

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. Н. Н. ВОРОЖЦОВА  
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ТОМОГРАФИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
д.ф.-м.н. проф., Е.Г. Багрянская

Новосибирск, 2016

## Содержание

Введение	5
Актуальность	5
Цели и задачи	8
Новизна, практическая значимость	9
Положения, выносимые на защиту	10
Достоверность, личный вклад соискателя, апробация работы	11
Структура и объём диссертации	12
Глава 1. Обзор литературы	14
1.1. Применение нитроксильных радикалов как спиновых зондов	14
1.2. Механизм восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой	16
1.3. Влияние структуры и свойств ННР на их стабильность по отношению к восстановлению в биологических средах	18
1.4. Применение циклодекстринов для модификации нитроксильных радикалов	19
1.5. Применение нитроксильных и тритильных радикалов как спиновых меток в структурной биологии	21
1.6. Экспериментальные методы исследования — ЭПР, PELDOR, DEER	22
1.7. Применение нитроксильных радикалов как спиновых меток для исследования структуры и функций белков	26
1.8. Применение тритильных радикалов как спиновых зондов для оксиметрии	30
1.9. Спиновые метки на основе триарилметильных радикалов	33
1.10. Применение нитронилнитроксильных радикалов как спиновых зондов оксида азота (II)	36
1.12. Постановка задачи	40
Глава 2. Исследование возможности применения нитронилнитроксильных радикалов в качестве спиновых зондов в ЭПР-томографии <i>in vivo</i>	43
2.1. Введение	43
2.2. Исследование магнитно-резонансных параметров	45
2.3. Восстановление радикалов аскорбатом	45
2.4. Восстановление радикалов в крови крыс и ее компонентах	47

2.5. ЭПР-томография мышеч с применением в качестве спинового зонда ННР <i>in vivo</i>	49
2.6. Влияние оксида азота (II) на фармакокинетику NN1	51
2.7. МРТ мышеч после введения NN1	54
2.8. Функциональные свойства нитронилнитроксильных радикалов, ковалентно-связанных с перметил- $\beta$ -циклодекстрином. Тип равновесия в аддукте ННР и ЦД	55
2.9. Чувствительность аддукта к оксиду азота (II)	59
2.10. Стабильность аддукта по отношению к восстановлению	60
2.11. Заключение	61
Глава 3. Исследование функциональных свойств 2,5-бис(спироциклогексил)- замещенных нитроксильных радикалов пирролинового и пирролидинового рядов	63
3.1. Введение	63
3.2. Исследование магнитно-резонансных параметров	65
3.3. Исследование липофильности	68
3.4. Восстановление нитроксильных радикалов аскорбатом	68
3.5. Релаксация спиروزамещенных радикалов в матрице трегалозы при комнатной температуре	71
3.6. Температурная зависимость $T_m$ и $T_1$ для свободных нитроксильных радикалов в трегалозе	75
3.7. Моделирование ЭПР спектров в X-диапазоне при T=300 K	79
3.8. Времена релаксации нитроксильных радикалов, ковалентно связанных с ДНК, при комнатной температуре в матрице трегалозы	81
3.9. Заключение	82
Глава 4. Исследование магнитно-резонансных и функциональных свойств третильных радикалов	84
4.1. Введение	84
4.2. Магнитно-резонансные параметры	85
4.3. Гидролиз третильных радикалов dAMT	88
4.4. Зависимость спектра dMET от pH	90
4.5. Заключение	91
Глава 5. Материалы и методы	92
5.1. Реагенты	92

5.1.1. Коммерческие реагенты	92
5.1.2. Некоммерческие реагенты	92
5.2. Определение коэффициентов разделения	92
5.3. Имобилизация нитроксильных радикалов в трегалозе	93
5.4. Измерения ESEEM	93
5.5. Измерения релаксации	94
5.6. Измерения стационарных спектров ЭПР	94
5.6.1. В главе 2	94
5.6.2. В главе 3	94
5.6.3. В главе 4	94
5.7. Процедура «заморозка — откачка»	95
5.8. ЭПР-томография в L-диапазоне <i>in vivo</i> .	95
5.9. Измерение стабильности радикалов	96
5.9.1. Восстановление ННР и ИНР аскорбиновой кислотой (глава 2)	96
5.9.2. Восстановление нитроксильных радикалов в крови крыс и ее компонентах (глава 2)	96
5.9.3. Восстановление аддукта ННР с ЦД аскорбиновой кислотой (глава 2)	97
5.9.4. Восстановление радикалов аскорбиновой кислотой (глава 3)	97
5.10. Исследование реакции радикалов с оксидом азота.	97
Основные результаты и выводы	99
Список используемых обозначений	100
Список используемой литературы	101
Список публикаций по теме диссертации	119
Благодарности	122
Приложения	123

## Введение

### Актуальность

Стабильные радикалы — нитроксильные и триарилметильные — широко развивающийся класс органических веществ, которые применяют в самых разных областях науки, но наиболее широкое применение в последнее время они получили в биофизических исследованиях. За счёт простого спектра ЭПР, чувствительного к различным параметрам окружения радикалов, они находят применение в качестве уникальных молекулярных зондов для исследования сложных молекулярных систем, в том числе и живых организмов. Стабильные радикалы используются в качестве спиновых зондов для исследования оксиметрии, рН, окислительно-восстановительного статуса среды и др., а также в качестве спиновых меток при исследовании структуры и функций нуклеиновых кислот, белков и их комплексов методом стационарного ЭПР и импульсной диполь-дипольной ЭПР-спектроскопии.

Термин "спиновые метки" используется для обозначения парамагнитных молекул, которые, будучи присоединёнными к тому или иному компоненту исследуемой системы, позволяют получать информацию о свойствах ближайшего окружения с помощью спектральных методов, основанных на явлении электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В качестве спиновых меток обычно используются стабильные радикалы (нитроксильные (нитроксиды), тетратиариарилметильные (трители, ТАМ)), которые способны ковалентно или нековалентно связываться с исследуемыми молекулами без изменения свободной валентности, или комплексы переходных металлов (Mn (II), Gd (III) и др.).

Одно из наиболее динамично развивающихся направлений в последнее время — это метод адресного введения спиновых меток (site-directed spin labeling, SDSL). Использование современных методов молекулярной биологии позволяет адресно встраивать парамагнитную (спиновую) метку или несколько меток в заданные места биологической макромолекулы. Для исследования таких спин-меченых макромолекул разработан набор спектральных методов, основанных на ЭПР. Они дают набор расстояний, а иногда и углов, между спиновыми метками, по которым методами молекулярной механики определяется пространственное строение исследуемой молекулы или комплекса. Метод спиновых меток позволяет исследовать сложные молекулярные системы, в том числе гетерогенные: проводить измерения расстояний между фрагментами молекул, оценивать их подвижность, определять локальные значения физических параметров среды, таких как полярности (диэлектрической проницаемости), вязкости, электростатического потенциала поверхностей,

концентраций некоторых веществ, например, кислорода, тиолов, восстановителей, pH, и др., а также отслеживать динамику изменения перечисленных выше параметров. Важным условием возможности использования этого метода является отсутствие или невысокая концентрация естественных парамагнитных примесей в образце, мешающих проводить измерения. Биологические системы как раз отвечают этому критерию, поэтому биофизика, биохимия и структурная биология являются важнейшими областями применения метода спиновых меток.

Указанные методы прекрасно дополняют другие методы структурной биологии, помогая не только устанавливать третичную структуру сложных биополимеров, но и исследовать их динамику. В отличие от классического рентгеноструктурного анализа (РСА), для измерения расстояний в спин-меченых образцах не требуется получения кристаллических образцов и даже выделения исследуемых молекул или комплексов. Более того, новейшие исследования включают измерения *in cellula*, обычно в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, и, таким образом, отражают строение и функционирование биомолекул в естественной среде. Конформация молекулы в кристаллическом виде, которая определяется с помощью РСА, статична, и может сильно отличаться от конформации в растворах. Исследование современными методами ЯМР тоже имеет ограничения для сложных и динамичных структур, характеризующихся множеством разнообразных конформаций, находящихся в состоянии обмена с сопутствующим уширением сигналов в спектрах. Структурные исследования методами ЭПР, как правило, проводятся в условиях глубокой заморозки, благоприятствующих выявлению наиболее заселенных конформаций.

ЭПР является мощным методом изучения структурных перестроек биологически важных молекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты, а также их комплексы. Важным достоинством этого метода является его высокая чувствительность, в 1000 раз большая по сравнению с ЯМР-спектроскопией, и пригодность для исследования гетерогенных и непрозрачных образцов. Стационарный ЭПР и метод спинового эха позволяют получать богатую информацию о подвижности спиновой метки и делать выводы о различных динамических равновесиях в исследуемых системах.

Особенностью нитроксильных радикалов является то, что их структуру можно легко варьировать, приспособив их для самых разных целей: от неинвазивных исследований живых объектов и безопасных контрастных агентов до использования в свободно-радикальной полимеризации. Триарилметильные радикалы имеют очень узкие линии в спектре ЭПР (до 50 мГс) и используются в качестве сенсоров на кислород (оксиметрия) в исследованиях ЭПР *in vivo* за счёт повышенной устойчивости и чувствительности.

В связи с широким применением нитроксильных и тритильных радикалов в качестве спиновых зондов для оксиметрии, для измерения рН среды и в качестве спиновых меток для исследования структуры и функций белков в настоящее время в Новосибирском институте органической химии, а также в Международном томографическом центре проводится синтез новых нитроксильных и тритильных радикалов с улучшенными функциональными свойствами. Исследования магнитно-резонансных и функциональных свойств серии новых НР и ТАМ с применением методов стационарной и импульсной ЭПР-спектроскопии и ЭПР-томографии и являлось главной задачей настоящей диссертации.

В лаборатории в МТЦ СО РАН в лаб. чл.-корр. РАН В. И. Овчаренко были синтезированы новые высоко растворимые в воде и низкотоксичные ННР, и было предложено использовать их в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии [1,2]. Авторами предполагалась аномально высокая стабильность таких радикалов, хотя литературные данные свидетельствовали о высокой скорости восстановления ННР биогенными восстановителями. Неясно было, чем обусловлена возможность применения новых ННР в качестве контрастных реагентов: их повышенной стабильностью по сравнению с другими ННР, или же другими особенностями проведенных экспериментов, например, высокой концентрацией, растворимостью в воде или локализацией в областях организма с пониженной концентрацией восстанавливающих агентов. В случае высокой стабильности таких ННР можно было бы предполагать возможность их использования в качестве сенсоров оксида азота в ЭПР-томографии. Кроме того, для улучшения стабильности ННР можно было бы использовать заключение нитроксильных радикалов в супрамолекулы (циклодекстрины, эмульсии, полисомы и т.д.), которое, как известно, может приводить к увеличению стабильности. В настоящей работе была поставлена задача использования такого подхода для улучшения функциональных свойств нитронилнитроксильных радикалов.

Увеличение стабильности НР достигается также введением стерео-затрудненных заместителей вместо метильных групп при  $\alpha$ -атоме углерода группировки N–O. Было показано, что замещение метильных групп на спироциклические значительно улучшает функциональные свойства радикалов и их стабильность. 2,6-спироциклогексилзамещённые нитроксильные радикалы пиперидинового ряда имеют значительное преимущество перед 2,2,6,6-тетраметилзамещёнными аналогами при исследованиях структуры биополимеров методом SDSL и обладают улучшенными релаксационными свойствами. Однако известно, что пиперидиновые НР намного менее стабильны по сравнению с пирролиновыми и пирролидиновыми НР. В лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН к. х. н. И. А. Кирилюком была синтезирована серия пирролиновых и пирролидиновых 2,5-

спироциклогексилзамещённых нитроксильных радикалов. В этой диссертации эти радикалы исследовались для их возможного будущего использования в качестве спиновых меток для измерения расстояний в биополимерах методом PELDOR.

Как было отмечено выше, сложноэфирные тритильные радикалы и их ближайшие прекурсоры могут быть эффективными внутриклеточными оксиметрическими ЭПР-зондами. Для улучшения функциональных свойств ТАМ, в частности для увеличения их чувствительности по отношению к кислороду в НИОХ СО РАН под руководством к. х. н. В. М. Тормышева были синтезирована серия дейтерированных ТАМ. Кроме того, были синтезированы ТАМ с морфолиновой группой, которые могли бы использоваться в качестве бифункциональных зондов на рН и кислород. Для выводов о применимости таких радикалов необходимо было провести магнитно-резонансные измерения их параметров.

### **Цели и задачи**

Цели настоящей работы:

- 1) выявить потенциал применения ряда новых стабильных радикалов на основе нитроксильных и тритильных радикалов в качестве спиновых зондов и спиновых меток;
- 2) установить механизм релаксации нитроксильных радикалов при комнатной температуре при иммобилизации в матрице трегалозы.

Объектом исследования настоящей работы были недавно синтезированные новые нитронилнитроксильные радикалы, 2,5-спироциклогексил- и 2,5-спироциклопентилзамещенные нитроксильные и триарилметильные радикалы. В работе ставились задачи измерения их магнитно-резонансных параметров, а также выявления функциональных свойств.

Для новых водорастворимых низкотоксичных нитронилнитроксильных радикалов:

- (а) измерить устойчивость по отношению к аскорбиновой кислоте в модельных условиях и крови крыс;
- (б) установить применимость в качестве контрастных реагентов в магнитно-резонансной томографии;
- (в) установить применимость в ЭПР-томографии *in vivo* в качестве зондов на оксид азота;
- (г) выявить возможность улучшения их функциональных свойств при ковалентном связывании с циклодекстринами.

Для 2,5-спироциклогексилзамещенных нитроксильных радикалов: (а) измерить устойчивость по отношению к аскорбиновой кислоте в модельных условиях, (б) измерить релаксационные параметры в стеклообразной матрице трегалозы и установить возможность их с применения в качестве спиновых меток в биополимерах при измерениях расстояний при комнатных температурах.



Для триарилметильных радикалов измерить: (а) константы СТВ  $^{13}\text{C}$ ; (б) скорость реакции сольволиза в некоторых растворителях.

### **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 их введения. Показано, что вследствие высокой скорости восстановления ННР и их продукта реакции с NO (ИНР), а также быстрого выведения ННР в мочевой пузырь, использование таких радикалов для исследования количественного содержания оксида азота в тканях невозможно.

Показано, что нитронилнитроксильный радикал, ковалентно связанный с ЦД, сохраняет свою чувствительность к NO, а константа восстановления нитроксильного фрагмента NNCD 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 ЦД.

Измерены константы скорости восстановления новых 2,5-спироциклогексан-замещенных нитроксильных радикалов пирролинового типа аскорбиновой кислотой, и показано, что они обладают существенно более высокой стабильностью по отношению к биогенным восстановителям по сравнению с их тетраметильными аналогами и 2,5-спироциклогексан-замещенными нитроксильными радикалами пиперидинового типа, и являются перспективными для структурных исследований биополимеров. Измерены времена продольной и фазовой электронной спиновой релаксации новых 2,5-спироциклогексан-замещенных НР пирролинового типа в матрице трегалозы при 300 К, исследован механизм их электронной спиновой релаксации, и показано, что они являются перспективными спиновыми метками для структурных исследований биополимеров при комнатной температуре.

Для ряда новых тритильных радикалов (ТАМ) измерены константы СТВ неспаренного электрона с ядрами  $^{13}\text{C}$ . На примере характерного ряда ТАМ в настоящей работе показано, что константы СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$  практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру. Исследование показало отсутствие заметного влияния растворителя на величины константы СТВ. Показано, что тритильный радикал dAMT-1 претерпевает реакцию сольволиза в метаноле и водном буфере и измерены соответствующие константы скорости.

## **Практическая значимость**

Полученные результаты имеют практическое значение и могут быть применены в структурных исследованиях биомакромолекул, в частности олигонуклеотидов, с помощью адресного введения спиновых меток (SDSL) 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 структурных биофизических измерений.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Высокая стабильность новых 2,5-спироциклогексан-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-спироциклогексан-замещенных нитроксильных радикалов пирролинового типа в матрице трегалозы при комнатной температуре. Перспективность их использования в качестве спиновых меток для структурных исследований биополимеров при комнатной температуре;
3. Магнитно-резонансные и функциональные свойства новых тритильных радикалов (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 нитронилнитроксильных радикалов (ННР) в качестве зондов оксида азота  $\text{NO}$  *in vivo* и в качестве контрастных реагентов МРТ;
5. Функциональные свойства новых нитронилнитроксильных радикалов, ковалентно-связанных с циклодекстрином (NNCD) (структура, магнитно-резонансные свойства, стабильность по отношению к биогенным растворителям, чувствительность к  $\text{NO}$ ).

## **Достоверность**

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**

Автор диссертации участвовал в постановке задач, решаемых в рамках настоящей работы, принимал участие в проведении всех экспериментов и обработке результатов, проводил все численные расчёты, принимал участие в интерпретации полученных результатов.

Автором были проведены все эксперименты, описанные в разделах «Материалы и методы», за исключением измерения температурных зависимостей времён релаксации, спироциклогексизамещённых НР, проведённых к. ф.-м. н. О. А. Крумкачёвой и А. А. Кужелевым. При этом эксперименты с использованием ЭПР-томографа проводились совместно с к. х. н. Л. А. Шундриным; эксперименты *in vivo* на мышах — совместно с к. б. н. Н. А. Стефановой. Объекты исследований были синтезированы в других лабораториях: нитронилнитроксильные радикалы — в лаборатории многоспиновых комплексных соединений МТЦ СО РАН под руководством д. х. н. Е. Ю. Фурсовой; 2,5-спироциклогексизамещённые нитроксильные радикалы — в лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН под руководством к. х. н. И. А. Кирилюка; триарилметильные радикалы — в группе металлокомплексного катализа НИОХ СО РАН под руководством к. х. н. В. М. Тормышева. Кровь крыс и живые мыши Wistar были предоставлены виварием ИЦГ СО РАН.

## **Апробация работы**

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах [А1–А5].

Кроме того, результаты диссертационной работы докладывались на следующих российских и международных конференциях [А6–А20]:

1. All-Russia Youth School with Foreign Participation “Magnetic resonance in chemical and biological physics”. Новосибирск, Россия, 6–10 сентября 2010 г.;
2. XLIX International Students Scientific Conference “Students and Progress in Science and Technology”. Новосибирск, Россия, 16–20 апреля 2011 г.;
3. Current Topics in Organic Chemistry. Новосибирск, Россия, 6–10 июня 2011 г.;

4. Magnetic and Spin Phenomena in Chemistry and Biology. Новосибирск, Россия, 6–10 июня 2011 г.;
5. SPIN2011 (VI International Conference on Nitroxide Radicals). Марсель, Франция, 26–29 сентября, 2011 г.;
6. L International Students Scientific Conference “Students and Progress in Science and Technology”. Новосибирск, Россия, 13–19 апреля, 2012 г.;
7. Current Topics in Organic Chemistry. Новосибирск, Россия, 9–14 июля 2012 г.;
8. VIII International Voevodsky Conference. Новосибирск, Россия, 15–19 июля 2012 г.;
9. The 6<sup>th</sup> advanced EPR school of EFEP. Реховот, Израиль, 12–18 января 2013 г.;
10. SPIN2014 (VII International Conference on Nitroxide Radicals). Зеленоградск, Россия, 14–20 сентября 2014 г.;
11. Modern development of magnetic resonance. Казань, Россия, 22–26 сентября 2015 г.

### **Структура и объём 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 применения. В заключение обзора описаны цель и задачи настоящей диссертационной работы.

*Вторая глава* посвящена исследованию возможности применения новых водорастворимых нитронилнитроксильных радикалов в качестве спиновых зондов на оксид азота в ЭПР-томографии. Получены магнитно-резонансные параметры таких радикалов. Проведены исследования стабильности этих радикалов по отношению к восстановлению этих спиновых зондов в различных средах: аскорбиновой кислотой в буферных водных растворах, в крови и ее компонентах. Показано, что эти нитронилнитроксильные радикалы реагируют с оксидом азота с образованием иминонитроксильных радикалов, имеющих существенно отличающийся спектр ЭПР. Проведены измерения по использованию радикалов в качестве спиновых зондов методом ЭПР-томографии *in vivo*. Впервые были получены ЭПР-томографические изображения мышей с введенными им нитронилнитроксильными радикалами. Обсуждаются особенности и проблемы применения таких радикалов в живых системах. Кроме того, в этой главе приведено исследование функциональных свойств перметил- $\beta$ -циклодекстрина, спин-меченого

нитронилнитроксильным радикалом. С помощью метода модуляции спада электронного спинового эха был определен тип равновесия «гость — хозяин» в данном аддукте. Исследована стабильность этих радикалов по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой.

*Третья глава* посвящена исследованию 2,5-бис(спироциклогексил)-замещенных нитроксильных радикалов пирролинового и пирролидинового рядов как спиновых меток для структурных измерений в биомолекулах. Описаны результаты исследования стабильности нового класса радикалов по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой, их липофильности и измерения электронной спиновой релаксации в трегалозе при комнатных температурах. Результаты, полученные в этой главе, демонстрируют большую стабильность новых спирозамещенных радикалов по сравнению с широко используемыми тетраметилзамещенными нитроксильными радикалами. Показано, что в матрице трегалозы при комнатной температуре структура заместителей во 2-м и 5-м положениях нитроксильного кольца не оказывает существенного влияния на электронную спиновую фазовую релаксацию. В случае ковалентного связывания нитроксильных радикалов с биополимерами время релаксации для спирозамещенных радикалов увеличивается по сравнению с тетраметильными аналогами. В качестве экспериментальных методов используются как стационарная, так и импульсная ЭПР-спектроскопия.

*Четвертая глава* посвящена исследованию магнитно-резонансных и функциональных свойств тритильных радикалов. В частности впервые были измерены g-факторы, константы СТВ на ядрах водорода и константы СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$  заместителей для ряда новых тритильных радикалов, синтезированных В. М. Гор-мышевым. Было обнаружено, что тритильные радикалы с эфирными заместителями сольволизуются в различных растворителях и измерены константы скорости их гидролиза.

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

В конце работы приведен список используемой литературы, состоящий из 204 источников. Работа состоит из 127 страниц и содержит 48 рисунков, 11 таблиц и 5 приложений.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Применение нитроксильных радикалов как спиновых зондов

Нитроксильные радикалы (нитроксиды, НР) — это наиболее развитый в синтетическом отношении класс стабильных органических радикалов. Небольшие молекулы НР с легко варьируемой структурой и простым ЭПР-спектром, чувствительным к различным параметрам среды, представляют собой уникальный набор молекулярных зондов для исследования сложных молекулярных систем. В последние годы наибольшее распространение получили работы по применению НР в биофизике, в медицине и в химии полимеров.

В биофизике НР используются для изучения строения и механизмов взаимодействия сложных биомолекул и исследования процессов, обеспечивающих различные аспекты жизнедеятельности клеток [3]. Развитие новых физических методов исследования на основе низкочастотного ЭПР и эффекта Оверхаузера, таких, как томография на основе двойного протон-электронного резонанса, динамическая поляризация ядер в циклически меняющемся поле и др., открывает новые возможности для неинвазивного исследования живых объектов и диагностики с помощью парамагнитных молекулярных зондов [3,4,5].

Наличие неспаренного электрона позволяет использовать НР и в МРТ в качестве т. н. контрастирующих агентов, ускоряющих спиновую релаксацию, что позволяет усилить сигнал и увеличить разрешение [6,7].

Другое направление применения НР в биологии связано с их свободно-радикальной природой и, следовательно, способностью к одноэлектронному окислению и восстановлению. Благодаря этой особенности НР чрезвычайно легко взаимодействуют с активными радикалами, образующимися в результате протекания различных окислительных процессов в живых системах. Благодаря этому НР блокируют развитие цепных радикальных процессов с участием активных форм кислорода (АФК), с которыми связывают развитие различных патологий [8]. Реагируя с активными радикалами, НР могут образовывать устойчивые аддукты либо претерпевать одноэлектронное восстановление или окисление с образованием, соответственно, гидроксилamina или оксоаммониевого катиона. Последний быстро превращается в гидроксилamin, реагируя с органическими соединениями. Гидроксилamины, в свою очередь, способны реагировать с АФК, регенерируя при этом НР. Совокупность этих процессов обуславливает высокую антиоксидантную активность нитроксильных радикалов. Показано, что НР, подобно природному ферменту супероксиддисмутазе, катализируют диспропорционирование супероксидного радикала, являющегося основным источником всех АФК в организме [9,10].

Ещё один механизм антиоксидантного действия НР связан с их способностью тушить триплетные состояния за счёт спинового обмена. Под действием света некоторые соединения, являющиеся естественными компонентами живых тканей, способны переходить в возбуждённые триплетные состояния, отличающиеся повышенной реакционной способностью. Такие фотовозбуждённые молекулы, реагируют с образованием свободных радикалов и способны вызывать необратимые химические повреждения и способствовать повышению концентрации АФК. Показано, что НР облегчают переход фотовозбуждённых молекул в основное состояние [11]. На этом основано использование НР в качестве компонентов светозащитных составов [12,13].

Недостатком нитроксильных спиновых зондов является их быстрое восстановление в тканях живых организмов [14]. Восстановителями являются как низкомолекулярные клеточные антиоксиданты (прежде всего, аскорбат-анионы), так и ферментативные системы [15]. Первичными продуктами восстановления НР в биологических образцах являются гидроксиламины, являющиеся диамагнитными соединениями, которые невозможно зарегистрировать с помощью ЭПР или использовать в качестве контрастных агентов. Из-за реакции гидроксиламинов с постоянно образующимися АФК, в живых тканях наблюдается некое равновесие между НР и продуктами их восстановления — гидроксиламинами. Однако для подавляющего большинства НР это равновесие сдвинуто в сторону образования гидроксиламина, что затрудняет использование НР в медико-биологических исследованиях с использованием магнитного резонанса [9].

Восстановление НР оказывает негативное влияние и на перспективы фармакологического применения НР. В ходе экспериментов на клеточных культурах, где восстановление НР идёт не так быстро, показано, что физиологическая активность НР и гидроксиламинов может существенно различаться. Например, НР являются активными радиопротекторами, а гидроксиламины — нет [16]. Переход к измерениям *in vivo* нередко нивелирует различия в активности НР и гидроксиламинов, при этом полезные свойства теряются [9].

Также у стабильных нитроксильных радикалов существует много других приложений, несвязанных с биофизикой. Например, «живая» контролируемая нитроксидными полимеризация [17], молекулярные магнетики [18,19], агенты для селективного окисления [20,21,22] и т. д.

## 1.2. Механизм восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой

В работе Бобко с соавторами был изучен механизм восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой [23]. Впервые было показано, что этот процесс характеризуется равновесием между нитроксильным радикалом и аскорбиновой кислотой с одной стороны, и гидроксиламином и радикалом аскорбата с другой стороны. Были обнаружены новые реакции, дающие существенный вклад в наблюдаемые кинетические кривые восстановления НР, а именно: окисление ГА радикалом аскорбата и дегидроаскорбиновой кислотой. Также было показано, что нитроксильные радикалы восстанавливаются продуктами разложения дегидроаскорбиновой кислоты, предположительно 2,3-дикетогулоновой кислотой. Впервые предложена и подтверждена математическим моделированием полная реакционная схема восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой.

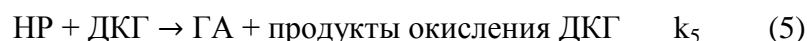
В ходе исследований было выяснено, что восстановление НР аскорбиновой кислотой — обратимый процесс. Было показано, что обратимость процесса восстановления нитроксильных радикалов обусловлена окислением гидроксиламина продуктами окисления аскорбиновой кислоты, радикалом аскорбата и дегидроаскорбиновой кислотой. Исследование кинетики окисления гидроксиламина в присутствии аскорбиновой кислоты и различных концентраций аскорбат оксидазы показало, что скорость окисления гидроксиламина НР зависит как от концентрации аскорбат оксидазы, т. е. скорости генерации радикала аскорбата, так и от концентрации ГА (примечание — в системе аскорбат/аскорбат оксидаза в присутствии кислорода протекает ферментативная генерация радикала аскорбата). Кроме того, было показано, что дегидроаскорбиновая кислота (ДГА) также способна восстанавливаться гидроксиламинами НР до радикала аскорбата. Гидроксиламины, в свою очередь, превращаются в нитроксильные радикалы. Следует отметить, что процесс окисления ГА дегидроаскорбиновой кислотой не стехиометрический, т. к. ДГА является неустойчивым соединением в водных растворах и гидролизует в 2,3-дикето-гулоновую кислоту (ДКГ). В литературе отмечалось, что продукты разложения ДГА обладают восстановительными свойствами по отношению к нитроксильным радикалам. Результаты математического моделирования полученных данных позволили авторам предположить, что восстанавливающим соединением для НР служит продукт гидролиза ДГА — 2,3-дикетогулоновая кислота.

На основе математического моделирования полученных кинетических кривых, была предложена схема реакций восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой

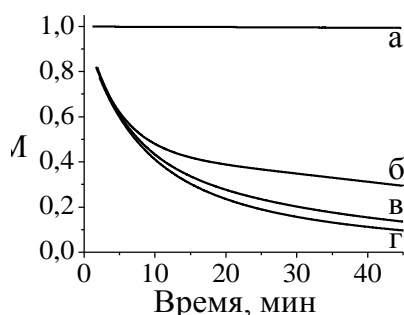


кислотой. Авторами были измерены константы скоростей реакций для представителей НР пирролидинового, имидазолинового и имидазолидинового типов.

Предложенный механизм реакции состоит из пяти элементарных реакций. Реакция (1) описывает равновесие, осуществляемое между окислительно-восстановительными парами НР/ГА и АК/АР. Существование этого равновесия подтверждается экспериментами, приведёнными на рис. 1.1. Реакция (2) описывает равновесие, устанавливающееся между парами НР/АР и ГА/ДГА. Реакции (3) и (4) хорошо известны и изучены в литературе.



(Здесь НР — нитроксильный радикал, АК — аскорбиновая кислота, ГА — гидроксилламин НР, АР — радикал аскорбата, ДГА — дегидроаскорбиновая кислота, ДКГ — 2,3-дикетогулоновая кислота.)



**Рисунок 1.1** — Кинетические кривые восстановления нитроксильного радикала ДМТЭПГ (1 мМ) в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,6, ДТПА 0,1 мМ в присутствии 50 мМ GSH (а), 100 мМ АК (б), 100 мМ АК и 5 мМ GSH (в), 100 мМ АК и 50 мМ GSH (г).

Кроме того, в этой работе впервые была показана роль глутатиона (GSH) в восстановлении НР аскорбиновой кислотой. Было показано, что хотя GSH не восстанавливает НР, но оказывает сильное влияние на их восстановление аскорбатом через восстановление продуктов окисления АК (АР и ДГА) обратно в аскорбиновую кислоту.

На рисунке 1.1 приведены кинетические кривые восстановления радикала ДМТЭПГ (структуру см. в таблице 1.1) в присутствии GSH и АК. Как видно из рисунка, глутатион не восстанавливает НР. Более того, глутатион не влияет на скорость реакции НР с АК, но увеличивает эффективность восстановления НР. Этот эффект связан со способностью GSH восстанавливать продукты окисления аскорбиновой кислоты (АР и ДГА) обратно в АК. Из

полученных данных была вычислена эффективная константа скорости реакции глутатиона и радикала аскорбата. Её значение составило  $10 \pm 5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Отметим, что найденная константа скорости реакции является эффективной в силу сложности механизма взаимодействия AP и GSH.

### **1.3. Влияние структуры и свойств НР на их стабильность по отношению к восстановлению в биологических средах**

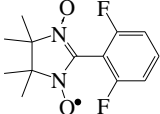
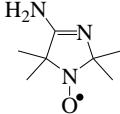
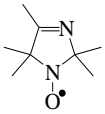
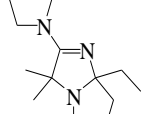
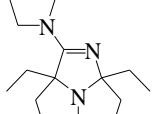
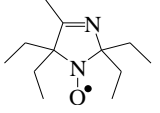
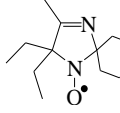
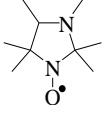
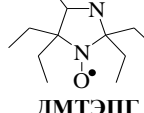
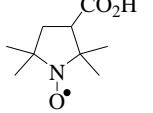
Как было отмечено выше, окислительно-восстановительные свойства НР чрезвычайно важны для применения этих соединений в биофизике и медицине. В связи с этим проблема влияния структурных особенностей на окислительные свойства НР привлекала внимание различных групп исследователей. Традиционные методы синтеза стабильных НР различных классов рассчитаны на получение производных с четырьмя метильными группами в ближайшем окружении нитроксильного радикального центра или с одной-двумя отличными от метильных группами. Проведённые исследования показали, что наибольшей устойчивостью к восстановлению обладают нитроксильные радикалы на основе гетероциклов с пятичленным кольцом (пирролинового, пирролидинового и имидазолидинового ряда) [24,25]. Однако, использование даже этих НР для исследования биологических систем затруднено вследствие их восстановления.

Недавно было обнаружено, что замена метильных групп около нитроксильной группы на этильные понижает скорость восстановления пятичленных НР аскорбат-анионами в 20–30 раз [26,27]. Увеличение стерических затруднений существенным образом повышает устойчивость НР к восстановлению в крови [27] и в гомогенате печени [28]. Уменьшение скорости восстановления связывают с понижением пространственной доступности нитроксильного фрагмента. В качестве количественных критериев, позволяющих выстроить НР в единый ряд по их окислительно-восстановительным свойствам, в различных работах использовались: скорость реакции НР с низкомолекулярными восстановителями (в большинстве работ — с АК) [24,25,27]; электрохимические потенциалы окисления/восстановления по данным циклической вольтамперметрии [28,29]; константа равновесия в системе НР —  $^{15}\text{N}$ -меченый гидроксилламин [29,30].

В работе Бобко с соавторами были приведены сравнительные исследования стабильности радикалов 2-имидазолинового, 3-имидазолинового, имидазолидинового и пирролидинового типов, а также их тетраэтильных аналогов по отношению к восстановлению к аскорбиновой кислоте [23]. Было показано, что устойчивость НР к восстановлению возрастает при увеличении количества этильных групп во втором и пятом положениях гетероцикла. Стабильность НР к восстановлению уменьшается в ряду

радикалов: пирролидин > имидазолидин > 3-имидазолин > 2- имидазолин-3-оксид (ННР). Было обнаружено, что замещение метильных заместителей вблизи радикального центра нитроксида на этильные группы ведёт к увеличению стабильности соединений по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой. Такая же тенденция для этилзамещённых НР наблюдается и при использовании крови крыс в качестве восстановителя. Бимолекулярные константы скоростей реакции некоторых НР с 44аскорбиновой кислотой и начальные скорости восстановления НР в крови крыс приведены в таблице 1.1.

**Таблица 1.1** — Бимолекулярные константы скорости восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,5, с добавлением 0,1 мМ ДТПА и значения начальных скоростей восстановления НР в присутствии крови крыс ( $V_0$ ) для некоторых НР.

Радикал					
$k, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$(1,6 \pm 0,8) \cdot 10^3$	$22,5 \pm 1,6$	$5,6 \pm 0,3$	$13,4 \pm 0,9$	$0,74 \pm 0,07$
$V_0, \mu M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	—	2,4	—	1,8	1,0
Радикал					
$k, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$0,5 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$	$0,85 \pm 0,05$	$0,020 \pm 0,003$	$0,10 \pm 0,01$
$V_0, \mu M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	0,033	—	0,22	<0,01	—

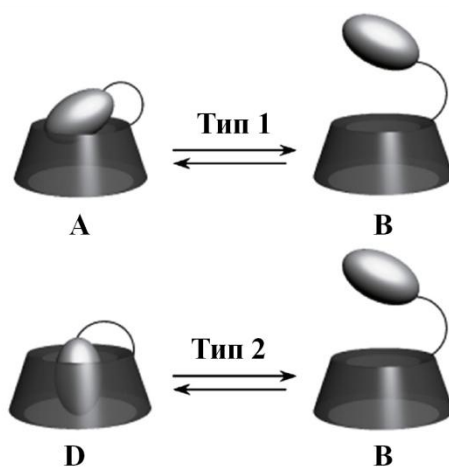
Большинство широко используемых нитроксильных радикалов обладают двумя парами метильных групп при  $\alpha$ -атоме углерода нитроксильной группировки. Однако известно, что введение спироциклических групп вместо геминальных метильных групп может улучшить свойства нитроксильного радикала, касающихся «живой» полимеризации [31,32]. Более того, увеличение стерических затруднений спироциклическими группами заместителей при  $\alpha$ -атомах углерода может тормозить восстановление нитроксильных радикалов низкомолекулярными биогенными восстановителями и ферментативными системами [26,27,28,33,34].

#### 1.4. Применение циклодекстринов для модификации нитроксильных радикалов

Циклодекстрины (ЦД), являясь циклическими олигомерами глюкозы находят широкое применение в различных областях науки и технологии. Высокий интерес к ним в первую очередь обусловлен тем, что в структуре ЦД есть гидрофобная полость, размер которой определяется числом глюкопиранозных связей в молекуле. С полостью ЦД

органические и неорганические вещества могут образовывать комплексы включения, что позволяет использовать их как различные молекулярные «клетки», агенты доставки, ловушки, активаторы или ингибиторы физико-химических процессов [35,36,37]. Ковалентное связывание функциональных групп по одной или нескольким глюкопиранозным связям также создает поле для возможных приложений ЦД. Производные ЦД, содержащие парамагнитные центры, представляют собой одну из таких возможностей [38,39,40]. В зависимости от парамагнитных центров модифицированные ЦД могут быть эффективными контрастными агентами для магнитно-резонансной томографии [41,42,43], селективными тушителями люминесценции [44], супрамолекулярными высокочувствительными зондами *in vivo* [45,46].

Модификация ЦД стабильным нитроксильным радикалом — это многообещающее приложение для одновременной функционализации как ЦД, так и радикала. Например, помещение радикала в полость ЦД может способствовать увеличению его стабильности в восстановительных средах. В свою очередь спин-меченый ЦД интересен как объект для изучения стационарного и импульсного ЭПР. Известно, что спин-меченые ЦД, связанные с нитроксильными радикалами гибким линкером, обладают динамическим равновесием между разными структурными конформациями. Радикал может находиться снаружи полости ЦД (рис. 1.2, конформация В), может прикрывать ее (А) или быть глубоко погруженным в нее (D). Таким образом, может реализовываться два типа равновесия: 1) между радикалом, прикрывающим полость и находящимся снаружи ( $A \rightleftharpoons B$ ); 2) между радикалом, погруженным в полость и находящимся снаружи ( $D \rightleftharpoons B$ ) [38,47]. Доказано, что аддукты с глубоко погруженным в полость радикалом обладают гораздо большим временем жизни по сравнению со свободными аддуктами [48,49,50].

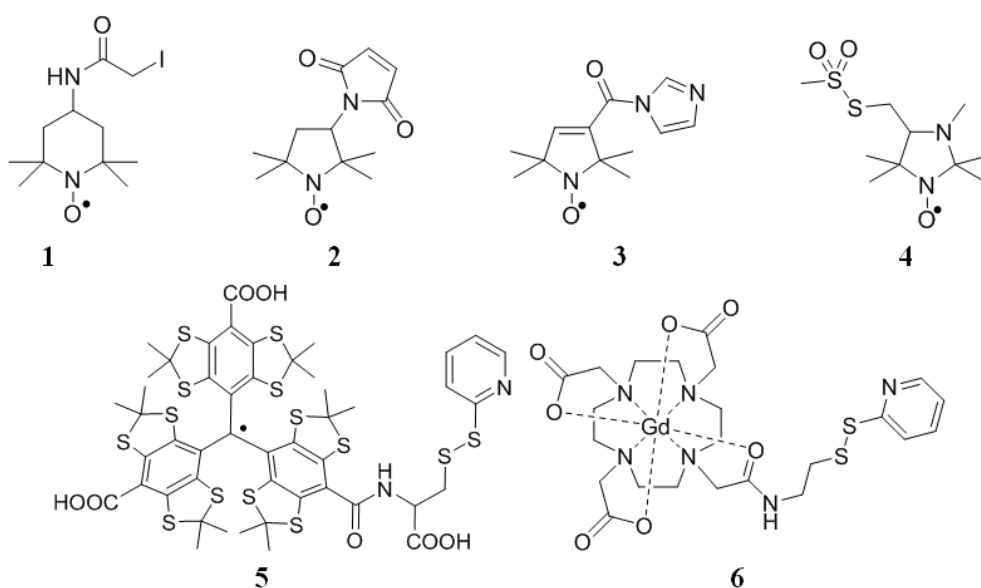


**Рисунок 1.2** — Типы равновесий в аддуктах ЦД и радикала.

## 1.5. Применение нитроксильных и тритильных радикалов как спиновых меток в структурной биологии

Термин «спиновые метки» используется для обозначения парамагнитных молекул (или стабильных радикалов), которые, будучи присоединёнными к тому или иному компоненту исследуемой системы, позволяют получать информацию о свойствах ближайшего окружения с помощью спектральных методов, основанных на явлении электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В качестве спиновых меток обычно используются стабильные радикалы — нитроксильные (нитроксиды), тетраатриарилметильные (трители, ТАМ) —, которые способны ковалентно или нековалентно связываться с исследуемыми молекулами без затрагивания свободной валентности, или комплексы переходных металлов (Mn (II), Gd (III) и др.).

