

СТРИЖАКОВ РОДИОН КОНСТАНТИНОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ  
СВОЙСТВ НИТРОКСИЛЬНЫХ И ТРИТИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв,  
физика экстремальных состояний вещества

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Новосибирск, 2016

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении Науки Новосибирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук и Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении Науки институте «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук.

Научный  
руководитель

**Багрянская Елена Григорьевна**  
доктор физико-математических наук, профессор

Официальные  
оппоненты

**Мотякин Михаил Викторович**  
доктор физико-математических наук  
ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,  
ведущий научный сотрудник лаборатории спиновой химии  
(г. Москва)

**Марьясов Александр Георгиевич**  
кандидат физико-математических наук  
ФГБУН Институт химической кинетики и горения  
им. В.В. Воеводского СО РАН, старший научный сотрудник  
лаборатории химии и физики свободных радикалов  
(г. Новосибирск)

Ведущая  
организация

ФГБОУ ВПО Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова (г. Москва)

Защита состоится 23 декабря 2016 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 002.191.01 при ФГБУН Казанском физико-техническом институте им. Е. К. Завойского Казанского научного центра РАН по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 10/7, КФТИ КазНЦ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУН Казанского физико-технического института КазНЦ РАН [kfti.knc.ru/about-institute/sovety/dissertation-council/announcements](http://kfti.knc.ru/about-institute/sovety/dissertation-council/announcements).

Отзывы на автореферат в двух заверенных экземплярах просим отправлять по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 10/7.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
канд. физ.-мат. наук

Хайбуллин Рустам Ильдусович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Стабильные нитроксильные (НР) и триарилметильные (или тритильные, ТАМ) радикалы в последнее время получили широкое применение в биофизических исследованиях. За счёт простого спектра ЭПР, чувствительного к различным параметрам окружения радикалов, в сочетании с методами ЭПР-спектроскопии они находят применение в качестве спиновых зондов и спиновых меток для исследования сложных молекулярных систем, в том числе и живых организмов. Стабильные радикалы используются в качестве спиновых зондов для исследования концентрации кислорода, pH, окислительно-восстановительного статуса среды и других параметров, а также в качестве спиновых меток при исследовании структуры и функций нуклеиновых кислот и белков методами стационарной и импульсной ЭПР-спектроскопии. Последнее применение радикалов используется в сочетании с методом адресного введения спиновых меток. Применимость радикалов в качестве спиновых зондов и спиновых меток определяется такими свойствами, как стабильность радикалов по отношению к биогенным восстановителям, которая определяет возможность использования *in vivo* и *in vitro*, магнитно-резонансные параметры ( $g$ -фактор и константы сверхтонкого взаимодействия, СТВ) и их зависимость от среды, что определяет возможность и точность измерения необходимых параметров, а также параметры электронной спиновой релаксации, которые для спиновых меток определяют диапазон измеримых расстояний импульсными методами. Поэтому исследования этих свойств и являются актуальной задачей.

**Цель данной работы** — выявить потенциал применения ряда новых стабильных нитроксильных и триарилметильных радикалов в качестве спиновых меток и спиновых зондов в ЭПР-томографии и для исследования структуры и функций биополимеров и установить механизм релаксации нитроксильных радикалов при их иммобилизации в матрице трегалозы. В работе ставились **задачи** измерения магнитно-резонансных параметров радикалов, а также их функциональных свойств.

1. Для новых водорастворимых низкотоксичных нитронилнитроксильных радикалов:
  - (а) измерить устойчивость по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой в модельных условиях, в крови крыс и её компонентах;
  - (б) установить их применимость в качестве контрастных агентов в магнитно-резонансной томографии;
  - (в) установить их применимость в ЭПР-томографии *in vivo* в качестве зондов NO;
  - (г) выявить возможность улучшения их функциональных свойств при ковалентном связывании с циклодекстрином.
2. Для серии бис(спироциклогексил)замещенных нитроксильных радикалов:
  - (а) измерить устойчивость по отношению к аскорбиновой кислоте в модельных условиях;
  - (б) измерить их релаксационные параметры в стеклообразной матрице трегалозы и установить возможность их применения в качестве спиновых меток при измерениях расстояний в биополимерах при комнатной температуре.
3. Для серии новых триарилметильных радикалов:
  - (а) измерить константы СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$ ;
  - (б) измерить скорость реакции сольволиза в некоторых растворителях.

**Научная новизна.** Исследована возможность применения новых низкотоксичных водорастворимых нитронилнитроксильных радикалов (ННР) в качестве зондов оксида азота NO *in vivo*. Методом ЭПР изучена их стабильность, реакция с оксидом азота, а также фармакокинетика в живом организме мыши методом ЭПР-томографии в L-диапазоне при различных способах введения ННР. Показано, что вследствие высокой скорости восстановления ННР и их продуктов реакции с NO, иминонитроксильных радикалов (ИНР), а также быстрого выведения ННР в мочевой пузырь, использование таких радикалов для исследования количественного содержания оксида азота в тканях невозможно.

Показано, что ННР, ковалентно связанный с циклодекстрином (ЦД), сохраняет свою чувствительность к NO, а константа восстановления нитроксильного фрагмента аддукта близка к константе соответствующего свободного радикала. Для получения более стабильного зонда необходим синтез структуры с более гибким линкером, который позволил бы радикальному фрагменту глубже погружаться в полость ЦД.

