

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ
ИМ. В. В. ВОЕВОДСКОГО
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

АГЕЕВА Александра Андреевна

**ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-
ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СВЯЗАННЫХ СИСТЕМАХ –
МОДЕЛЯХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ С БИОМОЛЕКУЛАМИ**

02.00.04 – физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
доктор химических наук, профессор
Лёшина Татьяна Викторовна

Новосибирск – 2020

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Литературный обзор: Использование модельных процессов при исследовании окислительно-восстановительных процессов с участием лекарств	15
1.1 Представление о лиганд-рецепторном комплексе.....	15
1.2 Ионные каналы и их роль в функционировании организма.....	17
1.3 Изучение природы антиоксидантной активности статинов на примере взаимодействия аторвастатина с фотогенерированными короткоживущими радикалами.....	21
1.4 Радикальные формы 1,4-дигидропиридинов (ДГП) – синтетических аналогов НАДН и лекарств на их основе. Роль состояний с переносом заряда при моделировании взаимодействия нифедипина с активным сайтом кальциевого рецептора	25
1.5 Строение и свойства радикальных форм природного алкалоида лаппаконитина. Моделирование процесса связывания лекарства с натриевыми каналами. Роль трансформации радикалов в процессе диссоциации лиганд-рецепторного комплекса.....	31
1.6 Фотофизические свойства и фотоиндуцированные превращения лаппаконитина и его производных	33
1.7 Изучение методами фотохимии и спиновой химии парамагнитных форм энантиомеров лекарств на примерах фотоиндуцированных процессов в модельных связанных системах. Сравнение различий реакционной способности энантиомеров в составе модельных донорно-акцепторных систем с результатами биохимических исследований	37
Глава 2. Экспериментальная часть	48
2.1 Материалы и реактивы	48
2.2 Методы исследования	50
2.2.1 Метод Химической Поляризации Ядер (ХПЯ) в квазистационарном и времяразрешенном вариантах, приготовление растворов.....	50
2.2.2 Оптические методы: спектрофотометрия, флуоресценция (стационарная и времяразрешенная), стационарный фотолиз.....	54
Глава 3. Исследование фотофизических свойств природного дитерпенового алкалоида – лаппаконитина и его производных.....	59

Глава 4. Роль хиральной конфигурации в фотоиндуцированных взаимодействиях в связанной системе NPX-Trp с двумя хиральными центрами.....	71
4.1 Стереоселективность процесса переноса электрона	72
4.2 Хиральная инверсия	81
Глава 5. Спиновая селективность в процессе фотоиндуцированного переноса электрона в связанных системах, содержащих (S) и (R)-напроксен	89
Основные результаты и выводы	102
Приложение.....	103
Список литературы	106
Благодарности	116

Введение

Актуальность темы исследования. Значительная роль, которую играют активные короткоживущие частицы с неспаренными электронами (свободные и ион-радикалы, парамагнитные ионы) в функционировании живых организмов в норме и патологии, сегодня не вызывает сомнений. Соответственно, строение и свойства активных форм кислорода (ROS, reactive oxygen species), играющих существенную роль в процессах старения организма, а также ответственных за так называемый окислительный стресс, детально изучены различными методами, начиная с биохимических и медицинских, и заканчивая современными физико-химическими с временным разрешением [1]. Существенно меньше известно об активных парамагнитных интермедиатах лекарств, образующихся в процессах их функционирования в организме при взаимодействии с ферментами, рецепторами и транспортными белками, а также при метаболизме. Согласно современной точке зрения, процессы лиганд-рецепторного и фермент-субстратного связывания включают донорно-акцепторные взаимодействия, нередко это стадии с переносом заряда [2]. Образующиеся в результате взаимодействия с аминокислотными остатками, расположенными в активных сайтах ферментов и рецепторов, радикалы и ион-радикалы лекарств также привлекают внимание исследователей, еще и как возможные источники токсических эффектов [3]. При этом принятым подходом к исследованию фототоксических и фотоаллергических реакций является изучение парамагнитных форм лекарств, образующихся при УФ облучении. В соответствии с гипотезой о переносе заряда как части взаимодействия лекарство-рецептор/лекарство-фермент, изучение модельного процесса – фотоиндуцированного переноса электрона между лекарствами и донорами электрона в настоящей работе используется для получения информации о парамагнитных формах лекарств и их возможной роли в живых системах. Особенно актуальными на сегодняшний день проблемами считаются установление природы влияния заместителей на процесс связывания лекарств с биомолекулами, а также выяснение природы различий в лечебной активности оптических изомеров (энантиомеров) лекарств [4]. Для получения ответов на эти вопросы с помощью исследования фотоиндуцированных модельных процессов с переносом заряда в представленной работе выбрано два класса лекарств: представитель алкалоидов

лаппаконитин и его производные, и нестероидный противовоспалительный препарат (S)-напроксен (NPX), и его (R)-аналог.