Метод спиновых меток позволяет исследовать сложные молекулярные системы, в том числе гетерогенные: проводить измерения расстояний между фрагментами молекул, оценивать их подвижность, определять локальные значения физических параметров среды, таких как полярность (диэлектрическая проницаемость), вязкость, электростатический потенциал поверхностей, концентраций некоторых веществ, например, кислорода, тиолов, восстановителей, pH, и др., а также отслеживать динамику изменения перечисленных выше параметров [51]. Важным условием возможности использования этого метода являются отсутствие или невысокая концентрация естественных парамагнитных примесей в образце, мешающих проводить измерения. Биологические системы как раз отвечают этому критерию, поэтому биология (биофизика, биохимия, структурная биология) являются важнейшей областью применения метода спиновых меток [52,53,54].



**Рисунок 1.3** — Некоторые спиновые метки: нитроксильные (1–4) тритильная (5) и гадолиниевая (6).

Одно из наиболее динамично развивающихся направлений в последнее время—метод адресного введения спиновой метки (site-directed spin labeling, SDSL) [3,51,52,55]. Использование современных методов молекулярной биологии позволяет адресно встраивать парамагнитную (спиновую) метки в заданные места биологической макромолекулы. Для исследования таких спин-меченых макромолекул разработан набор спектральных методов, основанных на ЭПР. Спектральные исследования дают набор расстояний, а иногда и углов, между спиновыми метками, по которым методами молекулярной механики определяется пространственное строение исследуемой молекулы или комплекса.

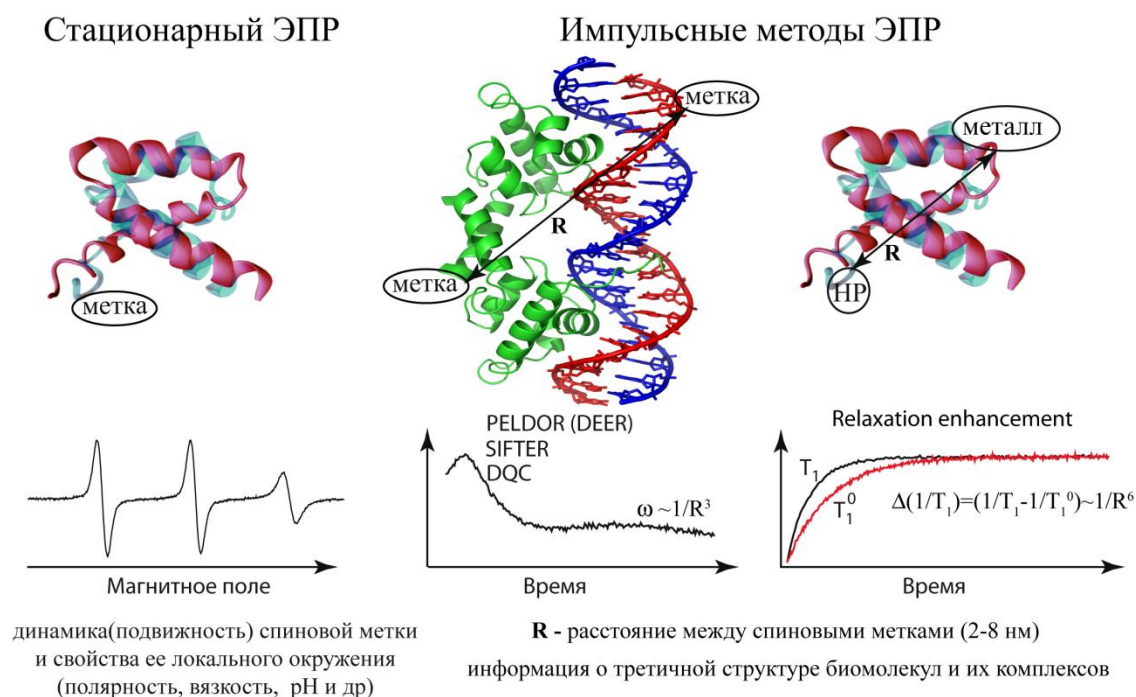
Указанные методы прекрасно дополняют другие методы структурной биологии, помогая не только устанавливать третичную структуру сложных биополимеров, но и исследовать их динамику. В отличие от классического рентгеноструктурного анализа (РСА), для измерения расстояний в спин-меченых образцах не требуется получения кристаллических образцов и даже выделения исследуемых молекул (комплексов). Более того, новейшие исследования включают измерения *in cellula* и, таким образом, отражают строение и функционирование биомолекул в естественной среде [56,57,58]. Конформация молекулы в кристаллическом виде, которую определяют с помощью РСА, статична, и может сильно отличаться от конформации в растворах. Исследование современными методами ЯМР тоже имеет ограничения для сложных и динамичных структур, характеризующихся множеством разнообразных конформаций, находящихся в состоянии обмена с сопутствующим уширением сигналов в спектрах. Структурные исследования методами ЭПР, как правило, проводятся в условиях глубокой заморозки, благоприятствующих выявлению наиболее заселенных конформаций.

В последнее время [59,60] появился целый ряд новых подходов и методов, основанных на импульсной ЭПР-спектроскопии, а также способов улучшения характеристик спиновых меток и разработки методов их направленного введения, что привело к их широкому применению в структурной биологии [59,61].

### **1.6. Экспериментальные методы исследования — ЭПР (PELDOR, DEER, DQC)**

ЭПР является мощным методом изучения структурных перестроек биологически важных молекул, таких как протеины и нуклеиновые кислоты, а также их комплексы [62,63,64,65,66]. Важным достоинством этого метода является его высокая чувствительность, в 1000 раз большая по сравнению с ЯМР-спектроскопией, и пригодность для исследования гетерогенных и непрозрачных образцов.

Стационарный ЭПР и метод спинового эха позволяют получать богатую информацию о подвижности спиновой метки и делать выводы о свойствах среды, которая ее окружает, а также отслеживать изменения структуры при модификациях биомолекул. Адресное исследование спин-меченых биополимеров с помощью стационарного ЭПР позволяет по форме линии определять внутреннюю динамику, исследовать конформационные равновесия и связывание с лигандами (рис. 1.4) [67,68]. Импульсный ЭПР позволяет определять межспиновые расстояния до  $25\text{Å}$  [69].



**Рисунок 1.4** — Методы ЭПР спектроскопии с использованием адресного введения спиновых меток и информация, которую можно получить с использованием соответствующего метода. В случае однократно спин-меченого биополимера информацию получают по анализу формы линии ЭПР. В случае импульсного ЭПР (методы PELDOR, DQC, SIFTER) расстояние между спиновыми метками  $R$  определяется по частоте детектируемых осцилляций на временной зависимости интенсивности спинового эха. В случае метода усиленной релаксации (relaxation enhancement) используются спиновая метка на основе нитроксильного или тритильного радикала и спиновая метки на основе металла, а расстояние между ними определяется по времени продольной релаксации  $T_1$ .

В импульсной дипольной ЭПР спектроскопии выделяют два основных метода: двойной электрон-электронный резонанс (Pulse Electron-Electron Double Resonance, PELDOR или Double Electron-Electron Resonance, DEER) [70,71] и двухквантовая когерентность (DQC) [72]. Метод импульсного двойного электрон-электронного резонанса PELDOR, который применяется чаще других, был предложен новосибирскими учеными Ю. Д. Цветковым и А. Д. Миловым. В 2012 году за это открытие А. Д. Милову была вручена премия ЭПР

общества в области химии, академику Ю. Д. Цветкову — в 2013 году была присуждена премия им. Е. К. Завойского за развитие импульсной ЭПР-спектроскопии, в том числе и метода PELDOR. Метод основан на использовании специальной последовательности микроволновых импульсов на двух разных частотах, в результате применения которой в магнитном поле детектируются осцилляции, частота которых зависит от диполь-дипольного взаимодействия между спиновыми магнитными моментами неспаренных электронов двух разных спиновых меток. Временные схемы экспериментов приведены на рисунке 1.5.

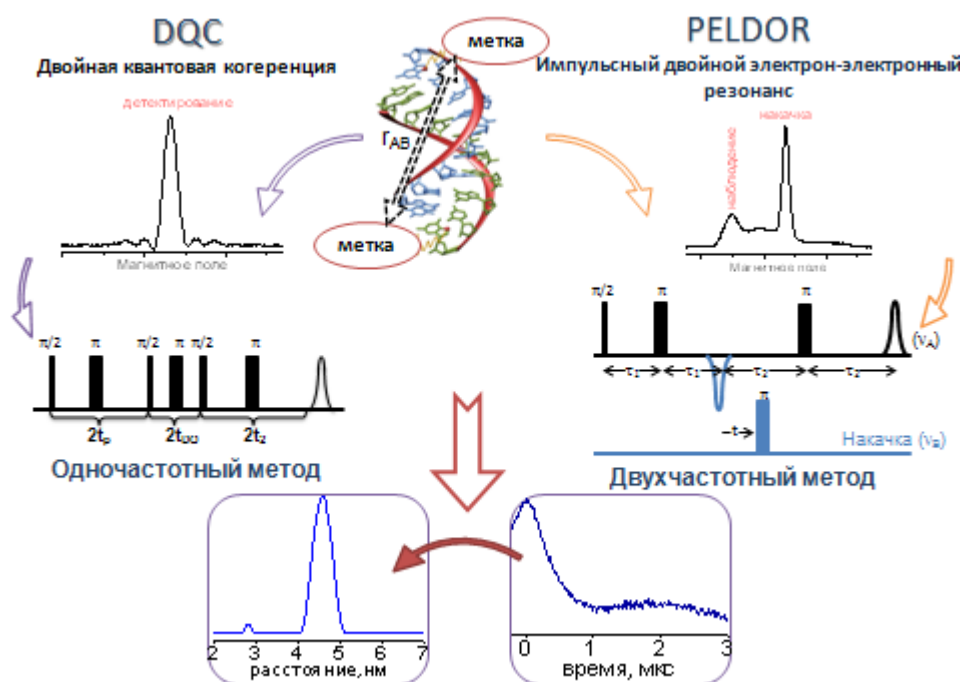


Рисунок 1.5 — Временные схемы экспериментов по измерению расстояний в спин-меченных молекулах: двойная квантовая когеренция (DQC) и импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR).

Взаимодействие между неспаренными электронами, в свою очередь, непосредственно связано с расстоянием между спиновыми метками и их взаимной ориентацией. Для успешного применения этих методов необходимо одновременно выполнить два условия. Первое требование заключается в иммобилизации исследуемой биомолекулы для предотвращения усреднения дипольного взаимодействия между спинами. Второе требование налагает условие на электронные времена релаксации спиновой метки: время фазовой релаксации,  $T_m$  должно быть достаточно длительным, чтобы обеспечить регистрацию хотя бы одного периода дипольной осцилляции. От величины  $T_m$  зависит и диапазон расстояний, которые можно измерять методом PELDOR. В свою очередь, величина  $T_m$  зависит от свойств среды, температуры и строения спиновой метки. Глубокая заморозка образцов позволяет одновременно добиться иммобилизации исследуемой молекулы и повысить  $T_m$ . Большинство



исследований проводятся при температурах 50–60 К. Недавно было показано, что некоторые спиновые метки позволяют проводить измерения при более высоких температурах, в том числе и при комнатной, для молекул, иммобилизованных на носителе или в твёрдой матрице. Условия для проведения таких измерений при более высоких температурах будут обсуждаться ниже.

Спектроскопия PELDOR позволяет измерить расстояния между спиновыми метками в диапазоне от 2 до 8 нм [70,73,74]. Этот подход успешно используется для измерений расстояний в белках и нуклеиновых кислотах, а также их комплексах [63,75,76,77]. Последовательное введение пар меток в различные заданные положения белка, ДНК или РНК и измерение расстояний с помощью метода PELDOR позволяет получить информацию о третичной структуре биологических молекул и их комплексов, а в некоторых случаях сделать выводы об их функциях.

Применение метода PELDOR в высоких магнитных полях (260 ГГц, 360 ГГц) позволяет получить информацию не только о расстояниях между спиновыми метками, но и об их взаимной ориентации [58].

Использование двух и более не идентичных спектроскопически различимых спиновых меток (ортогональные спиновые метки) позволяет расширить возможности метода ЭПР и исследовать изменение локального окружения всех спиновых меток одновременно в таких ситуациях как агрегация биомолекул или взаимодействие двух белков [78]. Так, например комбинация двух нитроксильных спиновых меток и двух меток на основе гадолиния Gd (III) позволяет одновременно измерить в одном образце различные расстояния в парах нитроксил – нитроксил, нитроксил – Gd (III) и Gd (III) – Gd (III) [78,79].

В отличие от метода PELDOR, для экспериментов DQC используются микроволновые импульсы только на одной частоте, однако экспериментально реализовать метод DQC на коммерчески доступном ЭПР-спектрометре для нитроксильных радикалов проблематично, так как для этого необходимо возбудить весь спектр спиновой метки микроволновыми импульсами. В то же время, метод DQC, вероятно, является идеальным методом для меток с узким ЭПР спектром, например, систем, содержащих две тритильные метки, где можно легко добиться полного возбуждения спектра ЭПР. Недавно была предложена новая последовательность для измерения расстояний SIFTER, в которой также используются микроволновые импульсы на одной частоте [80]. Преимуществом этого метода является увеличение чувствительности до четырех раз в случае применения высокопольной ЭПР-спектроскопии и спиновых меток на основе тритильных радикалов [81].

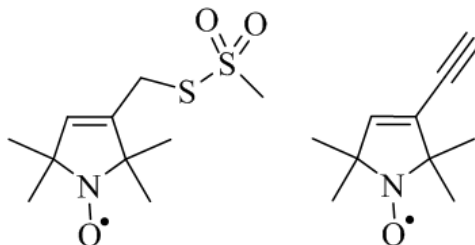
Альтернативный метод измерения межспиновых расстояний основан на исследовании времени спин-решеточной электронной релаксации спиновой метки (чаще всего

нитроксильной) в присутствии быстро релаксирующей спиновой метки другого типа [82,83]. В качестве быстро релаксирующей метки, как правило, используют парамагнитные металлы, входящие в состав исследуемых биополимеров или специально селективно введенные в их состав. Из-за быстрой электронной релаксации эти металлы не регистрируются методами импульсного ЭПР вплоть до 10 К, однако, из-за диполь-дипольного взаимодействия с нитроксильным радикалом их присутствие увеличивает скорость электронной релаксации нитроксильной спиновой метки, и величина изменения зависит от межспинового расстояния нитроксил — металл. Данный метод позволяет измерять расстояния до 15 нм, однако в отличие от методов дипольной ЭПР спектроскопии (таких как PELDOR) позволяет получать только среднее расстояние без информации о функции распределения. Возможности новых технологий импульсного ЭПР и тенденции развития методов обсуждаются в недавнем обзоре [55].

### **1.7. Применение нитроксильных радикалов как спиновых меток для исследования структуры и функций белков**

Как указывалось выше, в разделе 1.3, замещение  $\alpha$ -атома углерода в НР на спироциклический фрагмент значительно меняет свойства радикала. В частности, это сильно меняет константу скорости рекомбинации нитроксильных радикалов с С-центрированными радикалами (стерический эффект в «живой» полимеризации), а также увеличивает стабильность НР по отношению к восстановлению. Недавно было обнаружено, что пиперидиновые НР со спироциклическими группами при  $\alpha$ -атомах углерода могут также иметь серьёзные преимущества перед 2,2,6,6-тетраметильными аналогами в структурных исследованиях с использованием импульсного ЭПР, в частности метода PELDOR [84,85]. Как было отмечено выше, эти исследования подразумевают применение метода адресного введения спиновых меток. В настоящее время множество спиновых меток, часто используемых в SDSL, в том числе MTSSL и TPA, принадлежат семейству пирролиновых нитроксильных радикалов. Чтобы проводить измерения расстояний методом PELDOR, к спиновым меткам предъявляют некоторые требования, а именно: низкие скорости спин-спиновой (для возможности проведения экспериментов при определённой температуре) и спин-решёточной (для обеспечения приемлемой чувствительности) релаксаций. В случае стандартных спиновых меток, например MTSSL и TPA (рис. 1.6), скорости спин-спиновой и спин-решёточной релаксаций достаточно малы до температур  $\sim 70$  К, что позволяет проводить измерения методом PELDOR в температурном диапазоне жидкого гелия. Предложенные группой Итона пиперидиновые 2,6-спироциклогексилзамещённые НР [3636,3737] обладают такими же релаксационными свойствами до температур  $\sim 125$  К. Таким

образом, кроме повышенной стабильности по сравнению со стандартными спиновыми метками, их можно также использовать для измерений расстояний в температурном диапазоне жидкого азота. Это значительно удешевляет исследования структур биомакромолекул, которые в последнее время приобрели широкое распространение.



**Рисунок 1.6** — Структуры спиновых меток *MTSSL* (слева) и *TPA*.

Как уже было отмечено выше, важнейшим фактором, ограничивающим применение нитроксильных радикалов в биологии, является их восстановление в биологических образцах биогенными антиоксидантами и ферментативными системами в диамагнитные гидроксиламины [14]. Устойчивость спиновых меток в биологических образцах имеет особенно большое значение для исследований *in cellula*, поскольку внутри клеток высока концентрация окислительно-восстановительных ферментативных систем и антиоксидантов. Кроме того, для измерения межспиновых расстояний методами импульсного ЭПР необходимо сохранение обеих спиновых меток, поэтому оценка скорости гибели пригодного для измерений образца примерно в 2 раза выше.

Совокупность имеющихся в литературе данных позволяет обозначить ряд общих закономерностей влияния структурных факторов на скорость восстановления НР в разных системах:

1) Пятичленные гетероциклические НР (пирролидинового, пирролинового, имидазолидинового рядов) намного устойчивее к восстановлению, чем пиперидиновые НР. Этот эффект вызван различиями в относительных стабильностях соответствующих гетероциклов с  $sp^2$ - и  $sp^3$ -гибридными атомами азота, что следует из конформационных особенностей различных циклических систем [24];

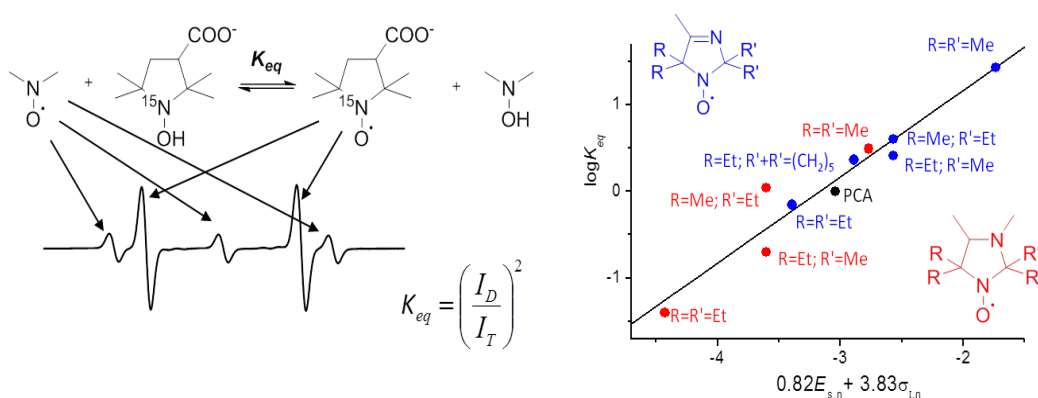
2) Электронные эффекты заместителей влияют ожидаемым образом: повышение акцепторного характера заместителей способствует повышению скорости восстановления; при этом электронные эффекты, как правило, оказывают меньшее влияние, чем размер или тип цикла. Некоторые авторы отмечают более быстрое восстановление НР, содержащих катионные фрагменты, по сравнению с НР, содержащими анионные группы [86,87,88,89]. Этот эффект иногда объясняют электростатическим взаимодействием, делающим выгодной реакцию отрицательно заряженного аскорбат-аниона с катионными НР [86]. Однако, в

ранней работе Шварца и др. убедительно показано, что наблюдаемый эффект заряженных групп прекрасно коррелирует с индуктивными константами заместителей [90];

3) Введение нескольких объёмных алкильных заместителей в окружение нитроксильной группы может приводить к существенному снижению скорости восстановления. Впервые резкое увеличение устойчивости к восстановлению при замене четырёх метильных заместителей в окружении нитроксильной группы на этильные было обнаружено в 1974 г. на примере восстановления нитроксильных радикалов парафенилендиамином [91]. Для биологических систем этот эффект был впервые описан в работе группы А. Раса [26]. Позднее стабилизирующее влияние объёмных алкильных заместителей было продемонстрировано для нитроксильных радикалов самых разных структурных типов [27,28, 34,92]. Согласно литературным данным, наиболее сильные изменения наблюдаются при замене четырёх метильных заместителей в окружении нитроксильной группы на этильные. Для разных циклических нитроксильных радикалов наблюдается уменьшение скорости восстановления нитроксильной группы аскорбиновой кислотой в 20–100 раз. Показательны результаты исследования устойчивости различных нитроксильных радикалов к восстановлению в растворах аскорбиновой кислоты, в цитозольном экстракте и в ооцитах *Xenopus laevis* [92]. Производные 2,2,5,5-тетраэтилпирролидин-1-оксилов показали наивысшую устойчивость, превосходящую даже устойчивость тритильного радикала; устойчивость нитроксильных радикалов может быть повышена настолько, что время жизни внутри живых клеток может составлять многие часы.

Многие авторы высказывали предположение, что причина стабилизации нитроксильных радикалов объёмными заместителями заключается в ограничении доступности нитроксильной группы. Однако, попытки провести корреляции между кинетикой восстановления и доступной поверхностью группы N–O• не были успешными. Влияние объёмных заместителей на термодинамические параметры реакции восстановления нитроксильных радикалов отмечалось в работах [34,92]. Убедительное доказательство этого приведено в работе [93]. Авторами этой работы проведены измерения констант равновесия в системе нитроксильный радикал — стандартный гидроксилламин, 1-гидрокси-3-карбокси-2,2,5,5-тетраметилпирролидин, содержащий изотоп  $^{15}\text{N}$  (CPH- $^{15}\text{N}$ ). Помимо этого были исследованы кинетики восстановления аскорбиновой кислотой и измерены потенциалы электрохимического восстановления. Результаты этих измерений, полученные для серии нитроксильных радикалов имидазолинового и имидазолидинового рядов, различающихся количеством и размером заместителей в окружении нитроксильной группы, были проанализированы методом двухпараметровой корреляции с использованием стерических констант Фуджиты ( $E_s$ ) и индуктивных констант Гаммета ( $\sigma_I$ ). Установлено, что линейные

двухпараметровые уравнения с использованием этих констант прекрасно описывают как кинетические (константы скоростей восстановления аскорбиновой кислотой), так и термодинамические (электрохимические потенциалы и константы равновесия в системе нитроксильный радикал —  $\text{CPH-}^{15}\text{N}$ ) параметры (рис. 1.7). Примечательно, что не только кинетические параметры, но и термодинамические параметры демонстрируют чёткую связь со стерическими требованиями заместителей. Отметим, что авторами был применен подход, ранее успешно использованный для анализа констант рекомбинации нитроксильных и алкильных радикалов [94], и обнаружена хорошая корреляция между константами скорости восстановления нитроксидов и константами скорости их рекомбинации с алкильными радикалами.



**Рисунок 1.7** — ЭПР-спектр смеси  $\text{NR}$  и гидроксиламина  $\text{CPH-}^{15}\text{N}$  (слева); корреляция логарифмов констант равновесия  $\lg(K_{eq})$  с двумя параметрами, выражающими эффекты заместителей при нитроксильной группе  $f(E_s, \sigma)$  (справа). Прямая соответствует уравнению  $\log(K_{eq}) = 3,17(\pm 0,54) + 0,82(\pm 0,11) \cdot E_{s,n} + 3,83(\pm 0,54) \cdot \sigma_{1,n}$ . Параметры корреляции:  $R^2 = 0,93$ ;  $s = 0,24$ ;  $N = 10$ ;  $F_{99,99\%} = 44$ .

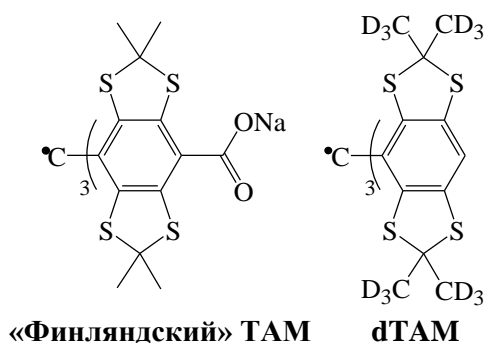
Поскольку, в отличие от констант скоростей восстановления, константы равновесия не зависят ни от доступности реакционных центров, ни от механизма реакции, а характеризуют только конечные и начальные состояния, можно сделать вывод, что эффект объёмных заместителей связан не с «экранированием» нитроксильной группы, а со стабилизацией или дестабилизацией нитроксильных радикалов и соответствующих гидроксиламинов. По мнению авторов, различное стабилизирующее или дестабилизирующее влияние объёмных заместителей на нитроксид и гидроксиламин связано с различной геометрией нитроксильной и гидроксиламиновой групп, различающихся по характеру гибридизации атома азота.

## 1.8. Применение тритильных радикалов как спиновых зондов

### для оксиметрии

Триарилметильные, ТАМ, или тритильные радикалы — стабильные парамагнитные зонды, которые чрезвычайно удобны для ЭПР-спектроскопических и томографических приложений из-за их уникальных свойств, таких как исключительная стабильность в живых тканях и биологических жидкостях [95], узкая одиночная линия ЭПР, высокое аналитическое разрешение даже при микромолярных концентрациях, заметное уширение линии, чувствительное к концентрации молекулярного кислорода. Применение тритильных радикалов весьма разнообразно. Главным образом, их используют в ЭПР-томографии [96], измерении концентрации кислорода — оксиметрии [97,98], детектировании супероксидных радикал-анионов [99]. Для измерения концентрации кислорода используют в основном эфирные формы, однако существует множество перспективных модификаций с улучшенной чувствительностью и дополнительными функциями. В частности, фторированные производные, используемые для количественного определения оксигенации тканей с хорошей чувствительностью [100,101], альдегидные формы с улучшенной чувствительностью к кислороду [102], радикалы с аминогруппами, позволяющие одновременно оценивать  $pO_2$  и  $pH$  [103,104] и тритил-нитроксильные бирадикалы для одновременного измерения окислительно-восстановительного статуса и оксигенации [105,106].

Наиболее популярным структурным мотивом тритильных радикалов является так называемый «финляндский» радикал [107], запатентованный фирмой Nyscomed. Такая тетратиатриарильная структура (рисунок 1.8) обладает высокой стабильностью и большим потенциалом для многочисленных модификаций.

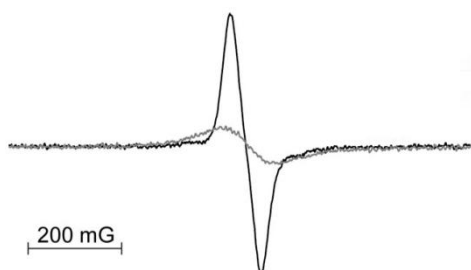


**Рисунок 1.8** — Структуры классического «финляндского» тритильного радикала и дейтерированного оксиметрического зонда dТАМ.

Например, в университете Огайо было развито новое приложение низкопольного электронного парамагнитного резонанса для неинвазивных измерений миокардического давления кислорода и тканевой кислотности [108]. Это приложение применено для

мониторинга миокардического  $pO_2$  в модели глобальной ишемии и реперфузии в изолированных сердцах крыс. Измерения концентрации миокардического кислорода были проведены с использованием «финляндского» тритильного радикального зонда dTAM (рис. 1.8). Дейтерирование метильных групп в арильных заместителях обеспечивает достижение максимально узкой линии в спектре ЭПР, который представлен одной узкой линией с шириной 58 мГс. Обменное спиновое взаимодействие радикала с молекулярным кислородом приводит к уширению спектральной линии, обеспечивая основу для измерений концентрации кислорода методом ЭПР (см. рис. 1.9).

Линию ЭПР можно описать как свёртку лоренцева и эффективного гауссова контуров, обусловленных неразрешённой спектральной структурой. Обменное взаимодействие увеличивает лоренцев вклад в ширину линии. Ширина линии зависит от концентрации кислорода линейно с чувствительностью 0,53 мГс/мм рт. ст.  $O_2$ , позволяя детектирование давлений кислорода порядка 1 мм рт. ст. Однако общее уширение зависит от концентрации кислорода нелинейно при малых концентрациях и практически не чувствительно при  $pO_2$  ниже 10 мм рт. ст. Чтобы измерить миокардическую оксигенацию в изолированных перфузированных крысиных сердцах, спиновый зонд dTAM добавляли к перфузатному буферу. Тритильные радикалы с тремя карбоксильными группами гидрофильны при нейтральном рН и распределены во внеклеточной среде (примечание — соответствующий коэффициент разделения октанол/вода  $K_p \leq 0,02$  в диапазоне рН от 6,5 до 8,0). Таким образом, можно ожидать локализацию зонда dTAM внутри сосудов и внутри тканей. Было показано, что присутствие dTAM в буфере не влияет на параметры сокращения сердца, поэтому, даже если токсичность зонда есть, то она весьма мала.



**Рисунок 1.9** — Уширение спектра ЭПР 0,1 мМ радикала dTAM. Чёрной линией показан спектр в буферном растворе без кислорода, серым — в растворе, насыщенном воздухом [108].

Другое применение тритильных радикалов — это использование их как бифункциональных зондов на рН и кислород, основанное на включении в структуру TAM протонируемых групп [104]. Авторы этой работы синтезировали производные TAM, содержащие аминокгруппы. Новые тритильные радикалы сочетают высокую стабильность с чувствительностью к рН и кислороду в диапазоне от 6,8 до 9,0. Чтобы улучшить

чувствительность зондов, авторы уменьшали число спектральных компонент путём синтеза ассиметрических производных ТАМ, содержащих и карбоксильную, и аминую функции. Это также привело к увеличению растворимости зонда при физиологическом значении рН. Т. к. атомы азота и водорода аминогрупп расположены довольно близко к радикальному центру, изменения соответствующих констант СТВ составляют от 300 до 1000 мГц, что сравнимо с собственными значениями СТВ. Большие рН-зависимые сдвиги линий индивидуальных спектральных компонент, с узкими линиями 160–280 мГц, позволяют легко различать и интерпретировать изменение рН по спектру ЭПР и наблюдать зависимое от кислорода уширение линии на ~6 мГц на 1% кислорода. Синтезированные в этой работе производные ТАМ представляют первые двойные парамагнитные зонды на рН и O<sub>2</sub> с перспективой применения для биомедицинских исследований.

Кроме улучшения функциональности тритильных радикалов разрабатываются также способы их доставки до исследуемой среды в организме, т. к. приложения ранее доступных соединений было ограничено их слабой внутриклеточной проницаемостью. Недавно сообщалось о синтезе и характеристиках сложноэфирных тритильных радикалов как потенциальных ЭПР-зондах [98]. Были исследованы их чувствительность к кислороду, окислительно-восстановительные свойства, проницаемость в клетки и ферментативный внутриклеточный гидролиз. Результаты показали, что ацетоксиметоксикарбонильный тритил АМТ-02 высоко стабилен в присутствии бычьих эндотелиальных клеток аорты и может усваиваться. Также авторы наблюдали проникновение в клетку и внутриклеточный гидролиз АМТ-02, приводящий к трикарбоксилатной форме, тритилу СТ-03, который лучше подходит для оксиметрии, т. к. он обладает более узкой линией ЭПР. Это исследование показало, что сложноэфирные тритильные радикалы могут быть эффективными внутриклеточными оксиметрическими ЭПР-зондами. Для данной работы в Новосибирском институте органической химии к.х.н. В. М. Тормышевым и его коллегами были синтезированы дейтерированные аналоги радикалов типа АМТ-02, которые могут оказаться перспективными оксиметрическими зондами для внутриклеточных измерений.

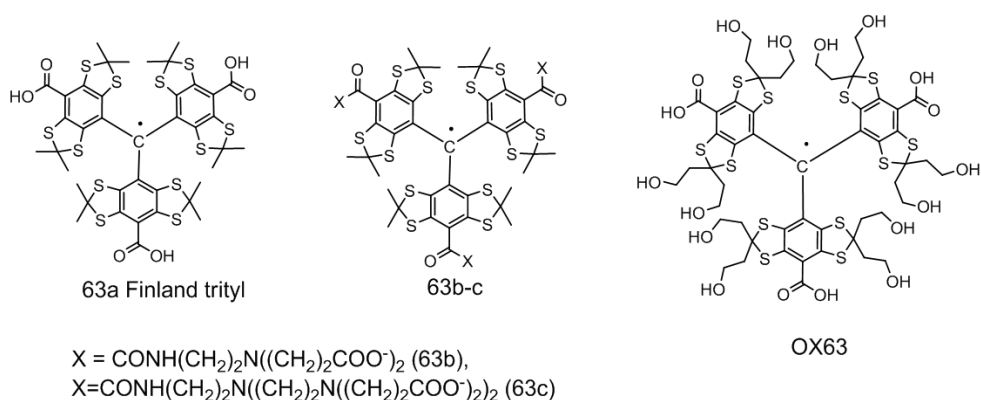
Известно также, что тритильные радикалы [109] и их ближайшие прекурсоры — соответствующие триарилметанола [110] — являются хиральными молекулами. В обычном состоянии и те, и другие представляют собой рацемическую смесь молекулярных пропеллеров (правовинтовой *M*- и левовинтовой *P*-энантиомеры) с симметрией C<sub>3</sub> в случае одинаковых арильных заместителей. С помощью экспериментов с использованием методов ВЭЖХ на хиральной стационарной фазе [109] и NOESY/EXSY [110] было доказано, что эти энантиомеры медленно переходят друг в друга посредством конфигурационного обменного механизма переворота двух арильных колец. В зависимости от объёма арильных групп, они



обнаруживают различные тенденции к взаимному переходу, и время полуперехода рацемизации при комнатной температуре изменяется от нескольких часов до нескольких лет. Т. о., энантимеры достаточно стабильны, что бы их можно было получать и хранить в замороженном виде месяцы по отдельности. Т. к. тритильные радикалы очень перспективны для биомедицинских диагностических приложений, то их энантиомерная чистота в будущем может иметь огромное значение.

### 1.9. Спиновые метки на основе триарилметильных радикалов.

Стерически экранированные трис-(тетратиаарил)-метильные радикалы (ТАМ), первоначально разработанные компанией Nyscomed Innovation AB для ЯМР-томографии с использованием эффекта Оверхаузера, в последние годы привлекают пристальное внимание исследователей в качестве перспективной для биологических применений альтернативы нитроксильным радикалам (рис. 1.10). Наибольшее значение приобрели так называемый «финляндский тритил» (Finland trityl) (**63a**) и OX63 [111]. Спектры ЭПР этих радикалов представляют собой синглет, очень узкий даже для недеитерированных производных: ширина линии в спектрах составляет около 100 мГс. Ширина линии весьма чувствительна к кислороду: уширение составляет 500 мГс/мМ кислорода и носит обратимый характер [107,112]. При этом концентрационное уширение для этих радикалов составляет всего 10 мГс/мМ. Указанные свойства делают ТАМ превосходными спиновыми зондами для ЭПР-оксиметрии (определение концентрации кислорода, основанное на использовании инструментальной базы и методологии ЭПР). Показана возможность получения трехмерных образов распределения концентрации кислорода с высоким разрешением, в том числе в живых объектах [113,114,115].



**Рисунок 1.10** — Структуры базовых триарилметильных радикалов **63a** и **OX63**, и производных ТАМ **63b-c**.

Другой важной особенностью этих радикалов является относительно высокая устойчивость в живых системах. Так, период полураспада пригодного для применения *in vivo*

радикала Oх63 в почках и в крови по разным данным составляет 12–21 минут [116,117]. При этом скорость гибели уменьшается при понижении концентрации кислорода. Для радикала 63a-d<sub>36</sub>, пердейтерированного по экзоциклическим метильным группам, время полураспада в крови превышает 24 ч [118]. При этом сами по себе в отсутствие кислорода эти радикалы разлагаются довольно медленно. Так для деоксигенированного водного раствора радикала 69a-d<sub>36</sub> период полураспада превышает год [117]. Показано, что причиной гибели ТАМ в живых тканях является реакции со свободными радикалами, в первую очередь, с супероксидным радикалом O<sub>2</sub><sup>-</sup> или протонированного формой последнего – радикалом HO<sub>2</sub> [119,120].

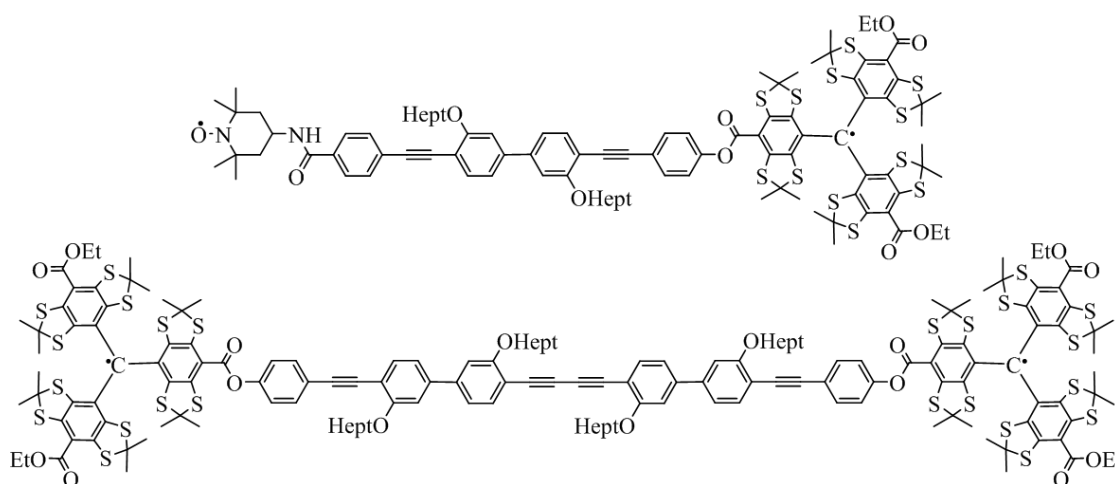
Радикал Oх63 (**70**) малотоксичен, его LD<sub>50</sub> для мышей составляет 8 ммоль/кг. Радикалы «финляндской» серии гораздо токсичнее. Геометрическое строение ТАМ **63** отличается особенностью — ароматические кольца выведены из состояния копланарности с плоскостью, образованной центральным атомом углерода и тремя арильными C<sup>(1)</sup>-атомами [121]. Структуры этого типа, часто называемые молекулярными пропеллерами, отличаются эффективным пространственным экранированием углеродного атома, несущего неспаренный электрон. При этом полярная часть (карбоксилатные группы) находятся на концах лопастей, остальная же часть молекулы липофильна. В связи с этим молекулы Finland ТАМ способны «прилипать» боковой поверхностью к липофильным фрагментам биомолекул и мембран. Например, при добавлении радикала **63a** к 5% раствору человеческого альбумина в буферном растворе, содержащем 0,9% NaCl и 0,05 М фосфатов при pH 7 80% радикала, он оказывается в связанной с альбумином форме. Образование агрегатов, очевидно, является одной из причин токсичности радикалов «финляндской» серии. Введение дендримерных фрагментов в ароматическое кольцо (**63b,c**) повышает устойчивость тритильных радикалов и снижает склонность к агрегации, но приводит к уширению спектральной линии до 0,8 Гс и значительному снижению чувствительности к кислороду [95].

Отметим, что синтез тритильных радикалов намного сложнее по сравнению с нитроксильными радикалами.

ТАМ радикалы отличаются микросекундными временами электронной спиновой релаксации в жидкости при комнатной температуре [122]. Впервые применимость ТАМ радикалов в качестве спиновых меток для измерений расстояний в нанометровом диапазоне при криогенной температуре была показана на примере дважды спин-меченых бирадикалов, содержащих жесткий линкер варьируемой длины. Методами PELDOR и DQC были изучены бирадикалы указанного типа с метками тритил–нитроксил и тритил–тритил (рис. 1.11) [123]. Полученные в этой работе результаты полностью совпадают с ранними исследованиями

аналогичных бирадикалов, содержащих пару нитроксильных спиновых меток, что указывает на то, что размер ТАМ меток не влияет на динамику системы.

Недавние исследования показали, что использование тритильных меток в случае спин-меченого ДНК-дуплекса позволяет достичь большей точности в измерении межспиновых расстояний по сравнению с метками нитроксильного типа. Так замена нитроксильных меток на ТАМ в одном и том же ДНК дуплексе приводит к сужению распределения по расстояниям примерно в 3 раза. Расчеты, выполненные методом молекулярной динамики (МД), подтверждают экспериментальные результаты и показывают большее количество конформационных перестроек нитроксильных меток по сравнению с ТАМ метками. Данный эффект связан с ограничением подвижности ТАМ радикалов, вызванного нековалентным взаимодействием с концевым спаренным основанием дуплекса [124].