Измерены константы скорости восстановления серии новых бис(спироциклогексил)-замещенных НР аскорбиновой кислотой, и показано, что они обладают существенно более высокой стабильностью по отношению к биогенным восстановителям по сравнению с их тетраметилзамещенными аналогами. Измерены времена продольной и фазовой электронной спиновой релаксации новых бис(спироциклогексил)замещенных НР в матрице трегалозы при 300 К, исследован механизм их электронной спиновой релаксации. Показано, что они являются перспективными спиновыми метками для структурных исследований биополимеров при комнатной температуре.

Для ряда новых тритильных радикалов измерены константы сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона с ядрами  $^{13}\text{C}$ . На примере характерного ряда ТАМ показано, что эти константы практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру, а также полярности растворителя. Показано, что тритильный радикал dAMT-1 претерпевает реакции сольволиза в метаноле и водном буфере и измерены соответствующие константы скорости.

**Практическая значимость работы.** Полученные результаты имеют практическое значение, так как изученные НР и ТАМ могут быть применены в структурных исследованиях биомакромолекул, в частности олигонуклеотидов, с помощью адресного введения спиновых меток и импульсных методов ЭПР-спектроскопии. В результате проведенных исследований была показана перспективность применения ряда нитроксильных радикалов в качестве спиновых меток как с точки зрения релаксационных, так и окислительно-восстановительных свойств. Исследованы магнитно-резонансные и физико-химические свойства тритильных радикалов «финляндского» типа и показано, что эти радикалы перспективны для их применения в качестве спиновых меток и спиновых зондов для биофизических измерений.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Высокая стабильность новых 2,5-бис(спироциклогексил)замещенных нитроксильных радикалов пирролинового типа по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой и биогенным восстановителями по сравнению с их тетраметилзамещенными аналогами, а также спирозамещенными НР пиперидинового типа. Перспективность их применения для структурных исследований биополимеров.

2. Механизм продольной и фазовой электронной спиновой релаксации новых 2,5-бис(спироциклогексил)замещенных НР пирролинового типа в матрице тре-галозы при комнатной температуре. Перспективность их использования в качестве спиновых меток для структурных исследований биополимеров при комнатной температуре.

3. Магнитно-резонансные и функциональные свойства новых ТАМ. Независимость констант СТВ неспаренного электрона с ядрами  $^{13}\text{C}$  от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру по карбоксильным группам и от растворителя. Механизм реакции сольволиза для некоторых ТАМ в метаноле и водных растворах.

4. Функциональные свойства новых низкотоксичных водорастворимых ННР в качестве зондов оксида азота  $\text{NO}$  *in vivo* и в качестве контрастных реагентов для магнитно-резонансной томографии.

5. Функциональные свойства нового ННР, ковалентно связанного с циклодекстрином (структура, магнитно-резонансные свойства, стабильность по отношению к биогенным растворителям, чувствительность к  $\text{NO}$ ).

**Достоверность** выводов и результатов работы обеспечена комплексным подходом к экспериментальным и теоретическим исследованиям. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными и не противоречат им. Все исследования были проведены на сертифицированном оборудовании и с использованием современных программных пакетов.

**Личный вклад соискателя** во всех работах является основным и заключается в обсуждении целей, задач исследования, в проведении экспериментальной работы, анализе, интерпретации полученных результатов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены и обсуждались на международных и российских конференциях:

Молодежная школа-конференция «Магнитный резонанс в химической и биологической физике» (Новосибирск, 2010); XLIX Международная студенческая конференция (Новосибирск, 2011); XIV “Current Topics in Organic Chemistry” (Новосибирск, 2011); “Magnetic and Spin Phenomena in Chemistry and Biology” (Новосибирск, 2011); SPIN2011 (Марсель, Франция, 2011); L Международная студенческая конференция (Новосибирск, 2012); XV “Current Topics in Organic Chemistry” (Новосибирск, 2012); VIII International Voevodsky Conference (Новосибирск, 2012); VI advanced EPR school of EFEP (Реховот, Израиль, 2013); SPIN2014 (Зеленоградск, 2014); “Modern development of magnetic resonance” (Казань, 2015).

Работа была поддержана грантами в рамках следующих проектов: 14-03-32024, 12-04-01435, 12-03-33010 Российского фонда фундаментальных исследований и 14-14-00922 Российского научного фонда.

**Объем и структура диссертации.** Работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы, включающего 204 источника. Работа изложена на 127 страницах и содержит 48 рисунков, 11 таблиц и 5 приложений

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность: научному руководителю д. ф.-м. н. Е. Г. Багрянской за постановку задачи и научное руководство; к. ф.-м. н.

О. А. Крумачевой и д. ф.-м. н. М. В. Федину, А. А. Кужелеву, д. х. н. Л. А. Шундрину, д. б. н. Н. Г. Колосовой и д. б. н. Н. А. Стефановой за помощь в проведении экспериментов и обсуждение результатов; к. х. н. И. А. Кирилоку, д. х. н. Е. В. Третьякову, д. х. н. Е. Ю. Фурсовой и к. х. н. В. М. Тормышеву за синтез нитроксильных и тритильных радикалов; к. х. н. Д. Н. Половяненко, к. х. н. М. В. Еделева и к. ф.-м. н. Д. А. Пархоменко за полезные научные дискуссии.

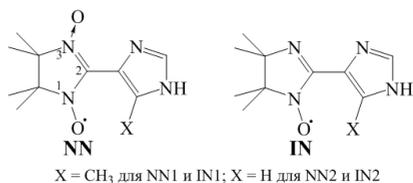
## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** описана актуальность темы диссертации, сформулированы основные цели и задачи работы, приведены положения, выносимые на защиту, дана краткая аннотация глав диссертации.