Степень разработанности темы исследования. Алкалоиды из аконита, природные связанные системы, имеющие в составе молекулы и донор – дитерпеновый фрагмент, и акцептор – остаток антраниловой кислоты (хромофор), лежат в основе целого ряда лечебных препаратов, среди которых есть как блокаторы натриевых каналов (лекарства антиаритмики), так и яды-нейротоксины [5]. Противоположные физиологические эффекты близких по строению соединений принято объяснять особенностями их связывания с натриевыми рецепторами. При этом в литературе ключевым считается вопрос о природе влияния заместителей, в частности, расположенных в дитерпеновой части молекулы [6]. В результате проведенного ранее анализа фотоиндуцированных эффектов химической поляризации ядер (ХПЯ) широкого набора замещенных лаппаконитинов была сформулирована гипотеза о возможной связи между эффективностью процессов фотодеградации и дезактивации синглетного возбужденного состояния лаппаконитинов [7]. Между тем фотофизические свойства лаппаконитина до сих пор не изучены, поэтому с целью проверки гипотезы о связи фотодеградации со свойствами возбужденных состояний в диссертации проведено детальное исследование фотофизических процессов, происходящих при УФ облучении лаппаконитина и ряда его производных, что позволило описать влияние заместителей. Кроме того, в работе предложен способ оценки потенциальной фототоксичности этого класса соединений на основе обнаруженной корреляции «структура-свойство».

Другим ярким примером лекарств, которые также содержат хромофор и, соответственно, обладают фототоксическими эффектами, являются нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). При этом ряд НПВП содержит асимметрический атом углерода, предполагающий наличие энантиомеров. Энантиомеры этих лекарств обладают различными, а нередко и противоположными терапевтическими эффектами [2, 8–10]. На сегодняшний день, физико-химическая природа различий в активности энантиомеров лекарств остается до конца не установленной, несмотря на многочисленные биохимические исследования. Для решения этой задачи в работах лаборатории Магнитных Явлений ИХКГ СО РАН в кооперации с испанскими исследователями был развит оригинальный подход, использующий элементарные процессы с переносом заряда для моделирования связывания лекарств с ферментами и

рецепторами [11–16]. При этом различия в активности энантиомеров напроксена, находящегося в составе связанных систем – диад с двумя хиральными центрами, оценивались путем сравнения скоростей фотоиндуцированного переноса электрона (R,S)- и (S,S)-диастереомеров диад. Исследования методами фотохимии и спиновой химии действительно позволили обнаружить различия в скоростях как частичного, так и полного переноса заряда (стереоселективность переноса электрона) в диадах с (R) и (S)-напроксом. Стоит отметить, что обнаруженные различия в реакционной способности качественно согласуются с результатами биохимических исследований [15]. Данная диссертационная работа является продолжением уже проведенных исследований и направлена на установление природы обнаруженных различий. В частности, в работе изучаются различия в распределении спиновых плотностей в ион-бирадикалах диастереомеров диад, проявляющиеся как различия в эффектах ХПЯ диастереомеров, т. н. спиновая селективность обратного переноса электрона. Еще одной характерной особенностью подкласса 2-арилпропионовых кислот НПВП является то, что различные представители этого подкласса подвергаются хиральной инверсии – превращению одной стереоизомерной формы в другую [17]. Изучение механизмов хиральной инверсии лекарственных препаратов весьма актуально в связи с тем, что лекарства могут подвергаться инверсии непосредственно в живом организме. Это практически важная проблема фармакологии, поскольку чаще всего только один энантиомер обладает необходимыми лечебными свойствами и тогда следствием спонтанной инверсии становится изменение дозы лекарства. Впервые процесс хиральной инверсии под действием ферментов был обнаружен на примере НПВП – ибупрофена [18–19]. Позднее было доказано, что некоторые другие производные 2-арилпропионовой кислоты также подвергаются метаболической инверсии [20]. Одна из точек зрения, представленных в литературе, состоит в том, что хиральная инверсия (R)-энантиомеров протекает через катализируемое ферментами образование «активированного» производного кофермента А, в котором осуществляется обратимое протонирование хирального центра, приводящее к обращению конфигурации [21]. Принимая во внимание, что в ионных реакциях оптическая конфигурация обычно сохраняется, а кроме того, для повторного протонирования требуется время, как правило, большее, чем времена жизни ионов, можно предположить, что инверсия происходит через обратимый отрыв атома водорода. В данной работе впервые обнаружено фотоиндуцированное обращение оптической

конфигурации, происходящее в результате обратимого переноса атома водорода между хиральными центрами в парамагнитной форме диады «(R)-напроксен-(S)-триптофан».