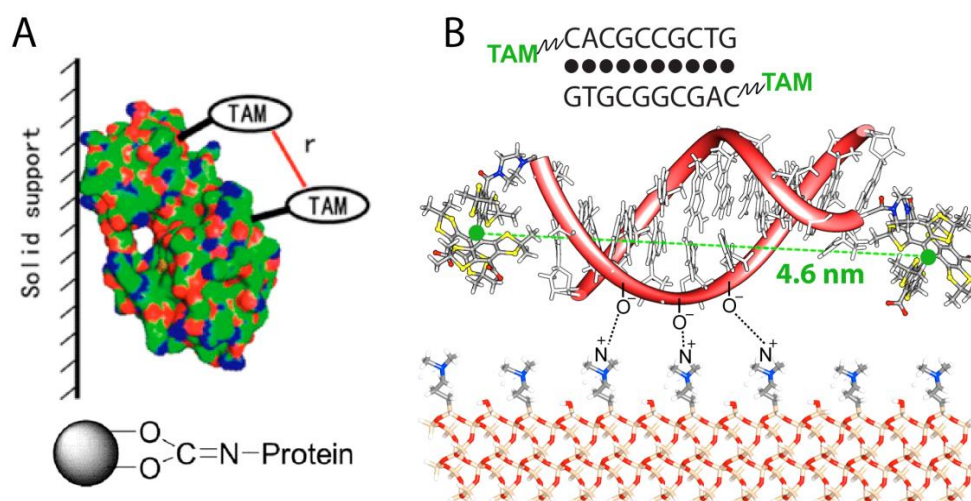


**Рисунок 1.11** — ТАМ-меченые бирадикалы.

Недавно были проведены первые дипольные эксперименты ЭПР при физиологических температурах с использованием ТАМ: при 4 °С в белках [125] и при 37 °С в ДНК-дуплексе [126]. В обоих случаях столь высокие температуры были достигнуты благодаря присущим тритильным меткам высоким значениям времен электронной спиновой фазовой релаксации  $T_m$  и реализованной в обоих исследованиях эффективной иммобилизации исследуемого спин-меченого объекта. В первой работе дважды меченый ТАМ лизоцим Т4 был иммобилизован путем ковалентного присоединения к сефарозе (рис. 1.12А). При этом способе иммобилизации значение  $T_m$  составило 700 нс при 4°С, что позволило впервые добиться измерения межспинового расстояния до 2,5 нм. Во второй работе дважды меченый ТАМ ДНК-дуплекс был адсорбирован на ионообменном сорбенте NucleosilDMA (рисунок 1.12В). Значение  $T_m$  составило 1,4 мкс при 37°С, что позволило измерить с высокой точностью расстояние 4,6 нм. Важным результатом этой работы было

то, что полученные при температуре 37 °С межспиновые расстояния находятся в хорошем соответствии с результатами измерений, проведенных при 80 К.

Как было отмечено выше, большие значения времен  $T_m$  являются принципиально важными для дипольной ЭПР спектроскопии, так как они задают диапазон доступных для измерения расстояний [127,128]. При комнатной температуре для ковалентно присоединенных спиновых меток времена  $T_m$  обычно меньше по сравнению с  $T_m$  для свободного радикала в растворе. Это вызвано ограничением подвижности метки и наличием анизотропных взаимодействий (СТВ- и  $g$ -анизотропии). Недавно было показано, что вклад в механизм  $T_m$  от  $g$ -анизотропии незначителен в низких магнитных полях [122], но становится преобладающим в Q-диапазоне [129]. Это означает, в случае использования ТАМ меток для достижения максимальных значений  $T_m$  при комнатных температурах целесообразно проводить дипольные ЭПР эксперименты в X-диапазоне.



*Рисунок 1.12 — Измерение межспиновых расстояний в ТАМ-меченых мутантных белках и ДНК-дуплексах*

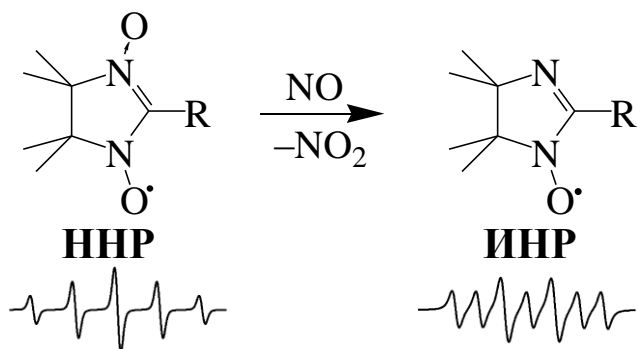
### **1.10. Применение нитрилнитроксильных радикалов как спиновых зондов оксида азота (II)**

Одним из видов НР являются нитрилнитроксильные радикалы, ННР, которые часто используют в исследованиях, связанных с измерением концентрации оксида азота (II), NO. Это приложение важно для биологических исследований, т. к. NO является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. Он представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия вторичный мессенджер в большинстве клеток организма. В частности, оксид азота участвует в реализации многих важных физиологических функций, таких как, регуляция тонуса гладких мышц, снижение агрегации

тромбоцитов, вазодилатация [130], состояние памяти, нейротрансмиссия [131], реакции иммунной системы и т.д., а также некоторых патологических процессов. Важная роль оксида азота в многочисленных биологических процессах в организме явилась основанием для того, чтобы в 1992 г. назвать NO Молекулой Года [132].

В 1980 г. Фурчготт и Завадски впервые описали релаксацию кусочков аорты с интактным эндотелием в ответ на ацетилхолин. Это свидетельствовало о присутствии вещества, выделяемого эндотелиальными клетками и влияющего на миоциты, а также вызывающего расслабление гладкой мускулатуры сосудов [133]. Вещество было названо производимым эндотелием расслабляющим фактором (ПЭРФ). Позже группа Игнаро [134] идентифицировала ПЭРФ как оксид азота (II), продуцируемый эндотелиальными клетками. Это открытие вызвало огромный интерес к NO и побудило учёных провести большое количество исследований на эту тему.

Использование ННР в исследованиях, связанных с NO, основано на том, что они селективно реагируют между собой, образуя иминонитроксильные радикалы, ИНР. При переходе от ННР к ИНР сильно меняется спектр ЭПР: структура ННР из пяти линий с соотношением интенсивностей 1:2:3:2:1 переходит в структуру ИНР из семи линий с соотношением 1:1:2:1:2:1:1 (рисунок 1.13). Это различие позволяет использовать ННР в качестве сенсоров NO в биологических системах, используя, в том числе и ЭПР в качестве метода регистрации [135,136].



**Рисунок 1.13** — Реакция ННР с NO с образованием ИНР и изменением спектра ЭПР.

В ряде работ ННР были применены в качестве зондов NO *in vitro* и *ex vivo*. Например, в [130] в кусочках аорты кролика с помощью ацетилхолина вызывали расслабление гладких мышц, после чего добавляли ННР. Затем измерялся сосудистый тонус, а после измельчения и растворения кусочков — содержание в образце ИНР методом ЭПР. В работе [131] источником оксида азота служила NO-синтетаза, полученная из крысиного мозжечка. Синтез NO индуцировали путём добавления к ней NADPH и аргинина; активность NO-синтетазы измеряли методом ЭПР после добавления в раствор ННР, заключённых в липосомы.

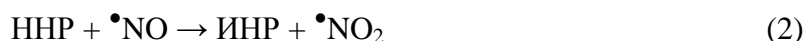
Недостатком этих методов является быстрое восстановление в организме ННР в диамагнитные продукты, не имеющие спектра ЭПР.

Одним из способов защиты ННР от восстановления является встраивание радикалов в липидную фазу. Применение гидрофобных ННР должно обеспечить их надёжное встраивание в липидную фазу фосфолипидных мультислоёв, липосомных и клеточных мембран. Это обеспечит тем самым защиту радикалов от биологических восстановителей, что существенно может повысить эффективность ННР как акцепторов NO. В работе Бобко с соавторами ННР был включён в мультислои из фосфатидилхолина [137]. Добавление цитозоля мозжечка крысы к такому образцу ННР не сопровождалось изменением спектра ЭПР в течение нескольких часов, в то время как спектр ЭПР для того же ННР в растворе в присутствии цитозоля не удавалось записать из-за быстрого восстановления радикала. Т. о., мембранный барьер значительно ограничивает доступность гидрофобных ННР для биологических восстановителей и существенно снижает скорость их восстановления. Полученные данные указывают на перспективность использования гидрофобных ННР, способных встраиваться в мультислои, для увеличения эффективности детектирования NO и продления срока действия ННР в качестве антагонистов оксида азота *in vitro* и *in vivo*.

Физиологические эффекты действия ННР нельзя просто объяснить их радикал-радикальной реакцией с оксидом азота, т. к. ННР быстро восстанавливаются в соответствующие гидросиламины (ННР-Г). Тем не менее, было показано, что образуется более чем 18% восстановленной формы ИНР, гидросиламина ИНР-Г, при внутривенном введении ННР крысам. В этом свете особенно важным становится изучение механизма реакции оксида азота с его восстановленной формой (ННР-Г). В работе Бобко с соавторами был исследован механизм реакции между нитронилнитроксильными радикалами и оксидом азота в восстановительной среде [138]. Было обнаружено, что ННР в восстановительной среде реагируют с оксидом азота с образованием ИНР-гидросиламина. Было выдвинуто две гипотезы:

- (а) оксид азота реагирует с ННР-Г с образованием ИНР-Г;
- (б) ННР-Г окисляется в радикал ННР, который под действием NO превращается в ИНР. ИНР, в свою очередь, восстанавливается в гидросиламин ИНР-Г.

Применение метода ЯМР позволило доказать, что при генерации NO в присутствии аскорбиновой кислоты происходит окисление гидросиламина ННР в радикал ННР, который в свою очередь реагирует с оксидом азота с образованием ИНР, а в присутствии аскорбиновой кислоты как радикал ННР, так и радикал ИНР восстанавливаются до соответствующих гидросиламинов. Была предложена следующая схема реакций, хорошо объясняющая полученные данные:



(Здесь ННР — нитронилнитроксильный радикал; ИНР — иминонитроксильный радикал; ННР-Г, ИНР-Г — соответствующие ННР и ИНР гидроксиламины, соответственно. Red/Ox — пара восстановитель/окислитель.)

Суммарная реакция (5) описывает экспериментально наблюдаемое накопление гидроксиламина ИНР-Г при взаимодействии гидроксиламина ННР-Г с NO в присутствии восстановителя (в окислительно-восстановительной парой Red/Ox<sup>•</sup> является аскорбиновая кислота/радикал аскорбата). Равновесие в реакции (1) в восстановительной среде сильно сдвинуто в правую сторону, при этом спектр ЭПР ННР не наблюдается в присутствии избытка восстановителя или в гомогенатах тканей. Реакции (3) и (4) показывают механизм накопления радикала ННР до стационарной концентрации, которую можно детектировать методом ЭПР при высоких скоростях генерации оксида азота. С другой стороны, ННР подвергается восстановлению в реакции (1) или реагирует с NO (2). Т. о., накопленное количество продукта реакции, ИНР-Г, прямо пропорционально генерируемому количеству NO и обратно пропорционально концентрации аскорбиновой кислоты. Выше приведённая схема реакций даёт правдоподобное объяснение антагонистического действия ННР относительно NO в биологических системах.

В дальнейшем эти результаты позволили авторам разработать метод регистрации оксида азота в биологических системах, основанный на использовании фторзамещённых ННР как спиновых ловушек на оксид азота, и метода регистрации <sup>19</sup>F ЯМР [139,140]. Суть метода основана на специфической реакции оксида азота с ННР с образованием ИНР, но т. к. эти соединения быстро восстанавливаются в биологической системе в диамагнитные соединения, то регистрация продукта реакции и исходного соединения осуществлялась с помощью <sup>19</sup>F-ЯМР спектроскопии. Для изучения скорости генерации оксида азота *ex vivo* были выбраны три различные линии крыс: Две из них — ISIAN и OXYS — линии крыс с гипертензией различного происхождения. Было предположено, что повышенное давление крови этих крыс обусловлено меньшей стационарной концентрацией оксида азота. Крысы линии Wistar (линия крыс с нормальным давлением) были выбраны как контроль [138]. Для определения количества генерируемого оксида азота, крысам внутрибрюшинно вводился фторзамещённый ННР (0,2 мг/г живого веса). Через один час производили забор крови и

записывали спектры  $^{19}\text{F}$ -ЯМР. Соотношение концентраций ННР/ИНР, представляющее фракцию спиновой ловушки, прореагировавшей с оксидом азота, существенно выше в крови крыс линии Wistar по сравнению с линиями OXYS и ISIAN. В то же самое время разница в соотношении концентраций ННР/ИНР не наблюдалась для крыс линии OXYS и ISIAN. Т. о., был сделан вывод о связи между врождённой гипертензией у крыс линии OXYS и ISIAN и недостатком оксида азота в организмах животных. Полученные в этой работе результаты показывают возможность применения данного метода при определении оксида азота в организмах млекопитающих *in vivo*. Одним из важных недостатков метода является высокая токсичность использованных радикалов и их низкая растворимость в воде. Кроме того, одним из препятствий применения радикалов *in vivo* может являться взаимодействие с супероксидным радикалом, который неизбежно образуется в организмах с гипертензией [141,142].

### 1.11. Постановка задачи

В связи с широким применением нитроксильных и тритильных радикалов в качестве спиновых зондов для оксиметрии, для измерения рН среды и в качестве спиновых меток для исследования структуры и функций белков в настоящее время в Новосибирском институте органической химии, а также в Международном томографическом центре проводится синтез новых нитроксильных и тритильных радикалов с улучшенными функциональными свойствами. Исследования магнитно-резонансных и функциональных свойств серии новых НР и ТАМ с применением методов стационарной и импульсной ЭПР-спектроскопии и ЭПР томографии и являлось главной задачей настоящей диссертации.

Недавно Е. Ю. Фурсовой с соавторами были синтезированы новые высоко растворимые в воде и низкотоксичные ННР, и было предложено использовать их в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии [143,144]. Однако ранее было показано, что скорость восстановления ННР с другими заместителями аскорбиновой кислотой довольно высока. В связи с этим оставался вопрос о том, чем обусловлена возможность их применения в качестве контрастных реагентов (их повышенной стабильностью по сравнению с другими ННР, или же другими особенностями проведенных экспериментов), например, высокой концентрацией, растворимостью в воде или локализацией в областях организма с пониженной концентрацией восстанавливающих агентов. В настоящей работе эти радикалы были исследованы на предмет возможности их использования в качестве сенсоров оксида азота в ЭПР-томографии. Соответственно были поставлены следующие задачи:



— исследовать устойчивость ННР и ИНР к восстановлению в модельной системе (восстановление аскорбиновой кислотой), цельной крови и *in vivo*;

— исследовать фармакокинетику ННР в организме животных;

— изучить распределение NO в организме с помощью ННР методом ЭПР-томографии;

— ответить на вопрос, можно ли применять ННР для получения информации о локализации оксида азота в живых организмах.

Как обсуждалось выше, заключение нитроксильных радикалов в супрамолекулы (циклодекстрины, эмульсии, полисомы и т.д.) может приводить к улучшению функциональных свойств нитроксильных радикалов. В настоящей работе была поставлена задача использования такого подхода для улучшения функциональных свойств нитронилнитроксильных радикалов. Для этого было необходимо:

— исследовать влияние циклодекстрина на стабильность нитронилнитроксильных радикалов.

У большинства широко используемых в настоящее время нитроксильных радикалов группировка N–O экранирована метильными заместителями при  $\alpha$ -атоме углерода. Было показано, что замещение метильных групп на спироциклические значительно улучшает функциональные свойства радикалов и их стабильность. В частности, обнаружено, что 2,6-спироциклогексилзамещённые нитроксильные радикалы пиперидинового ряда имеют значительное преимущество перед 2,2,6,6-тетраметилзамещёнными аналогами при исследованиях структуры биополимеров методом SDSL ЭПР в высоких магнитных полях. Они обладают такими релаксационными свойствами, что исследования с помощью ЭПР можно проводить при температурах жидкого азота и даже при комнатных температурах.

Также хорошо известно, что пирролиновые и пирролидиновые нитроксильные радикалы с пятичленным остовом гораздо стабильнее по отношению к восстановлению по сравнению с пиперидиновыми производными. Однако до сих пор пятичленные спироциклогексилзамещённые радикалы не были исследованы как спиновые метки для измерений расстояний. Недавно в лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН под руководством к. х. н. И. А. Кирилюка была синтезирована серия пирролиновых и пирролидиновых 2,5-спироциклогексилзамещённых нитроксильных радикалов (рисунок 2.2). В настоящей работе эти радикалы исследовались для их возможного будущего использования в качестве спиновых меток для измерения расстояний в биополимерах методом PELDOR. Соответственно, были поставлены следующие задачи:

— измерить константы восстановления аскорбиновой кислотой для оценки устойчивости радикалов;

— измерить их способность проникать в клетки для оценки применения во внутри- или межклеточных измерениях;

— измерить скорости спин-спиновой и спин-решёточной релаксации при локализации этих радикалов в трегалозе при комнатной температуре.

Как было отмечено выше, сложноэфирные тритильные радикалы и их ближайшие прекурсоры могут быть эффективными внутриклеточными оксиметрическими ЭПР-зондами. Ранее группа Цвайера провела исследование [98] двух ТАМ, недеитерированных аналогов dAMT-2 и dAMT-3 (см. рис. 3.1 и табл. 3.1), как средств доставки оксиметрических зондов в клетки. Идея заключалась в том, что недеитерированные аналоги dAMT-2 и dAMT-3 обладают липофильностью, достаточной для прохождения через клеточную мембрану. Внутри клетки эти радикалы гидролизуются до трикарбокситритильного радикала, недеитерированного аналога dCT, линия которого уже, следовательно, он более чувствителен к кислороду. Поэтому, чтобы увеличить чувствительность этих оксиметрических зондов, группа металлокомплексного катализа НИОХ СО РАН под руководством к. х. н. В. М. Тормышева синтезировала дейтерированные ТАМ dAMT-1–3, которые могут оказаться перспективными оксиметрическими зондами для внутриклеточных измерений. Кроме того, были синтезированы ТАМ с морфолиновой группой, которые могли бы использоваться в качестве бифункциональных зондов на рН и кислород. Для выводов о применимости таких радикалов необходимо было провести магнитно-резонансные измерения. Для этого были поставлены следующие задачи:

— измерить ширину линии ЭПР ряда ТАМ радикалов при нормальных давлениях кислорода и при высоком вакууме;

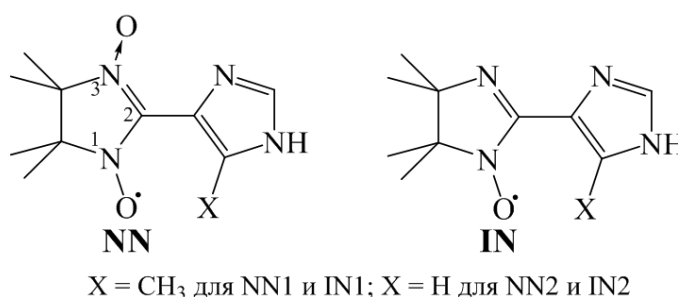
— исследовать зависимость спектра ЭПР ТАМ с морфолиновой группой от рН, и исследовать возможность применения этого радикала в качестве рН-чувствительного спинового зонда;

— исследовать реакцию сольволиза ТАМ в органических средах и буферных растворах при различных значениях рН среды.

## Глава 2. Исследование возможности применения нитронилнитроксильных радикалов в качестве спиновых зондов в ЭПР-томографии *in vivo*

### 2.1. Введение

Нитронилнитроксильные радикалы впервые были синтезированы группой Уллмана в 1960-х годах [145] и нашли широкое применение в качестве строительных блоков в магнитно-активных материалах [146] и как спиновые зонды на оксид азота [135,147]. В последнем случае при исследовании биологических систем проблемой является их плохая растворимость в водных растворах. В 2005 году Е. Ю. Фурсовой с соавторами были синтезированы новые гидрофильные нитронилнитроксильные радикалы (ННР), 2-(5-метил-1Н-имидазол-4-ил)-4,4,5,5-тетраметил-4,5-дигидроимидазол-3-оксид-1-оксил (NN1) и 2-(1Н-имидазол-4-ил)-4,4,5,5-тетраметил-4,5-дигидроимидазол-3-оксид-1-оксил (NN2) (рис. 2.1) [143]. Поскольку эти радикалы обладают высокой растворимостью в воде и низкой токсичностью, авторы предложили использовать их в качестве контрастных реагентов для магнитно-резонансной томографии [144].



**Рисунок 2.1** — Структура нитронилнитроксильных радикалов (ННР) NN1 и NN2 и соответствующих иминонитроксильных радикалов (ИНР) IN1 и IN2. На примере NN показана нумерация атомов в имидазольном кольце.

Ранее в работах [135,136] было показано, что константы скорости восстановления ННР (например, близкого по структуре к NN1 и NN2 2-фенил-4,4,5,5-тетраметил-4,5-дигидроимидазол-3-оксид-1-оксила) аскорбиновой кислотой и другими биологически значимыми восстановителями лежат в диапазоне величин  $10^3$ – $10^4$  М<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>. Очевидно, что высокая скорость восстановления радикалов должна приводить к быстрому превращению их в диамагнитные гидроксилламины, не являющиеся релаксантами, и таким образом к невозможности их применения в живых системах в качестве контрастных реагентов.

Как говорилось в разделе 1.4, одним из путей защитить нитроксильный радикал от влияния восстановителей является его модификация циклодекстрином (ЦД) путем

ковалентного связывания. Прежде всего, такое приложение является многообещающим, т. к. возможно одновременно функционализировать как ЦД, так и радикал. Обсуждалось также, что спин-меченые ЦД, связанные с нитроксильными радикалами гибким линкером, обладают динамическим равновесием между разными структурными конформациями. Радикал может находиться снаружи полости ЦД, может прикрывать ее или быть глубоко погруженным в нее (подробнее см. раздел 1.4 и рис. 1.2). Доказано, что аддукты с глубоко погруженным в полость радикалом обладают большим временем жизни по сравнению со свободными аддуктами (см. раздел 1.4). Из-за растущего интереса к спиновым производным ЦД мы изучили спин-меченый ЦД с новым типом метки, нитронилнитроксильным радикалом, который ранее никогда не использовался.

Как уже было отмечено в литературном обзоре, вследствие селективной реакции с оксидом азота, приводящей к образованию иминонитроксильных радикалов (ИНР) и имеющих отличный от ННР спектр ЭПР, ННР могут применяться в качестве спиновых зондов на оксид азота. В работах [143,144], было показано, что проблемой их применения в живых системах является их низкая растворимость в воде и крови. Поскольку ННР, синтезированные в работах Фурсовой с соавторами являются гидрофильными и низкотоксичными [143,148,149], можно предположить, что их можно использовать как спиновые зонды для ЭПР-томографии *in vivo*. Кроме того, ковалентное связывание ННР с ЦД могло бы повысить стабильность радикалов.

Таким образом, целью этой главы диссертации было:

— определение стабильности **NN1**, **NN2** и **IN1**, **IN2** по отношению к аскорбиновой кислоте, как наиболее распространенному биогенному восстановителю, в крови животных, а также в элементах крови — плазме и эритроцитах;

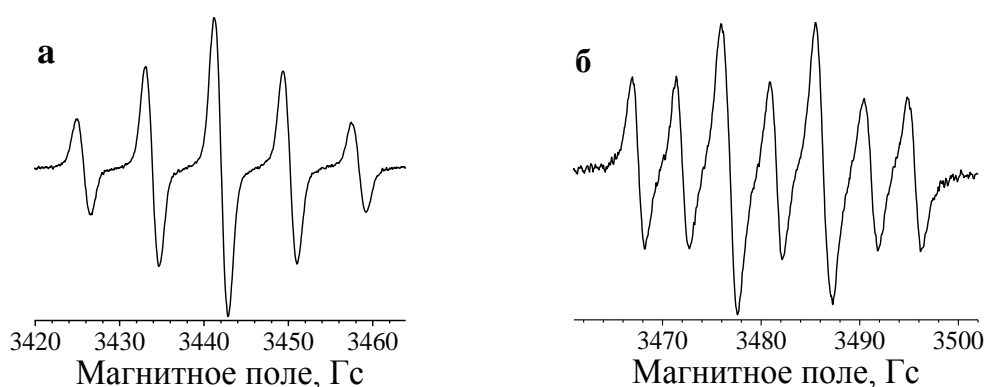
— исследование возможности применения ННР **NN1** и **NN2** в качестве спиновых зондов оксида азота (II) NO;

— исследовать влияние ЦД, ковалентно связанного с нитронилнитроксильным радикалом (аддукт **NN-CD**, см. структуру на рис. 2.11)

Для решения поставленных задач были применены метод ЭПР-спектроскопии, а также ЭПР-томографии в L-диапазоне (~1 ГГц).

## 2.2. Определение магнитно-резонансных параметров

На рисунке 2.2 приведены спектры ЭПР радикалов **NN1** и **NN2** в натрий-фосфатном буферном растворе при pH 7,2, а соответствующие константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ) и g-факторы приведены в таблице 2.1. Полученные значения магнитно-резонансных параметров близки к имеющимся в литературе для ННР с другими заместителями. Значения констант СТВ слабо зависят от бокового заместителя во втором положении дигидроимидазольного кольца: для имидазольного производного **NN1**  $a_{N1} = a_{N3} = 8,07$  Гс; для фенильного производного  $a_{N1} = a_{N3} = 8,05$  Гс [150]. Ширина линий в спектре равна 1,6 Гс, что обусловлено уширением за счет имеющегося в растворе кислорода. Эксперименты проводились при естественных условиях.



**Рисунок 2.2** — ЭПР-спектры **NN1** (а) и **IN1** (б). Константы СТВ и g-факторы приведены в Таблице 2.1.

**Таблица 2.1** — Константы СТВ, g-факторы нитроксильных радикалов, а также их константы скорости восстановления аскорбатом. Данные показаны как среднее со стандартным отклонением. Для каждого радикала усреднение проводилось по трем измерениям.

Соединение	g-фактор	Константа СТВ (атом азота), Гс	$k_1, 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	$k_2, 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
<b>NN1</b>	$2,0068 \pm 0,0003$	$8,07 \pm 0,04$ (1, 3)	$1,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,5$
<b>NN2</b>	$2,0065 \pm 0,0002$	$8,18 \pm 0,04$ (1, 3)	$1,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,5$
<b>IN1</b>	$2,0065 \pm 0,0002$	$9,55 \pm 0,04$ (1) $4,49 \pm 0,03$ (3)	—	—
<b>IN2</b>	$2,0061 \pm 0,0002$	$9,97 \pm 0,04$ (1) $4,42 \pm 0,03$ (3)	—	—

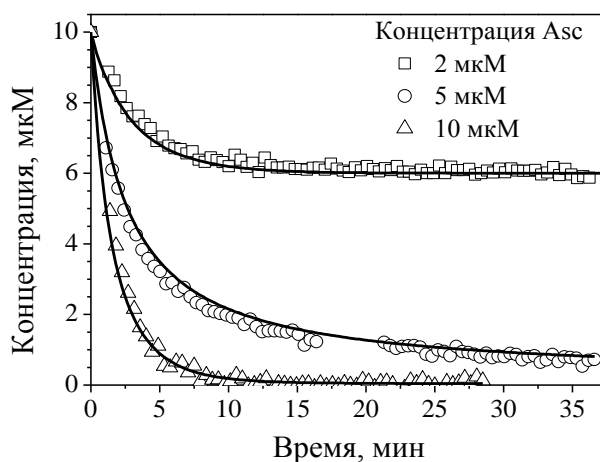
## 2.3. Восстановление радикалов аскорбатом

Для получения константы скорости восстановления нитроксильных радикалов **NN1** и **NN2** аскорбиновой кислотой методом ЭПР были измерены кинетики гибели радикалов при различных концентрациях аскорбиновой кислоты (рис. 2.3). Кинетические кривые были получены путем двукратного интегрирования сигнала последовательно записанных спектров

ЭПР. Моделирование кинетических зависимостей проводилась в соответствии со схемой реакций (см. раздел 1.2 и [23]):



где ННР — нитронилнитроксильный радикал, АК — аскорбиновая кислота, ГА — гидроксилламин ННР, АР — радикал аскорбата, ДГА — дегидроаскорбиновая кислота, ДКГ — 2,3-дикетогулоновая кислота, Пр — продукты окисления ДКГ. При моделировании были использованы следующие значения констант скорости из [23]:  $k_3 = 2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ ,  $k_{-3} = 1,1 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  и  $k_4 = 7 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ . Было сделано предположение, что константы скорости реакций, обратных (1) и (2),  $k_{-1}$  и  $k_{-2}$ , значительно меньше, чем для прямых реакций восстановления,  $k_1$  и  $k_2$ . Действительно, экспоненциальный характер экспериментально наблюдаемой кинетики гибели радикалов позволяет пренебречь обратимостью восстановления. Константы скорости восстановления ННР, полученные при моделировании, приведены в таблице 2.1.



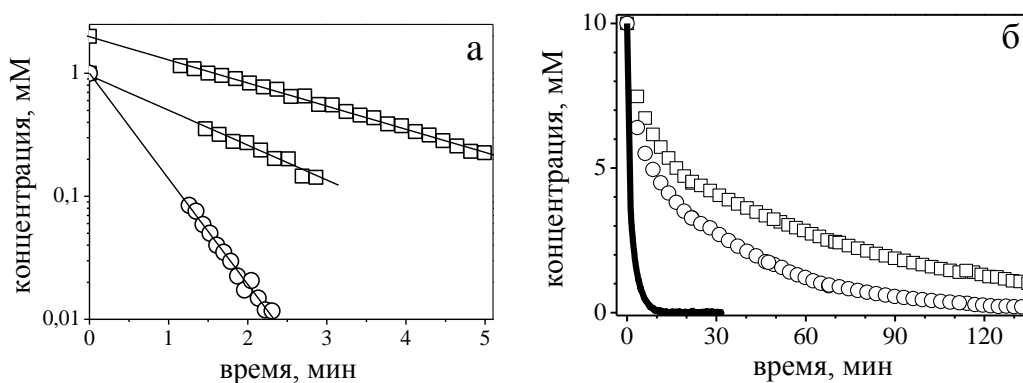
**Рисунок 2.3** — Кинетические кривые восстановления 10 мкМ NN1 аскорбиновой кислотой (Asc) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,95), содержащем 0,1 мМ DTPA (для исключения влияния металлов, см. раздел 5.3) при разных концентрациях Asc: 2 (□), 5 (○) и 10 мкМ (△). Сплошные линии соответствуют расчету с использованием следующих констант:  $k_1 = (1,2 \pm 0,1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для NN1;  $k_2 = (1,4 \pm 0,1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для NN2. Значения представлены в виде среднего со стандартным отклонением.

Следует отметить, что значения констант скорости восстановления NN1 и NN2 близки к значениям, которые известны в литературе для других нитронилнитроксильных радикалов,

$10^3$ – $10^4$   $M^{-1} \cdot c^{-1}$  [135,136,138]. Таким образом, радикалы **NN1** и **NN2** не обладают высокой стабильностью по сравнению с другими нитронилнитроксильными радикалами.

#### 2.4. Восстановление радикалов в крови крыс и ее компонентах

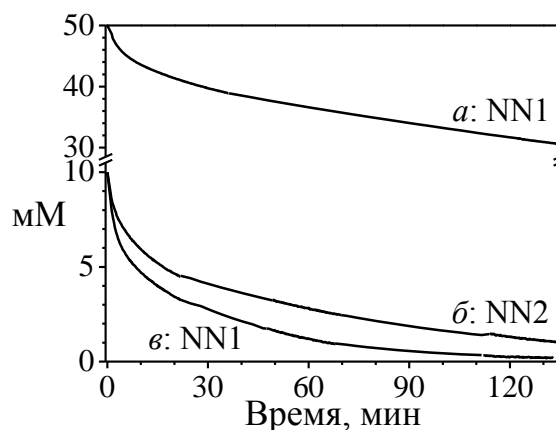
Нами были проведены эксперименты по исследованию стабильности ННР в цельной крови крыс в концентрациях до 50 мМ, которая равна 10% от летальной дозы данных радикалов [143], а также в ее компонентах. При малых начальных концентрациях ННР, 1–2 мМ, наблюдается экспоненциальное уменьшение концентрации радикала (рис. 2.4а). Кинетики разложения моноэкспоненциальны с наблюдаемой константой скорости для **NN1**  $k_{obs} = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3} c^{-1}$  и для **NN2**  $k_{obs} = (32,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} c^{-1}$  (величины даны со стандартным отклонением). Если предположить, что восстановление ННР в крови обусловлено преимущественно аскорбиновой кислотой, а вклад других компонентов пренебрежимо мал, то можно оценить концентрацию ASC в крови как 8 мкМ для **NN1** и 24 мкМ для **NN2** (рассчитано с учетом констант скорости  $k_1$  (см. раздел 2.3) и соответствующей  $k_{obs}$ ). Отметим, что эти величины сопоставимы с имеющимися в литературе: так средний уровень аскорбата в цельной крови самок беспородных крыс составляет 19,9 мкМ, или 3,5 мг/л [151].



**Рисунок 2.4** — Кинетики разложения **NN1** ( $\square$ ), **NN2** ( $\circ$ ) и **IN1** (жирная сплошная кривая на рисунке б) в крови крыс при разных начальных концентрациях нитроксильных радикалов: (а, экспоненциальная шкала) 1–2 мМ и (б, линейная шкала) 10 мМ. Сплошные прямые на рисунке б соответствуют чисто экспоненциальному спаду.

При концентрациях радикала более 10 мМ (рис. 2.4б) кинетика разложения во времени содержит быструю и медленную компоненту. Такой характер кинетики может быть обусловлен разными скоростями восстановления ННР различными компонентами в составе крови. Кроме того, основные восстанавливающие агенты содержатся в клетках, а вследствие высокой гидрофильности ННР время проникновения их в клетки может быть длительным. В случае начальной концентрации ННР 10 мМ параметр спада экспоненты кинетики разложения ННР составил более одного часа. При более высоких концентрациях

наблюдается быстрый спад кинетики 10 мМ ННР а затем медленный спад с типичным временем в несколько часов. Точные измерения разложения были ограничены образованием тромбов и последующим свертыванием крови, что наблюдается примерно через два часа при комнатной температуре после добавления ННР.



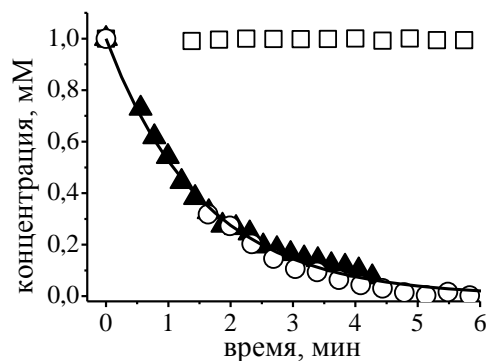
**Рисунок 2.5** — Кинетики восстановления 50 (а) и 10 мМ (в) радикала **NN1** и 10 мМ **NN2** (б) в цельной крови крысы.

Так же как и в случае восстановления аскорбиновой кислотой, наблюдаемая кинетика гибели радикала **NN2** в цельной крови короче, чем для радикала **NN1**.

Таким образом, проведенные результаты показывают, что в случае применения высоких концентраций **NN1** и **NN2** можно проводить эксперименты по исследованию распределения спиновых зондов методом ЭПР-томографии *in vivo* в течение нескольких часов. Однако, измеренные кинетики восстановления иминонитроксильных радикалов **IN1** и **IN2**, показали, что ИНР восстанавливаются, по крайней мере, в 20 раз быстрее в тех же условиях (сплошная кривая на рис. 2.4б). Этот факт может оказаться препятствием для применения этих ННР в качестве спиновых зондов на оксид азота.

На рисунке 2.6 представлены кинетические кривые разложения **NN1** в различных компонентах крови крысы (детали проведения эксперимента приведены в разделе 5.9.3). В плазме крови сигнал ЭПР оставался неизменным в течение одного часа, тогда как в эритроцитах кинетика уменьшения сигнала ЭПР была экспоненциальна с наблюдаемой константой скорости  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Учитывая четырехкратное разбавление фракции эритроцитов, можно сделать вывод о том, что скорости восстановления ННР равна значению в цельной крови ( $k_{\text{obs}} = (9 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ) в пределах погрешности этого эксперимента.





**Рисунок 2.6** — Кинетики разложения **NN1** в разных компонентах крови крыс при начальной концентрации нитроксильного радикала 1 мМ: в плазме (□), в эритроцитах (○) и в цельной крови (▲). Кинетика в эритроцитах нормализована в соответствии с четырехкратным разбавлением в процессе приготовления. Сплошной линией обозначено наилучшее экспоненциальное моделирование кинетики в эритроцитах.

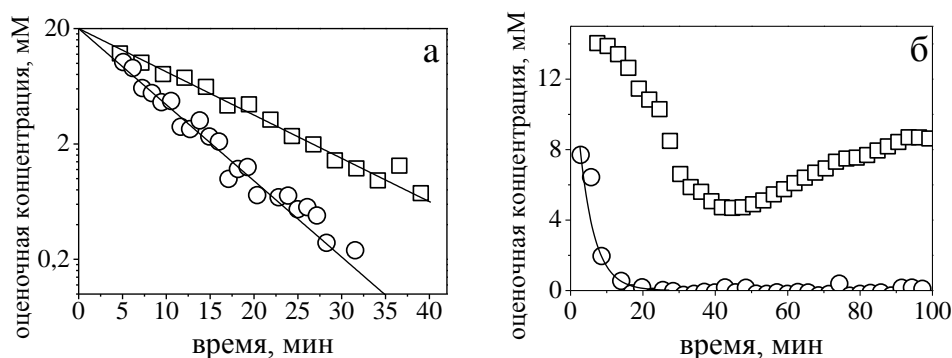
Эти результаты хорошо согласуются с проведёнными нами измерениями коэффициента распределения радикала **NN1** в смеси октанол — вода 1:1 (см. раздел 5.2). Найдено, что коэффициент распределения — отношение концентрации в фазе октанола к концентрации в водной фазе — равен 0,85. Таким образом, **NN1** является амфифильным соединением и способен проникать через мембрану, а восстановление ННР в крови крыс происходит внутри клеток эритроцитов, но не в плазме (см. рис. 2.6).

Таким образом, можно заключить: учитывая низкую токсичность **NN1** и **NN2**, несмотря на большие скорости восстановления радикалов аскорбиновой кислотой и *in vitro*, можно использовать большие концентрации радикалов для нивелирования негативного эффекта их разложения в биологических условиях для проведения экспериментов по ЭПР томографии. Однако необходимо иметь в виду, что возможность использования таких высоких концентраций ННР обусловлена не их высокой стабильностью, а отсутствием таких высокой концентрации биогенных восстановителей в крови и тканях. Можно предполагать, что введение большой концентрации ННР может приводить к существенным изменениям в составе различных компонентов крови. Низкая токсичность обусловлена их гидрофильностью и быстрым выведением в мочевой пузырь.

## 2.5. ЭПР-томография мышей с применением в качестве спинного зонда ННР *in vivo*

Для исследования распределения **NN1** и **IN1** в теле живой мыши был использован метод ЭПР-томографии в L-диапазоне. Было использовано два различных способа введения радикала в организм мыши — внутрибрюшинное (ВБ) и внутривенное (ВВ). В случае ВВ введения сигнал ЭПР нитроксильного радикала измеряли в области брюшинной полости, где

радикал перераспределяется после введения (рис. 2.7а), или мочевого пузыря (рис. 2.7б), куда он выводится в процессе метаболизма. Соответствующие значения наблюдаемых констант скорости реакции первого порядка оказались равными:  $k_{\text{obs}} = (6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  для **NN1**,  $k_{\text{obs}} = (11 \pm 1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  в области брюшины и  $k_{\text{obs}} = (4 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  в области мочевого пузыря для **IN1** (величины даны со стандартным отклонением). Для **NN1** кинетическая кривая в мочевом пузыре имела сложный неэкспоненциальный характер (рис. 2.7б) из-за его одновременного разложения и накопления.



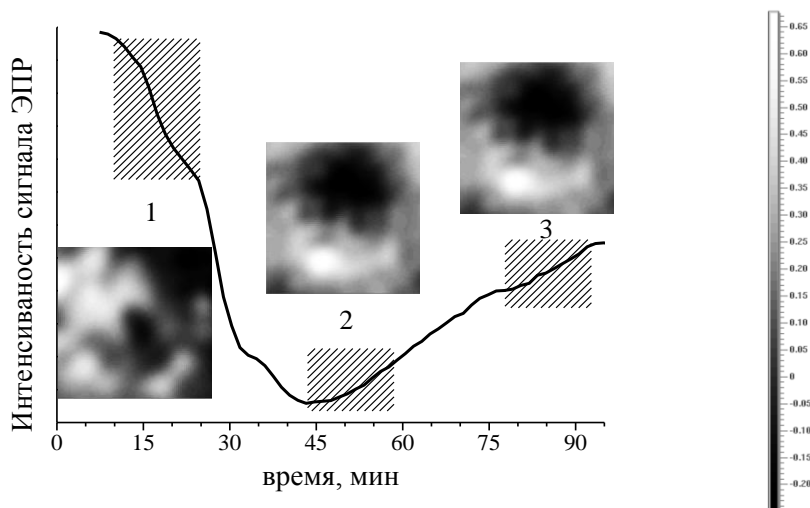
**Рисунок 2.7** — (а) Кинетика сигнала ЭПР **NN1** ( $\square$ ) и **IN1** ( $\circ$ ) при введении внутрибрюшинно. Сигнал записан в области брюшины. Концентрация приведена в логарифмической шкале. Начальные концентрации составили примерно 20 мМ (при калибровке на внешний сигнал ННР). (б) Кинетики сигнала ЭПР **NN1** ( $\square$ ) и **IN1** ( $\circ$ ) при введении внутрибрюшинно. Сигнал записан в области мочевого пузыря. Начальные концентрации составили примерно 14 мМ.