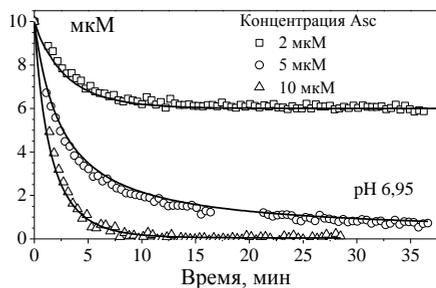
**Первая глава** посвящена обзору литературы. В ней описаны основные приложения нитроксильных и тритильных радикалов как спиновых зондов и спиновых меток, в том числе применения, связанные с биологическими объектами. Изложены литературные данные по исследованию стабильности радикалов в окислительно-восстановительных средах и влиянию на нее различных факторов. Наконец, в обзоре описаны основные методы и подходы, которые используются в работе. В частности, рассмотрен метод импульсной ЭПР-спектроскопии, а также его приложения. В заключение обзора описаны цель и задачи диссертационной работы.

**Вторая глава** посвящена исследованию возможности применения новых водорастворимых нитронилнитроксильных радикалов (ННР) в качестве спиновых зондов на оксид азота в ЭПР-томографии.

В лаборатории многоспиновых комплексных соединений МТЦ СО РАН Е. Ю. Фурсовой были синтезированы новые хорошо растворимые в воде и низкотоксичные нитронилнитроксильные радикалы (см. рис. 1), которые были предложены для использования в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии [1, 2]. Было неясно, чем обусловлена возможность применения новых ННР в этом качестве *in vivo*, учитывая известный факт быстрого восстановления ННР биогенными восстановителями. В случае высокой стабильности новых радикалов можно было бы предполагать возможность их использования в качестве сенсоров оксида азота в ЭПР-томографии.



**Рисунок 1** — Химические структуры нитронилнитроксильных радикалов NN1 и NN2 и соответствующих иминонитроксильных радикалов IN1 и IN2. На примере NN показана нумерация атомов в имидазольном кольце.



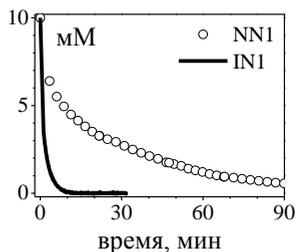
**Рисунок 2** — Кинетические кривые восстановления 10 мкМ NNI аскорбиновой кислотой Asc в 0,1 М фосфатном буфере. Сплошные линии соответствуют расчетным (соответствующие константы,  $M^{-1} \cdot c^{-1}$ :  $k_{NN1} = 1200$ ;  $k_{NN2} = 1400$ ).

Кроме того, для улучшения стабильности ННР возможно использование заключения радикалов в супрамолекулы (циклодекстрины, эмульсии, полисомы и т.д.), которое может приводить к увеличению стабильности. В настоящей работе была поставлена задача использования такого подхода для улучшения функциональных свойств ННР.

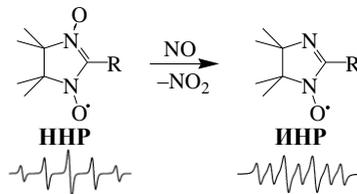
Нами были получены магнитно-резонансные параметры этих радикалов, проведены исследования их стабильности по отношению к восстановлению в различных средах: аскорбиновой кислотой в буферном водном растворе (рис. 2), в крови (рис. 3) и ее компонентах.

Показано, что константы восстановления новых ННР аскорбиновой кислотой очень высоки и близки по значению величинам для других ННР. Однако следует отметить, что в цельной крови крыс при начальной концентрации 10 мМ и более полное восстановление происходит более часа (рис. 3). Это связано с тем, что из-за высокой растворимости ННР медленно проникают в клетки, а концентрация биогенных восстановителей в крови не превышает десятки мМ. Таким образом, лишь большая растворимость позволяет использовать ННР в больших концентрациях в исследованиях *in vivo*. Показано, что эти ННР реагируют с оксидом азота с образованием иминитроксильных радикалов, имеющих существенно отличающийся спектр ЭПР (рис. 4).

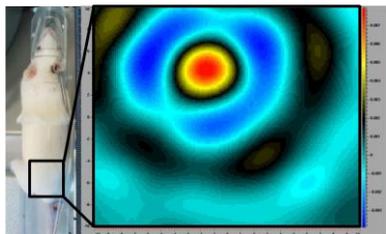
Проведены измерения по использованию радикалов в качестве спиновых зондов методом ЭПР-томографии *in vivo*. Анестезированной мыши внутривенно вводили радикал **NNI**. Его сигнал был обнаружен лишь в области мочевого пузыря, где он накапливался в течение 60–90 минут. Таким образом, радикал довольно быстро выводится из организма через кровеносную и выделительную системы, т. к. он очень хорошо растворим в воде. Впервые были получены ЭПР-томографические изображения мышцей с введенными им нитронилнитроксильными радикалами (рис. 5), а накопление ННР именно в мочевом пузыре было также подтверждено с помощью магнитно-резонансной томографии (рис. 6).



**Рисунок 3** — Кинетики разложения 10 мМ **NNI** (○) и **INI** (сплошная кривая) в цельной крови крыс.



**Рисунок 4** — Реакция ННР с **NO** с образованием иминитроксильного радикала и изменением спектра ЭПР.

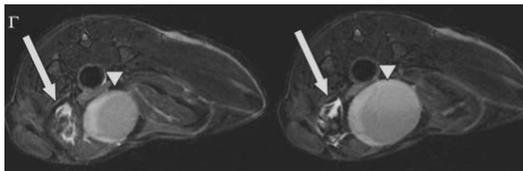


**Рисунок 5** — ЭПР-томография мышцы с введенным NNI. Наличие сигнала ЭПР определяется красным цветом на томограмме, другие участки являются артефактами обработки.