Скорость восстановления введенного внутрибрюшинно **IN1** (рис. 2.7б) оказалась намного быстрее скорости восстановления **NN1** в соответствии с измеренными кинетиками этих радикалов в крови, (см. рис. 2.4). Таким образом, ИНР являются крайне нестабильными в биологических системах *in vivo*, так как быстро восстанавливается даже при высоких начальных концентрациях. Нам не удалось наблюдать накопления **IN1** в мочевом пузыре, что свидетельствует о его быстром восстановлении в диамагнитный гидроксилламин. В то же время, несмотря на восстановление (рис. 2.7а), **NN1** накапливается в мочевом пузыре (рис. 2.7б).

При внутривенном введении **NN1** и **NN2** (оцениваемые начальные концентрации — 14–20 мМ) наблюдается рост сигнала в области мочевого пузыря (рис. 2.8а), с максимумом концентрации **NN1** примерно через 1,5 ч после введения. В тех же условиях эксперименты с **IN1** и **IN2** в качестве спиновых зондов не привели к наблюдению какого-либо сигнала ЭПР. Эти данные свидетельствуют о более быстром восстановлении **IN1** и **IN2** в случае внутривенного введения по сравнению с внутрибрюшинным введением.

Томографические изображения, полученные в трех точках после внутрибрюшинного введения **NN1**, показаны на рис. 2.8. Время, необходимое для записи каждого изображения,

обозначено заштрихованными прямоугольниками. Можно отметить, что в начале радикал **NN1** равномерно распределен в области брюшины (выше мочевого пузыря), а затем постепенно локализуется. Сигнал ЭПР в области мочевого пузыря имеет наибольшую интенсивность на изображении, тогда как сигнал ЭПР других частей тела мыши был нулевым. Таким образом, радикалы локализируются в мочевом пузыре.

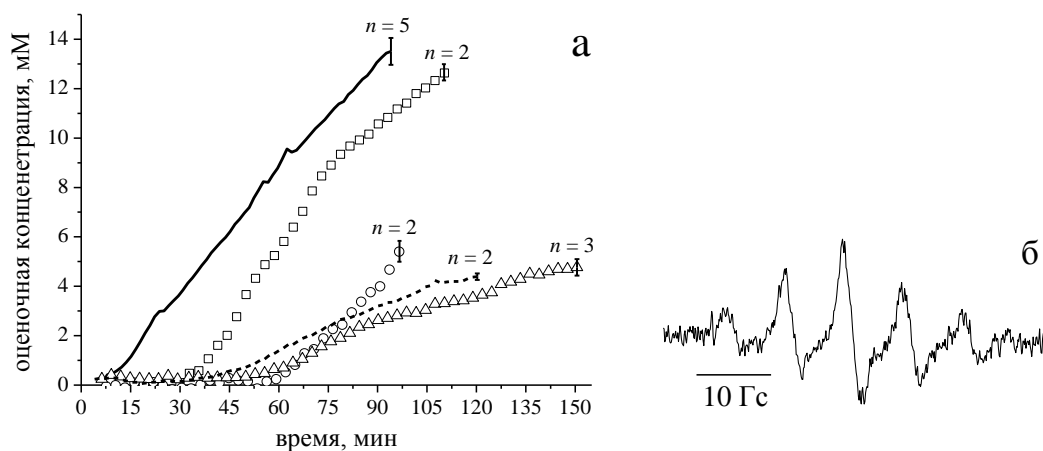


**Рисунок 2.8** — Интенсивность сигнала ЭПР (сплошная линия), измеренная в области мочевого пузыря мыши при разных временах после внутрибрюшинного введения **NN1** (во вставках — соответствующие изображения ЭПР-томографии). Заштрихованные прямоугольники (1), (2) и (3) обозначают промежутки времени, в течение которых были записаны соответствующие изображения. Справа показана палитра интенсивности сигнала ЭПР на томографических изображениях. Черный и темно-серый цвета отвечают шуму.

## 2.6. Влияние оксида азота (II) на фармакокинетику **NN1**

Для исследования возможности применения **NN1** *in vivo* в качестве зондов оксида азота (II) были проведены эксперименты по ЭПР-томографии в комплексе с моделированием увеличенного производства биогенного NO в сравнении с контролем. Для обеспечения выработки оксида азота в кровеносных сосудах, мыши под язык вводили нитроглицерин до или после внутривенного введения ННР в дозе 0,83 мг/кг. Сигнал ЭПР регистрировался в области мочевого пузыря. Нами также был применен другой способ создания повышенной концентрации оксида азота в организме: с помощью липополисахарида (ЛПС). ЛПС является препаратом, который индуцирует производство NO путем усиления экспрессии NO-синтазой (iNOS). ЛПС вводили ВБ за четыре часа до введения **NN1**, потому что ЛПС вызывает продолжительный систематический воспалительный процесс, приводящий к увеличенной выработке NO. Сравнение кинетических кривых сигнала ЭПР **NN1** в присутствии и

отсутствию нитроглицерина изображено на рис. 2.9а. К сожалению, нам не удалось зарегистрировать спектр **IN1** ни после введения нитроглицерина, ни после ЛПС. Был зарегистрирован только сигнал **NN1** (рис. 2.9б).

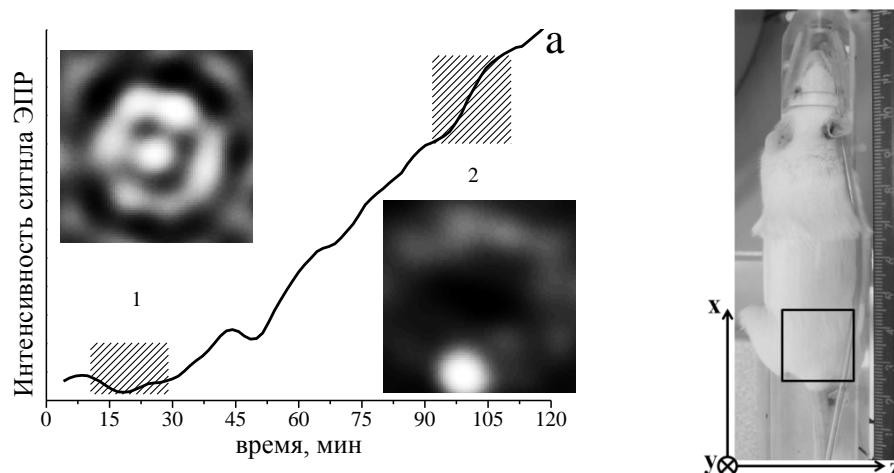


**Рисунок 2.9** — (а) Фармакокинетики введенного внутривенно **NN1**, записанные в области мочевого пузыря мыши при различных методах увеличения генерации **NO** по сравнению с контролем. Контрольный эксперимент показан черной сплошной линией. Условия экспериментов: нитроглицерин ввели за три минуты до введения радикала ( $\square$ ), нитроглицерин ввели через одну минуту ( $\circ$ ) и 0,5 минут ( $\Delta$ ) после введения радикала, ЛПС ввели за четыре часа до введения радикала (штрихованная линия). Буква *n* отвечает количеству мышей, использованных в данном эксперименте; также показаны соответствующие стандартные отклонения. (б) Типичный спектр ЭПР, записанный в области мочевого пузыря в течение любого из экспериментов. Он отвечает спектру **NN1** без какого-либо вклада **IN1**.

Как известно, нитроглицерин в живом организме очень быстро разлагается и его время жизни составляет менее 10 мин [152]. Таким образом, введение нитроглицерина за три минуты *до* внутривенного введения **NN1** не влияет на скорость накопления радикала в мочевом пузыре и его предельную концентрацию. Отметим, что в кинетике накопления **NN1** наблюдается временная задержка примерно в 25–30 минут. Скорее всего, это связано с тем, что нитроглицерин приводит к временному расслаблению сосудов и замедлению кровотока.

Введение нитроглицерина *после* внутривенного введения **NN1** очень сильно влияет на его фармакокинетику: наблюдается большая задержка (ок. 45 мин) появления сигнала ЭПР **NN1** в мочевом пузыре мыши, а также существенное уменьшение предельной концентрации **NN1** в 2–2,5 раза.

В случае выработки NO путем использования ЛПС наблюдаются аналогичный эффект (см. рис. 2.9а и 2.10а). Результаты ЭПР-томографии свидетельствуют о выведении **NN1** в мочевой пузырь.



**Рисунок 2.10** — (а) Интегральная интенсивность сигнала ЭПР (сплошная кривая), измеренная в области мочевого пузыря при разных временах, прошедших после внутривенного введения **NN1** в мышь с воспалением, вызванным ЛПС. Заштрихованные прямоугольники (1) и (2) обозначают промежутки времени, необходимые для записи ЭПР-томограммы. (б) Примерное позиционирование мыши и соответствующие координаты: квадрат символизирует поле видимости спектрометра  $20 \times 20$  мм. Концентрация **NN1** в других частях тела мыши оказалась ниже уровня чувствительности ЭПР.

Наблюдаемый эффект введения нитроглицерина или ЛПС на кинетику **NN1** может быть обусловлен различными причинами или их комбинацией: (а) реакцией образующегося NO с **NN1**, (б) увеличением концентрации восстанавливающих агентов в кровотоке, связанном с присутствием повышенной концентрации оксида азота, (в) расслаблением кровеносных сосудов и замедлением кровотока. Все эти причины приводят к уменьшению максимальной концентрации радикала (примерно в 2,5 раза меньше, чем у контроля) и временную задержку его накопления в мочевом пузыре. Поскольку в случае введения нитроглицерина до введения **NN1** наблюдается лишь задержка накопления, а предельная концентрация радикалов в мочевом пузыре остается той же, можно полагать, что основными причинами являются первая и вторая. Поскольку нам не удалось зарегистрировать спектров иминонитроксильных радикалов (продуктов реакции **IN1** с оксидом азота) интерпретация результатов становится неоднозначной. Другой проблемой в случае с применением ННР является невысокая пространственная разрешающая способность ЭПР томографии, а также ее низкая чувствительность.

Необходимо заметить, что и у ННР, и у ИНР спектр ЭПР состоит из нескольких линий (ширина линии  $>1,6$  Гс) с константами сверхтонкого расщепления 4,5–9 Гс. Таким образом, сложно разделить томографические изображения от одного образца при градиенте поля 10 Гс/см и площади обзора  $2 \times 2$  см<sup>2</sup> в стандартной программе обработки данных ЭПР-томографии. Но, учитывая возможности современных компьютеров, можно было бы разработать такую программу в случае интенсивных линий ННР и ИНР.

### 2.7. МРТ мышей после введения NN1

Как было отмечено в разделе 1.10, ранее было предложено использовать NN1 в качестве контрастных реагентов для МРТ [144]. В проведенных экспериментах использовался ЯМР-томограф в низких магнитных полях и с малым пространственным разрешением. Кроме того, эксперименты проводились на животных после их декапитации. Поскольку ЭПР-томография не обладает высоким пространственным разрешением, нами были исследованы МРТ изображения мышей на приборе Bruker Biospec 117/11 с введением в качестве контрастного реагента NN1 и для сравнения широко используемого контрастного агента гадодиамида, известного под торговым названием “Omniscan”. Измерения проводились сотрудником ИЦГ СО РАН А. Акуловым. В Приложениях А и Б показаны изображения МРТ мышцы с опухолью, привитой на бедренную кость, до и после 30 минут введения 0,1 мМ/кг контрастного агента “Omniscan”. Приложение А(а) демонстрирует кросс-секцию (10/45) бедренной кости около опухоли (показанной стрелками). Можно хорошо видеть контраст в области опухоли и особенно сосудов около опухоли. В Приложении А(б) приведено изображение кросс-секции (16/45) брюшинной области около мочевого пузыря, который показан стрелками. Хорошо видно сильные изменения контраста в районе мочевого пузыря. Отметим, что положение мышцы до и после введения контрастного агента несколько изменилось, однако это не является препятствием для демонстрации действия контраста.

В Приложении Б(в) показаны магнитно-резонансные T<sub>1</sub>-взвешенные изображения мышцы с опухолью, привитой на правой бедренной кости, зарегистрированной спустя 20 минут (слева) и 60 минут (справа) после внутрибрюшинной инъекции 11,8 мМ/кг NN1. Кросс-секция (14/45) бедренной части около опухоли (показана широкими стрелками).

В Приложении Б(г) показана кросс-секция (19/45) брюшинной области около мочевого пузыря (дополнительно отмеченная белыми треугольниками). Видно, что наблюдается очень слабый контраст области опухоли и очень сильный контраст мочевого пузыря вследствие быстрого выведения NN1. Узкие длинные стрелки показывают области начальной локализации NN1 обусловленной внутрибрюшинным введением радикалов

в обоих случаях. Видно, что с течением времени контраст этой области уменьшается из-за перераспределения **NN1**.

Таким образом, хотя **NN1** и увеличивает ядерную релаксацию и функционирует как контрастный агент, он не накапливается в опухоли, а быстро выводится в мочевой пузырь в полном соответствии с результатами ЭПР томографии. В то время как МРТ контрастный агент, “Omniscan”, позволяет получить контрастные изображения опухоли и сосудов, **NN1** может использоваться только для получения контрастных изображений мочевого пузыря.

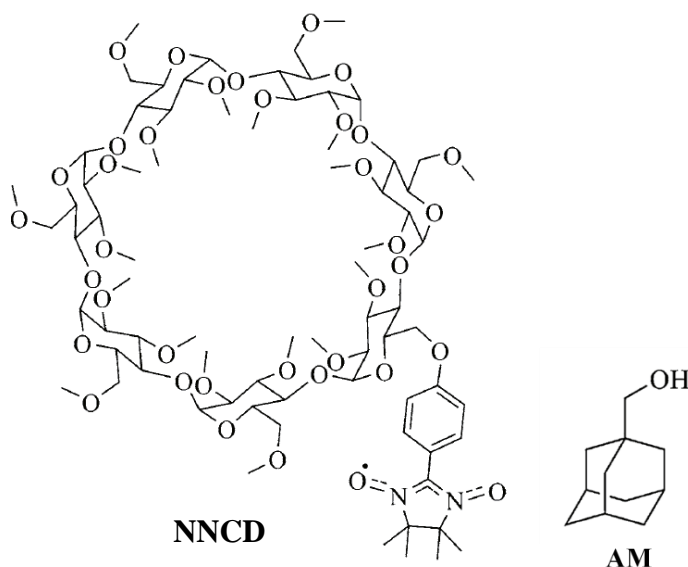
## **2.8. Функциональные свойства нитронилнитроксильных радикалов, ковалентно-связанных с перметил- $\beta$ -циклодекстрином. Тип равновесия в аддукте ННР и ЦД**

В литературном обзоре было отмечено, что для увеличения стабильности спиновых зондов и спиновых меток используются различные подходы: введение стерически затрудненных заместителей в близкое окружение радикального центра или заключение спиновых меток в наноконтейнеры (каликсарены, полисомы, кукурбитурилы, циклодекстрины и т.д.). Модификация ЦД стабильным нитроксильным радикалом — это многообещающее приложение для одновременной функционализации как ЦД, так и радикала. Из-за растущего интереса к спиновым производным ЦД мы изучили спин-меченый ЦД с новым типом метки, нитронилнитроксильным радикалом, который ранее никогда не использовался. Известно, что нитронилнитроксильные радикалы (ННР) эффективно реагируют с NO, образуя иминонитроксильные радикалы. Используя большую разницу в спектрах ЭПР этих радикалов, ННР можно использовать как зонды оксида азота (II). Т. к. главным препятствием в таком применении является высокая скорость восстановления радикалов в живых системах, то логично предположить, что связывание их с ЦД повысит стабильность *in vivo*.

Для изучения типа равновесия в спин-меченом ЦД был использован метод модуляции спада электронного спинового эха (ESEEM), который ранее был использован для изучения похожих систем [39]. Экспериментально наблюдаемый ESEEM обусловлен сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона в нитроксильном радикале с ядрами дейтерия окружающих молекул D<sub>2</sub>O. Ранее было показано, что если ядра находятся далеко от нитроксильного радикала, то частота модуляции соответствует ядерной зеемановской частоте дейтерия, тогда как амплитуда модуляции  $K(^2\text{H})$  (нормализованная на амплитуду ЭСЭ) пропорциональна количеству молекул D<sub>2</sub>O, окружающих нитроксильный радикал [153,154,155,156]. Для нитроксильного фрагмента параметр  $K(^2\text{H})$  зависит от

местонахождения радикала относительно полости ЦД, и относительное изменение этого параметра нужно относить к значению  $K(^2H)$  для аналогичного свободного радикала.

Нами были измерены ESEEM для свободного радикала в различных условиях: в растворе  $D_2O/DMSO-d_6$  (4:1 об.) с 5 мМ перметил- $\beta$ -ЦД **Trimeb** в двух состояниях: (1) в отсутствие и (2) в присутствии 5 мМ молекулы-конкурента 1-гидроксиметиладамантана (**AM**) 4 (рис. 2.11 и табл. 2.2). Затем эти данные были использованы в качестве калибровки при исследовании целевого спин-меченого ЦД **NNCD**.



**Рисунок 2.11** — Слева: структура аддукта **NNCD** перметил- $\beta$ -циклодекстрина и нитронитроксильного радикала; справа: структура молекулы конкурента **AM**, 1-гидроксиметиладамантана. Составные части аддукта **NNCD** — это перметилированный циклодекстрин **Trimeb** и **HNP NN**.

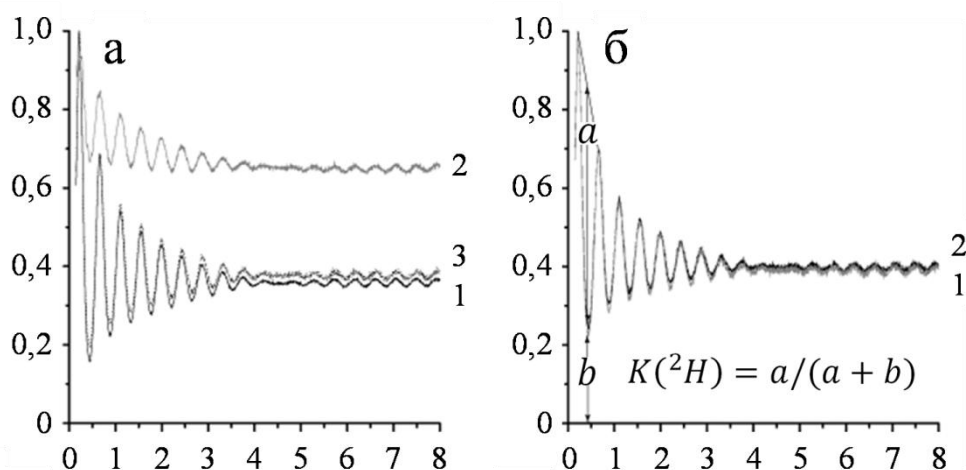
Для того, чтобы количественно описать доступность нитроксильного радикала для молекул  $D_2O$ , был использован параметр  $R_K$ , который равен отношению полученной амплитуды модуляции к амплитуде модуляции свободного радикала ( $R_K = K(^2H)(\text{получ.})/K(^2H)(\text{радикал}) \times 100\%$ ). Согласно этому определению, значение  $R_K$  для радикала, например, равно 100%.

**Таблица 2.2** — Амплитуда модуляции  $K(^2H)$  и параметр  $R_K$ , полученные из данных ESEEM для свободного радикала, его комплекса с **Trimeb** и спин-меченого **Trimeb**, **NNCD** (в присутствии и отсутствии конкурента **AM**) в растворе  $D_2O/DMSO-d_6$  (4:1 об.).

Система	$K(^2H)$ , $\pm 0,01$	$R_K$ , %
Свободный радикал NN	0,81	100
Радикал NN + Trimeb	0,28	30
Радикал NN + Trimeb + AM	0,77	95
NNCD	0,74	91
NNCD+ AM	0,72	89

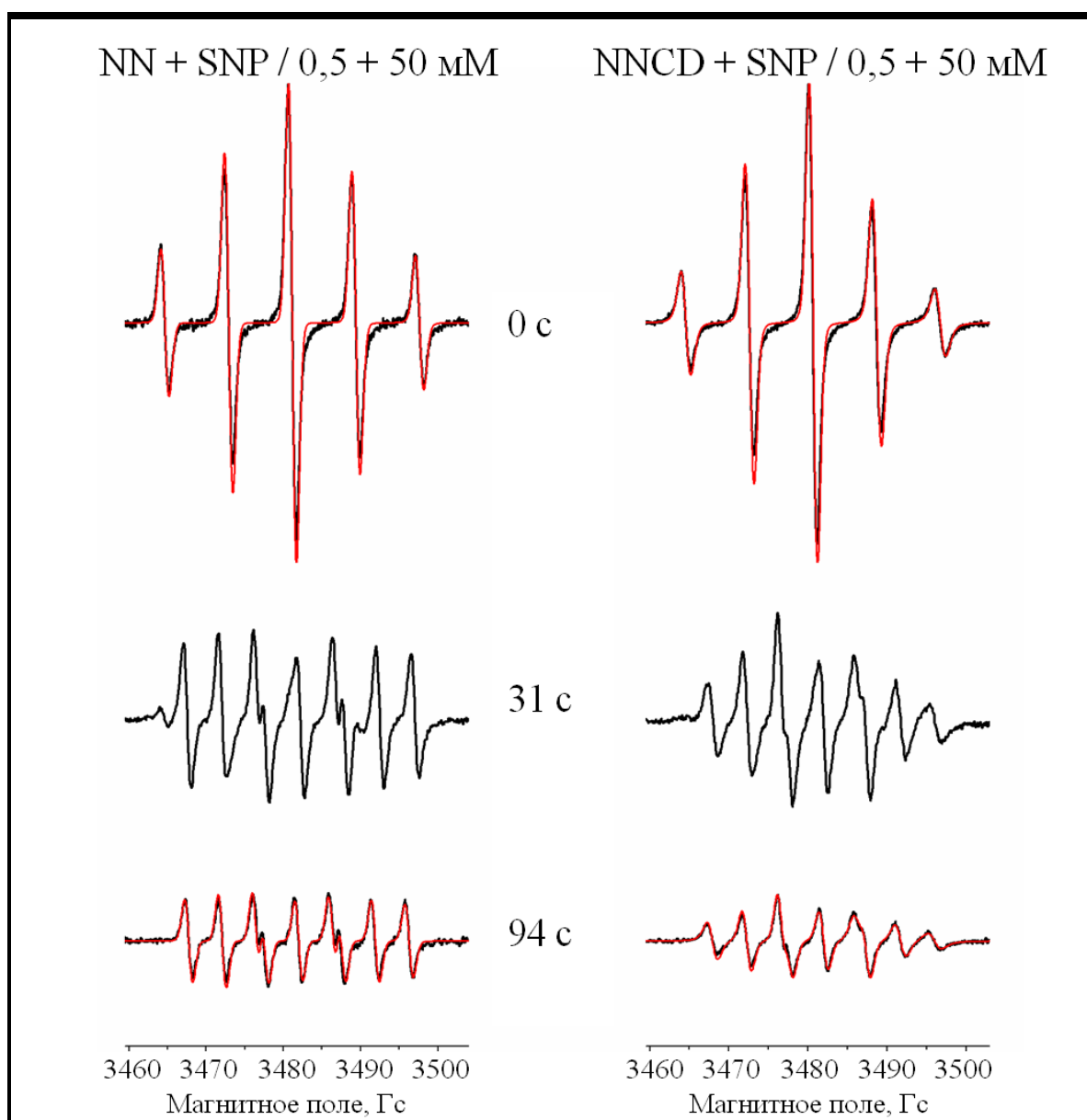


Образование комплекса между радикалом и ЦД **Trimeb** приводит к значительному уменьшению доступности радикала для молекул растворителя ( $R_K = 30\%$ ), что проявляется в уменьшении значения  $K(^2H)$  по сравнению со значением для свободного радикала. Это свидетельствует о том, что нитроксильный радикал обладает высоким сродством к **Trimeb** и образует комплекс включения с **Trimeb**, находясь внутри полости. При добавлении 5 мМ конкурента **AM** к раствору амплитуда модуляции  $K(^2H)$  восстанавливается до начального значения ( $R_K = 95\%$ ), найденного в отсутствие ЦД **Trimeb**.



**Рисунок 2.12** — Характерные временные зависимости сигнала ЭСЭ: (а) линия 1 — для свободного радикала **NN**, линия 2 — для **NN** в присутствии 5 мМ ЦД **Trimeb**, линия 3 — для **NN** в присутствии 5 мМ ЦД и 5 мМ молекулы-конкурента **AM**; (б) линия 1 — для аддукта **NNCD**, линия 2 — для аддукта в присутствии конкурента. На части (б) также приведен способ определения  $K(^2H)$ . По оси ординат в обоих случаях указана относительная интенсивность сигнала ЭСЭ.

Рисунок 2.12 и таблица 2.2 демонстрируют результаты исследований ESEEM **NNCD** в  $D_2O/DMSO-d_6$  (4:1 об.) до и после добавления конкурента **AM** (5 мМ). Ковалентное присоединение ННР к **Trimeb** приводит к незначительному уменьшению амплитуды модуляции  $K(^2H)$  по сравнению со значением, найденным для радикала. При добавлении конкурента **AM** (5 мМ) к раствору значение  $K(^2H)$  не изменяется. Эти результаты свидетельствуют о том, что нитроксильные фрагменты **NNCD** не погружены в полость **Trimeb** и, следовательно, основываясь на предыдущих исследованиях нитроксильных радикалов, ковалентно связанных с ЦД [38,48], динамическое равновесие **NNCD** должно происходить между конформациями, находящегося снаружи полости **Trimeb** и прикрывающего полость радикала (рис. 2.11, тип 1).



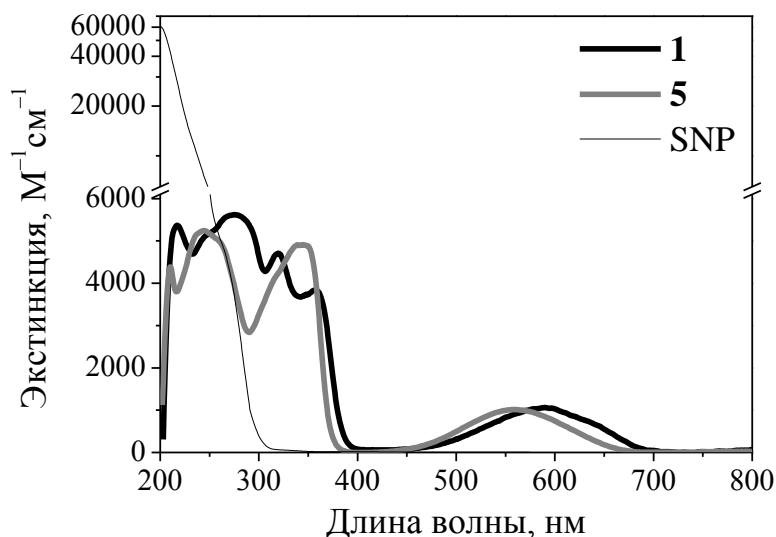
**Рисунок 2.13** — Кинетика изменения спектров в течение фотолиза свободного ННР (слева) и **NNCD** (справа) в присутствии нитропруссид натрия в воде при 300 К (время облучения указано).

Рисунок 2.13 (сверху) демонстрирует стационарные спектры ЭПР радикала и **NNCD** в воде при 300 К. Наблюдаемые ЭПР спектры состоят из пяти линий с соотношением 1:2:3:2:1, обусловленным сверхтонким взаимодействием с двумя эквивалентными атомами азота. Полученные спектры промоделированы с использованием программного обеспечения Easyspin [157] в модели медленного вращения. Рассчитанные сверхтонкие расщепления на ядрах  $^{14}\text{N}$ ,  $a_{\text{N}}$ , и вращательные времена корреляции,  $t_{\text{corr}}$ , даны в таблице 2.3. Моделирование обнаружило отличие времени корреляции для свободного нитронилнитроксильного радикала (ННР) от ННР, пристыкованного к ЦД **NNCD** примерно на порядок из-за ограниченного движения радикального фрагмента в аддукте **NNCD**. Это говорит о том, что гидродинамические радиусы свободного радикала и **NNCD** отличаются примерно в два раза.

## 2.9. Чувствительность аддукта к оксиду азота (II)

Метод стационарного ЭПР был применен для изучения функциональных свойств нового соединения **NNCD**: его чувствительности к оксиду азота NO и стабильности по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой. Было исследовано влияние ковалентного мостика между ННР и ЦД на реакцию **NNCD** с NO путем сравнения результатов ЭПР в соответствующих экспериментах со свободным радикалом и **NNCD**.

Хорошо известно, что фотолиз нитропрусида натрия (SNP) приводит к образованию NO [158]. Спектры поглощения радикала, **NNCD** и SNP (рис. 2.14) свидетельствуют о том, что экстинкция SNP в регионе 200–250 нм примерно на порядок больше **NNCD** и радикала. Однако, спектр излучения ртутной лампы высокого давления включает набор характерных полос в УФ и видимом диапазонах (185, 254, 365, 405, 436, 546 и 578 нм), поэтому интегральное поглощение нитроксильных радикалов также значимо.



**Рисунок 2.14** — Спектры поглощения в видимой и УФ областях 100 мкМ **NNCD** (черная линия 1), 100 мкМ свободного радикала **NN** (серая линия 5) и 50 мкМ SNP в воде.

ЭПР спектры радикала и **NNCD** в течение фотолиза SNP проявляют трансформацию, характерную для перехода ННР (соотношение линий 1:2:3:2:1) в ИНР (1:1:2:1:2:1:1), и последующую деградацию последнего, происходящую из-за нестабильности ИНР по отношению к облучению (см. рис. 2.14). Промежуточные спектры отражают суперпозицию спектров ННР и ИНР. Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод о том, что и ННР, ковалентно связанный с ЦД, **NNCD** и свободный ННР реагируют с NO с примерно одинаковой скоростью, с образованием соответствующих иминонитроксильных радикалов.

Экспериментальные спектры свободных ИНР и ковалентно связанных с ЦД ИНР были промоделированы так же, как и спектры ННР. Полученные магнитно-резонансные параметры приведены в таблице 2.3. Время корреляции для ковалентно связанных с ЦД ИНР

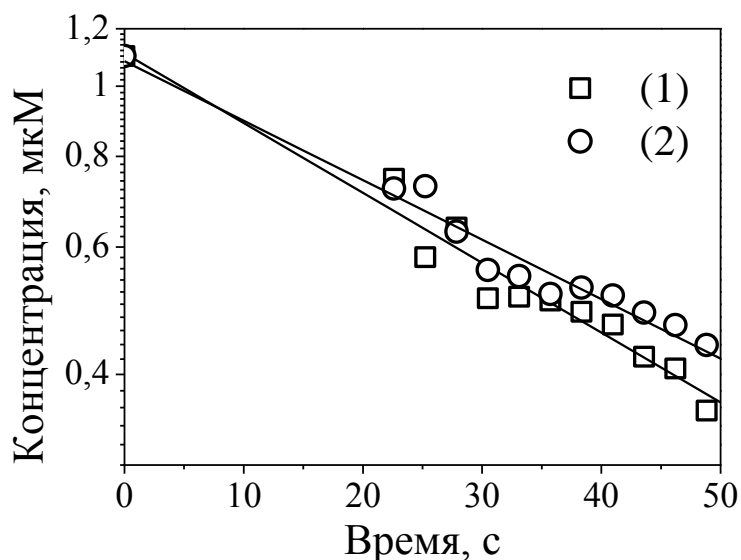
в десять раз больше, чем свободных, что хорошо согласуется с соответствующими данными ННР.

**Таблица 2.3** — Расчет спектров ЭПР проводился с помощью программного обеспечения из пакета *Easyspin* в модели медленного движения с учетом двух эквивалентных ядер  $^{14}\text{N}$  для ННР и двух неэквивалентных ядер  $^{14}\text{N}$  для ИНР. При моделировании были использованы следующие значения:  $a_{\text{N}1} = a_{\text{N}2} = [5,3 \ 5,3 \ A_{zz}]$  Гс,  $g = [2,0075 \ 2,0075 \ 2,0060]$  для ННР;  $a_{\text{N}1} = [5,65,6 \ A_{zz1}]$  Гс,  $a_{\text{N}2} = [1,5 \ 1,5 \ A_{zz2}]$ ,  $g = [2,0073 \ 2,0073 \ 2,0046]$  для ИНР. Значения  $A_{zz}$ , вращательного времени корреляции  $t_{\text{corr}}$  и лоренцева ширина линии варьировались. Изотропная константа  $\text{СТВ}_{\text{a}_\text{N}} = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$ . Значения  $g$ - и  $\text{СТВ}$ -тензоров взяты из [159].

	Изотропная $a_{\text{N}1}$ , Гс	Изотропная $a_{\text{N}2}$ , Гс	Ширина линии, Гс	$t_{\text{corr}}$ , $10^{-10}$ с
	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$
Свободный NN	8,2	8,2	1,2	1,3
Полученный из него ИНР	9,9	4,4	1,2	0,8
NNCD	8,2	8,2	1,2	7,9
Полученный из NNCD ИНР	9,8	4,4	1,2	7,9

## 2.10. Стабильность аддукта по отношению к восстановлению

Были исследованы кинетики восстановления **NNCD** и свободного радикала при различных начальных условиях. Полученные кинетические кривые описываются распадом псевдо-первого порядка. Исследованная реакция предполагает сложный механизм [23], согласно которому аскорбиновая кислота находится в двукратном избытке по сравнению с нитроксильным радикалом при той же концентрации. Поэтому эту реакцию можно рассматривать как реакцию псевдо-первого порядка, принимая во внимание ее константу и используемые концентрации. Сравнение полученных констант второго порядка для свободного радикала **5** и спин-меченого ЦД **NNCD** (рис. 2.15), позволило получить константы второго порядка  $k_{\text{II}} = (3,9 \pm 0,5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для радикала **NN** и  $k_{\text{II}} = (3,8 \pm 0,5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для **NNCD**. Поскольку значения констант очень близки, можно сделать вывод, что присоединение ННР к ЦД не защищает его от восстановления аскорбиновой кислотой. Возможной причиной этого является жесткость линкера между ННР и ЦД, который не позволяет ему быть погруженным в полость ЦД и препятствовать реакции восстановления аскорбиновой кислотой. Этот вывод хорошо согласуется с результатами ESEEM, свидетельствующими о типе равновесия **NNCD**, которое соответствует тому, что радикал прикрывает полость и находится снаружи.



**Рисунок 2.15** — Экспоненциальные кинетики реакции 10 мкМ свободного ННР **NN** с 10 мкМ аскорбиновой кислоты (1, квадраты) и реакции 10 мкМ аддукта **NNCD** с 10 мкМ аскорбиновой кислоты (2, круги) в воде при 300 К. Сплошные линии отражают соответствующий экспоненциальный спад концентрации в реакции псевдо-первого порядка.

## 2.11. Заключение

В данной главе была исследована возможность применения нитронилнитроксильных радикалов (ННР) в качестве зондов оксида азота NO *in vivo*. Для этого, во-первых, была определена стабильность радикалов в условиях, приближенным к физиологическим, и собственно *in vivo*. Во-вторых, исследуемые ННР были непосредственно протестированы *in vivo* в различных моделях содержания NO: в контрольной и с увеличенным содержанием/генерацией, вызванной применением нитроглицерина и ЛПС. Кроме того, с помощью метода ЭПР-томографии в L-диапазоне были наглядно продемонстрированы фармакокинетики перераспределения в живом организме ННР при различных способах их введения. Известно, что ННР эффективно реагируют с оксидом азота со скоростью  $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  [135,136]. Проведенные нами эксперименты показали, что константы скорости изученных нами **NN1** и **NN2** с оксидом азота лежат в том же диапазоне. В наших экспериментах обнаружено существенное уменьшение сигнала ЭПР и увеличение задержки накопления ННР в мочевом пузыре после введения нитроглицерина или ЛПС в мышь. Можно было бы предположить, что уменьшение ЭПР сигнала обусловлено реакцией с оксидом азота, генерируемым нитроглицерином. Оценка скорости генерации NO в живой мышце составляет  $0,4 \text{ нМ} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$  [160]. Таким образом, в течение времени проведения эксперимента (~50 минут), общая концентрация сгенерированного NO примерно равна 0,2 мкМ. Как

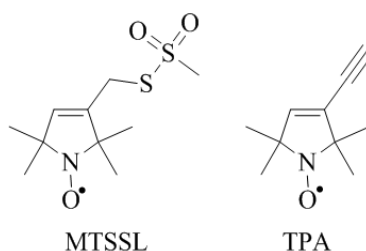
показано на рисунке 4.9а, наблюдаемое уменьшение **NN1** (8 мМ) существенно превышает эту величину. Таким образом, наблюдаемый нами эффект обусловлен реакцией с оксидом азота не прямым образом, а опосредовано, за счет расширения кровеносных сосудов и замедления процессов выведения ННР в мочевой пузырь. Из анализа результатов данного исследования можно сделать выводы о том, что ННР невозможно использовать *in vivo* в качестве детекторов NO, учитывая их быстрое выведение в мочевой пузырь и быстрое восстановление биогенными восстановителями. Результаты, полученные методом магнитно-резонансной томографии, показали, их невысокую эффективность. Хотя **NN1** и увеличивает ядерную релаксацию и функционирует как контрастный агент, он не накапливается в опухоли, а быстро выводится в мочевой пузырь в полном соответствии с результатами ЭПР томографии. Таким образом, **NN1** может использоваться только для получения контрастных изображений мочевого пузыря.

Методами стационарного и импульсного ЭПР были изучены магнитно-резонансные характеристики и функциональные свойства нитронилнитроксильного радикала, ковалентно связанного с циклодекстрином. Обнаружено, что (а) **NNCD** проявляет динамическое равновесие между конформациями радикального фрагмента, находящегося снаружи полости и прикрывающего ее (рис. 2.11, тип 1); (б) ковалентное связывание ННР к ЦД увеличивает эффективный гидродинамический радиус в два раза, приводя к соответствующему увеличению вращательного времени корреляции на порядок; (в) ННР, ковалентно связанный с ЦД, сохраняет свою чувствительность к NO, однако константа восстановления нитроксильного фрагмента **NNCD** близка к константе соответствующего свободного радикала. Таким образом, для улучшения функциональных свойств **NNCD** необходимо использовать другую структуру линкера, которая позволила бы радикальному фрагменту глубже погружаться в полость ЦД.

## Глава 3. Исследование функциональных свойств 2,5- бис(спироциклогексил)-замещенных нитроксильных радикалов пирролинового и пирролидинового рядов

### 3.1. Введение

Ранее было показано [84,85], что введение спироциклических фрагментов в положения 2 и 5 при  $\alpha$ -атомах углерода нитроксильной группы пиперидиновых нитроксильных радикалов приводит к существенному увеличению их стабильности по отношению к восстановлению аскорбиновой кислотой по сравнению с 2,2,6,6-тетраметильными аналогами. Другим преимуществом нитроксильных радикалов со спироциклическими фрагментами является увеличение времени фазовой релаксации при температурах 80–300 К, что позволяет использовать их для измерения расстояний методом импульсного двойного электрон-электронного резонанса (pulse electron double resonance, PELDOR) в сочетании с методом адресного введения спиновых меток (site-directed spin labeling, SDSL) [161]. Спиновые метки, используемые в методе SDSL, например MTSSL и TPA (рисунок 3.1), принадлежат семейству пирролиновых нитроксильных радикалов. Присутствие метильных заместителей около нитроксильного фрагмента в этих метках накладывает ограничения на их использование в методе PELDOR при температурах выше азотных, как правило, измерения расстояний проводится при температурах ниже 80 К.