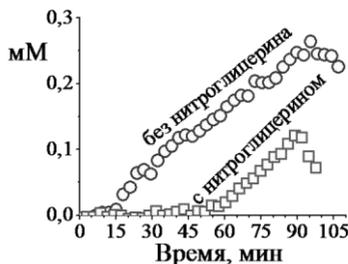
Для проверки возможности детектирования NO посредством ЭПР-томографии был проведен эксперимент по одновременному введению ННР и нитроглицерина, который приводит к повышенной генерации оксида азота. Фармакокинетика накопления радикала в мочевом пузыре сохранила свой характер, но произошла задержка по времени накопления примерно на 50 минут по сравнению с контролем (рис. 7).

В течение эксперимента в спектрах ЭПР наблюдался лишь сигнал самого ННР, но не продукта его реакции с NO, ИНР. Это объясняется тем, что последний восстанавливается на порядок быстрее ННР (см. также рис. 3). Оценка количества образовавшегося NO в организме мыши за время эксперимента под воздействием нитроглицерина составляет несколько мкМ [3], в то время как экспериментально наблюдаемое изменение количества ННР в мочевом пузыре составляло 150 мкМ. Такое различие фармакокинетик никак не может объясняться только реакцией с NO и, скорее всего, связано с тем, что нитроглицерин вызывает расширение кровеносных сосудов и, следовательно, замедление тока крови. Таким образом, ННР невозможно использовать как зонды NO *in vivo*.

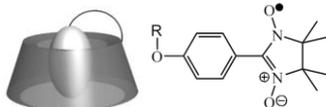
Кроме того, в этой главе приведено исследование функциональных свойств перметил-β-циклодекстрина, ковалентно связанного с нитронилнитроксильным радикалом (структура на рис. 8). Показано, что в этом аддукте сохраняется способность нитроксильного фрагмента вступать в реакцию с оксидом азота. С помощью метода модуляции спада электронного спинового эха был определен тип равновесия «гость — хозяин» в данном аддукте: радикальный фрагмент прикрывает полость циклодекстрина, но не погружается в нее. Исследована стабильность этих радикалов по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой. Показано, что значения констант восстановления аддукта и свободного радикала



**Рисунок 6** — МРТ T<sub>1</sub>-взвешенные изображения кросс-секции брюшной области мыши через 20 минут (слева) и через 60 минут (справа) после внутрибрюшинной инъекции NNI. Узкие длинные стрелки показывают области начальной локализации радикала, обусловленной внутрибрюшинным введением радикала; мочевой пузырь отмечен белыми треугольниками.



**Рисунок 7** — Сравнение кинетик накопления NNI при внутривенном введении в мышь (доза 0,83 мг/кг).

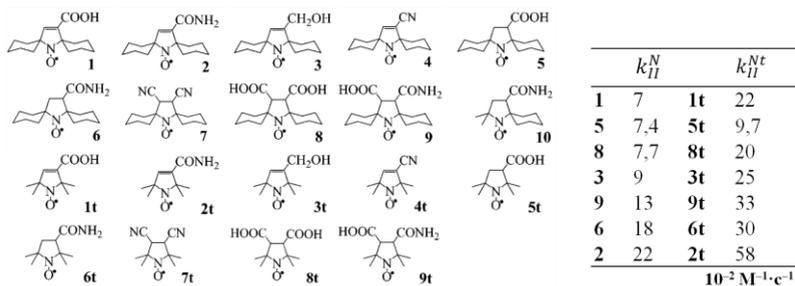


**Рисунок 8** — Схематичная структура аддукта нитронилнитроксильного радикала и перметил-β-циклодекстрина.

практически не различаются: 3800 и 3900 М<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>, соответственно. Таким образом, в данном аддукте циклодекстрин не влияет на стабильность ННР по отношению к восстановлению, что говорит о том, что для изменения структуры комплекса необходимо применение более длинного и гибкого линкера.

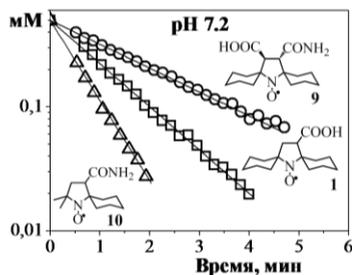
**Третья глава** посвящена исследованию 2,5-бис(спироциклогексил)замещенных НР пирролинового и пирролидинового рядов как спиновых меток для структурных измерений в биомолекулах.

Введение стерически затрудненных заместителей вместо метильных групп около группы N–O приводит к увеличению стабильности НР [4]. Кроме того, бис(спироциклогексил)замещённые НР пиперидинового ряда имеют значительное преимущество перед тетраметилзамещёнными аналогами при исследованиях структуры биополимеров методом адресного введения спиновых меток и имеют существенно меньшую скорость электронной спиновой релаксации при температурах 80–150 К. Недавно было показано, что такие радикалы можно применять для структурных исследований белков при комнатной температуре, используя иммобилизацию в матрице трегалозы. Отметим, что в замороженных растворах такие измерения возможны только при температуре жидкого гелия или азота [5].

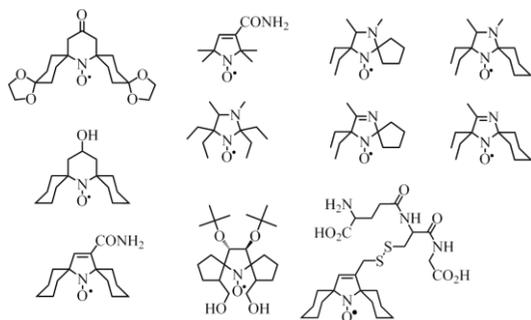


**Рисунок 9** — Слева: структуры исследуемых радикалов; справа: значения констант восстановления аскорбиновой кислотой некоторых из радикалов при pH 7,2:  $k_{II}^N$  — для бис(спироциклогексил)замещенных НР,  $k_{II}^{Nt}$  — для их тетраметилзамещенных аналогов.

В лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН И. А. Кирилюком была синтезирована серия бис(спироциклогексил)замещённых НР пирролидинового, имидазолинового, имидазолидинового и пиперидинового рядов (рис. 9 и 11). В диссертации исследовались функциональные свойства этих радикалов как спиновых меток для измерения расстояний в биополимерах методом импульсного ЭПР.



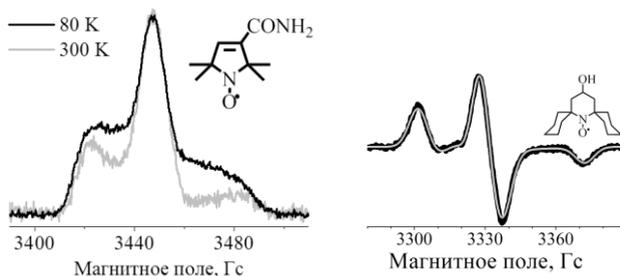
**Рисунок 10** — Кинетические кривые реакции НР 1, 9, 10 (0,5 М) с 0,1 М аскорбиновой кислотой (логарифмическая шкала).



Как упоминалось выше, объемные заместители около нитроксильного фрагмента замедляют восстановление нитроксильных радикалов в биологических системах, увеличивая время жизни спиновых зондов. Нами была изучена реакция нитроксильных радикалов **1, 2, 3, 5, 6, 8, 9** и их 2,2,5,5-тетрамethylзамещенных аналогов с аскорбиновой кислотой. Типичные кинетики гибели радикалов приведены на рис. 10, а соответствующие константы скорости второго порядка — в таблице

**Рисунок 11** — Структуры НР с различным типом замещения около нитроксильного центра, для которых были измерены значения электронной спиновой релаксации в трегалозе при комнатной температуре.

на рис. 9. Показано, что восстановление тетраметилзамещенных аналогов происходит в среднем в 2–3 раза быстрее, чем новых спироциклогексилзамещенных НР.



**Рисунок 12** — Слева: эхо-детектированные ЭПР-спектры (поглощение) в X-диапазоне для одного из исследуемых НР при 80 К и 300 К. Справа: Типичный стационарный спектр ЭПР одного из радикалов в трегалозе при 300 К и его моделирование (серая линия).

**Рисунок 13** — Структура исследованного дуплекса и использованных спиновых меток –R. Около меток указано измеренное время фазовой релаксации  $T_m$ .

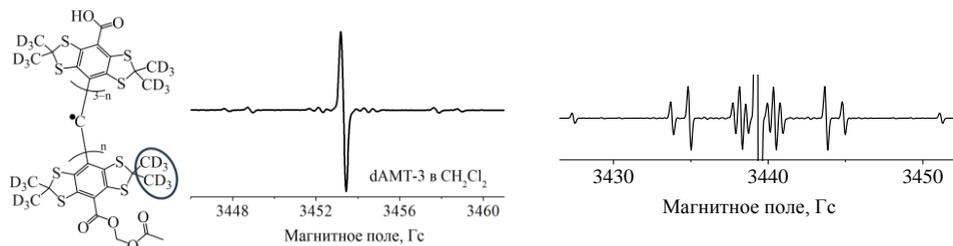
до 2 нм методом двойного электронного резонанса в сочетании с методом адресного введения спиновых меток.

Для того, чтобы понять механизм релаксации при комнатной температуре в трегалозе, были записаны эхо-детектируемые спектры при 300 и 80 К (рис. 12). Оказалось, что

Для другой серии радикалов с различным замещением около нитроксильного центра (рис. 11) были измерены значения электронной спиновой релаксации при иммобилизации в трегалозе при комнатной температуре. Показано, что в этих условиях структура заместителей во 2-м и 5-м (или 6-м для пиперидиновых радикалов) положениях нитроксильного кольца не оказывает существенного влияния на электронную спиновую фазовую релаксацию  $T_m$ , и ее значение составило в среднем около 700 нс. Такое время позволяет измерять расстояния

при комнатной температуре крайние компоненты спектра уменьшены по интенсивности по сравнению с центральной. Такое поведение является типичным для проявления интенсивных либраций [6]. Как известно, либрации вызывают анизотропную спиновую релаксацию. Действительно, как оказалось, измеренные значения спиновой релаксации в X- и Q-диапазонах сильно зависят от положения в спектре и изменяются, например, для радикала на рисунке 12 (слева) от 730 нс до 445 нс.

В случае ковалентного связывания НР с дуплексом олигонуклеотидов время релаксации при комнатной температуре для спиروزамещенных радикалов увеличивается по сравнению с тетраметильными аналогами примерно на 100 нс (рис. 13). Скорее всего, это обусловлено взаимодействием спирициклогексильных групп с олигонуклеотидов, вследствие чего уменьшается амплитуда либраций NO группы.



**Рисунок 14** — Слева: общая структура для группы исследуемых тритильных радикалов, где  $n = 1, 2$  или  $3$ ; справа: общий вид спектра ЭПР одного из тритильных радикалов ( $n = 3$ ).

**Рисунок 15** — Увеличенный по интенсивности в 20 раз спектр тритильного радикала ( $n = 2$ ).

**Четвертая глава** посвящена исследованию магнитно-резонансных и функциональных свойств тритильных радикалов. Тритильные радикалы являются перспективными чувствительными внутриклеточными оксиметрическими ЭПР-зондами. Для выводов о применимости таких радикалов необходимо проводить измерения их магнитно-резонансных параметров. В частности, впервые были измерены g-факторы, константы СТВ с ядрами водорода и  $^{13}\text{C}$  заместителей для ряда новых тритильных радикалов, синтезированных к. х. н. В. М. Тормышевым (рис. 14). Эти радикалы отличаются от распространенных ТАМ замещением протонов на дейтоны, которое приводит к тому, что центральная линия может достигать ширины до 50 мГс и благодаря этому возможно точное измерение всех констант СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$ .

Были измерены константы СТВ  $^{13}\text{C}$  для этого ряда ТАМ (рис. 15) и показано, что они практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру. Также было показано отсутствие заметного влияния растворителя на величины констант СТВ. Обнаружена аномально большая ширина сателлитных линий, соответствующих СТВ с центральным атомом углерода тритильного радикала, обусловленная модуляцией анизотропной части константы СТВ (см. рис. 15).

Кроме того, было обнаружено, что тритильные радикалы с эфирными ацетоксиметоксильными заместителями претерпевают отщепление этой группы в водном буфере при pH 7,2 и метаноле. Измеренные константы скорости их сольволиза составили соответственно  $3,7 \cdot 10^{-6}$  и  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ .

**В пятой главе** описаны источники получения используемых реактивов и экспериментальные методики, которые используются в настоящей работе, в том числе методы стационарного и импульсного ЭПР, методы исследования стабильности свободных радикалов и некоторые другие.

Для иммобилизации радикалов в трегалозе готовили ее раствор с радикалом. Раствор в пробирке быстро замораживали и затем образец сушили при 0,1 мм рт. ст. в течение двух часов. После сушки стеклообразный остаток дробили и дополнительно сушили в ампуле, после чего ее запаивали.

Для измерения времен спин-решеточной  $T_1$  фазовой  $T_m$  релаксации на ЭПР-спектрометре Bruker Elexsys использовались соответственно трехимпульсная и двухимпульсная последовательности ( $\pi-\tau-\pi/2-\tau-\pi$  и  $\pi/2-\tau-\pi$ ). В обоих случаях варьировалась задержка между импульсами  $\tau$ . Продолжительность импульса  $\pi/2$  составила 10 нс. Оба времени,  $T_1$  и  $T_m$ , измерены на частоте центральной компоненты ЭПР-спектра соответствующего НР.

Стационарные спектры НР записаны на ЭПР-спектрометре Bruker EMX в X-диапазоне. Для измерения параметров спектры моделировали с помощью системы компьютерной алгебры Matlab и программного пакета Easyspin.

Для предотвращения уширения линий ЭПР в образцах тритильных радикалов, было проведено удаление кислорода из растворов путем многократного повторения циклов «заморозка — откачка — оттаивание». Такая же процедура была проделана для спиروزамещенных НР для более точных измерений релаксационных параметров.

Для измерения констант восстановления аскорбиновой кислотой смешивали растворы НР и кислоты, после чего реакционную смесь в ампуле сразу помещали в резонатор ЭПР-спектрометра. Затем записывались последовательные спектры ЭПР каждые 5 секунд, которые затем обрабатывались для получения соответствующей кинетической кривой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Исследована возможность применения новых низкотоксичных водорастворимых нитронилнитроксильных радикалов (ННР) в качестве зондов оксида азота *in vivo*. Методом ЭПР изучена их стабильность, реакция с NO, а также фармакокинетика в живом организме мыши методом ЭПР-томографии при различных способах их введения. Вследствие высокой скорости восстановления ННР и их продукта реакции с NO, а также быстрого выведения ННР в мочевой пузырь, использование таких радикалов для исследования количественного содержания оксида азота в тканях невозможно.
2. Показано, что ННР, ковалентно связанный с циклодекстрином, сохраняет свою чувствительность к NO, а константа восстановления нитроксильного фрагмента аддукта близка к константе соответствующего свободного радикала. Для получения более стабильного зонда необходим синтез структуры с более гибким линкером, который позволит радикальному фрагменту глубже погружаться в полость циклодекстрина.
3. Измерены константы скорости восстановления новых 2,5-спироциклогексилзамещенных НР пирролинового типа аскорбиновой кислотой, и показано, что они обладают более высокой стабильностью по отношению к восстановителям по сравне-

нию с их тетраметильными аналогами, и являются перспективными для структурных исследований биополимеров.

- Измерены времена продольной и фазовой электронной спиновой релаксации новых 2,5-бис(спиродихлоргексил)замещенных НР пирролинового типа в матрице трегалозы при 300 К. Показано, что основным механизмом электронной спиновой релаксации является модуляция анизотропии СТВ за счет либрационных движений радикала. Показано, что они являются перспективными спиновыми метками для структурных исследований биополимеров при комнатной температуре.
- Для ряда новых тритильных радикалов измерены константы СТВ неспаренного электрона с ядрами  $^{13}\text{C}$ . На примере характерного ряда ТАМ показано, что эти константы практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру, а также от полярности растворителя. Показано, что тритильные радикалы претерпевают реакцию сольволиза в метаноле и водном буфере и измерены соответствующие константы скорости.

### ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Имидазол-4-ильные 2-имидазолиновые нитроксильные радикалы – новый класс перспективных контрастных средств для магнитно-резонансной томографии / В. И. Овчаренко, Е. Ю. Фурсова, Т. Г. Толстикова и др. // Доклады Академии наук. – 2005. – Т. 404, № 2. – С. 198–200;
- Стабильный нитроксильный радикал – контрастирующий агент для магнитно-резонансной томографии / А. А. Савелов, Д. А. Кокорин, Е. Ю. Фурсова и др. // Доклады Академии наук. – 2007. – Т. 416, № 4. – С. 493–495;
- Suk-Jae, C. Relationship between nitroglycerin-induced vascular relaxation and nitric oxide production: probes with inhibitors and tolerance development / C. Suk-Jae, F. Ho-Leung // *Biochemical Pharmacology*. 1993. – Vol. 45, № 1. – P. 157–163;
- Development of novel nitroxyl radicals for controlling reactivity with ascorbic acid / Yu. Kinoshita, K. Yamada, T. Yamasaki et al. // *Free Radical Research* – 2009. — Vol. 43, № 6. – P. 565–571;
- EPR spectroscopic analysis of U7 hammerhead ribozyme dynamics during metal ion induced folding / V. Meyer, M. A. Swanson, L. J. Clouston et al. // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 108, № 5. – P. 1213–1219;
- Dzuba, S. A. Librational motion of guest spin probe molecules in glassy media // *Physics Letters A*. – 1996. – V. 213, №. 1. – P. 77–84.

### ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в журналах:

- A1. Synthesis of 2,5-Bis(spirocyclohexane)-Substituted Nitroxides of Pyrroline and Pyrrolidine Series, Including Thiol-Specific Spin Label - an Analog of MTSSL with Long Relaxation Time [Text] / I. A. Kirilyuk, Yu. F. Polienko, O. A. Krumkacheva, **R. K. Strizhakov**, Yu. V. Gatilov, I. A. Grigor'ev, E. G. Bagryanskaya // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2012. – Vol. 77, № 18. – P 8016–8027;
- A2. Permethyl- $\beta$ -Cyclodextrin Spin-Labeled with Nitronyl Nitroxide: Synthesis and EPR Study [Text] / **R. K. Strizhakov**, E. V. Tretyakov, A. S. Medvedeva, V. V. Novokshonov, V. G.

- Vasiliev, V. I. Ovcharenko, O. A. Krumkacheva, M. V. Fedin, E. G. Bagryanskaya // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – Vol. 45, № 10. – P. 1087–1098;
- A3. Nitronyl Nitroxides as a Spin Probe in EPR Tomography In Vivo [Text] / **R. K. Strizhakov**, L. A. Shundrin, N. G. Kolosova, N. A. Stefanova, E. U. Fursova, V. I. Ovcharenko, E. G. Bagryanskaya // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – Vol. 45, № 8. – P. 743–758;
- A4. Room-Temperature Electron Spin Relaxation of Triarylmethyl Radicals at the X- and Q-Bands [Text] / A. A. Kuzhelev, D. V. Trukhin, O. A. Krumkacheva, **R. K. Strizhakov**, O. Yu. Rogozhnikova, T. I. Troitskaya, M. V. Fedin, V. M. Tormyshev, E. G. Bagryanskaya // The Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – Vol. 119. – P. 13630–13640;
- A5. Room-temperature electron spin relaxation of nitroxides immobilized in trehalose: Effect of substituents adjacent to NO-group [Text] / A. A. Kuzhelev, **R. K. Strizhakov**, O. A. Krumkacheva, Yu. F. Polienko, D. A. Morozov, G. Yu. Shevelev, D. V. Pyshnyi, I. A. Kirilyuk, M. V. Fedin, E. G. Bagryanskaya // Journal of Magnetic Resonance. – 2016. – Vol. 266. – P. 1–7.

### Тезисы научных конференций:

- A6. Устойчивые спиновые зонды и контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии на основе нитронилнитроксильных радикалов [Текст] / **Р. К. Стрижаков**, Д. Н. Половяненко, Е. Ю. Фурсова, В. И. Овчаренко, Е. Г. Багрянская // Магнитный резонанс в химической и биологической физике: Программа и тезисы докладов Всеросс. молодежной школы с междунар. участием, Новосибирск, Россия, 6–10 сен. 2010. – Новосиб.: Изд-во ИХХГ СО РАН, 2010. – С. 94;
- A7. Исследование устойчивости нитронилнитроксильных радикалов методом ЭПР [Текст] / **Р. К. Стрижаков**, Д. Н. Половяненко, Е. Г. Багрянская // Студент и научно-технический прогресс: Материалы 49-й междунар. науч. студ. конф., Новосибирск, Россия, 16–20 апр. 2011. – Новосиб.: Изд-во НГУ, 2011. – С. 129;
- A8. Nitronyl Nitroxides as the Probes for Nitric Oxide [Text] / **R. Strizhakov**, D. Polovyanenko, L. Shundrin, E. Fursova, V. Ovcharenko, E. Bagryanskaya // Current Topics in Organic Chemistry: Book of Abstracts, Novosibirsk, Russia, 6–10 Jun. 2011. – Published by Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, 2011. – P. 197;
- A9. Nitronyl Nitroxides as the Probes for NO [Text] / **R. Strizhakov**, D. Polovyanenko, L. Shundrin, N. Stefanova, E. Fursova, N. Kolosova, V. Ovcharenko, E. Bagryanskaya // Magnetic and Spin Phenomena in Chemistry and Biology: Abstracts of International conference, Novosibirsk, Russia, 11–13 Dec. 2011. – Novosibirsk: Published by International Tomography Center SB RAS, 2011. – P. 32;
- A10. Nitronyl Nitroxides as the Probes for Nitric Oxide [Text] / **R. Strizhakov**, D. Polovyanenko, L. Shundrin, N. Stefanova, E. Fursova, N. Kolosova, V. Ovcharenko, E. Bagryanskaya // SPIN-2011: Abstracts of VI International Conference on Nitroxide Radicals, Marseille, France, 26–29 Sep. 2011. – Marseille: Published by University of Provence, 2011. – P. 120;
- A11. **Стрижаков, Р. К.** Исследование функциональных свойств спиновых зондов на основе нитроксильных и триарилметильных радикалов методом ЭПР [Текст] / **Р. К. Стрижаков** // Студент и научно-технический прогресс: Материалы 50-й юбилейной междунар. науч. студ. конф., Новосибирск, Россия, 13–19 апр., 2012. – Новосиб.: Изд-во НГУ, 2012. – С. 120;