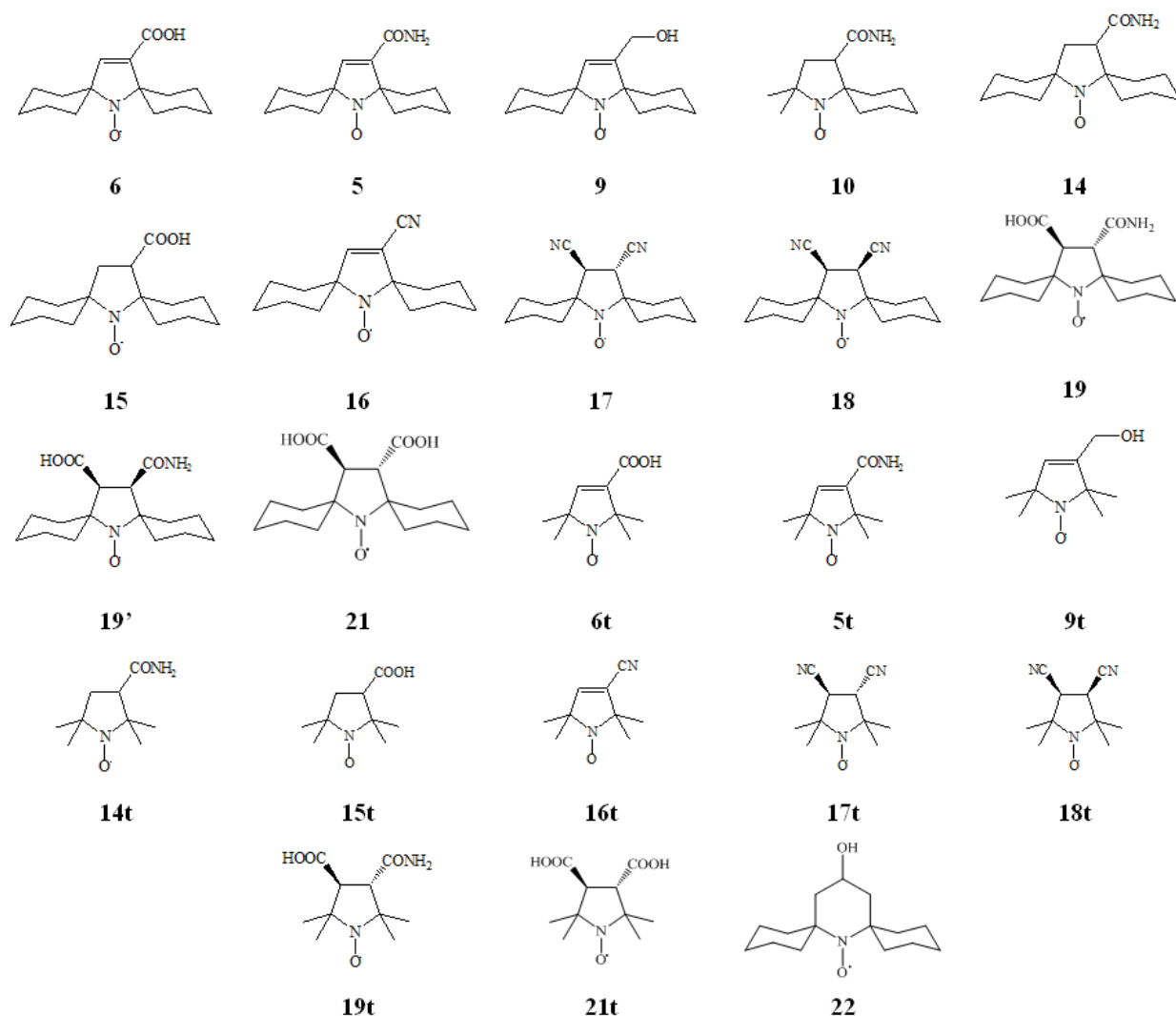


**Рисунок 3.1** — Обычные спиновые метки, используемые в методе SDSL.

При  $T < 80$  К замораживается вращение метильных групп вокруг связи C–C, которое вносит основной вклад в механизм электронной спиновой релаксации нитроксильных радикалов при  $T > 80$  К. Замещение метильных заместителей в положения 2 и 6 нитроксильного фрагмента на более объемные спироциклические фрагменты позволяет устранить этот вклад в релаксацию и использовать метод PELDOR при более высоких температурах.

Как обсуждалось в разделе 1.3, изменение структуры кольца нитроксильных радикалов с пиперидинового на пирролиновый или пирролидиновый приводит к увеличению стабильности нитроксильных радикалов почти на порядок. Хорошо известно, что

пирролидиновые нитроксильные радикалы обладают гораздо большей стабильностью по отношению к восстановлению по сравнению с пиперидиновыми производными [162].



**Рисунок 3.2** — Химические структуры исследуемых нитроксильных радикалов.

В этой главе диссертации нами были исследованы функциональные свойства большого ряда нитроксильных радикалов со спироциклическими фрагментами около нитроксильной группы N–O, структура которых показана на рисунке 3.2. Синтез новых спироциклических радикалов был осуществлен в лаборатории азотистых соединений к. х. н. И. А. Кирилюком с соавторами. Нами были измерены их магнитно-резонансные параметры (константы СТВ, g-факторы), константы скорости их восстановления аскорбиновой кислотой, а также времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации при локализации их в матрице трегалозы при комнатной температуре. Исходя из полученных результатов, были сделаны выводы о перспективности применения таких радикалов в качестве спиновых меток при исследовании структуры биополимеров при комнатных температурах.



### 3.2. Исследование магнитно-резонансных параметров

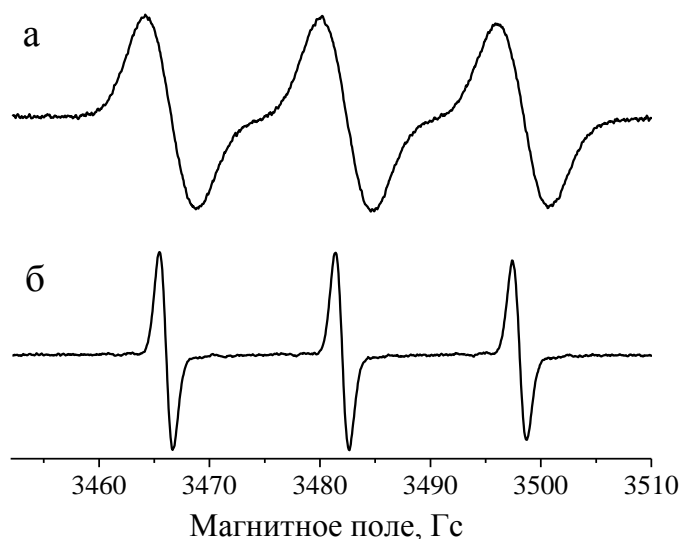
Нами были зарегистрированы ЭПР-спектры радикалов **1–22** и S-Tempol и с помощью их моделирования определены магнитно-резонансные параметры радикалов— константы СТВ  $a_N$  и  $g$ -факторы. Детальное описание экспериментов приведено в главе 5. При расчете варьировались следующие параметры:  $g$ -фактор, константа СТВ  $a_N$  с атомом азота, константы СТВ  $a_H$  с 8 протонами при атомах углерода во 2-м и 5-м положениях спироциклогексильных фрагментов, а также собственная ширина линии.

Известно, что замена геминальных метильных групп возле нитроксильного фрагмента объемными заместителями приводит к значительному уширению линий в спектре ЭПР [28,163]. Измерения ширины линий в спектрах нитроксильных радикалов **5, 6, 9, 14, 15, 17–19, 21** подтвердили данный факт: для всех радикалов ширина линий оказалась близкой и составила 4,5 Гс. Другие параметры спектров, полученные с помощью моделирования, приведены в таблице 3.1.

*Таблица 3.1 — Значения  $g$ -факторов и констант СТВ с ядрами азота  $a_N$  исследуемых нитроксильных радикалов. Спектры были записаны в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,2 с 5% этанола (от объема) для лучшей растворимости.*

Нитроксильный радикал	$g$ -фактор ( $\pm 0,00002$ )	$a_N$ , Гс ( $\pm 0,3\%$ )
<b>5</b>	<b>2,00586</b>	<b>15,78</b>
<b>6</b>	<b>2,00581</b>	<b>15,96</b>
<b>9</b>	<b>2,00584</b>	<b>16,05</b>
<b>14</b>	<b>2,00586</b>	<b>15,98</b>
<b>15</b>	<b>2,00584</b>	<b>16,08</b>
<b>17</b>	<b>2,0059</b>	<b>14,83</b>
<b>18</b>	<b>2,00597</b>	<b>15,04</b>
<b>19</b>	<b>2,00598</b>	<b>15,80</b>
<b>21</b>	<b>2,00581</b>	<b>15,98</b>
<b>22</b>	<b>2,00594</b>	<b>16,63</b>

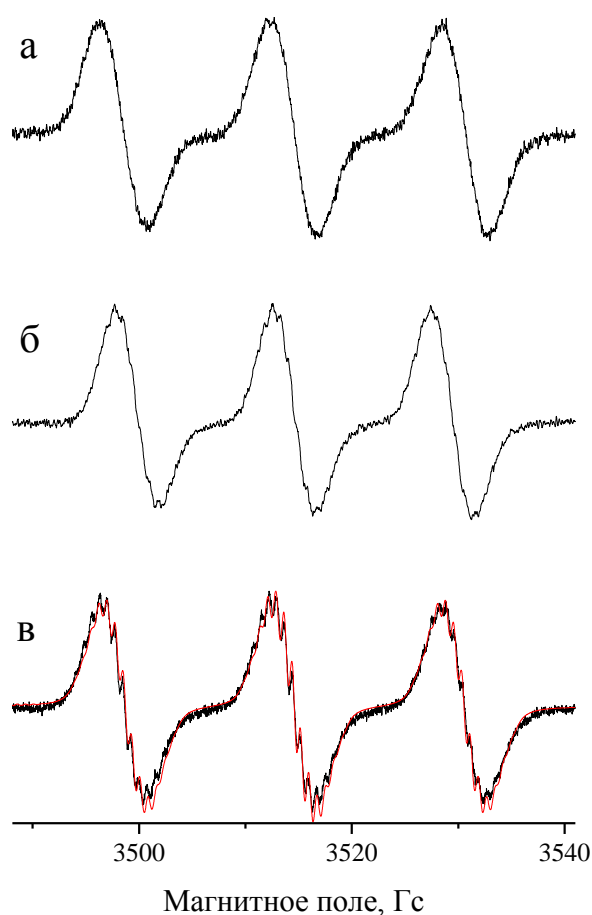
Типичные спектры нитроксильных радикалов показаны на примерах 7-азадиспиро[5.1.5.2]пентадекан-7-оксила **14** и соответствующего ему проксильного нитроксильного радикала **14t** показаны на рисунке 3.3. Детальное рассмотрение и компьютерное моделирование форм линий в спектрах имидазолидиновых нитроксильных радикалов с этильными группами около нитроксильного фрагмента показало, что введение каждой пары этильных групп приводит к дополнительному расщеплению около 2 Гс в спектре ЭПР. Оно соответствует константе СТВ только с одним из четырех метиленовых атомов водорода пары геминальных этильных заместителей [163].



**Рисунок 3.3** — Спектры ЭПР 0,1 мМ растворов нитроксильных радикалов **14** (а) и 3-карбамоил-проксила **14t** (б) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2) с добавлением 5% (об.) этанола. Настройки спектрометра были следующими: частота 9,87 ГГц, мощность радиоволнового излучения 10 мВт, частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 4,3 и 1 Гс для **14** и **14t** соответственно, время конверсии 5,12 мс.

Структура спектра ЭПР дегазированного водного раствора 0,1 мМ нитроксильного радикала **6** (5% ДМСО, рН 7,2) оказалась частично разрешена. Этот спектр был рассчитан с использованием следующих параметров: одна константа СТВ  $a_N = 16$  Гс, пять  $a_H = 1,45$  Гс (5Н), четыре  $a_H = 0,77$  Гс (4Н), дополнительное уширение 0,64 Гс (гауссов профиль) и 0,74 Гс (лоренцев профиль) (рисунок 3.4в). Расщепление обусловлено СТВ с четырьмя парами аксиальных и экваториальных атомов водорода циклогексановых колец в положениях 2 и 6. Отметим, что у них может отличаться распределение спиновой плотности из-за стерических и электронных эффектов карбоксильной группы **6**. Вторая константа СТВ  $a_H = 1,45$  Гс отнесена к взаимодействию с атомом водорода в третьем положении кольца, аналогично 3-карбамоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксиду, где атом водорода в этом положении обладает расщеплением около 0,5 Гс [164].

При моделировании спектра мы предположили, что константа СТВ с атомом водорода при первом атоме в спироциклогексильном фрагменте структуры 7-азадиспиро[5.1.5.2]пентадека-14-ена (радикалы **5**, **6**, **9** и **16**) несколько больше, чем для аналогичных в метильных заместителей (радикалы **5t**, **6t**, **9t** и **16t**). В нашем случае это значение составило 1,45 Гс вместо 0,5 Гс. Эта разница могла возникнуть в результате изменений геометрии пирролинового кольца, например, из-за взаимодействия карбоксильной группы с циклогексановым кольцом. Однако, основываясь только на имеющихся данных, невозможно сделать однозначное отнесение констант СТВ.



**Рисунок 3.4** — Экспериментальные и расчетный спектры ЭПР следующих дегазированных 0,1 мМ растворов с 5% (об.) ДМСО: **15** (а), **19** (б) и **6** (в) при рН 7,2 после трех циклов «заморозка — откачка — оттаивание». Параметры моделирования для радикала **6** (Гс):  $a_N = 16$ , пять  $a_H = 1,45$ , четыре  $a_H = 0,77$ ; дополнительное уширение 0,64 Гс (гауссова форма линии) и 0,74 Гс (лоренцева форма линии). Настройки спектрометра были следующими: частота 9,87 ГГц, мощность радиоволнового излучения 6,39 мВт, частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 0,03 Гс, время конверсии 655,36 мс.

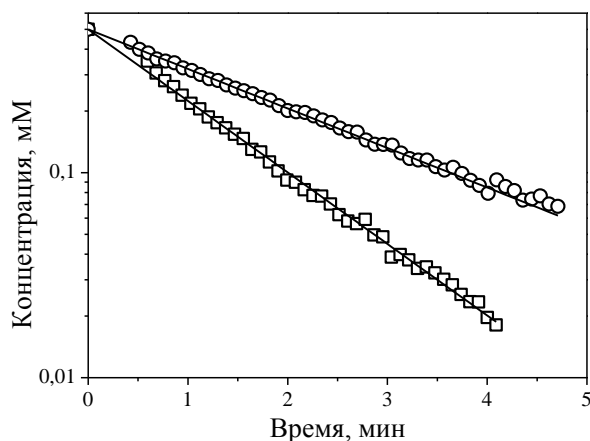
Необходимо отметить, что спектры ЭПР дегазированных растворов 0,01 мМ нитроксильных радикалов **15** и **19** разрешены гораздо хуже, поэтому на основании их анализа получить достоверные значения констант СТВ с атомами водорода не представляется возможным (рисунок 3.2а,б). Такое различие в структуре спектров может быть следствием большей жесткости имидазолинового кольца в радикале **6** по сравнению с имидазолидиновым кольцом радикалов **15** и **19** и/или несимметричной структуры нитроксильных радикалов **15** и **19**, которая приводит к набору малых расщеплений с различными константами СТВ.

### 3.3. Исследование липофильности

Растворимость в воде является важным параметром для различных биологических приложений нитроксильных радикалов, например, МРТ и ЭПР исследований (окислительно-восстановительный статус и распределение), и возможных фармакологических приложений (имитаторы СОД, антиоксиданты и т. д.). Очевидно, что из-за наличия объемных неполярных циклогексановых колец новые нитроксильные радикалы более гидрофобны по сравнению со своими тетраметилзамещенными аналогами. В частности, радикалы **16–18** практически нерастворимы в воде, а радикалы **5–10** слаборастворимы. Коэффициенты разделения растворимых в воде радикалов в смеси *n*-октанол/0,1 М фосфатный буфер при рН 7,2 были измерены для трех нитроксильных радикалов **14**, **15**, **21**. Среди этих радикалов амидный **14** проявил ожидаемо наибольшую липофильность ( $P_{o/w} = 99,6$ ). Предполагается, что радикалы **15** и **21** существуют в анионной карбоксилатной форме при рН 7,2. Нитроксильный радикал **15** основном локализуется в органической фазе ( $P_{o/w} = 3,2$ ), что делает его похожим на 4-гидрокси-ТЕМРО ( $P_{o/w} = 3,14$ ) и на 4-оксо-ТЕМРО ( $P_{o/w} = 1,8$ ) [28]. Дианионный радикал **21** в значительной степени гидрофилен ( $P_{o/w} = 0,004$ ).

### 3.4. Восстановление нитроксильных радикалов аскорбатом

Известно, что объемные заместители около нитроксильного фрагмента замедляют восстановление нитроксильных радикалов в биологических системах, увеличивая время жизни спиновых зондов. Нами была изучена реакция нитроксильных радикалов **5**, **6**, **9**, **14**, **15**, **19**, **21** и их 2,2,5,5-тетраметильных аналогов (см. рисунок 3.2) с аскорбиновой кислотой. Как было отмечено в главе 1, аскорбиновая кислота является важным биогенным восстановителем нитроксильных радикалов [14]. Реакция восстановления нитроксильных радикалов аскорбатом протекает по сложному механизму, включающему несколько обратимых стадий, поэтому наблюдаемые кинетики восстановления радикалов могут отличаться от экспоненциального спада [23]. Было показано, что эти отклонения важны для радикалов с очень низкой скоростью восстановления и/или высокой степенью превращения. Показано, однако, что глутатион способен удалять из реакции радикал аскорбата, подавляя обратные реакции некоторых стадий и приводя кинетику к экспоненциальному виду [165]. Этот подход был использован нами, чтобы улучшить точность измерений константы скорости реакции для некоторых из новых нитроксильных радикалов. Необходимо отметить, что константа реакции второго порядка чувствительна к множеству факторов: температуре, рН, примесям металлов в системе, которые катализируют кинетику и т. д. [86]



**Рисунок 3.5** — Разложение нитроксильных радикалов **15** (○) и **19** (□) в буферном растворе с 0,1 М аскорбиновой кислотой и 50 мМ глутатионом при pH 7,2 в логарифмической шкале.

Соответствующие константы скорости реакции приведены в таблице 3.2.

**Таблица 3.2** — Значения констант скорости реакций нитроксильных радикалов с аскорбиновой кислотой,  $k_{asc} \times 10^{-2}$ ,  $M^{-1} \cdot c^{-1}$  при pH 7,2. Относительная ошибка измерений составила 15%.

Радикал	$k_{II}, 10^{-2} M^{-1} \cdot c^{-1}$	Радикал	$k_{II}, 10^{-2} M^{-1} \cdot c^{-1}$	Отношение $k(Nt)/k(N)$
<b>5</b>	<b>22</b>	<b>5t</b>	<b>58</b>	<b>2,63</b>
<b>6</b>	<b>7</b>	<b>6t</b>	<b>22</b>	<b>3,14</b>
<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9t</b>	<b>25</b>	<b>2,78</b>
<b>14</b>	<b>18</b>	<b>14t</b>	<b>30</b>	<b>1,67</b>
<b>15</b>	<b>7,4</b>	<b>15t</b>	<b>9,7</b>	<b>1,3</b>
<b>19</b>	<b>13</b>			
<b>21</b>	<b>7,7</b>	<b>21t</b>	<b>20</b>	<b>2,6</b>
<b>22</b>	<b>125</b>			

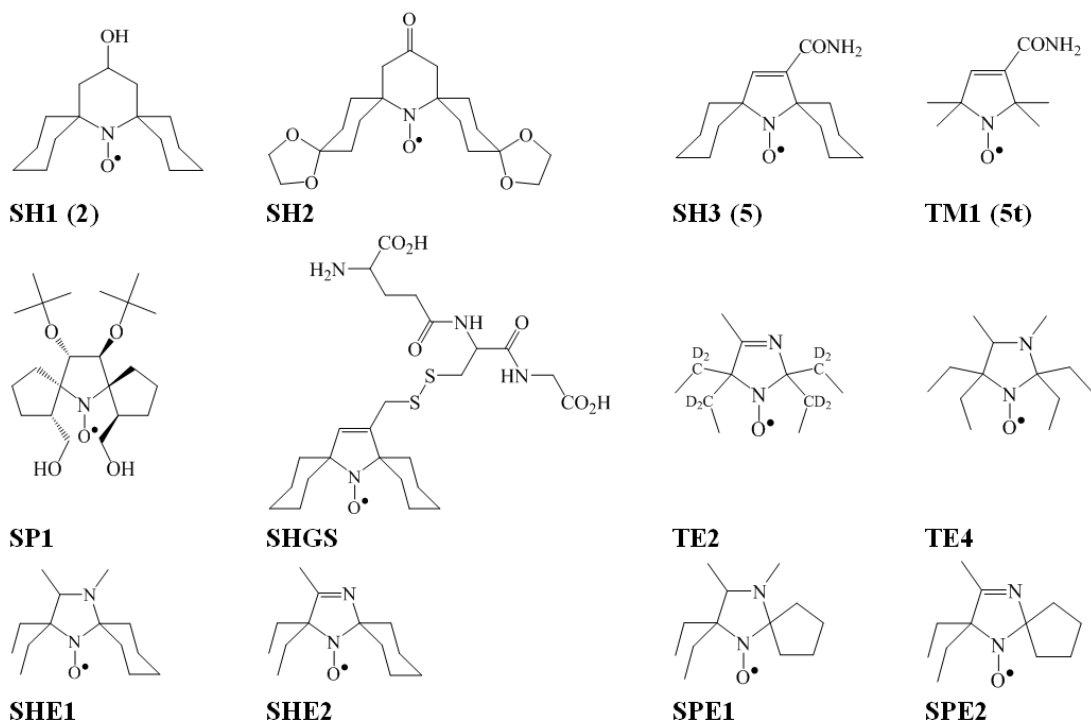
В наших экспериментах была использована деионизированная вода. Проведенные эксперименты показали, что добавление ДТПА не влияет на кинетику, а главным фактором, который приводит к изменениям в кинетике, является температура. Поскольку эксперименты проводились нами при комнатной температуре, и ее колебания могли достигать 4–5 градусов; ошибка измерений констант оценивается в 15%. Примеры кинетики разложения нитроксильных радикалов в присутствии аскорбата показаны на рисунке 3.5, а полученные константы скорости приведены в таблице 3.2.

Окислительно-восстановительные свойства нитроксильных радикалов зависят и от стерических, и от электронных эффектов заместителей. Показано, что при замене метильных групп в 4-оксо-ТЕМРО на спироциклогексильные фрагменты скорость восстановления радикалов уменьшается. Однако, аналогичный эффект от замещения на этильные фрагменты выше [34]. Подобная замена геминальных метильных групп

пирролидинового и пирролинового кольца на спироциклогексильные фрагменты также привела к уменьшению скорости восстановления нитроксильных радикалов (таблица 3.2), хотя этот эффект оказался не таким большим, как в случае замены метильных групп на этильные в радикалах изоиндолинового, имидазолинового, имидазолидинового и пиперидинового рядов [26,27,33]. Как видно из таблицы, величина этого эффекта зависит от структуры нитроксильного радикала. Наибольший эффект (от 2,6 до 3,1 раз) наблюдался для пирролиновых нитроксильных радикалов, тогда как окислительная активность 3-монозамещенных пирролидиновых радикалов обнаружила более слабую зависимость от заместителей (от 1,3 до 1,7 раз). Эта разница в эффекте заместителей может объясняться особенностями конформационной жесткости циклических систем 7-азадиспиро[5.1.5.2]пентадекана и 7-азадиспиро[5.1.5.2]пентадека-14-ена. Очевидно, что конформация *анти,анти*-спироциклогексановых колец относительно нитроксильной группы (которая преобладает в 14-замещенных 7-азадиспиро[5.1.5.2]пентадекан-7-оксилах) благоприятствует реакции нитроксильного радикала с аскорбат-анионом. В 14-замещенных 7-азадиспиро[5.1.5.2]пентадека-14-ен-7-оксилах преобладает конформация *анти,син*-, поэтому нитроксильный фрагмент частично защищен циклогексановой группой. В результате у 2,5-бис-спироциклогексановых производных почти нет разницы в окислительной активности нитроксильных радикалов пирролинового и пирролидино-вого рядов, в то время как 2,2,5,5-тетраметил-замещенные радикалы пирролидинового ряда восстанавливаются примерно в два раза медленнее, чем соответствующие пирролиновые радикалы.

Как видно из таблицы 3.2, константы восстановления нитроксильных радикалов аскорбатом в пределах 2,2,5,5-тетраметильного и 2,5-бис-спироциклогексанового рядов зависят от электронных эффектов заместителей. Электронно-насыщенные анионные карбоксилатные группы уменьшают скорость восстановления, тогда как электрон-акцепторные карбоксамидные группы делают радикалы более сильными окислителями. Следует также отметить, что и 2,2,5,5-тетраметил- и 2,5-бис-спироциклогексил-замещенные пятичленные кольца более стабильны по отношению к восстановлению, чем стерически затрудненный нитроксильный радикал пиперидинового ряда **22**.

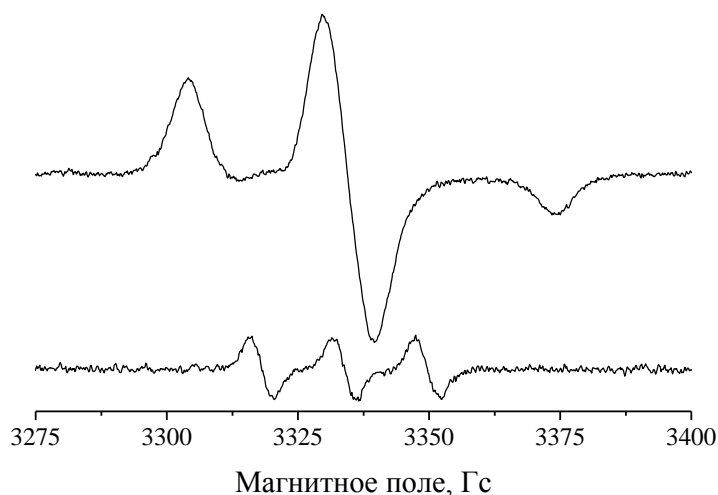
В работе [166] к. ф.-м. н. О. Крумкачевой была измерена температурная зависимость электронной спиновой релаксации исследованного ряда спирозамещенных радикалов. Было показано, что эти радикалы могут быть успешно применены в качестве спиновых меток для измерений расстояний в биополимерах при температурах до 150 К.



*Рисунок 3.6 — Структуры и обозначения использованных нитроксильных радикалов (для некоторых в скобках даны обозначения из рис. 3.2).*

### 3.5. Релаксация спиروزамещенных радикалов в матрице трегалозы при комнатной температуре

Недавно в работе Итона с соавторами [75] было показано, что спиروزамещенные радикалы могут быть использованы в качестве спиновых меток для измерения расстояний в белках при комнатных температурах. В этом случае иммобилизация биополимера осуществляется с помощью лиофилизации в растворе дисахаридов. Лيوфилизация является способом сушки веществ, при котором высушиваемый препарат замораживается, а затем при малом давлении происходит возгонка растворителя. Дисахарид при этом образует достаточно жесткую матрицу, чтобы предотвратить как движения макромолекулы, так и локальные движения спиновых меток в структуре макромолекулы. Вследствие этого электронная спиновая фазовая релаксация замедляется и становится возможным проводить измерения методом PELDOR даже при комнатной температуре. Нами были измерены времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации для серии нитроксильных радикалов (рисунок 3.6). Целью этого исследования была оптимизация структуры окружения нитроксильной группы N–O для получения максимальной величины времени электронной спиновой фазовой релаксации спиновых меток с целью их дальнейшего использования для измерения структуры в лиофилизированных олигонуклеотидах методом PELDOR при комнатной температуре. Отметим, что чем больше время фазовой релаксации  $T_m$  используемой спиновой метки, тем большее расстояние можно измерить методом PELDOR.



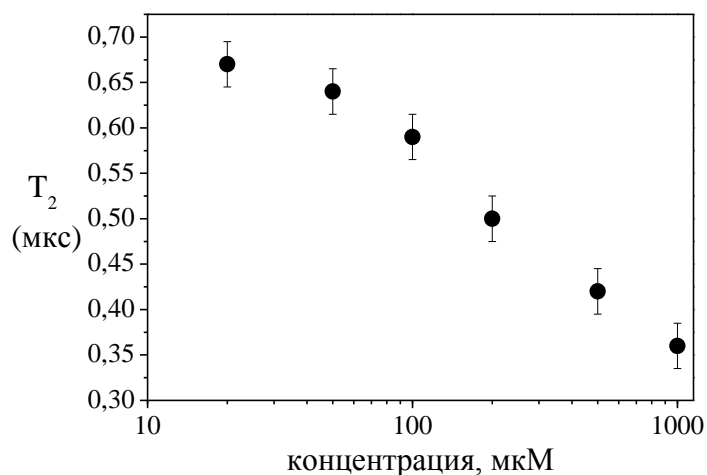
**Рисунок 3.7** — Спектры ЭПР лиофилизованного образца с радикалом **5** (SH3) (сверху) и 50 мкМ раствора этого же радикала в воде (снизу).

Другим преимуществом лиофилизации водных растворов дисахаридов состоит в том, что при таком способе иммобилизации сохраняется нативная структура исследуемого нуклеотида. Как показано в работе [167], трегалоза обладает преимуществом по сравнению с сахарозой при лиофилизации, так как образует более однородную структуру распределения дисахарида, воды и исследуемого вещества. В данной работе были приготовлены лиофилизованные из водных растворов с трегалозой образцы серии нитроксильных радикалов пиперидинового, пирролинового, имидазолинового и имидазолидинового рядов с различными объемными заместителями около нитроксильного центра. При приготовлении лиофилизованного образца раствор, содержащий 50 мкМ (если не указано иное) радикала и 0,8 М трегалозы быстро замораживали, а затем сушили под вакуумом в течение двух часов (подробное описание процедуры см. в разделе 5.3). Типичный спектр ЭПР лиофилизованного образца представлен на рис. 3.7. Для сравнения также указан изотропный спектр раствора радикала в воде.



**Таблица 3.3** — Измеренные времена спин-спиновой  $T_m$  и спин-решеточной  $T_1$  релаксаций для лиофилизированных образцов, содержащих **22** (SH1) при разных концентрациях радикала и разном давлении. Давление 1 атм соответствует свежеприготовленному образцу, давление  $1,3 \cdot 10^{-4}$  атм — дегазированный образец в герметичной ампуле. Концентрация трегалозы во всех случаях равна 0,8 М. Измерение релаксации проводилось на частоте центральной линии в спектре. Относительная ошибка значений составила не более 5%.

$C_{SH1}$ , мкМ	P = 1 атм		P $\approx 1,3 \cdot 10^{-4}$ атм	
	$T_m$ , мкс	$T_1$ , мкс	$T_m$ , мкс	$T_1$ , мкс
1000	0,36	15,4		
500	0,42	16,4	0,48	16,5
200	0,50	17,4	0,61	17,4
100	0,59	17,4		
50	0,64	18,0	0,65	18,1
20	0,67	18,2		



**Рисунок 3.8** — Значения времен электронной спин-спиновой релаксации  $T_m$  лиофилизированного образца **22** (SH1) в зависимости от начальной концентрации радикала. Значения взяты из табл. 3.3 при P = 1 атм.

Известно, что при большой концентрации радикалов время релаксации уменьшается из-за обменного взаимодействия между радикалами. На примере бис-спироциклогексилзамещенного пиперидинового радикала SH1 была экспериментально исследована зависимость времени спин-спиновой релаксации  $T_m$  от концентрации радикалов. Обнаружено, что при концентрации НР менее 0,1 мМ время релаксации  $T_2$  не зависит от концентрации НР и изменяется в пределах ошибки (см. табл. 3.3 и рис. 3.8). Измерения релаксации  $T_m$  для всей серии НР проводилось при концентрации НР 0,05 мМ, при которой отсутствует влияние диполь-дипольного и обменного взаимодействия на  $T_m$ . Для предотвращения влияния обменного взаимодействия с молекулами кислорода на спиновую

релаксацию производили дополнительную дегазацию с последующим запаиванием ампулы с образцом.

Нами было проведено сравнение двух методик приготовления лиофилизированных образцов радикалов. Один образец с радикалом **5** (SH3) приготовлен методом, указанным выше, т. е. быстрая заморозка с последующей сушкой под вакуумом, а второй — согласно методике [167], а именно: сушка под током азота и последующая выдержка над парами насыщенного LiCl. Измеренные значения релаксации  $T_m$  обоих образцов практически совпали: 0,75 и 0,72 мкс, соответственно. Таким образом, были определены условия приготовления и измерений остальных радикалов.

В таблице 3.4 приведены значения времен релаксации  $T_1$  и  $T_m$  при комнатной температуре для всех исследуемых радикалов в X-диапазоне и для некоторых — в Q-диапазоне. Также для этих диапазонов приведена длительность  $\pi$ -импульса в последовательностях для измерения релаксации ( $\pi/2-\pi$  для  $T_m$  и  $\pi-\pi/2-\pi$  для  $T_1$ ).

**Таблица 3.4** — Измеренные в X- и Q-диапазонах времена спин-спиновой  $T_m$  и спин-решеточной  $T_1$  релаксации при комнатной температуре для лиофилизированных образцов, содержащих в исходном растворе 50 мкМ радикала и 0,8 М трегалозы в воде. Каждый образец дополнительно дегазировался при давлении  $\sim 10^{-4}$  атм и запаивался в герметичной ампуле. Измерение релаксации проводилось на частоте центральной линии в спектре.

\*Значение  $T_m$  для TE2 получено косвенным способом, т. к. зависимость спада двухимпульсного эха от задержки между импульсами не строго экспоненциальная, а модулированная влиянием ядер дейтерия в радикале TE2.

Радикал	X-диапазон ( $\pi = 20$ нс)		Q-диапазон ( $\pi = 240$ нс)	
	$T_m$ , мкс ( $\pm 0,3$ )	$T_1$ , мкс ( $\pm 0,8$ )	$T_m$ , мкс ( $\pm 0,3$ )	$T_1$ , мкс ( $\pm 0,8$ )
SH1	0,66	17,3	0,74	19,1
SH2	0,68	17,8	0,78	17,8
SH3	0,74	22,2	0,81	21,3
SP1	0,58	28,9	0,67	24,2
TE2	0,57*	15,2	0,67	15,0
SHGS	0,61	21,6	0,73	21,5
TE4	0,55	20,2		
SHE1	0,57	19		
SHE2	0,63	17,6		
SPE1	0,61	21,9		
SPE2	0,63	16,8		
TM1	0,63	11,8		

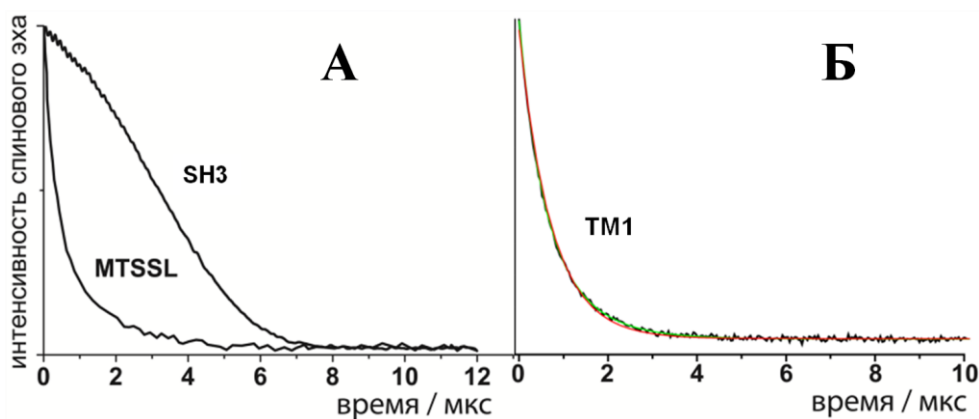
Как оказалось, замена заместителей возле нитроксильного фрагмента N–O влияет на время спин-спиновой релаксации  $T_m$  не так значительно ( $\pm 15\%$ ), как на время спин-решеточной  $T_1$  ( $\pm 40\%$ ) (см. табл. 3.4). Кроме того, в случае времени  $T_1$  яснее

просматривается зависимость значения  $T_1$  от структуры заместителей в радикале. Так, самым большим временем  $T_1$  обладает бис(спироциклопентил)-замещенный радикал SP1, а самым малым — тетраметилзамещенный TM1. На примере радикалов SHE1 и SPE1 видно, что замена спироциклогексильной группы возле нитроксильного фрагмента на спироциклопентильную заметно увеличивает время  $T_1$  за счет большей жесткости последней группы. Для более жестких циклов имидазолиновых радикалов SHE2 и SPE2 такая зависимость от боковых заместителей уже не вносит значительного вклада. При этом стоит отметить, что время фазовой релаксации  $T_m$  для всех четырех радикалов практически одинаковое. Также, сравнивая SH1, SH2 и SH3, можно обратить внимание на то, что большую роль играет жесткость и размер основного цикла радикала. Так, у радикалов с более жестким пятичленным циклом время релаксации больше, чем у радикалов с шестичленным, потому что увеличивается жесткость цикла и, следовательно, затрудняются локальные движения радикала. Ковалентное связывание нитроксильного радикала с глутатионом длинным линкером (радикал SHGS) увеличивает подвижность спиновой метки, добавляя дополнительные степени свободы, поэтому времена релаксации SH3 заметно больше по сравнению его производным SHGS. Можно также отметить довольно низкое значение времени  $T_m$  радикала SP1, особенно если учесть, что это пирролидиновый радикал с бис(циклопентил)- замещением. Это связано с наличием гидрофильных групп –ОН в циклопентильных фрагментах. Из-за них в лиофилизированном образце радикал окружает больше молекул воды по сравнению, например с SH3, поэтому и локальные движения разрешены в большей степени.

### 3.6. Температурная зависимость $T_m$ и $T_1$ для свободных нитроксильных радикалов в трегалозе.

Для нитроксильных радикалов **TM1**, **SH2** и **SH3** были измерены температурные зависимости времён электронной релаксации  $T_m$  и  $T_1$  в матрице трегалозы. Характерные спады спинового эха при низкой (100 К) и комнатной температурах наблюдаемые для нитроксильного радикалов **SH3**, **TM1** и стандартной спиновой метки MTSSL (см. рис. 3.1) в смеси вода-глицерин и в матрице трегалозы приведены на рис. 3.9А и Б. В отличие от MTSSL, временной спад спинового эха для нитроксильных радикалов с двумя спироциклогексановыми фрагментами при низких температурах не моноэкспоненциален. Аналогичное различие в форме кривых ранее наблюдали для пиперидиновых нитроксильных радикалов со спироциклогексановыми фрагментами в водно-глицериновом растворе [85].

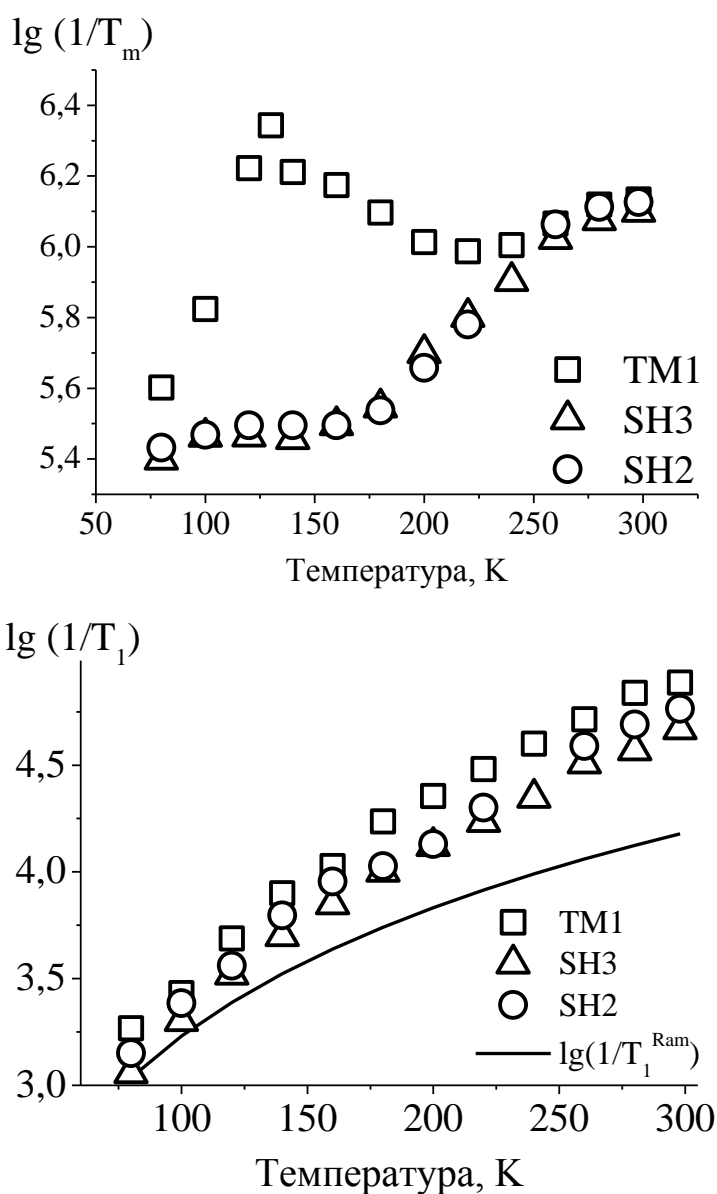
Температурные зависимости времен релаксации нитроксильных радикалов TM1, SH2 и SH3 приведены на рисунке 3.10. Для тетраметилзамещенных НР резкий рост скорости электронной фазовой релаксации при температурах  $T > 80$  К обусловлен движением  $-\text{CH}_3$  групп [168]. Введение громоздких спироциклических фрагментов вместо метильных групп приводит к отсутствию этого вклада. Временная зависимость спинового эха при низких температурах для спироциклогексан-замещенных НР определяется электронной фазовой релаксацией за счет флип-флоп переходов спинов протонов растворителя [169]. Флип-флоп переходы в системе ядерных спинов изменяют величину сверхтонкого взаимодействия с электроном, что приводит к спектральной диффузии [170]. При этом спад спинового эха можно описать функцией:  $I(t) = I_0 \exp(-\frac{t}{T_m})^n$ , где  $n$  меняется в пределах от  $n=2$  до  $n=1$  и зависит от температуры. В пределе низких температур (25 К)  $n \approx 2$ ; при температурах, когда на электронную фазовую релаксацию начинают оказывать влияния динамические процессы, значение  $n$  стремится к единице.