- A12. Исследование 2,5-спироциклогексилзамещённых нитроксильных радикалов как спиновых меток методом ЭПР [Текст] / **Р. Стрижаков**, О. Крумкачёва, И. Кирилук, Ю. Полиенко, Ю. Гатилов, И. Григорьев, Е. Багрянская // Актуальные проблемы органической химии: Сб. трудов Всерос. молодежной науч. конф., Новосибирск, Россия, 9–14 июля 2012. – Новосибир.: Изд-во НИОХ СО РАН, 2012. – С. 34;
- A13. Приложение ЭПР-томографии для нитронилнитроксильных радикалов как зондов оксида азота (II) [Текст] / **Р. Стрижаков**, Л. Шундрин, Н. Стефанова, Е. Фурсова, Н. Колосова, В. Овчаренко, Е. Багрянская // Актуальные проблемы органической химии: Сб. трудов Всерос. молодежной науч. конф., Новосибирск, Россия, 9–14 июля 2012. – Новосибир.: Изд-во НИОХ СО РАН, 2012. – С. 103;
- A14. EPR Study of 2,5-spirocyclohexyl-substituted Nitroxides as Spin Labels [Text] / **R. Strizhakov**, O. Krumkacheva, I. Kirilyuk, Y. Polienko, Y. Gatilov, I. Grigoriev, E. Bagryanskaya // Physics and chemistry of elementary chemical processes: Abstracts of the VII International Voevodsky Conference, Novosibirsk, Russia, 15–19 Jul. 2012. – Novosibirsk: Published by Institute of Chemical kinetics and combustion of SB RAS, 2012. – P. 156;
- A15. The Use of Nitronyl Nitroxides in EPR-imaging as Probes of Nitric Oxide [Text] / **R. Strizhakov**, L. Shundrin, N. Stefanova, E. Fursova, N. Kolosova, V. Ovcharenko, E. Bagryanskaya // Physics and chemistry of elementary chemical processes: Abstracts of the VII International Voevodsky Conference, Novosibirsk, Russia, 15–19 Jul. 2012. – Novosibirsk: Published by Institute of Chemical kinetics and combustion of SB RAS, 2012. – P. 157;
- A16. EPR Study of 2,5-spirocyclohexyl-substituted Nitroxides as Spin Labels [Text] / **R. Strizhakov**, O. Krumkacheva, I. Kirilyuk, Y. Polienko, Y. Gatilov, I. Grigoriev, E. Bagryanskaya // European Federation of EPR groups: Abstracts of the 6<sup>th</sup> advanced EPR school, Rehovot, Israel, 10–14 Jan. 2013. – Rehovot: Published by Weizmann Institute of Science, 2013. – С. 45;
- A17. EPR Study of 2,5-Spirocyclohexyl-Substituted Nitroxides as Spin Labels [Text] / **R. Strizhakov**, O. Krumkacheva, I. Kirilyuk, Y. Polienko, Y. Gatilov, I. Grigoriev, E. Bagryanskaya // SPIN-2014: Abstracts of VII International Conference on Nitroxide Radicals, Zelenogradsk, Kaliningrad region, Russia, 14–20 Sep. 2014. – Moscow: TORUS PRESS, 2014. – P. 91;
- A18. Physicochemical Properties of the Nitronyl Nitroxide Covalently Linked with Permethyl- $\beta$ -Cyclodextrin [Text] / O. Krumkacheva, **R. Strizhakov**, E. Tretyakov, A. Medvedeva, V. Novokshonov, V. Vasiliev, V. Ovcharenko, E. Bagryanskaya // SPIN-2014: Abstracts of VII International Conference on Nitroxide Radicals, Zelenogradsk, Kaliningrad region, Russia, 14–20 Sep. 2014. – Moscow: TORUS PRESS, 2014. – P. 92;
- A19. Electron Spin Relaxation of Nitroxide Spin Labels in the Trehalose Glassy Matrix at Room Temperature [Text] / **R. Strizhakov**, A. Kuzhelev, O. Krumkacheva, G. Shevelev, I. Kirilyuk, M. Fedin, E. Bagryanskaya // Modern Development of Magnetic Resonance: Abstracts of the International Conference, Kazan, Russia, 22–26 Sep. 2015. – Kazan: Published by Zavoisky Phys.-Tech. Inst., 2015. – P. 28;
- A20. EPR study of the Inclusion Complex of Nitronyl Nitroxide Covalently linked with Permethyl-B-cyclodextrin [Text] / **R. Strizhakov**, O. Krumkacheva, E. Tretyakov, A.

Medvedeva, V. Novokshonov, V. Vasiliev, V. Ovcharenko, E. Bagryanskaya // Modern Development of Magnetic Resonance: Abstracts of the International Conference, Kazan, Russia, 22–26 Sep. 2015. – Kazan: Published by Zavoisky Phys.-Tech. Inst., 2015. – P. 132.