**Рисунок 3.9** — (А) Характерные спады спинового эха для MTSSL [85] и SH3 в водно-глицериновых растворах (1:1) при 100 К; (Б) спад эха радикала TM1 в Q-диапазоне при комнатной температуре (черная линия), биэкспоненциальное моделирование спада (зеленая линия,  $T_{m1} = 0,94$  мкс,  $T_{m2} = 0,44$  мкс с вкладами 0,56 и 0,44, соответственно), моноэкспоненциальное моделирование (красная линия,  $T_m = 0,72$  мкс). Наблюдение эха проводилось на частоте центральной линии в спектре.

Для того, чтобы сравнивать результаты при различных температурах, времена фазовой электронной спиновой релаксации оценивали как время, за которое интенсивность сигнала спинового эха спадает в 2,7 раза. Температурные зависимости времен релаксации для нитроксильных радикалов **5**, **6**, **9**, MDSSL (спироциклогексилзамещенный аналог MTSSL), полученные по этому методу, показаны на рис. 3.10 и в табл. 3.5. Оцененные времена релаксации  $T_m$  для этих нитроксильных радикалов практически не зависят от температуры в диапазоне 50–120 К, и практически одинаковы для всех изученных

соединений. На основании этого можно заключить, что новые 2,5-спироциклогексилзамещённые пирролиновые НР пригодны для измерения межспиновых расстояний методом PELDOR даже при температуре 80–120 К.



**Рисунок 3.10** — Температурные зависимости времён релаксации  $T_m$  (сверху) и  $T_1$  (снизу) в водно-глицериновом растворе (1:1) для TM1 ( $\square$ ), SH3( $\Delta$ ), SH2 ( $\circ$ ). Погрешность измерений  $\sim 5\%$ . Измерение релаксации проводилось на частоте центральной линии в спектре. Сплошной линией снизу показан результат моделирования экспериментальных данных для SH3( $\Delta$ ) в предположении, что основным механизмом спин-решеточной электронной релаксации является Рамановский процесс:  $1/T_1^{Ram} = C_{Ram} T^2$  при температуре выше температуры Дебая. Полученное из моделирования значение  $C_{Ram} = 0,17 \text{ с}^{-1} \cdot \text{К}^{-2}$ .

**Таблица 3.5** — Параметры электронной спиновой релаксации  $T_m$  и  $T_1$  в водно-глицериновых растворах (1:1) при  $T=80$  К и  $T=120$  К. Погрешность измерений  $\sim 5\%$ . Измерение релаксации проводилось на частоте центральной линии в спектре. Данные радикала MTSSL взяты из [85].

Радикал	$\lg(1/T_m)$ $\lg(1/T_1)$		$\lg(1/T_m)$ $\lg(1/T_1)$	
	T= 80 К		T= 120 К	
<b>6</b>	<b>5,41</b>	<b>2,96</b>	<b>5,40</b>	<b>3,40</b>
<b>SH3 (5)</b>	<b>5,37</b>	<b>2,96</b>	<b>5,44</b>	<b>3,42</b>
<b>9</b>	<b>5,41</b>	<b>3,00</b>	<b>5,42</b>	<b>3,38</b>
<b>MDSSL</b>	<b>5,49</b>	<b>2,87</b>	<b>5,57</b>	<b>3,33</b>
<b>MDSSL-GSH</b>	<b>5,42</b>	<b>2,92</b>	<b>5,43</b>	<b>3,39</b>
<b>MTSSL</b>	<b>5,57</b>	<b>3,2</b>	<b>6,4</b>	<b>3,58</b>

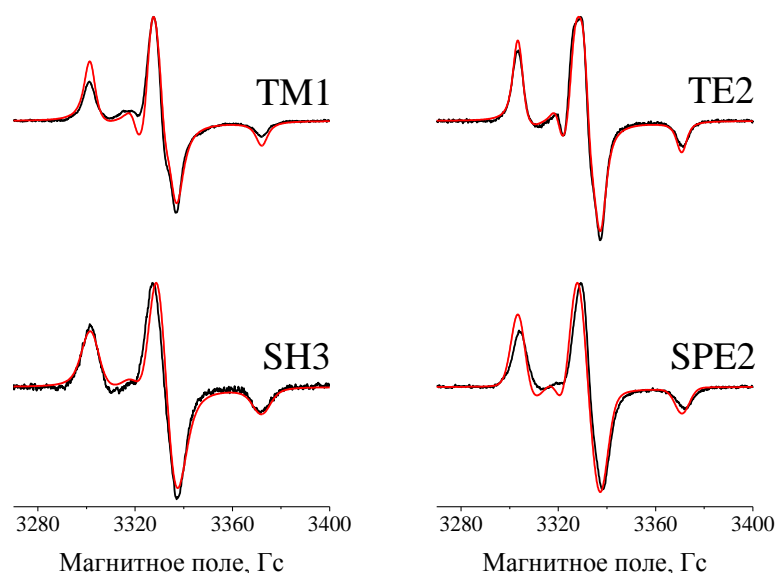
На рис. 3.10 также приведены температурные зависимости времен электронной релаксации  $T_1$  для исследуемых радикалов. Для спироциклогексилзамещенных радикалов в диапазоне температур 50–120 К спин-решеточная релаксация определяется Рамановским процессом, как и для большинства нитроксильных радикалов, и ее скорость пропорциональна  $T^2$   $1/T_1^{Ram} = C_{Ram} T^2$  в пределе высоких температур — выше температуры Дебая. Это позволяет увеличивать частоту повторения импульсной последовательности с увеличением температуры и, таким образом, компенсировать снижение интенсивности спинового эха, которое пропорционально Больцмановскому фактору  $\sim 1/T$ .

При комнатной температуре величины времен релаксации были получены с использованием моделирования экспериментальных спадов моноэкспонентой. Отметим, что  $T_m$  релаксационные кривые слегка отличаются от моноэкспоненты, и могут быть более точно описаны биэкспоненциальным спадом. Однако, с нашей точки зрения эти различия малы и ими можно пренебречь (см. рис. 3.9Б). Возможно, именно отличия от экспоненты являются причиной некоторой несистематической зависимости величин  $T_m$  для различных радикалов. Форма зависимости  $T_m$  от температуры (рис. 3.10) в целом сравнима с той, что наблюдалась в замороженных растворах [84,166]. Тетраметилзамещенный радикал демонстрирует значительное ускорение фазовой релаксации  $1/T_m$  при  $T > 100$  К, так как термически активируется быстрое вращение метильных групп; при  $T > 140$  К это вращение становится достаточно быстрым для усреднения анизотропии СТВ, приводя к некоторому уменьшению фазовой релаксации; наконец, при  $T > 220$  К фазовую релаксацию определяет либрационное движение группы NO [171,172,173] и ее скорость продолжает увеличиваться с ростом температуры. В отличие от тетраметилзамещенного радикала для спироциклогексилзамещенного радикала не наблюдалась колоколообразная форма зависимости. Наблюдалось лишь увеличение  $1/T_m$  из-за либраций, которое начинается выше

~170 К. Температурная зависимость  $1/T_1$  аналогична для обоих радикалов и в целом похожа на зависимость, полученную в замороженных растворах.

### 3.7. Моделирование ЭПР спектров в X-диапазоне при T=300 К

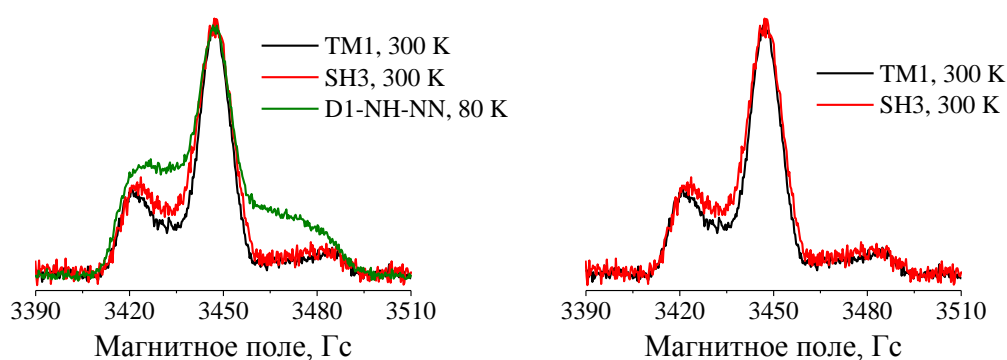
Для большинства радикалов экспериментальные спектры ЭПР в X-диапазоне при температуре 300 К хорошо согласуются с расчетными в модели твердотельных порошков (функция «реррег» в программе Easyspin). Спектры приведены на рисунке 3.11 и в Приложении В, а параметры моделирования — в Приложении Г. Эти результаты однозначно доказывают, что дополнительная сушка трегалозы приводит к полному подавлению вращательных движений радикалов. Для радикалов **SP1** и **SHSG**, для хорошего согласия экспериментального и расчетного спектров, к последним были добавлены синглетные широкие линии с тем же самым g-фактором. Мы относим эту линию к фракции нитроксидов с высокой локальной концентрацией, приводящей к обменному сужению. Такие фракции могут образовываться при быстрой дегидратации трегалозы в ходе сушки. Отметим, что радикалы в таких «кластерах» релаксируют значительно быстрее, что вносит большой вклад в спад спинового эха; это было подтверждено экспериментально. Данные по временам релаксации, приведенные в таблице 3.4, относятся только к очень низким концентрациям НР.



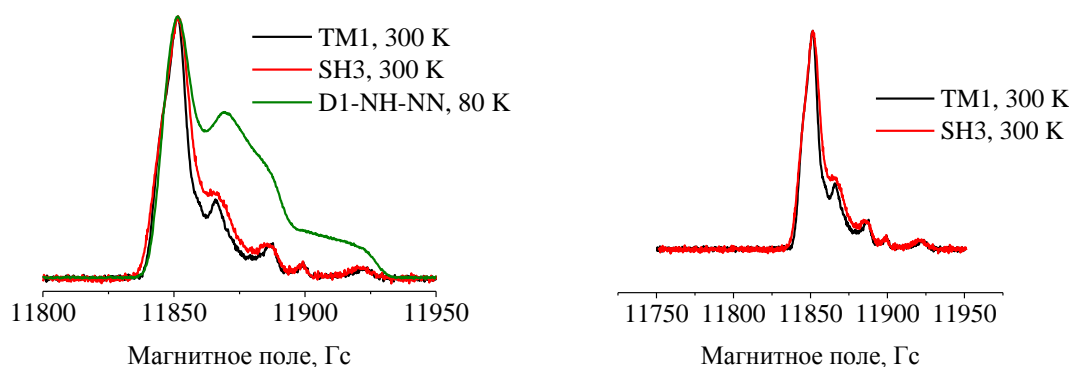
*Рисунок 3.11 — Стационарные спектры ЭПР в X-диапазоне некоторых из исследуемых радикалов (черные линии) и их моделирование (красные линии). Спектры остальных радикалов, а также параметры моделирования см. в приложениях В и Г.*

На рисунках 3.12 и 3.13 показаны эхо-детектируемые ЭПР спектры в X/Q-диапазоне для двух радикалов **TM1** и **SH3**, соответственно, измеренные в трегалозе при комнатной

температуре. Эти спектры в обоих диапазонах были получены с использованием двухимпульсной последовательности с одинаковыми длинами импульсов 50/100 нс для  $\pi/2$  и  $\pi$  с задержкой 500 нс. ЭД ЭПР-спектры в трегалозе существенно отличаются от типичных низкотемпературных спектров в обоих диапазонах. Например, в X-диапазоне  $M_s=\pm 1$  компонента спектра уменьшена по интенсивности по сравнению с компонентой  $M_s=0$  (в центре спектра). Такое поведение является типичным для проявления интенсивных либраций при комнатной температуре в трегалозе [171,174]. Как известно, либрации вызывают анизотропную спиновую релаксацию. Действительно, величины  $T_m$ , измеренные в X/Q-диапазонах сильно зависят от положения в спектре и изменяются от 730 нс до 445 нс для **TM1** и от 780 нс до 465 нс для **SH3**.



**Рисунок 3.12** — Эхо-детектированные ЭПР-спектры в X-диапазоне для НР **TM1** (черная линия) и **SH3** (красная линия) при комнатной температуре. Эхо-детектированный ЭПР-спектр в X-диапазоне спин-меченного дуплекса при 80 К (зеленая линия).



**Рисунок 3.13** — Эхо-детектированные ЭПР спектры в Q-диапазоне для НР **TM1** (черная линия) и **SH3** (красная линия) при комнатной температуре. Эхо-детектированный ЭПР-спектр в Q-диапазоне спин-меченного дуплекса при 80 К (зеленая линия).

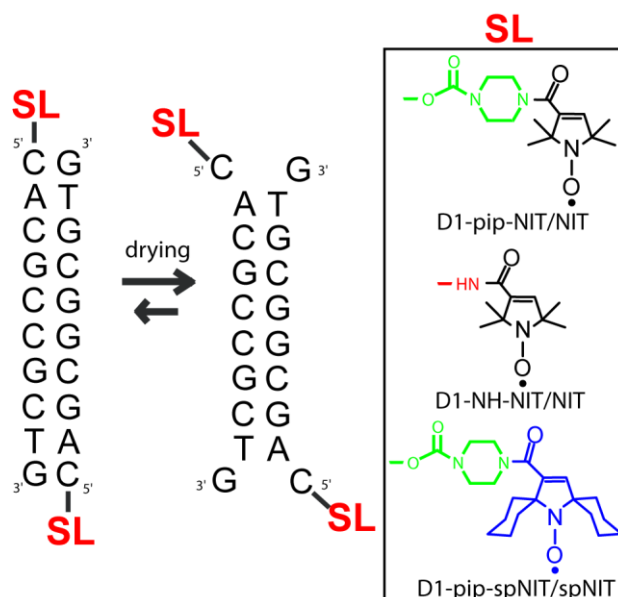
Отметим, что при комнатной температуре разница в  $1/T_m$  между свободными радикалами **TM1** и **SH3** становится очень маленькой. В то же время группа Итона [75], исследовав белки, спин-меченные спиросамещенными и тетраметильными радикалами, в матрице трегалозы при комнатных температурах, обнаружили, что происходит увеличение



времени фазовой релаксации спиросамещенного нитроксильного радикала по сравнению с тетраметильным. Можно предположить, что это объясняется различием в специфичном взаимодействии спиновых меток с белком [75]. Для проверки этой гипотезы мы сравнили два типа спиновых меток, ковалентно связанных с олигонуклеотидом и иммобилизованных в трегалозе.

### **3.8. Времена релаксации нитроксильных радикалов ковалентно связанных с олигонуклеотидами при комнатной температуре в матрице трегалозы**

Нами были измерены времена электронной спиновой релаксации для трех ДНК-дуплексов, спин-меченных парами тетраметил- или спироциклогексилзамещенных нитроксильных радикалов (рис. 3.10). Синтез дуплексов проводился в Институте химической биологии и экспериментальной медицины СО РАН Г. А. Шевелевым. В таблице 3.5 приведены измеренные величины электронной спиновой релаксации при комнатной температуре для трех спин-меченных систем ДНК в трегалозе. Используемые спиновые метки по строению наиболее близки к **2c** и **1**. Примечательно, что значение  $T_m$  для спироциклогексилзамещенной метки возросло по сравнению с радикалом **2c** (см. табл. 3.4), тогда как  $T_m$  для тетраметилзамещенной метки осталось близко к соответствующему значению для **1**. Как видно из таблицы, использование более жесткого NH-линкера для тетраметилзамещенной метки приводит к удлинению фазовой релаксации,  $T_m$ . Оба вышеприведенных результата свидетельствуют о важности взаимодействия спиновой метки с биомолекулой, его зависимости от типа радикала и линкера и, несомненно, от конкретной биомолекулы (белка или нуклеиновой кислоты). В нашем эксперименте со спин-меченой ДНК в трегалозе спироциклогексилзамещенная метка, возможно, лучше иммобилизуется по сравнению со свободным **2c** в трегалозе. То же самое происходит с тетраметилзамещенной меткой, но при использовании более жесткого линкера. Трудно сделать вывод о том, почему в работе [75] обнаружена столь ощутимая разница значений  $T_m$  для спироциклогексил- и тетраметилзамещенных спиновых меток (920 и 550 нс, соответственно). Большие значения  $T_m$  для спироциклогексилзамещенной метки, полученными в этой работе по сравнению с нашими данными для свободных радикалов типа **2** в трегалозе, можно объяснить взаимодействием спироциклогексильных групп с белком, которое уменьшает амплитуду либраций NO группы. Меньшие значения  $T_m$ , наблюдаемые для меток типа **1** [75] по сравнению с соответствующим исследованным нами радикалом, объясняется большей подвижностью метки по сравнению со свободным радикалом в матрице трегалозы.



**Рисунок 3.10** — Структуры спин-меченых ДНК-дуплексов.

Отметим, что хотя величина  $T_m$  спироциклогексилзамещенной метки, ковалентно связанной с ДНК немного выше по сравнению со значением для тетраметилзамещенной, значение  $T_1$  примерно в два раза больше в первом случае. В некоторых случаях это может нивелировать выгоду от большего значения  $T_m$  для измерений DEER.

Отметим, что большее значение  $T_1$  для спиновых меток на основе спироциклогексилзамещенных и спироциклопентилзамещенных радикалов, в особенности **3**, может быть преимуществом в случае их применения и использовании методов усиления релаксации или насыщение — восстановление.

**Таблица 3.5** — Времена релаксации, измеренные для спин-меченного дуплекса в трегалозе при 298 К в X-диапазоне. Образцы были дегазированы при  $3,5 \cdot 10^{-9}$  бар в течение 24 часов.

	$T_m$ , нс	$T_1$ , мкс
<b>D1-pip-spNIT/spNIT</b>	<b>850</b>	<b>25</b>
<b>D1-pip-NIT/NIT</b>	<b>720</b>	<b>13</b>
<b>D1-NH-NIT/NIT</b>	<b>800</b>	<b>13</b>

### 3.9. Заключение

Стабильность нитроксильных радикалов, используемых в качестве спиновых меток и спиновых зондов, определяющих их функциональность, является одной из важнейших характеристик. В этой главе нами были измерены константы скорости восстановления новых 2,5-спироциклогексан-замещенных нитроксильных радикалов пирролинового типа аскорбиновой кислотой. На основании анализа полученных данных показано, что они обладают существенно более высокой стабильностью по отношению к биогенным восстановителям по сравнению с их тетраметильными аналогами, и являются перспективными для структурных исследований биополимеров при азотных температурах, а

также многообещающими спиновыми зондами для измерений окислительно-восстановительного статуса методами ЭПР и МРТ в биомедицинских исследованиях [60,166,92].

Измерения расстояний в биомолекулах методами импульсного ЭПР, как правило, проводятся при гелиевых температурах. Разработка методик, которые могли бы позволить проводить такие измерения при комнатной температуре является важнейшей задачей уже несколько десятилетий. В опубликованных недавно работах продемонстрирована такая возможность. При разработке методик используются новые типы спиновых меток и/или подходы по их иммобилизации, в особенности с использованием трегалозы [75]. В этой главе мы исследовали электронную спиновую релаксацию серии нитроксильных радикалов с различными заместителями около NO-группы. Оказалось, что существенного различия в электронной спиновой фазовой релаксации для свободных нитроксильных радикалов в матрице трегалозы при комнатной температуре не наблюдается. Некоторые различия в релаксации между спироциклогексил- и тетраметилзамещенными нитроксильными радикалами появляются при ковалентном связывании их с биомолекулами. Таким образом, в нашей работе показано, что специфические взаимодействия НР с биомолекулой и способ введения спиновой метки (жесткость линкера) могут быть более важными факторами, чем релаксация свободного НР.

## Глава 4. Исследование магнитно-резонансных и функциональных свойств тритильных радикалов

### 4.1. Введение

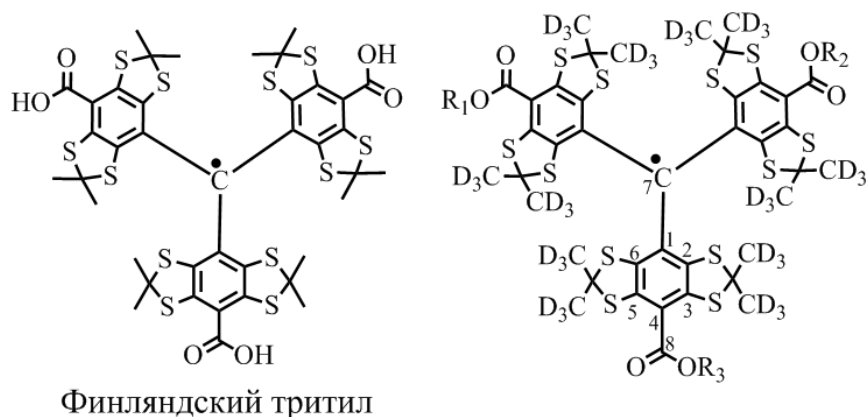
Стабильные триарилметильные радикалы (ТАМ), предложенные недавно [111] в качестве альтернативы нитроксильным радикалам, в последние годы стали предметом пристального внимания. По сравнению с нитроксилами ТАМ имеют заметные преимущества по ряду ключевых признаков, а именно: большие величины времен релаксации  $T_1$  и  $T_2$  и устойчивость по отношению к окислительно-восстановительным факторам, присутствующим в живых тканях и плазме крови. Эти качества в сочетании с узкими линиями в спектрах ЭПР обусловили перспективность ТАМ для множественных приложений, например, в биологии [98,105,115,175,176,177,178], медицине [113,114], аналитической химии [103,179,180], материаловедении [181], применения в качестве поляризующего агента в экспериментах с использованием эффекта динамической ядерной поляризации [182,183].

Особое место в ряду приложений ТАМ занимают исследования структуры биологических макромолекул, в том числе направленные на установление связей между строением и функциональными характеристиками биополимеров. Важно отметить, что спиновые метки на основе ТАМ демонстрируют рекордно большие времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации. Так при температуре 300 К и проведении ЭПР эксперимента в растворе они могут приближаться к 14 и 26 мкс, соответственно [129].

Благодаря таким большим значениям релаксации верхний предел достижимых для надежного измерения межспиновых расстояний в настоящее время достиг отметки 40–50 Å [124,125,126,184]. Отметим, что качество получаемых результатов контролируется множеством факторов, в том числе выбором сигналов, используемых в методиках импульсного ЭПР (DEER, DQC) для микроволновой накачки и регистрации спинового эха, соответственно [124,126].

Для проведения измерений необходимо располагать надежной информацией о природе сигналов, регистрируемых в спектрах электронного парамагнитного резонанса как бирадикалов, так и исходных спиновых меток на основе ТАМ. В дополнение к вкладам от обменного взаимодействия, типичного лишь для бирадикалов, источником сигналов в спектре ЭПР являются СТВ неспаренного электрона с ядрами атомов, обладающих ненулевым магнитным моментом, в том числе на ядрах  $^{13}\text{C}$ , представленных в исследуемых объектах на уровне природной распространенности (1,08–1,12 атомных процентов) [184].

Мы провели анализ литературных источников в поисках информации о проявлении вызванного ядрами  $^{13}\text{C}$  сверхтонкого взаимодействия в ЭПР спектрах тритильных радикалов. Тогда как для тритильных радикалов с простой структурой константы СТВ на ядрах  $^{13}\text{C}$  известны, по меньшей мере, с 60-х годов XX в. [185,186], для т. н. «финляндских» тритильных радикалов (см. [111] и рис. 4.1), учитывая их относительную новизну, они неизвестны. В этой главе нами были измерены константы СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$  для ряда тритильных радикалов. Приведены результаты систематического анализа влияния природы заместителей в тритильном радикале и растворителя на константы СТВ.



**Рисунок 4.1** — Структура «финляндского» тритила. Структура дейтеропроизводных «финляндского» тритила с различными заместителями  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и принятой нумерацией атомов углерода.

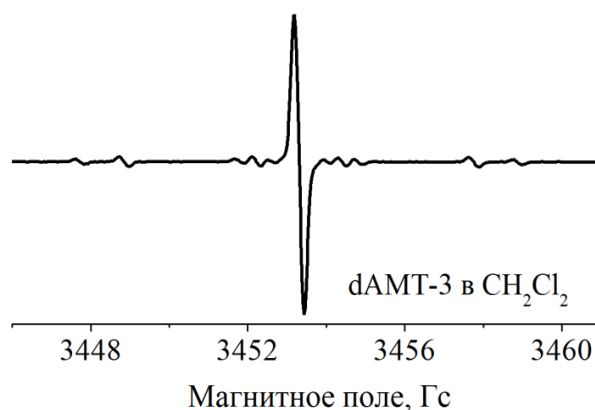
**Таблица 4.1** — Расшифровка заместителей в радикалах  $d\text{CT}$ ,  $d\text{AMT-1-3}$  и  $d\text{MET}$ . Полное дейтерирование по позициям 36 протонов двенадцати экзоциклических метильных групп приводит к получению дейтерированного аналога «финляндского» тритила  $d\text{CT}$  (Рис. 3.1,  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ , в ЭПР спектре которого наблюдается единственный интенсивный сигнал, регистрируемый в виде чрезвычайно узкого синглета шириной 39 мГц, Рис. 4.2.

Название	$R_1$	$R_2$	$R_3$
$d\text{CT}$	H	H	H
$d\text{AMT-1}$	H	H	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$
$d\text{AMT-2}$	H	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$
$d\text{AMT-3}$	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	$-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$
$d\text{MET}$	$-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$		

## 4.2. Магнитно-резонансные параметры

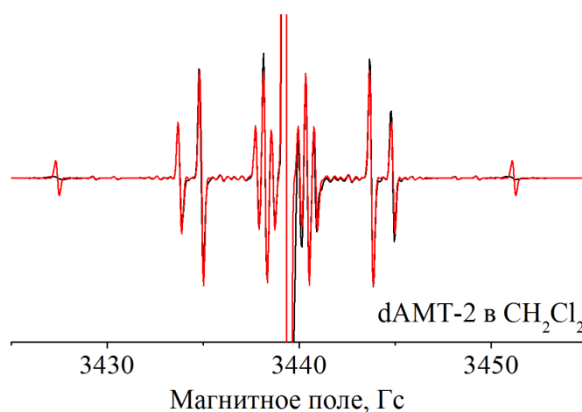
В качестве объекта исследования мы выбрали серию производных трис(8-карбоксил-2,2,6,6-тетраметилбензо[1,2-d;4,5-d']бис[1,3]дитиол-4-ил)метила, более известного под

названием «финляндский» тритил (см. рисунок 4.1). Структуры изученных объектов отличались заместителями  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  (см. рис. 4.1), природа которых указана в таблице 4.1.



**Рисунок 4.2** — Общий вид спектра ЭПР тритильного радикала dAMT-3. Спектры остальных радикалов, содержащих сложноэфирные группы при атомах  $C^4$ , имеют аналогичный вид (см. также рис. 4.3).

Малая ширина сигнала в сочетании с отсутствием в структуре изучаемого тритила атомов H, N, F или P, способных вызывать СТВ с неспаренным электроном, приводят к предельному упрощению спектра. Это позволяет с высокой надежностью регистрировать сигналы спутников от ядер  $^{13}C$ , измерить их интенсивности, измерить соответствующие константы СТВ и провести их отнесение. Распределение интенсивностей спутниковых сигналов выражается последовательностью 3:6:3:6:3 (сигналы перечислены в порядке их удаления от центрального синглета).



**Рисунок 4.3** — Увеличенный по оси ординат в 20 раз спектр dAMT-2 (черная линия) и его моделирование (красная линия). Кроме расщеплений на одном атоме  $^{13}C$  можно также увидеть и групповые расщепления с очень слабой интенсивностью, связанной с малой вероятностью реализации СТВ на двух и более ядер  $^{13}C$  (<0,01%)

В таблице 4.2 приведены магнитно-резонансные параметры радикалов —  $g$ -факторы константы СТВ с атомами углерода  $a_C$ . Нумерация атомов углерода соответствует приведенной на рисунке 4.1.

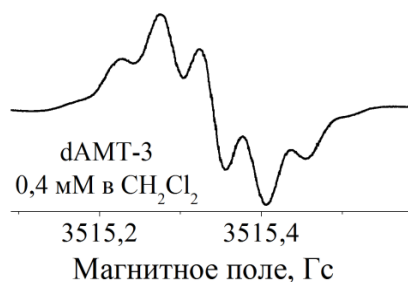
Очевидно, что указанное распределение отражает количество атомов углерода, представленных в молекуле тритила в конкретном структурном контексте: 3 атома  $C^8$ : $6C^{3,5}$ : $3C^4$ : $6C^2$ : $6$ : $3C^1$  (при отнесении сигналов использован подход, описанный в работе [187]).

**Таблица 4.2** — Магнитно-резонансные параметры исследуемых тритильных радикалов.

Значения констант СТВ с ядрами  $^{13}C$  измерены по спектрам ЭПР (кроме  $a_{c8}$ ), подтверждены моделированием спектров. Значения констант СТВ с ядрами  $^1H$  и  $g$ -факторы вычислены с помощью моделирования

	g-фактор $\pm 0,00005$	$a_{c7}$	$a_{c1}$	$a_{c2,6}$	$a_{c4}$	$a_{c3,5}$	$a_{c8}$	$a_H1$	$a_H2$
		Гс, $\pm 0,03$						мГс, $\pm 2$	
<b>dCT</b> в воде, pH 7,2	2,00260	—	11,2	9,0	3,3	2,4	1,3	—	—
<b>dAMT-1</b> в метаноле	2,00264	—	11,1	8,9	3,3	2,3	1,3	37	47
<b>dAMT-2</b> в бензоле	2,00278	23,5	11,0	8,8	3,0	1,8	1,4	55	45
<b>dAMT-3</b> в бензоле	2,00271	—	11,1	8,8	3,0	2,2	1,4	42	55
<b>dAMT-3</b> в дихлорметане	2,00271	—	11,1	8,8	3,0	2,2	1,4	42	55
<b>dMET</b> в воде pH 7,1	2,00267	—	11,0	8,8	3,4	2,5	—	91	116

Переход к сложным эфирам приводит к некоторому усложнению спектра ЭПР: в кислородсодержащих образцах регистрируются синглетные сигналы, уширенные до 100–200 мГс вследствие неразрешенного взаимодействия с протонами эфирных  $COOCH_2$  групп (см. рис. 4.2).



**Рисунок 4.4** — Сверхтонкая структура центральной линии спектра dAMT-3, связанная со сверхтонким расщеплением на парах протонов ацетоксиметоксильных групп в боковых заместителях

Однако удаление кислорода приводит к регистрации хорошо разрешенных спектров, позволяющих выявить сверхтонкую их структуру (см. рис. 4.4 и Приложение Д), вызванную присутствием метиленовых протонов, и измерить соответствующие константы  $a_H$  (табл. 4.2).

Анализ констант СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$  показывает, что последовательный переход от незамещенной формы дейтеропроизводного «финляндского» тритила (трикислота dCT) к моноэфиру dAMT-1, диэфиру dAMT-2, и наконец, к триэфирам dAMT-3 и dMET, не приводит к сколько-нибудь значимому изменению констант  $a_c$ . Аналогично, на значения констант СТВ с ядрами углерода не оказывает влияние природа спиртовой части сложного эфира и выбранного растворителя (см. табл. 4.2). Заметим, что полярность последнего изменялась в широких пределах.

Вместе с тем на примере ряда dAMT-1–3 (моноэфир, диэфир, триэфир) просматривается зависимость констант  $a_H$  от количества введенных эфирных групп. Обращает на себя внимание и эффект магнитной неэквивалентности метиленовых протонов, представленных в  $\text{COOCH}_2$ -группах. Представляется разумным связать указанную неэквивалентность с диастереотопной природой метиленовых протонов, которая вызвана хиральным характером ТАМ, подтвержденным недавними исследованиями [109].

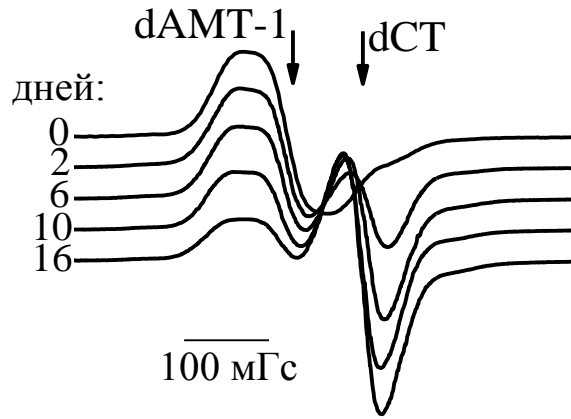
Особое место занимают сателлитные сигналы, соответствующие сверхтонкому взаимодействию с ядром  $^{13}\text{C}$  центрального атома углерода. В противоположность сателлитам от взаимодействия с периферическими атомами углерода, эти сигналы уширены до такой степени, что достоверного их наблюдения удалось добиться лишь для диэфира dAMT-2, причем при большом количестве накоплений. Это уширение может быть связано с увеличенным вкладом членов  $[g:g]$  и  $[A:A]$  в выражении для релаксации  $T_2$ .

Таким образом, на примере представительного ряда ТАМ, в настоящей работе показано, что константы СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$  практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру по карбоксильным группам последнего. Исследование показало отсутствие заметного влияния растворителя на величины  $a_H$ . Обнаружена аномально большая ширина сателлитных линий, соответствующих СТВ с ядром  $^{13}\text{C}$  центрального атома углерода тритильного радикала.

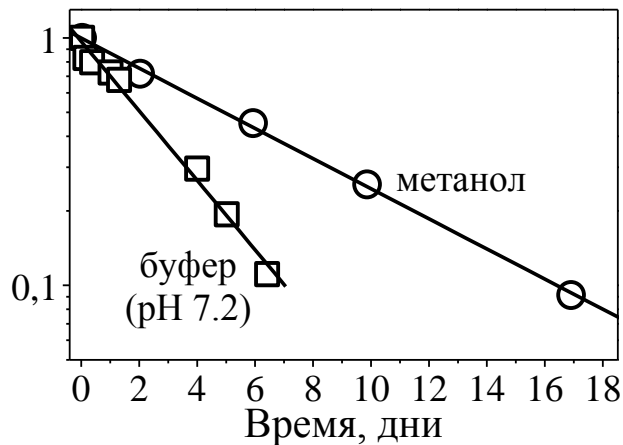
### 4.3. Гидролиз тритильных радикалов dAMT

Радикалы dAMT-1–3 были растворены в смеси карбонатный буфер (pH 9,6)/метанол 1:1 и затем, после шестикратного повторения процедуры «заморозка — откачка» были записаны их спектры ЭПР. Наблюдаемые спектры несимметричны, что означает присутствие двух неэквивалентных радикалов в растворе. Измеренные магнитно-резонансные параметры спектров показали, что основная компонента принадлежит радикалу dCT для всех трёх спектров, что означает быстрый (в течение одного часа длительности процедуры «заморозка — откачка») переход радикалов с 1–3 ацетоксиметоксильными группами в один и тот же трикарбоксильный тритильный радикал dCT в щелочной среде.





**Рисунок 4.5** — Изменения в спектре ЭПР тритильного радикала  $dAMT-1$  ( $0,25$  мМ) в  $MeOH$ , обусловленные реакцией гидролиза. Стрелками указаны центры сигналов  $dAMT-1$  и продукта гидролиза  $dCT$ .



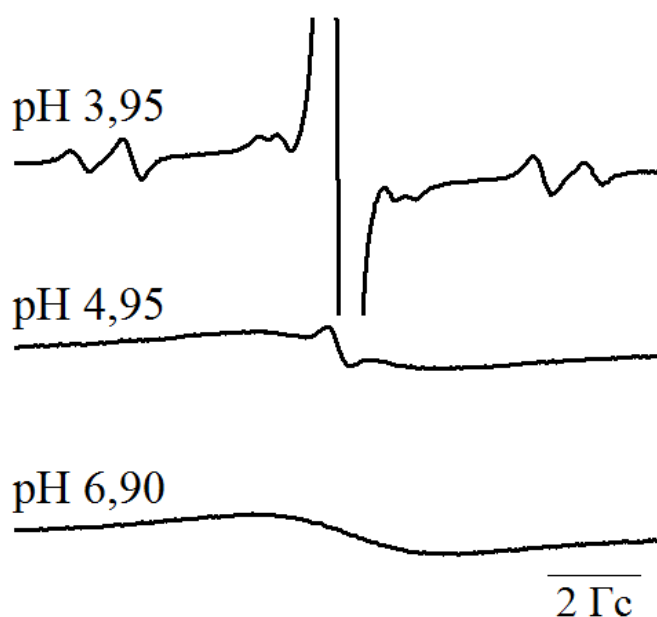
**Рисунок 4.6** — Кинетики гидролиза радикала  $dAMT-1$  в метаноле ( $\circ$ ) и фосфатном буфере при  $pH$  7,2 ( $\square$ ). Прямыми обозначены соответствующие линейзации кинетики.

Экспериментально было обнаружено, что реакция сольволиза протекает также в чистом метаноле и нейтральной среде, однако с меньшей скоростью (см. рис. 4.5 и 4.6). Для определения скорости сольволиза были приготовлены образцы радикала  $dAMT-1$  в метаноле ( $0,25$  мМ, шестикратная процедура «заморозка — откачка») и буфере с  $pH$  7,2 ( $0,5$  мМ, четырёхкратная процедура «заморозка — откачка», 5% метанола), спектры которых записывались каждые несколько дней при одинаковых настройках ЭПР-спектрометра.

Для оценки скорости гидролиза использовалось экспоненциальное приближение кинетики изменения максимума компоненты с  $g = 2,00344$  (радикал  $dAMT-1$ ). Вычисленные таким образом константы равны: в метаноле,  $k_{MeOH} = (1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ ; в водном буфере  $pH$  7,2,  $k_{вод} = (3,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ .

#### 4.4. Зависимость спектра dMET от pH

Поскольку тритильный радикал dMET содержит в своем составе атом азота, можно было бы ожидать зависимость его спектра ЭПР от pH. В этом случае можно было бы его применять в качестве бифункционального спинового зонда (на оксиметрию и pH). Для ответа на этот вопрос нами были измерены спектры dMET при различных значениях pH (рис. 4.7). Оказалось, что при  $\text{pH} > 4$  спектр сильно уширяется. Последнее, скорее всего связано с образованием комплексов тритильных радикалов и наличия сильного обменного в таких комплексах. Как было ранее показано в работе Храмцова с соавторами [103], комплексообразование тритильных радикалов обусловлено связыванием с их протонированными формами.



*Рисунок 4.7 — ЭПР-спектры 0,5 мМ водного раствора dMET при pH 3,95, 4,95, 6,90 (сверху вниз).*

Было обнаружено, что вид спектра ЭПР не изменяется при протонирование морфолиновой группы, т. к. она находится на большом удалении от радикального центра, и константы СТВ с ядрами С и Н ничтожно малы. Таким образом, можно сделать вывод о том, что этот радикал не пригоден для использования в качестве бифункционального зонда на pH и  $\text{O}_2$ , а для создания бифункционального зонда на основе тритильных радикалов протонированный атом азота необходимо вводить на положения в большей близости к радикальному центру.

#### 4.5. Заключение

В этой главе приведены результаты измерения магнитно-резонансных характеристик и исследования функциональных свойств новых тритильных радикалов.

Для ряда новых тритильных радикалов измерены константы СТВ неспаренного электрона с ядрами  $^{13}\text{C}$ . На примере характерного ряда ТАМ, в настоящей работе показано, что константы СТВ с ядрами  $^{13}\text{C}$  практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру по карбоксильным группам последнего. Исследование показало отсутствие заметного влияния растворителя на величины  $a_{\text{H}}$ . Обнаружена аномально большая ширина сателлитных линий, соответствующих СТВ с ядром  $^{13}\text{C}$  центрального атома углерода тритильного радикала, обусловленная модуляцией анизотропии константы СТВ.

Измерены константы скорости реакции отрыва ацетоксиметоксильной группы радикала dAMT-1 в метиловом спирте и водном буфере. Сделан вывод о том, что тритильные радикалы dAMT можно использовать в качестве чувствительных внутриклеточных оксиметрических зондов, однако следует учесть, что они разрушаются не только внутриклеточными эстеразами, но и в водной среде.

Установлено также, что в при движении в щелочную среду происходит обратимое уширение ЭПР-спектра радикала с протонируемой морфолиновой группой dMET, что препятствует его использованию в качестве бифункционального зонда на  $\text{pH}/\text{O}_2$ .

## Глава 5. Материалы и методы

### 5.1. Реагенты

#### 5.1.1. Коммерческие реагенты.

Использовалась трегалоза фирмы Sigma-Aldrich в форме дигидрата. L-аскорбиновая кислота приобретена в Sigma-Aldrich. Гепарин куплен в аптеке как лекарство без рецепта. Использовался Темпро (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил) фирмы Acros Organics. Животные для экспериментов, тиопентал натрия ((RS)-[5-этил-4,6-диоксо-5-(пентан-2-ил)-1,4,5,6-тетрагидропиримидин-2-ил]сульфанид натрия) и липополисахарид (ЛПС) были предоставлены проф. Н. Г. Колосовой из Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск).

#### 5.1.2. Некоммерческие реагенты.

Спирозамещенные нитроксильные радикалы синтезированы к. х. н. И. А. Кирилюком и описаны в [166]. Нитронилнитроксильные радикалы синтезированы д. х. н. Е. Ю. Фурсовой и описаны в [143]. Триарилметильные радикалы синтезированы к. х. н. В. М. Тормышевым и описаны в [124]. Аддукт нитронилнитроксильного радикала с ЦД синтезирован д. х. н. Е. В. Третьяковым и описан в [188].

### 5.2. Определение коэффициентов разделения

Чтобы разделить нитроксильный радикал в смеси октанол/вода, мы использовали подход, описанный в [28]. Раствор 0,1 М фосфатного буфера при pH 7,2 с радикалом (0,1 мМ для ННР или 1 мМ в других случаях) смешивали с таким же объемом *n*-октанола. Далее раствор сильно встряхивали в шейкере и центрифугировали при 12000g на Eppendorf Microcentrifuge 5415R в течение 90с для разделения фаз. Две образованные фазы аккуратно разделяли и помещали в одноразовые капилляры объемом 50 мкл для ЭПР-спектроскопии. Далее записывали спектры ЭПР этих образцов в одинаковых условиях и в одном и том же положении в резонаторе спектрометра. Интегральная интенсивность спектров нормировалась по концентрации на внешний стандарт — 1 мМ раствор радикала Темпро (2,2,5,5-тетраметилпиперидин-1-оксила), спектр которого записывался в тех же условиях. Коэффициент разделения был выражен как отношение интегральных интенсивностей спектров ЭПР слоев *n*-октанола и буфера:

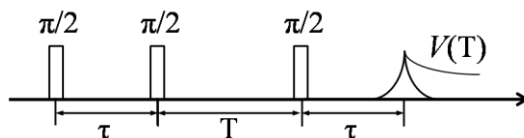
$$P_{o/w} = \frac{[I_{\text{октанол}}]}{[I_{\text{буфер}}]}$$

### 5.3. Иммобилизация нитроксильных радикалов в трегалозе

Для иммобилизации готовили 100 мкл раствора, содержащего 0,05 мМ радикала (если не указано иное) и 0,8 М трегалозы  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Раствор в пробирке быстро замораживали и переносили в эксикатор с  $P_2O_5$ , который подключен к форвакуумному насосу. Затем образец сушили в течение 2 ч при  $\sim 0,1$  мм рт. ст. После сушки стеклообразный остаток дробили и переносили в ампулу ЭПР с внешним диаметром 2 мм, которую дополнительно откачивали при таком же давлении 80 минут. После этого ампулу запаивали. Согласно методике [167] эксикатор подключили к току с азотом, при этом раствор, находящийся на стекле, дополнительно обдувался вентилятором для ускорения сушки, которая в итоге продлилась 4 ч. Затем получившуюся стекловидную массу поместили в герметичную камеру с насыщенным раствором LiCl на 9 дней. Итоговый образец поместили в ампулу и запаили.

### 5.4. Измерения ESEEM

Все образцы были приготовлены в смеси  $D_2O/DMSO-d_6$  в соотношении 8:2 (об.), чтобы предотвратить кристаллизацию при низких температурах. Концентрация нитроксильного радикала составила  $5 \cdot 10^{-4}$  М во всех экспериментах ESEEM. Концентрация 1-гидроксиметиладамантана (AM), использованного в экспериментах в качестве молекулы-конкурента, составила  $5 \cdot 10^{-3}$  М. Все эксперименты ESEEM проведены при 80 К в X-диапазоне (9 ГГц) с использованием коммерческого ЭПР-спектрометра Bruker Elexsys E580. Данные получены при значении магнитного поля, которое отвечает максимуму спектра ЭПР.

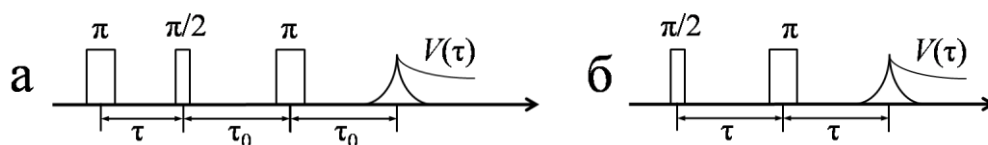


**Рисунок 5.1** — Схема импульсной последовательности ESEEM, использованной в эксперименте.

Была использована трехимпульсная стимулирующая ЭСЭ последовательность  $\pi/2$ - $\tau$ - $\pi/2$ - $T$ - $\pi/2$ - $\tau$ -эхо (см. рис. 5.1) с четырехэтапным фазовым циклированием. Длина импульса  $\pi/2$  составила 16 нс, временная задержка  $\tau = 210$  нс оптимизирована для получения максимальной модуляции  $^2H$ . Характерная зависимость ESEEM от времени показана на рис. 5.3. Полученные зависимости были аппроксимированы моноэкспонентой (которая отражает эффективный спад ЭСЭ в отсутствие модуляции), затем поделены на нее и нормализованы на максимум сигнала ЭСЭ. Амплитуда модуляции ЭСЭ  $K(^2H)$  определена как отношение интенсивности первого и второго максимумов к первому минимуму ( $K(^2H) = a/(a + b)$ , см. рис. 5.3б).

## 5.5. Измерения релаксации

Времена спин-решеточной  $T_1$  и фазовой  $T_m$  релаксации измерялись с помощью ЭПР-спектрометра Bruker ELEXSYS, работающего в X- и Q-диапазонах. Для измерения  $T_1$  использовалась трехимпульсная последовательность «инверсия — восстановление»:  $\pi$ - $\tau_{\text{вар}}$ - $\pi/2$ - $\tau$ - $\pi$ - $\tau$ -эхо. Для измерения  $T_m$  использовалась двухимпульсная последовательность  $\pi/2$ - $\tau_{\text{вар}}$ - $\pi$ - $\tau_{\text{вар}}$ -эхо (см. рис. 5.2). В обоих случаях варьируется задержка между импульсами  $\tau_{\text{вар}}$ . Продолжительность импульсов  $\pi/2$  и  $\pi$ , если не указано иное, составила 10 и 20 нс соответственно. Мощность импульсов была подобрана таким образом, чтобы интенсивность двухимпульсного эха была максимальной. Оба времени,  $T_1$  и  $T_m$ , измерены на частоте центральной компоненты ЭПР-спектра соответствующего НР.



**Рисунок 5.2** — Схемы импульсных последовательностей, использованных для определения  $T_1$  (а) и  $T_m$  (б).

## 5.6. Измерения стационарных спектров ЭПР

### 5.6.1. В главе 2

Стационарные спектры ЭПР нитронилнитроксильных радикалов записаны на спектрометре Bruker EMX в X-диапазоне. Настройки спектрометра были следующими: микроволновая частота — 9,87 ГГц, мощность микроволнового излучения — 2,02 или 4,0 мВт, частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 0,5 Гс, время конверсии 20–82 мс, разрешение 1024 точек; количество накоплений 1.

### 5.6.2. В главе 3

Стационарные спектры ЭПР записаны на спектрометре Bruker EMX в X-диапазоне (~9 ГГц). Настройки спектрометра были следующими: частота 9,87 ГГц, мощность 6,38 мВт, частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 0,5–1 Гс, время конверсии 5,12 мс.

Для измерения параметров спектры моделировались с помощью системы компьютерной алгебры Matlab и программного пакета Easyspin [157].

### 5.6.3. В главе 4

Стационарные спектры ЭПР записаны на спектрометре Bruker EMX в X-диапазоне с варьированием растворителя в зависимости от вида изучаемого ТАМ. Наряду с водными буферными растворами с различными значениями pH нами использовались органические растворители. Настройки спектрометра были следующими: частота 9,7 ГГц; мощность 10,11 мВт; частота модуляции 100 кГц; амплитуда модуляции 0,01–0,03 Гс, в отдельных случаях

2 Гс; время преобразования 163,8–327,7 мс; время записи спектра 671–2684 с; разрешение 8192 точки; количество накоплений варьировалось в интервале 1–16.

Симуляция спектров ЭПР проводилась с использованием пакета программ Matlab и Easyspin [157]. Варьированию подвергались следующие параметры: g-фактор, Гауссовый и Лоренцевский вклады в ширину линии ЭПР для каждой спиновой системы, константы СТВ с ядрами углерода и водорода.

### 5.7. Процедура «заморозка — откачка»

Чтобы предотвратить уширение линий ЭПР в образцах тритильных радикалов, было проведено удаление кислорода из растворов путем многократного повторения циклов «заморозка — откачка — оттаивание». Для каждого образца было проверено, что дальнейшая откачка не отражается на временах релаксации  $T_1$  и  $T_m$ .

### 5.8. ЭПР-томография в L-диапазоне *in vivo*

Самки беспородных мышей ( $n = 14$ ) получены в Центре общего пользования Института цитологии и генетики СО РАН. Мыши, использованные в этом исследовании, имели возраст 2 месяца и вес 25–28 г. Все манипуляции с животными одобрены институтской комиссией Института цитологии и генетики в соответствии с Правилами обращения с опытными животными.

Для анализа ЭПР-томографии использовался ЭПР-спектрометр L-диапазона (~1 ГГц) Bruker Eleksys E-540, оборудованный трехмерными градиентными катушками и резонатором E-540R36. Для позиционирования мыши внутри резонатора использовалась кроватка для животных от PharmaScanSystems. Мышам, анестезированным тиопенталом натрия (доза составила 133 мг/кг или 300 мкл 1,3%-го раствора внутривенно), вводили NN1 внутривенно либо в хвостовую вену, в зависимости от конкретного эксперимента. Концентрация нитроксильного радикала была оценена в 15 мМ с учетом общего объема крови в 1,2 мл (общий объем крови мыши составляет 77–80 мл на килограмм веса животного [151]). После введения нитроксильного радикала каждую мышшь фиксировали в резонаторе ЭПР-спектрометра; затем спектры ЭПР записывались от части тела (2x2 см) последовательно каждые 75–80 с.

Для того, чтобы исследовать распределение NN1 при увеличении генерации оксида азота, мыши вводили нитроглицерин в разное время до и после измерений (доза составила 0,83 мг/кг или 5 мкл раствора 5 мг\мл сублингвально) или вводили липополисахарид (ЛПС) за четыре часа до измерений, чтобы вызвать воспаление (доза составила 10 мг/кг внутривенно).

Настройки двумерной ЭПР-томографии были следующими: плоскость хz (также см. рис. 11б), поле зрения 20x20 мм, градиент поля 1,0 мТл/см, число стационарных проекций 31, микроволновая частота 1,03 ГГц, частота микроволнового излучения 22,7 мВт, частота модуляции 100 кГц, амплитуда модуляции 0,2 мТл, временная константа 10,24 мс.

## **5.9. Измерение стабильности радикалов**

### *5.9.1. Восстановление ННР и ИНР аскорбиновой кислотой (глава 2)*

190 мкл 10 мкМ раствора нитроксильного радикала (NN1 или NN2) в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 0,1 мМ диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА), необходимой для того, чтобы убрать влияние металлов, смешали с 10 мкл раствора аскорбиновой кислоты определенной концентрации (от 2 до 10 мкМ) в том же буфере. Сразу после смешивания раствор набирали в одноразовый капилляр емкостью 50 мкл, который помещали в резонатор ЭПР-спектрометра. Далее последовательно записывались спектры ЭПР (каждый спектр — 5,24 с). Точки кинетической кривой восстановления нитроксильного радикала получены путем двукратного интегрирования центральной линии каждого спектра для получения интегральной интенсивности сигнала ЭПР. «Мертвое время», т. е. промежуток времени между смешиванием растворов радикала и аскорбиновой кислоты и записью первого спектра, составляло в среднем 20–25 секунд для каждого эксперимента, что можно заметить по отсутствию экспериментальных точек в начале каждой кинетики. Для записи спектра в нулевой момент времени использовался отдельный раствор соответствующего радикала с концентрацией равной начальной в испытуемом растворе.

### *5.9.2. Восстановление нитроксильных радикалов в цельной крови крыс и ее компонентах (глава 2)*

Для того, чтобы получить образец цельной негомогенизированной крови крысы, трехмесячную самку обезглавливали и сливали ее кровь через яремную вену. Кровь стабилизировали гепарином и заморозкой до 0° С. Для измерения констант скорости ННР добавляли в кровь при комнатной температуре, быстро размешивали и помещали в пятидесятимикролитровый капилляр, который затем помещали в резонатор ЭПР-спектрометра Bruker EMX. Затем последовательно записывали спектры ЭПР как описано выше.

Эксперименты с компонентами крови были сделаны для того, чтобы понять, происходит ли восстановление ННР в клетках крови или в плазме. Компоненты крови разделяли следующим образом. Образец цельной крови одной крысы (10 мл) центрифугировали при 1500g в течение 20 минут при охлаждении. Кровь разделилась в результате на три фракции: примерно одинаковые количества плазмы и эритроцитов



и примерно 1% объема лейкоцитов. Фракцию плазмы отделили и заморозили. Фракцию эритроцитов разбавили раствором 0,9% NaCl в соотношении 1:1 и центрифугировали, как описано выше. Супернатант отделили, а образованную клеточную фракцию разбавили раствором NaCl и снова центрифугировали для того, чтобы отмыть эритроциты. Затем клеточную суспензию разбавили дистиллированной водой в соотношении 1:1 и заморозили до  $-70^{\circ}\text{C}$ , чтобы разрушить клетки эритроцитов. Цикл заморозка — оттаивание был повторен еще два раза. Следует отметить, что конечный раствор эритроцитов разбавлен в четыре раза (двукратное уменьшение объема и три последующих двукратных разбавления). После этого ННР в соответствующей концентрации был растворен в каждом образце и спектры ЭПР образцов были записаны, как описано выше.

Нитроксильных радикал (NN1, NN2, IN1, IN2) в конечной концентрации до одной десятой  $LD_{50}$  (50% летальной дозы, которая составляет 500 мМ [143]) был смешан с негомогенизированной, стабилизированной гепарином кровью крысы Wistar.

#### *5.9.3. Восстановление аддукта ННР с ЦД аскорбиновой кислотой (глава 2)*

Кинетические измерения проведены путем последовательной записи стационарных ЭПР-спектров. Раствор спин-меченого ЦД был быстро смешан с аскорбиновой кислотой (в 50 мМ фосфатном буфере при рН 7,24 с добавлением 0,1 мМ ДТПА) и перенесен в резонатор спектрометра. Характерное время между добавлением аскорбиновой кислоты и записью первого спектра составляло 20–25 с. Один спектр записывался в течение 5,24 с.

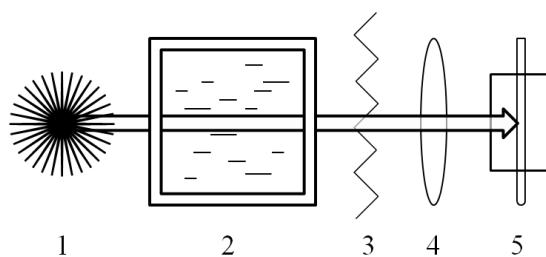
#### *5.9.4. Восстановление радикалов аскорбиновой кислотой (глава 3)*

Раствор нитроксильного радикала с концентрациями от 0,2 до 0,5 мМ в этаноле (10 мкл) смешивали с 0,1 М фосфатным буферным раствором, с 100 мМ аскорбиновой кислотой и 50 мМ глутатионом при рН 7,2. Смесь сразу же помещали в резонатор ЭПР-спектрометра в капилляре, а затем последовательно записывали спектры каждые 5 секунд. При этом с течением времени наблюдался спад интенсивности спектра. Концентрации НР рассчитаны с учетом интегральной интенсивности и внешнего стандарта в виде 1 мМ раствора радикала Темро. Константы скорости реакции второго порядка между НР и аскорбиновой кислотой рассчитаны исходя из кинетических кривых спада концентрации радикала в условиях псевдо-первого порядка.

### **5.10. Исследование реакции радикалов с оксидом азота**

Фотохимическая генерация оксида азота (II) NO происходила путем фотолиза нитропруссиды натрия (SNP). Кинетические измерения проводились путем последовательной записи стационарных спектров после начала облучения. Раствор 0,5 мМ спин-меченого ЦД смешивали с 50 мМ раствором SNP (в 100 мМ фосфатном буфере при рН 7,2 с 0,1 мМ

ДТПА) и перемещали в резонатор ЭПР-спектрометра. Непосредственно после этого начиналось облучение с одновременной записью спектров. Настройки были следующими: частота 9,78 ГГц; мощность 10,0 мВт; частота модуляции 100 кГц; амплитуда модуляции 0,5 Гс; время конверсии 10,24 мс; разрешение 1024 точек; количество накоплений 1. С этими настройками один спектр записывался в течение 10,49 с. Фотолиз проводился ртутной лампой, схему установки см. на рис. 5.3.



*Рисунок 5.3 — Схема установки фотолиза раствора с ННР и SNP. Цифрами обозначены: 1) источник излучения — ртутная лампа, 2) водяной фильтр излучения, 3) шторка, 4) фокусирующая линза, 5) резонатор спектрометра с образцом. Запись последовательных спектров начиналась непосредственно после открытия шторки лампы.*

## Основные результаты и выводы

1. 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 их введения. Вследствие высокой скорости восстановления ННР и их продукта реакции с NO (ИНР), 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 ЦД, сохраняет свою чувствительность к NO, а константа восстановления нитроксильного фрагмента NNCD 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 ЦД;
3. Измерены константы скорости восстановления новых 2,5-спироциклогексан-замещенных нитроксильных радикалов пирролинового типа аскорбиновой кислотой, и показано, что они обладают существенно более высокой стабильностью по отношению к биогенным восстановителям по сравнению с их тетраметильными аналогами и являются перспективными для структурных исследований биополимеров;
4. Измерены времена продольной и фазовой электронной спиновой релаксации новых 2,5-спироциклогексан-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;
5. Для характерного ряда новых тритильных радикалов (ТАМ) измерены константы СТВ неспаренного электрона с ядрами  $^{13}\text{C}$  и показано, что они практически не зависят от структуры и количества заместителей, присоединенных к тритильному ядру, а также от полярности растворителя. Показано, что тритильный радикал dAMT-1 претерпевает реакцию сольволиза в метаноле и водном буфере, и измерены соответствующие константы скорости.

## Список используемых обозначений

АК	аскорбиновая кислота
АР	радикал аскорбата
АФК	активные формы кислорода
ГА	гидроксиламин
ДГА	дегидроаскорбиновая кислота
ДКГ	2,3-дикетогулоновая кислота
ДТПА	диэтилентриаминпентауксусная кислота
ДМТЭПГ	3,4-диметил-2,2,5,5-тетраэтилпергидроимидазол-1-илоксил
ИНР (ИНР-Г)	иминонитроксильный радикал (соответствующий гидроксиламин)
ИЦГ	институт цитологии и генетики
ЛПС	липополисахарид
МТЦ	институт Международный томографический центр
МРТ	магнитно-резонансная томография
НИОХ	Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова
ННР (ННР-Г)	нитронилнитроксильный радикал (соответствующий гидроксиламин)
НР	нитроксильный радикал
ПЭРФ	производимый эндотелием расслабляющий фактор
СТВ	сверхтонкое взаимодействие
ТАМ	триарилметильный радикал
ЦД	циклодекстрин
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
GSH	глутатион, 2-амино-5-[(2-((карбоксиметил)амино)-1-(меркаптометил)-2-оксоэтил)амино]-5-оксопентановая кислота
MDS	(1-оксил-2,5-диспироциклогекси-3-метил)метилтиосульфат
MeOH	метанол-1, CH <sub>3</sub> OH
MTS, MTSSL	(1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-метил)метилтиосульфат
PELDOR	pulsed electron double resonance, импульсный метод двойного электронного резонанса
SDSL	site-directed spin labeling, метод адресного введения спиновых меток
TPA	2,2,5,5-тетраметилпирролин-1-оксил-3-ацетилен
$\Delta H_G/\Delta H_L$	гауссов/лоренцев вклад в ширину линии $\Delta H$

## Список используемой литературы

1. 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;
2. 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;
3. Khramtsov, V. V. Spin Labeling: The Next Millennium / V. V. Khramtsov, L. B. Volodarsky // Biological Magnetic Resonance. – Plenum Press, New York and London. – 1998. – Vol. 14. – P. 422;
4. Khramtsov, V. V. Biological applications of spin pH probes. / V. V. Khramtsov, I. A. Grigor'ev, M.A. Foster et. al. // Cellular and Molecular Biology. – 2000. — Vol. 46, № 8. – P. 1361–1374;
5. Khramtsov, V. V.. In vitro and In vivo Measurement of pH and Thiols by EPR-Based Techniques / V. V. Khramtsov, I. A. Grigor'ev, M.A. Foster et. al. // Antioxidants and Redox Signaling. – 2004. — Vol. 6. – P. 667–676;
6. Keana, J. F. W. The chemistry and biology of nitroxide compounds / , J. F. W. Keana, S. Pow, G. M. Rosen // Magnetic Resonance in Medicine. – 1987.— Vol. 3. – P. 83–88;
7. Magnetic resonance relaxivity of dendrimer-linked nitroxides / C. S. Winalski, S. Shortkroff, R. V. Mulkern et al. // Magnetic Resonance in Medicine – 2002. — Vol. 48, № 6. – P. 965–972;
8. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Oxford University Press, USA; 3 edition. – 1999. – P. 936.
9. The chemistry and biology of nitroxide compounds / B. P. Soule, F. Hyodo, K.-I. Matsumoto et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. — Vol. 42, № 11. – P. 1632–1650;
10. Therapeutic and Clinical Applications of Nitroxide Compounds / B. P. Soule, F. Hyodo, K.-I. Matsumoto et al. // Antioxidant & Redox signaling. – 2007. — Vol. 9. – P. 1731–1743;
11. Яньшолле, В. В. Изучение антиоксидантных свойств нитроксильных радикалов и пространственно затрудненных гидроксиламинов при их взаимодействии с триплетным и дезаминированным кинуренином / В. В. Яньшолле, И. А. Кирилюк, И. А. Григорьев и др. // Известия Академии Наук. Серия химическая. – 2010, №1. – С. 67–75;

12. Damiani, E. The effects of derivatives of the nitroxide tempol on UVA-mediated in vitro lipid and protein oxidation / E. Damiani, R. Castagna, L. Greci // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. — Vol. 33, № 1. – P. 128–136;
13. In vitro photostability and photoprotection studies of a novel 'multi-active' UV-absorber / E. Venditti, T. Spadoni, L. Tiano et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. — Vol. 45, № 3. – P. 345–354;
14. Kocherginsky, K. J. Nitroxide spin labels: reactions in biology and chemistry / K. J. Kocherginsky, H. M. Swartz eds. // Boca Raton, FL: CRC Press. – 1995, P. 270;
15. Swartz, H. M. The metabolism of nitroxides in cells and tissues / H. M. Swartz, G. S. Timmins, C. J. Rhodes, ed. // *Toxicology of the human environment: the critical role of free radicals*. London: Taylor & Francis. – 2000. – P. 91–111;
16. Studies of structure–activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage / M. C. Krishna, W. DeGraff, O. H. Hankovszky et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1998. — Vol. 41, № 18. – P. 3477–3492;
17. Hawker, C. J. New Polymer Synthesis by Nitroxide Mediated Living Radical Polymerizations / C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth // *Chemical Reviews*. – 2001, № 101. – P. 3661–3688;
18. Iwamura, H. Magnetic Ordering in Metal Coordination Complexes with Aminoxyl Radicals / H. Iwamura, K. Inoue // *Magnetism: Molecules and materials II. Models and Experiments* (eds J. Miller, M. Drillon). – 2001. – P. 61–108;
19. Ovcharenko, V. I. Metal–Nitroxide Complexes: Synthesis and Magnetostructural Correlations / V. I. Ovcharenko // *Stable radicals. Fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds* (ed R. G. Hicks). – 2010. – P. 461–506;
20. de Nooy, A. E. J. On the Use of Stable Organic Nitroxyl Radicals for the Oxidation of Primary and Secondary Alcohols / A. E. J. de Nooy, A. C. Besemer, H. van Bekkum // *Synthesis*. – 1996, № 10. – P. 1153–1174;
21. Bobbitt, J. M. Oxoammonium- and Nitroxide-Catalyzed Oxidations of Alcohols / J. M. Bobbitt, C. Brückner, N. Merbouh // *Organic Reactions*. – 2009, № 74. – P. 106–424;
22. Vogler, T. Applications of TEMPO in Synthesis / T. Vogler, A. Studer // *Synthesis* – 2008, № 13. – P. 1979–1993;
23. Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: Roles for ascorbate and glutathione / A. A., Bobko, I. A. Kirilyuk, I. A. Grigor'ev et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. — Vol. 42, № 3 – P. 404–412;

24. Keana, J. F. W. Influence of structure on the reduction of nitroxide MRI contrast-enhancing agents by ascorbate / J. F. W. Keana, F. L. Van Nice // *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*. – 1984. — Vol. 16, № 6. – P. 477–480;
25. Comparative study of the reduction rates of various types of imidazoline radicals in tissues / V. Yelinova, A. Krainev, A. Savelov et al. // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. – 1993. – P. 2053–2055;
26. Marx, L. A comparative study of the reduction by ascorbate of 1,1,3,3-tetraethylisindolin-2-yloxyl and of 1,1,3,3-tetramethylisindolin-2-yloxyl / L. Marx, R. Chiarelli, T. Guiberteau, // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. – 2000. – P. 1181–1182;
27. Synthesis of the tetraethyl substituted pH-sensitive nitroxides of imidazole series with enhanced stability towards reduction / I. A. Kirilyuk, A. A. Bobko, I. A. Grigor'ev et al. // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2004.— Vol. 2, № 7. – P. 1025–1030;
28. Enzymatic reduction-resistant nitroxyl spin probes with spirocyclohexyl rings / S. Okazaki, M. A. Mannan, K. Sawai et al. // *Free Radical Research* – 2007. — Vol. 41, № 10. – P. 1069–1077;
29. Володарский, Л. Б. Имидазолиновые-нитроксильные радикалы, Глава 5. Окислительно-восстановительные реакции нитроксильных радикалов / Л. Б. Володарский, И. А. Григорьев, С. А. Диканов и др. // Новосибирск: Наука Сибирское Отделение. – 1988. – С.171–216;
30. Диканов, С. А. Окислительные свойства нитроксильных радикалов в реакциях между ними и стерическими затрудненными гидросиламинами / С. А. Диканов, И. А. Григорьев, Л. Б. Володарский и др. // *Журнал физической химии*. – 1982. – Т. 56, № 11. – 2711–2767;
31. Steric and Electronic Effects in Cyclic Alkoxyamines—Synthesis and Applications as Regulators for Controlled/Living Radical Polymerization / C. Wetter, J. Gierlich, C. Knoop et al. // *Chemistry – A European Journal* – 2004. — Vol. 10, № 5. – P. 1156–1166;
32. Miura, Y. Low-Temperature “Living” Radical Polymerization of Styrene in the Presence of Nitroxides with Spiro Structures / Y. Miura, N. Nakamura, I. Taniguchi // *Macromolecules*. – 2001. — Vol. 34, № 3. – P. 447–455;
33. 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.
34. Yamasaki, T. Structure-Reactivity Relationship of PiperidineNitroxide: Electrochemical, ESR and Computational Studies / T. Yamasaki, F. Mito, Y. Ito // *Journal of Organic Chemistry*. 2011. — Vol. 76, № 2. – P. 435–440;

35. Mellet, C. O. Preorganized, Macromolecular, Gene-Delivery Systems / C. O. Mellet, J. M. Benito, J. M. Garcia Fernandez // *Chemistry*. – 2010. – Vol. 16 – № 23. – P. 6728–6742;
36. Dodziuk, H. Cyclodextrins and their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications / H. Dodziuk // Wiley-VCH, Weinheim, 2006;
37. a) Arima, H. Recent findings concerning PAMAM dendrimer conjugates with cyclodextrins as carriers of DNA and RNA / H. Arima, K. Motoyama // *Sensors*. – 2009. – Vol. 9. – P. 6346–6361;
- б) Rekharsky, M. V. Complexation thermodynamics of cyclodextrins / M. V. Rekharsky, Y. Inoue // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98, 1875–1917;
38. Nitroxide bound  $\beta$ -cyclodextrin: Is there an inclusion complex? / D. Bardelang, A. Rockenbauer, L. Jicsinszky et al. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2006. – Vol. 71. – P. 7657–7667;
39. Structural equilibrium in new nitroxide-capped cyclodextrins: CW and pulse EPR study / O. A. Krumkacheva, M. V. Fedin, D. N. Polovyanenko et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol. 117 – № 27. – P. 8223–8231;
40. Electron paramagnetic resonance studies on copper (ii)-cyclodextrin systems / A. Fragoso, M. C. Baratto, A. Diaz et al. // *Dalton Transactions*. – 2004. – № 9. – P. 1456–1460;
41. A  $\beta$ -cyclodextrin “click cluster” decorated with seven paramagnetic chelates containing two water exchange sites / J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee et al. // *Bioconjugate Chemistry*. – 2008. – Vol. 19 – № 8. – P. 1505–1509;
42. High-Relaxivity Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agent Based on Supramolecular Assembly between a Gadolinium Chelate, a Modified Dextran, and Poly- $\beta$ -Cyclodextrin / E. Battistini, E. Gianolio, R. Gref et al. // *Chemistry—A European Journal* – 2008. – Vol. 14. – P. 4551–4561;
43. Cyclodextrin-Based Bimodal Fluorescence/MRI Contrast Agents: An Efficient Approach to Cellular Imaging / Z. Kotkova, J. Kotek, D. Jirak et al. // *Chemistry*. – 2010. – Vol. 16 – № 33. – P. 10094–10102;
44. Time-Resolved and Pulse EPR Study of Triplet States of Alkylketones in  $\beta$ -Cyclodextrin / O. Krumkacheva, M. Tanabe, S. Yamauchi et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2012. – Vol. 42 – № 1. – P. 29–40;
45.  $\alpha$ -Phenyl-N-tert-butylnitron-Type Derivatives Bound to  $\beta$ -Cyclodextrins: Syntheses, Thermokinetics of Self-Inclusion and Application to Superoxide Spin-Trapping / D. Bardelang, L. Charles, J.-P. Finet et al. // *Chemistry—A European Journal* – 2007. – Vol. 13. – P. 9344–9354;



46. Lipophilic  $\beta$ -Cyclodextrin Cyclic– Nitron Conjugate: Synthesis and Spin Trapping Studies / Y. Han, Y. Liu, A. Rockenbauer et al. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2009. – Vol. 74. – P. 5369–5380;
47. EPR, NMR, and Thermodynamic Evidences for Forced Nuclear Spin–Electron Spin Interactions in the Case of 1-Phenyl-2-Methylpropyl-1, 1-Dimethyl-2-Nitroxide (TIPNO) Attached to Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin / E. G. Bagryanskaya, D. Bardelang, S. Chenesseau et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2009. – Vol. 36 – № 2–4. – P. 181–194;
48. Electron paramagnetic resonance spin trapping of glutathyl radicals by PBN in the presence of cyclodextrins and by PBN attached to  $\beta$ -cyclodextrin / D. N. Polovyanenko, S. R. A. Marque, S. Lambert et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – P. 13157–13162;
49. Spin trapping of superoxide in the presence of  $\beta$ -cyclodextrins / H. Karoui, A. Rockenbauer, S. Pietri et al. // *Chemical Communications*. – 2002. – P. 3030–3031;
50. Karoui, H. ESR-spin trapping in the presence of cyclodextrins. Detection of PBN-superoxide spin adduct / H. Karoui, P. Tordo // *Tetrahedron Letters*. – 2004. – Vol. 45. – P. 1043–1045;
51. Klare, J. P. Spin labeling EPR / J. P. Klare, H. J. Steinhoff // *Photosynthesis Research*. – 2009. — Vol. 102, № 2–3. – 377–390;
52. Berliner, L. J. Fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds / L. J. Berliner // *Stable radicals* (Ed. R. G. Hicks). – Chichester, Wiley. – 2010. – P. 521–534;
53. Nitroxides: applications in chemistry, biomedicine, and materials science / G. I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji et al. // *John Wiley & Sons*. – 2008. – P. 438;
54. Kokorin, A. Nitroxides–Theory, Experiment and Applications / A. Kokorin // *Intech*, Rijeka, Croatia, 2012. – P. 436;
55. Technological advances in site-directed spin labeling of proteins / W. L. Hubbell, C. J. López, C. Altenbach et al. // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2013. — Vol. 23, № 5. – P. 725–733;
56. Site-directed spin-labeling of nucleotides and the use of in-cell EPR to determine long-range distances in a biologically relevant environment / M. Azarkh, V. Singh, O. Okle et al. // *Nature protocols*. – 2013. — Vol. 8, № 1. – P. 131–147;
57. Probing protein conformation in cells by EPR distance measurements using Gd<sup>3+</sup> spin labeling / A. Martorana, G. Bellapadrona, A. Feintuch et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. — Vol. 136, № 38. – P. 13458–13465;
58. Long-Range Distance Measurements on Nucleic Acids in Cells by Pulsed EPR Spectroscopy // I. Krstic, R. Hansel, O. Romainczyk et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2011. — Vol. 50, № 22. – P. 5070–5074;

59. Shelke, S. A. Structural Information from Spin-Labels and Intrinsic Paramagnetic Centres in the Biosciences / S. A. Shelke, S. T. Sigurdsson // *Structure and Bonding* (Ed. C. R. Timmel, J. R. Harmer). – Springer, Berlin/Heidelberg. – 2013. — Vol. 152. – P. 121–162;
60. Chapter Fourteen-Development and Application of Spin Traps, Spin Probes, and Spin Labels / E. G. Bagryanskaya, O. A. Krumkacheva, M. V. Fedin et al. // *Methods in enzymology*. – 2015. — Vol. 563. – P. 365–396;
61. New developments in spin labels for pulsed dipolar EPR / A. J. Fielding, M. G. Consilio, G. Heaven et al. // *Molecules*. – 2014. — Vol. 19, № 10. – P. 16998–17025;
62. Schiemann, O. Mapping global folds of oligonucleotides by pulsed electron–electron double resonance / O. Schiemann // *Methods in enzymology* (Ed. H. Daniel). – Academic Press, San Diego. – 2009. – P. 329–351;
63. Schiemann, O. Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy / O. Schiemann, T. F. Prisner // *Quarterly reviews of biophysics*. – 2007. — Vol. 40, № 1. – P. 1–53;
64. Engels, J. W. Site-Directed Spin Labeling of RNA for Distance Measurements by EPR / J. W. Engels, C. Grünwald, L. Wicke // *Chemical Biology of Nucleic Acids* (Eds. V. A. Erdmann, W. T. Markiewicz, H. J. Barciszewski). – Springer, Berlin Heidelberg. – 2014. – P. 385–407;
65. I. D. Sahu, I. D. Use of electron paramagnetic resonance to solve biochemical problems / I. D. Sahu, R. M. McCarrick, G. A. Lorigan // *Biochemistry*. – 2013 – – Vol. 52, № 35. – P. 5967–5984;
66. a) Structure and dynamics of nucleic acids / I. Krstic, B. Endeward, D. Margraf et al. // *EPR Spectroscopy: Applications in Chemistry and Biology* (Eds. M. Drescher, G. Jeschke). – Springer, Berlin Heidelberg. 2012. – P. 159–198;
- б) Qin, P. Z. Application of NMR and EPR methods to the study of RNA / P. Z. Qin, T. Dieckmann // *Current opinion in structural biology*. – 2004. — Vol. 14, № 3. – P. 350–359;
- в) Sowa, G. Z. Site-directed spin labeling studies on nucleic acid structure and dynamics / G. Z. Sowa, P. Z. Qin // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Ed. P. M. Conn). – Elsevier Academic Press Inc, San Diego. – 2008. — Vol. 82 – P. 147–197;
67. Stationary-phase EPR for exploring protein structure, conformation, and dynamics in spin-labeled proteins / C. J. Lopez, M. R. Fleissner, E. K. Brooks et al. // *Biochemistry*. – 2014. — Vol. 53, № 45. – P. 7067–7075;
68. Experimental mapping of DNA duplex shape enabled by global lineshape analyses of a nucleotide-independent nitroxide probe / Y. Ding, X. J. Zhang, K. W. Tham et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. — Vol. 42. – P. 18;

69. Cooke, J. A. Distance measurements by continuous wave EPR spectroscopy to monitor protein folding / J. A. Cooke, L. J. Brown // *Protein Folding, Misfolding, and Disease: Methods and Protocols*. – 2011. – Vol. 752. – P. 73–96;
70. Milov, A. D. Application of ELDOR in electron-spin echo for paramagnetic center space distribution in solids / A. D. Milov, K. M. Salikhov, M. D. Shirov // *Fizika Tverdogo Tela*. – 1981. – Vol. 23, № 4. – P. 975–982;
71. Dead-time free measurement of dipole–dipole interactions between electron spins / M. Pannier, S. Veit, A. God et al. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2000. – Vol. 142, № 2. – P. 331–340;
72. Borbat, P. P. Protein structure determination using long-distance constraints from double-quantum coherence ESR: study of T4 lysozyme / P. P. Borbat, H. S. Mchaourab, J. H. Freed // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – Vol. 124, № 19. – P. 5304–5314;
73. Milov, A. D. Electron-electron double resonance in electron spin echo: Model biradical systems and the sensitized photolysis of decalin / A. D. Milov, A. B. Ponomarev, Y. D. Tsvetkov // *Chemical Physics Letters*. – 1984, – Vol. 110, № 1. – P. 67–72;
74. Edwards, T. E. EPR spectroscopic analysis of U7 hammerhead ribozyme dynamics during metal ion induced folding / T. E. Edwards, S. T. Sigurdsson // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44, № 38. – P. 12870–12878;
75. 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;
76. a) Site-directed spin labeling measurements of nanometer distances in nucleic acids using a sequence-independent nitroxide probe / Q. Cai, A. K. Kusnetzow, W. L. Hubbell et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34, № 17. – P. 4722–4730;
- b) RNA-binding to archaeal RNA polymerase subunits F/E: a DEER and FRET study / D. Grohmann, D. Klose, J. P. Klare et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132, № 17. – P. 5954–5955;
- b) Kim, N. K. Precise Mapping of RNA Tertiary Structure via Nanometer Distance Measurements with Double Electron– Electron Resonance Spectroscopy / N. K. Kim, M. K. Bowman, V. J. DeRose // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132, № 26. – P. 8882–8884;
- r) PELDOR spectroscopy reveals preorganization of the neomycin-responsive riboswitch tertiary structure / I. Krstic, O. Frolov, D. Sezer et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132, № 5. – P. 1454–1455;

- д) A PELDOR-based nanometer distance ruler for oligonucleotides // *Journal of the American Chemical Society* / O. Schiemann, N. Piton, Y. G. Mu et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126, № 18. – P. 5722–5729;
- е) Nanometer distance measurements on RNA using PELDOR / O. Schiemann, A. Weber, T. E. Edwards et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – Vol. 125, № 12. – P. 3434–3435;
- ж) Global structure of a three-way junction in a phi29 packaging RNA dimer determined using site-directed spin labeling / X. Zhang, C.-S. Tung, G. Z. Sowa et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134, № 5. – P. 2644–2652;
- з) Nanometer distance measurements in RNA using site-directed spin labeling / Q. Cai, A. K. Kusnetzow, K. Hideg et al. // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 93, № 6. – P. 2110–2117;
- и) Backbone structure of transmembrane domain IX of the Na<sup>+</sup>/proline transporter PutP of *Escherichia coli* / D. Hilger, Y. Polyhach, H. Jung et al. // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 96, № 1, P. 217–225;
77. а) Structural basis of the non-coding RNA RsmZ acting as a protein sponge / O. Duss, E. Michel, M. Yulikov et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 509, № 7502, P. 588–592;
- б) Duss, O. PR-aided approach for solution structure determination of large RNAs or protein–RNA complexes / O. Duss, M. Yulikov, G. Jeschke et al. // *Nature communications*. – 2014. – Vol. 5;
- в) Doubly Spin-Labeled RNA as an EPR Reporter for Studying Multicomponent Supramolecular Assemblies / A. A. Malygin, D. M. Graifer, M. I. Meschaninova et al. // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 109, № 12. – P. 2637–2643;
78. Distance Measurements on Orthogonally Spin -Labeled Membrane Spanning WALP 23 Polypeptides / P. Lueders, H. Jäger, M. A. Hemminga et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – Vol. 117, № 7, P. – 2061–2068;
79. Spectroscopic selection of distance measurements in a protein dimer with mixed nitroxide and Gd 3+ spin labels / I. Kaminker, H. Yagi, T. Huber et al. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2012. – Vol. 14, № 13. – P. 4355–4358;
80. Dipolar spectroscopy and spin alignment in electron paramagnetic resonance / G. Jeschke, M. Pannier, A. Godt et al. // *Chemical Physics Letters*. – 2000. – Vol. 331, № 2–4. – P. 243–252;
81. Pulsed EPR dipolar spectroscopy at Q-and G-band on a trityl biradical / D. Akhmetzyanov, P. Schops, A. Marko et al. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17, № 37. – P. 24446–24451;

82. Relaxation-based distance measurements between a nitroxide and a lanthanide spin label / H. Jäger, A. Koch, V. Maus et al. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2008. – Vol. 194, № 2. – P. 254–263;
83. EPR Relaxation-Enhancement-Based Distance Measurements on Orthogonally Spin-Labeled T4-Lysozyme / S. Razzaghi, E. K. Brooks, E. Bordignon et al. // *ChemBioChem*. – 2013 – Vol. 14, № 14. – P. 1883–1890;
84. Spirocyclohexyl Nitroxide Amino Acid Spin Label for Pulsed EPR Spectroscopy Distance Measurements / A. Rajca, V. Kathirvelu, S. Roy et al. // *Chemistry – A European Journal*. – 2010. — Vol. 16, № 19. – P. 5778–5782;
85. Relaxation rates for spirocyclohexylnitroxyl radicals are suitable for interspin distance measurements at temperatures up to about 125 K / V. Kathirvelu, C. Smith, C. Parks et al. // *Chemical Communications*. – 2009, № 4. – P. 454–456;
86. Kinetics of nitroxide spin label removal in biological systems: an in vitro and in vivo ESR study / F. Vianello, F. Momo, M. Scarpa et al. // *Magnetic Resonance Imaging – 1995* – Vol. 13, № 2. – P. 219–226;
87. Influence of chemical structure of nitroxyl spin labels on their reduction by ascorbic acid / W. R. Couet, R. C. Brasch, G. Sosnovsky et al. // *Tetrahedron* – 1985 – Vol. 41, №7. – P. 1165–1172;
88. Reduction and destruction rates of nitroxide spin probes / S. Belkin, R. J. Mehlhorn, K. Hideg et al. // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1987. – Vol. 256, № 1. – P. 232–243;
89. Factors affecting nitroxide reduction in ascorbate solution and tissue homogenates / W. R. Couet, R. C. Brasch, G. Sosnovsky et al. // *Magnetic Resonance Imaging*. – 1985. – Vol. 3, № 1. – P. 83–88;
90. Chemical and electrochemical reduction rates of cyclic nitroxides (nitroxyls) / S. Morris, G. Sosnovsky, B. Hui et al. // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1991. – Vol. 80, № 2. – P. 149–152;
91. О влиянии функционального состояния мембран на кинетику химических реакций / Р. М. Давыдов, Н. М. Кочергинский, Р. Д. Маковский и др. // *Доклады АН СССР*. – 1974. – Т. 216, № 2. – С. 929;
92. Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: Analysis of stability in reducing environment / A. P. Jagtap, I. Krstic, N. C. Kunjir et al. // *Free Radical Research*– Vol. 49, № 1. – 2015. – P. 78–85;
93. Effect of Sterical Shielding on the Redox Properties of Imidazoline and Imidazolidine Nitroxides / I. A. Kirilyuk, A. A. Bobko, S. V. Semenov et al. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2015. – Vol. 80, № 18. – P. 9118–9125;

94. Bagryanskaya, E. G. Scavenging of Organic C-Centered Radicals by Nitroxides / E. G. Bagryanskaya, S. R. A. Marque // *Chemical Reviews*. (Washington, DC, U. S.). – 2014. – Vol. 114, № 9. – P. 5011–5056;
95. Liu, Y. P. Highly stable dendritic trityl radicals as oxygen and pH probe / Y. P. Liu, F. A. Villamena, J. L. Zweier. // *Chemical Communications*. – 2008. – Vol. 36. – P. 4336–4338;
96. High resolution electron paramagnetic resonance imaging of biological samples with a single line paramagnetic label / P. Kuppusamy, P. Wang, M. Chzhan, et al. // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 1997. – Vol. 37, № 4 – P. 479–483;
97. Improved spin trapping properties by beta-cyclodextrin-cyclic nitron conjugate / Y. P. Liu, F. A. Villamena, J. Sun, et al. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2008. – Vol. 73, № 18. – P. 1490–1497;
98. Esterified trityl radicals as intracellular oxygen probes / Y. P. Liu, F. A. Villamena, J. Sun et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 46, № 7. – P. 876–883;
99. Reaction of superoxide with trityl radical: implications for the determination of superoxide by spectrophotometry / V. K. Kutala, N. L. Parinandi, J. L. Zweier et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – Vol. 424, № 1. – P. 81–88;
100. Synthesis of two persistent fluorinated tetrathiatritylmethyl (TAM) radicals for biomedical EPR applications / B. Driesschaert, N. Charlier, B. Gallez et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – Vol. 18, № 15. – P. 4291–4293;
101. Nano-emulsions of fluorinated trityl radicals as sensors for EPR oximetry / N. Charlier, B. Driesschaert, N. Wauthoz et al. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2009. – Vol. 197, № 2. – P. 176–180;
102. Trityl-based EPR probe with enhanced sensitivity to oxygen / A. Bobko, I. Dhimitruka, T. Eubank et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 47, № 5. – P. 654–658;
103. Synthesis and characterization of amino derivatives of persistent trityl radicals as dual function pH and oxygen paramagnetic probes / I. Dhimitruka, A. Bobko, C. M. Hadad et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130, № 32. – P. 10780–10787;
104. Trityl Radicals as Persistent Dual Function pH and Oxygen Probes for in vivo Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging: Concept and Experiment / A. Bobko, I. Dhimitruka, J. Zweier et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129, № 23. – P. 7240–7241;
105. Synthesis of N-14- and N-15-labeled Trityl-nitroxide Radicals with Strong Spin-Spin Interaction and Improved Sensitivity to Redox Status and Oxygen / Y. Liu, F. Villamena, Y. Song et al. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – Vol. 75, № 22. – P. 7796–7802;

106. Facile and High-Yielding Synthesis of TAM Biradicals and Monofunctional TAM Radicals / D. V. Trukhin, O. Y. Rogozhnikova, T. I. Troitskaya et al. // *Synlett.* – 2016. – Vol. 27. – P. 893–899;
107. Large-scale synthesis of a persistent trityl radical for use in biomedical EPR applications and imaging / I. Dhimitruka, M. Velayuthama, A. Bobko et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* – 2007. – Vol. 17, № 24. – P. 6801–6805;
108. Electron Paramagnetic Resonance Monitoring of Ischemia-Induced Myocardial Oxygen Depletion and Acidosis in Isolated Rat Hearts Using Soluble Paramagnetic Probes / D. Komarov, I., Dhimitruka, I. Kirilyuk et al. // *Magnetic Resonance in Medicine.* – 2012. – Vol. 68, № 2. – P. 649–655.
109. Chiral properties of tetrathiatriarylmethyl spin probes / B. Driesschaert, R. Robiette, F. Lucaccioni, et al. // *Chemical Communications.* – 2007. – Vol. 47, № 16. – P. 4793–4795;
110. Triarylmethanols with Bulky Aryl Groups and the NOESY/EXSY Experimental Observation of a Two-Ring-Flip Mechanism for the Helicity Reversal of Molecular Propellers / V. Tormyshev, A. Genayev, O. Sal'nikov et al. // *European Journal of Organic Chemistry.* – 2012, № 3. – P. 623–629;
111. a) Patent 5530140 U.S. / S. Anderson, K. Golman, F. Rise, H. Wikström, L. Wistrand – 1996;  
b) J. Ardenkjaer-Larsen, I. Leunbach I. // PCT Int. Appl. wo/9709633. – 1997;  
b) Patent 5728370 U.S / S. Andersson, F. Radner, A. Rydbeck, R. Servin, L.-G. Wistrand – 1998;  
r) M. Thaning // PCT Int. Appl. wo/9839277. – 1998;
112. Khramtsov, V. Fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds / V. Khramtsov, J. Zweier // *Stable radicals* (Ed. R. G. Hicks). – Wiley, New York. – 2010. – P. 537–566;
113. Where It's at Really Matters: In situ In vivo Vascular Endothelial Growth Factor Spatially Correlates with Electron Paramagnetic Resonance pO<sub>2</sub> Images in Tumors of Living Mice / M. Elas, D. Hleihel, E. Barth et al. // *Molecular Imaging and Biology.* 2011. – Vol. 13, № 6. – P. 1107–1113;
114. a) Electron Paramagnetic Resonance Oxygen Images Correlate Spatially and Quantitatively with Oxylite Oxygen Measurements / M. Elas, K.-H. Ahn, A. Parasca et al. // *Clinical Cancer Research.* – 2006. – Vol. 12. – P. 4209–4217,  
b) Quantitative tumor oxymetric images from 4D electron paramagnetic resonance imaging (EPRI): Methodology and comparison with blood oxygen level-dependent (BOLD) MRI / M.

- Elas, D. Williams, A. Parasca et al. // *Magnetic Resonance in Medicine* – 2002. – Vol. 49, № 4. – P. 682–691;
115. High resolution electron paramagnetic resonance imaging of biological samples with a single line paramagnetic label / P. Kuppusamy, P. Wang, M. Chzhan et al. // *Magnetic Resonance in Medicine* – 1997. – Vol. 37. – P. 479–483;
116. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration / M. C. Krishna, S. English, K. Yamada et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* – 2002. – Vol. 99, № 4. – P. 2216–2221.
117. Matsumoto, S. Antiangiogenic agent sunitinib transiently increases tumor oxygenation and suppresses cycling hypoxia / S. Matsumoto, S. Batra, K. Saito // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71, № 20. – P. 6350–6359;
118. EPR and DNP properties of certain novel single electron contrast agents intended for oximetric imaging / J. H. Ardenkjaer-Larsen, I. Laursen, I. Leunbach et al. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 1998. – Vol. 133, № 1. – P. 1–12;
119. Tidwell, T. T. *Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds* / T. T. Tidwell // *Stable Radicals* (Ed. R. G. Hicks). – Wiley, Chichester, UK. – 2011. – P. 1–31;
120. Oxidative and reductive metabolism of tris (p-carboxyltetrahydraaryl) methyl radicals by liver microsomes / C. Decroos, Y. Li, G. Bertho et al. // *Chemical research in toxicology*. – 2009. – Vol. 22, № 7. – P. 1342–1350;
121. Configurationally Stable Tris (tetrahydraaryl) methyl Molecular Propellers / B. Driesschaert, R. Robiette, C. S. Le Duff et al. // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2012. – Vol. 2012, № 33. – P. 6517–6525;
122. Owenius, R. Frequency (250MHz to 9.2 GHz) and viscosity dependence of electron spin relaxation of triarylmethyl radicals at room temperature / R. Owenius, G. R. Eaton, S. S. Eaton // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2005. – Vol. 172, № 1. – P. 168–175;
123. Trityl Radicals: Spin Labels for Nanometer-Distance Measurements / G. W. Reginsson, N. C. Kunjir, S. T. Sigurdsson et al. // *Chemistry—A European Journal* – 2012. – Vol. 18, № 43. – P. 13580–13584;
124. Shevelev, G. Y. Triarylmethyl Labels: Toward Improving the Accuracy of EPR Nanoscale Distance Measurements in DNAs / G. Y. Shevelev, O. A. Krumkacheva, A. A. Lomzov et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119, № 43. – P. 13641–13648;
125. Pulsed ESR Dipolar Spectroscopy for Distance Measurements in Immobilized Spin Labeled Proteins in Liquid Solution / Z. Yang, Y. Liu, P. Borbat et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134, № 24. – P. 9950–9952;



126. Physiological-Temperature Distance Measurement in Nucleic Acid using Triarylmethyl-Based Spin Labels and Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy / G. Shevelev, O. Krunkacheva, A. Kuzhelev et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136, № 28. – P. 9874–9877;
127. Jeschke, G. Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance / G. Jeschke, Y. Polyhach // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2007. Vol. 9 – № 16, 1895–1910;
128. Saxena, S. Theory of double quantum two-dimensional electron spin resonance with application to distance measurements / S. Saxena, J. H. Freed // *Journal of Chemical Physics*. – 1997. – Vol. 107, № 5. – P. 1317–1340;
129. Room-Temperature Electron Spin Relaxation of Triarylmethyl Radicals at the X- and Q-Bands / A. Kuzhelev, D. Trukhin, O. Krunkacheva, R. Strizhakov et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119, № 43. – P. 13630–13640;
130. Plasma Nitric Oxide Concentrations and Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Coronary Artery Disease / Y. Yoon, J. H. Song, S. H. Hon, et al. // *Clinical Chemistry*. – 2000. – Vol. 46, № 10. – P. 1626–1630;
131. Hopper, R. A. Tonic and Phasic Nitric Oxide Signals in Hippocampal Long-Term Potentiation / R. A. Hopper, J. Garthwaite // *Journal Of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26, № 45. – P. 11513–11521;
132. Koshland, D. NO news is good news / D. Koshland, E. Culotta // *Science*. – 1992. – Vol. 258, № 5090. – P. 1862–1865;
133. Furchgott, R. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R. Furchgott, J. Zawadzki // *Nature*. – 1980. – Vol. 288, № 5789. – P. 373–376;
134. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide / L. Ignarro, J. Buga, M. Wood et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* – 1987. – Vol. 84. – N. 24. – P. 9265–9269;
135. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/ $\bullet$ NO (nitric oxide) through a radical reaction / T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto et al. // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, № 3. – P. 827–832;
136. Spin Trapping of Nitric Oxide by Nitronylnitroxides: Measurement of the Activity of NO Synthase from Rat Cerebellum / Y. Woldman, V. Khramtsov, I. Grigorev et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – Vol. 202, № 1. – P. 195–203;

137. Новые доноры и акцепторы оксида азота как потенциальные терапевтические агенты / В. И. Елинова, А. А. Бобко, Д. Г. Мажукин и др. // *Биоорганическая химия*. – 2003. – Т. 29, № 4. – С. 434–441;
138. Redox-sensitive mechanism of NO scavenging by nitronyl nitroxides / A. Bobko, E. Bagryanskaya, V. Reznikov et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – Vol. 36, № 2. – P. 248–258;
139. Khramtsov, V. NMR spin trapping: Detection of free radical reactions using a phosphorus-containing nitronyl spin trap. / V. Khramtsov, L. Berliner, T. Clanton // *Magnetic Resonance in Medicine* – 1999. – Vol. 42. № 2. – P. 228–234;
140. NMR spin trapping: detection of free radical reactions with a new fluorinated DMPO analog. / V. V. Khramtsov, V. A. Reznikov, L. J. Berliner et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2001. – Vol. 30. № 10. – P. 1099–1107;
141. Dikalova, A. E. Antihypertensive effect of mitochondria-targeted proxyl nitroxides / A. E. Dikalova, I. A. Kirilyuk, S. I. Dikalov // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 4. – P. 355–362;
142. Quantification of superoxide radical production in thylakoid membrane using cyclic hydroxylamine / M. Kozuleva, I. Klenina, I. Mysyn et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. 2015. – Vol. 89. – P. 1014–1023;
143. 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;
144. 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;
145. Osiecki, J. H. Studies of free radicals. I. alpha.-Nitronyl nitroxides, a new class of stable radicals / J. H. Osiecki, E. F. Ullman // *Journal of the American Chemical Society*. – 1968. – Vol. 90 – № 4. – P. 1078–1079;
146. Electron paramagnetic resonance of switchable copper-nitroxide-based molecular magnets: An indispensable tool for intriguing systems / M. V. Fedin, S. L. Veber, E. G. Bagryanskaya et al. // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2015. – Vol. 289–290 – P. 341–356;
147. Therapeutic Effects of Imidazolineoxyl N-Oxide Against Endotoxin Shock through Its Direct Nitric Oxide-Scavenging Activity / M. Yoshida, T. Akaike, Y. Wada et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – Vol. 202, № 2. – P. 923–930;

148. Eriksson, U. G. Nonenzymatic Bioreduction in Rat Liver and Kidney of Nitroxyl Spin Labels, potential contrast agents in magnetic resonance imaging. / U. G. Eriksson, R. C. Brasch, T. N. Tozer // *Drug Metabolism and Disposition*. – 1987. – Vol. 15, № 2. – P. 155–160;
149. Nitroxyl Spin Label Contrast Enhancers for Magnetic-Resonance Imaging–Studies of Acute Toxicity and Mutagenesis. / V. Afzal, Brasch, R. C., Nitecki et al. // *Investigative Radiology*. – 1984. – Vol. 19 – № 6. – P. 549–552;
150. Superoxide-mediated reduction of the nitroxide group can prevent detection of nitric oxide by nitronyl nitroxides / R. Haseloff, S. Zollner, I. Kirilyuk et al. // *Free Radical Research* – 1997. – Vol. 26. – P. 7–17;
151. Todhunter, E. N. The Ascorbic Acid Content of Whole Blood Plasma of Normal Rats with Evidence of a Sex Difference / E. Todhunter, T. McMillan // *Journal of Nutrition*. 1946. – Vol. 31 – № 5. – P. 573–580;
152. Pharmacokinetics of glycerin trinitrate (nitroglycerin) after sublingual administration in patients with chronic ischemic heart disease. / S. Blagodatskikh, V. Piotrovskii, V. Metelits et al. // *Farmakologiya i Toksikologiya*. 1987. – Vol. 50 – № 6. – P. 59–63.
153. Schweiger, A. Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy / A. Schweiger, G. Jeschke // Oxford University Press, New York, 2001;
154. Water concentration profiles in membranes measured by ESEEM of spin-labeled lipids / D. A. Erilov, R. Bartucci, R. Guzzi et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – Vol. 109. – P. 12003–12013;
155. ESEEM Measurements of Local Water Concentration in D2O-Containing Spin-Labeled Systems / A. D. Milov, R. I. Samoilova, A. A. Shubin et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2008. – Vol. 35. – P. 73;
156. Studying supramolecular assemblies by ESEEM spectroscopy: Inclusion complexes of cyclodextrins / G. Ionita, M. Florent, D. Goldfarb et al. // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol. 113. – P. 5781;
157. Stoll, S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR / S. Stoll, A. Schweiger // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2006. – Vol. 178. – P. 42–55;
158. Shishido, S. M. Photosensitivity of aqueous sodium nitroprusside solutions: nitric oxide release versus cyanide toxicity / S. M. Shishido, M. G. de Oliveira // *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism*. – 2001. – Vol. 26 – № 2–3. – P. 239–261;
159. An advanced approach to the evaluation of the spin-rotational term for a nitronyl nitroxide in fluid solution / A. Collauto, A. Barbon, M. Zerbetto et al. // *Molecular Physics*. – 2013. – Vol. 111. – P. 2933–2941;

160. 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;
161. Hubbell W.L. Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling / W. L. Hubbell, C. A. Altenbach // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1994. – Vol. 4. – P. 566–573;
162. Keana, J. F. W. Nitroxides as potential contrast enhancing agents for MRI application: influence of structure on the rate of reduction by rat hepatocytes, whole liver homogenate, subcellular fractions, and ascorbate / J. F. W. Keana, S. Pow, G. M. Rosen // *Magnetic Resonance in Medicine* 1987. – Vol. 5. – P. 525–536;
163. EPR and quantum chemical studies of the pH-sensitive imidazoline and imidazolidine nitroxides with bulky substituents // *Applied magnetic resonance* / A. Bobko, I. Kirilyuk, N. Gritsan et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2010. – Vol. 39. – P. 437–451;
164. Hyde, J. S. Simulation of ESR spectra of the oxygen-sensitive spin-label probe CTPO / J. S. Hyde, W. K Subczynski // *Journal of Magnetic Resonance*. – 1984. – Vol. 56. – P. 125–130;
165. PELDOR Spectroscopy Distance Fingerprinting of the Octameric Outer-Membrane Protein Wza from *Escherichia coli* / G. Hagelueken, W. J. Ingledew, H. Huang et al. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – Vol. 48. – P. 2904–2906;
166. Synthesis of 2,5-Bis(spirocyclohexane)-Substituted Nitroxides of Pyrroline and Pyrrolidine Series, Including Thiol-Specific Spin Label: An Analogue of MTSSL with Long Relaxation Time / I. A. Kirilyuk, Yu. F. Polienko, O. A. Krumkacheva, R. K. Strizhakov et al. // *Journal of Organic Chemistry*. 2012. – Vol. 77, № 18. – P. 8016–8027;
167. Structural and dynamical characteristics of trehalose and sucrose matrices at different hydration levels as probed by FTIR and high-field EPR. / M. Malferrari, A. Nalepa, G. Venturoli et al. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – Vol. 16. – P. 9831–9848;
168. Shushakov, O. A. Determining methyl-group internal-rotation barriers for nitroxyl-radical paramagnetic-moiety screening by electron spin echo / O. A. Shushakov, S. A. Dzyuba, Y. D. Tsvetkov // *J. Struct. Chem*. – 1989. – Vol. 30. – №. 4. – P. 593–598;
169. Milov, A. D. Phase relaxation of hydrogen atoms stabilized in amorphous matrices / A. D. Milov, K. M. Salikhov, Y. D. Tsvetkov // 1973;
170. Romanelli, M. Evaluation and interpretation of electron spin-echo decay part I: Rigid samples / M. Romanelli, L. Kevan // *Concepts Magn. Reson.* – 1997. – Vol. 9. – №. 6. – P. 403–430;
171. Dzuba, S. A. Librational motion of guest spin probe molecules in glassy media // *Physics Letters A*. – 1996. – V. 213. – №. 1. – P. 77–84;

172. Kirilina, E. P. Librational dynamics of nitroxide molecules in a molecular glass studied by echo-detected EPR / E. P. Kirilina, S. A. Dzuba, A. G. Maryasov et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2001. – V. 21. – №. 2. – P. 203–221;
173. Kirilina, E. P. Molecular dynamics of nitroxides in glasses as studied by multi-frequency EPR / E. P. Kirilina, T. F. Prisner, M. Bennati et al. // *Magnetic Resonance in Chemistry*. – 2005. – V. 43. – №. S1. – P. S119–S129;
174. Buitink J. Pulsed EPR spin-probe study of intracellular glasses in seed and pollen / J. Buitink, S. A. Dzuba, F. A. Hoekstra et al. // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2000. – V. 142. – №. 2. – P. 364–368.
175. Khan, N. Measurements in vivo of parameters pertinent to ROS/RNS using EPR spectroscopy / N. Khan, H. Swartz // *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002.– Vol. 234. – P. 341–357;
176. Halevy, R. Microimaging of Oxygen Concentration near Live Photosynthetic Cells by Electron Spin Resonance / R. Halevy, V. Tormyshev, A. Blank // *Biophysical Journal*. 2010. – Vol. 99. № 3. – P. 971–978;
177. Synthesis and Characterization of Ester-Derivatized Tetrathiatriarylmethyl Radicals as Intracellular Oxygen Probes / Y. Liu, F. Villamena, J. Sun et al. // *Journal of Organic Chemistry*. – 2008. – Vol. 73. № 4. – P. 4190–4197;
178. Application of a trityl-based radical probe for measuring superoxide / C. Rizzi, A. Samouilov, V. Kutala et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. 2003.– Vol. 35. № 12. – P. 1608–1618;
179. A phosphonated triarylmethyl radical as a probe for measurement of pH by EPR / B. Driesschaert, V. Marchand, P. Leveque et al. // *Chemical Communications*. – 2012. – Vol. 48. – P. 4049–4051;
180. Dual-Function pH and Oxygen Phosphonated Trityl Probe / A. Bobko, I. Dhimitruka, D. Komarov et al. // *Analytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 84, № 14. – P. 6054–6060;
181. Molecular diffusion in porous media by PGSE ESR / T. Talmon, L. Shtirberg, W. Harneit et al. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2010. – Vol.12. – P. 5998–6007;
182. Leggett, J. A dedicated spectrometer for dissolution DNP NMR spectroscopy / J. Leggett, R. Hunter, J. Granwehr // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2010. – Vol. 12. – P. 5883–5892;
183. Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR / J. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* – 2003. – Vol. 100, № 18. – P. 10158–10163;
184. Trukhin D. Measuring Long-Range Distances in Proteins at Physiological Temperature Using Saturation Recovery EPR Spectroscopy / D. Trukhin, Z. Yang, C. Lopez //

- EFMC/ASMC15. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry. Rehovot, Israel, 2015. – P. 153;
185. Mohos, B. ESR investigation of the triphenylmethyl radical / B. Mohos, F. Tudos, L. Jokay // *Physics Letters A*. 1967.– Vol. 24, №6. – P. 310–312;
186. Schreiner, K. Spin density distribution and stereochemistry of triphenylmethyl radical in solution / K. Schreiner, A. Berndt, F. Baer // *Molecular Physics*. – 1973. – Vol. 26, № 4;
187. Sabacky, M. Triarylmethyl Radicals. Synthesis and Electron Spin Resonance Studies of Sesquioxanthryl Dimer and Related Compounds / M. Sabacky, C. Johnson, R. Smith // *Journal of the American Chemical Society*. – 1967. – Vol. 89, № 9. – P. 2054–2058;
188. Permethyl- $\beta$ -Cyclodextrin Spin-Labeled with Nitronyl Nitroxide: Synthesis and EPR Study / R. K. Strizhakov, E. V. Tretyakov, A. S. Medvedeva et al. // *Applied Magnetic Resonance*. – 2014. – Vol. 45. – P. – 1087–1098.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи в научных 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. Permethy- $\beta$ -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. – Новосибир.: Изд-во ИХКГ 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. – Новосибир.: 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. Кирилюк, Ю. Полиенко, Ю. Гатилов, И. Григорьев, Е. Багрянская // Актуальные проблемы органической химии: Сб. трудов Всеросс. молодежной науч. конф., Новосибирск, Россия, 9–14 июля 2012. – Новосиб.: 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 Всеросс. молодежной науч. конф., Новосибирск, Россия, 9–14 июля 2012. – Новосиб.: 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. – C. 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.

## Благодарности

В заключении автор работы выражает огромную благодарность научному руководителю Елене Григорьевне Багрянской за постановку задачи и научное руководство; сотрудникам лаборатории магнитного резонанса МТЦ СО РАН к. ф.-м. н. Олесе Анатольевне Крумкачевой и д. ф.-м. н. Матвею Владимировичу Федину, лаборатории магнитной радиоспектроскопии НИОХ СО РАН Андрею Андреевичу Кужелеву и лаборатории электрохимически активных соединений и материалов НИОХ СО РАН д. х. н. Леониду Анатольевичу Шундрину, сотрудникам сектора молекулярных механизмов старения ИЦИГ СО РАН д. б. н. Наталье Гориславовне Колосовой и д. б. н. Наталье Анатольевне Стефановой за помощь в проведении экспериментов и интерпретации результатов; сотрудникам лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН к. х. н. Игорю Анатольевичу Кирилюку, лаборатории изучения нуклеофильных и ион-радикальных реакций НИОХ СО РАН д. х. н. Евгению Викторовичу Третьякову, лаборатории многоспиновых комплексных соединений МТЦ СО РАН д. х. н. Елене Юрьевне Фурсовой и группы металло-комплексного катализа к. х. н. Виктору Михайловичу Тормышеву за синтез нитроксильных и тритильных радикалов; сотрудникам НИОХ СО РАН Дмитрию Николаевичу Половяненко, Марии Владимировне Еделева и Дмитрию Александровичу Пархоменко за полезные научные дискуссии.

## Приложения

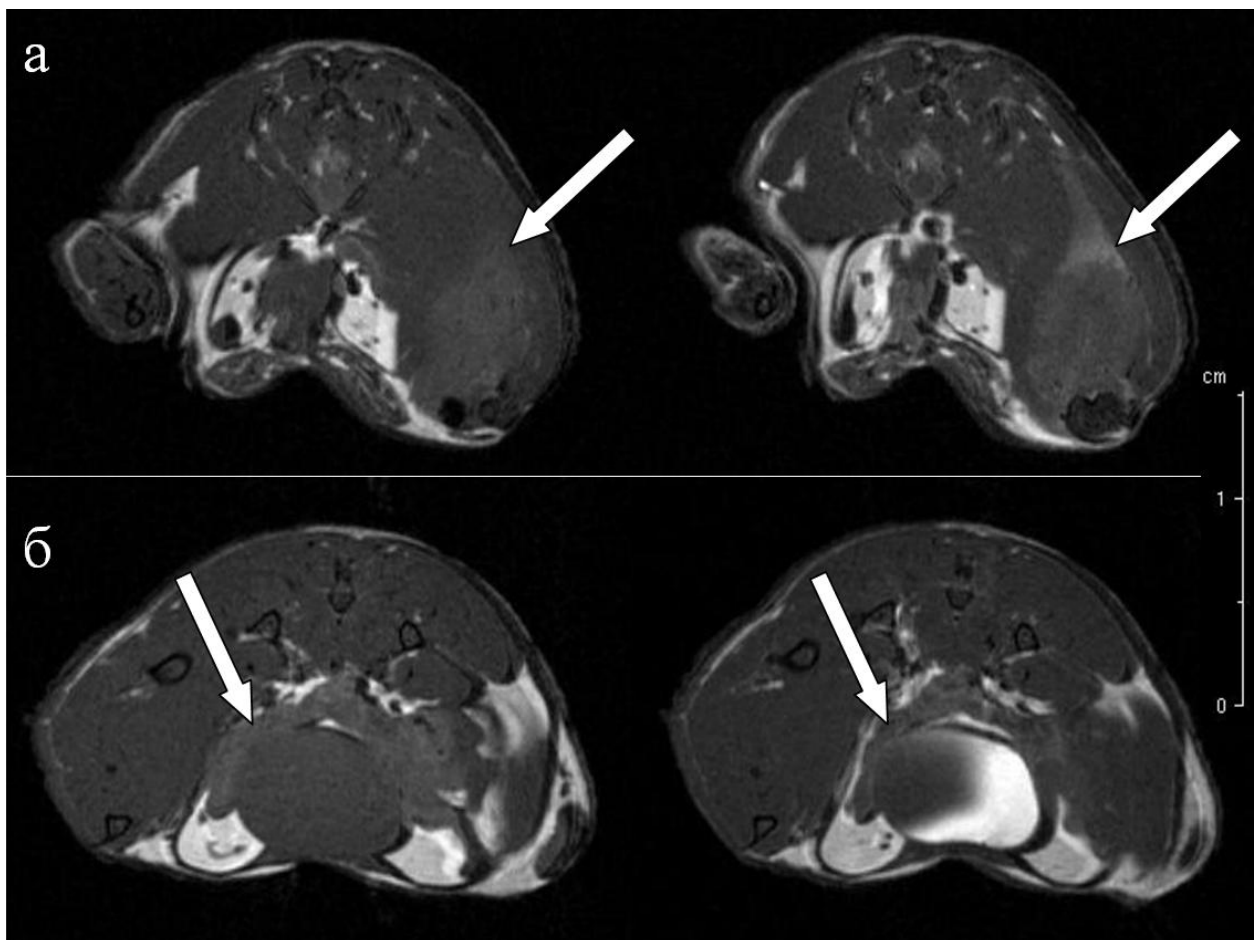
### Приложение А.

*(а), (б) МРТ T<sub>1</sub>-взвешенные изображения мышцы с опухолью на бедренной кости до (слева) и через 30 минут (справа) внутривенной инъекции 0,1 мМ/кг "Omniscan".*

*(а) Кросс-секция (10/45) бедренной кости около опухоли, показанной стрелками. Можно хорошо видеть контраст в области опухоли и особенно сосудов около опухоли.*

*(б) Кросс-секция (16/45) брюшной области около мочевого пузыря, который показан стрелками. Хорошо видно сильные изменения контраста в районе мочевого пузыря.*

*Следует отметить, что положение мышцы до и после введения контрастного агента несколько изменилось, однако это не является препятствием для демонстрации действия контраста.*



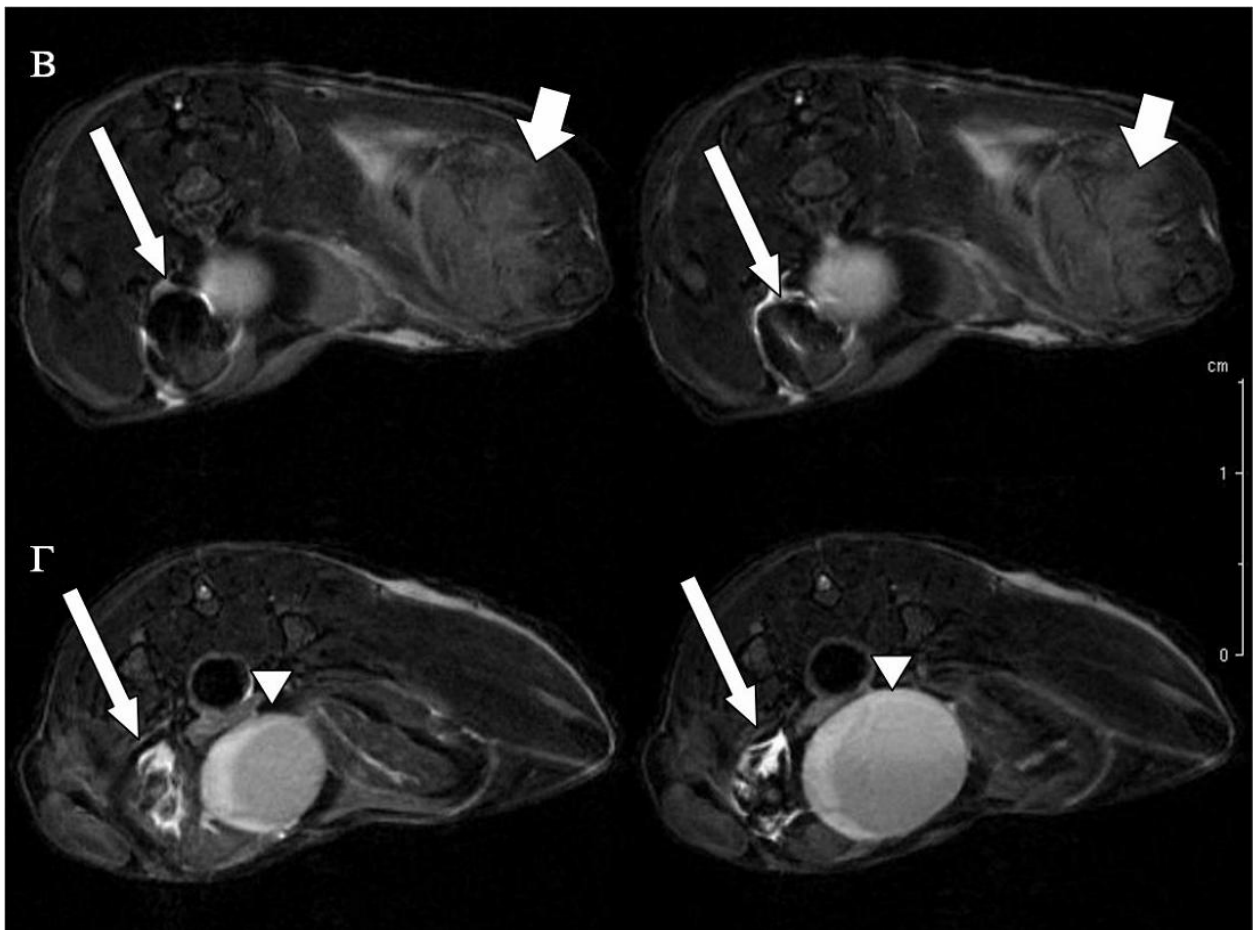
### Приложение Б.

(в), (г). МРТ  $T_1$ -взвешенные изображения мышцы с опухолью на бедренной кости через 20 минут (слева) и через 60 минут (справа) после внутривенной инъекции 1,8 мМ/кг

**NN1**. Узкие длинные стрелки показывают области начальной локализации **NN1** обусловленной внутривенным введением радикалов в обоих случаях. Видно, что с течением времени контраст этой области уменьшается из-за перераспределения **NN1**.  
(в) Кросс-секция (14/45) бедренной части около опухоли; показана широкими стрелками.

Можно видеть контраст в области опухоли.

(г) Кросс-секция (19/45) брюшинной области около мочевого пузыря, которая дополнительно отмечена белыми треугольниками. Видно, что наблюдается очень слабый контраст области опухоли и очень сильный контраст мочевого пузыря вследствие быстрого выведения **NN1**.

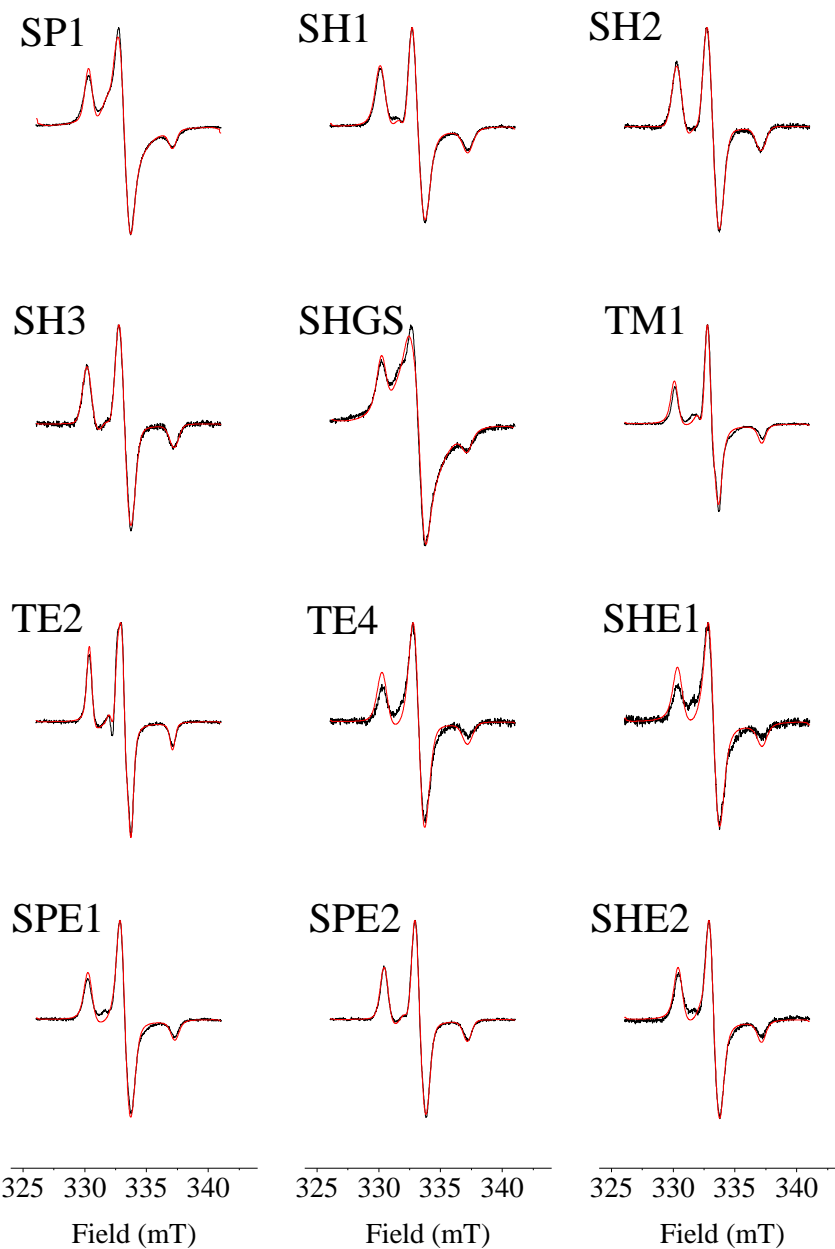


**Приложение В.**

*Стационарные спектры ЭПР серии нитроксильных радикалов (черные линии) и их моделирование (красная линия). Параметры моделирования перечислены в приложении*

*Г.*

T2



## Приложение Г.

Магнитно-резонансные параметры, которые использовались в моделировании  
стационарных спектров ЭПР серии нитроксильных радикалов.

<sup>1</sup>Доля компоненты спектра в твердом состоянии

<sup>2</sup>Доля изотропной обменно-суженной компоненты спектра

Радикал	Ширина линии, Гс ( $\pm 0,1$ )		$a_N$ , Гс ( $\pm 0,1$ )			g-фактор ( $\pm 0,0003$ )			
	Лоренцева	Гауссова	$a_{xx}$ , $a_{yy}$	$a_{zz}$	$a_{N,iso}$	$g_{xx}$	$g_{yy}$	$g_{zz}$	$g_{iso}$
<b>TM1</b>	4,3	4,4	5,2	35,2	15,2	2,0093	2,0093	2,0047	2,0078
<b>SH1</b>	5,1	6,9	6,3	35,3	16,0	2,0096	2,0096	2,0045	2,0079
<b>SH2</b>	5,1	6,0	5,1	33,9	14,7	2,0094	2,0094	2,0042	2,0077
<b>SH3</b>	0,9	8,1	5,3	35,2	15,3	2,0103	2,0082	2,0042	2,0076
<b>SHSG</b>	<b>0,54<sup>1</sup></b>	6,7	5,4	34,4	14,1	2,0066	2,0125	2,0043	2,0078
	<b>0,46<sup>2</sup></b>	22,7	18,3	—	—				
<b>SP1</b>	<b>0,66<sup>1</sup></b>	2,4	5,7	33,9	14,4	2,0114	2,0079	2,0042	2,0078
	<b>0,34<sup>2</sup></b>	25,3	7,9	—	—				
<b>TE4</b>	2,8	8,7	3,3	34,5	13,7	2,0088	2,0087	2,0044	2,0073
<b>TE2</b>	2,6	2,9	4,5	33,6	14,2	2,0076	2,0107	2,0041	2,0075
<b>SHE1</b>	6,2	5,4	3,1	34,1	13,4	2,0088	2,0084	2,0038	2,007
<b>SHE2</b>	4,9	5,1	3,9	33,7	13,8	2,0087	2,0083	2,0038	2,0069
<b>SPE1</b>	3,7	5,7	3,0	35,1	13,7	2,0083	2,009	2,0038	2,007
<b>SPE2</b>	1,9	6,7	4,8	33,6	14,4	2,0079	2,009	2,0036	2,0068

## Приложение Д.

Центральные линии стационарных спектров ЭПР исследуемых тритильных радикалов при комнатной температуре. Используемые растворители указаны на рисунке.