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение элементарных процессов, происходящих при фотооблучении донорно-акцепторных связанных систем, включающих биоактивные молекулы. Это природная связанная система – алкалоид лаппаконитин (является действующим веществом лекарства «Аллапенин») и донорно-акцепторные связанные системы с двумя хиральными центрами, включающие НПВП (R)/(S)-напроксен. Согласно ранее разработанному подходу, окислительно-восстановительные процессы в связанных системах призваны моделировать взаимодействие лекарства с ферментом или рецептором.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- 1) Методами времязрешенной флуоресценции измерены фотофизические характеристики (квантовые выходы, времена жизни флуоресценции) для диады (R)/(S)-напроксен-(S)-триптофан, а также лаппаконитина и его производных. В последнем случае также измерены квантовые выходы фоторазложения.
- 2) При помощи методов ХПЯ исследовано строение парамагнитных интермедиатов, образующихся при фотооблучении диады (R)/(S)-напроксен-(S)-триптофан, в частности, оценены различия коэффициентов усиления ХПЯ протонов для диастереомеров диад «напроксен-триптофан» и «напроксен-N-метилпирролидин» (спиновая селективность).
- 3) Измерена зависимость коэффициентов усиления ХПЯ, детектированных при фотооблучении смеси диастереомеров, от соотношения их концентраций.
- 4) Проведена идентификация диастереомеров в продуктах фотолиза диады «напроксен-триптофан» с помощью моделирования формы линии (деконволюция) для отдельных сигналов в спектрах ЯМР высокого разрешения.

Научная новизна. Продемонстрирована корреляция «структура-свойство» для ряда алкалоидов-дитерпеноидов: лаппаконитина и его производных. Показано, что введение заместителей в различные части молекулы лаппаконитина влияет на фотофизические свойства и механизмы фоторазложения: а именно, с увеличением квантового выхода флуоресценции уменьшается степень фоторазложения из триплетного возбужденного состояния.

Впервые обнаружено различие в коэффициентах усиления ХПЯ (R,S)- и (S,S)-диастереомеров диад, содержащих НПВП напроксен и доноры электрона – триптофан и N-метилпиролидин. Данное различие в коэффициентах усиления ХПЯ (R,S) и (S,S)-диастереомеров указывает на спиновую селективность обратного переноса электрона. Была также установлена зависимость коэффициента усиления ХПЯ от соотношения концентраций диастереомеров при облучении их смеси, что указывает на влияние межмолекулярных процессов на перенос электрона в диадах. Получены данные (результаты рентгеноструктурного анализа в твердости, спектры ЯМР в жидкости, расчеты методами молекулярной динамики) в пользу предположения, что этим межмолекулярным процессом является димеризация диастереомеров диад.

По эффектам ХПЯ детектирован также обратимый перенос атома водорода между хиральными центрами бирадикала, образованного при УФ облучении диады (R)-напроксен-(S)-триптофан, который приводит к обращению оптической конфигурации (хиральная инверсия). Это первый известный нам случай хиральной инверсии под действием фотооблучения, и также первый пример, где показан радикальный механизм инверсии.

Теоретическая и практическая значимость результатов. Практическая значимость результатов связана с установлением одной из возможных причин фототоксичности лекарственного средства лаптаконитина и его производных. Предложен способ оценки фототоксичности на основе анализа фотофизических характеристик лаптаконитинов. Показано как анализ взаимного влияния заместителей в молекуле лаптаконитина (корреляция «структура-свойство») может объяснить природу различий в действии отдельных представителей семейства алкалоидов – дитерпеноидов, среди которых есть как нейротоксины (яды), так и нейромедиаторы (лекарства от аритмии). При этом данные соединения мало отличаются по структуре и связываются с одними и теми же рецепторами, поэтому новые данные о природе различий могут быть востребованными.

Теоретическая и практическая значимость результатов, полученных при изучении диад с участием напроксена, состоит в установлении одной из возможных причин различий активности диастереомеров в элементарных процессах с переносом заряда. Поскольку наиболее вероятной причиной разных эффектов ХПЯ диастереомеров является различие констант сверхтонкого взаимодействия (СТВ) в димерах, можно

ожидать различий в распределении спиновой и электронной плотности в парамагнитных интермедиатах энантиомеров лекарств. Это, в свою очередь, может быть причиной разной лечебной активности энантиомеров, если считать, что их взаимодействие с ферментами включает стадии с переносом заряда.

Изучение фотоиндуцированной хиральной инверсии, происходящей в молекуле с двумя хиральными центрами, до сих пор не проводилось. Также не известны элементарные механизмы ферментативной хиральной инверсии, несмотря на интенсивное исследование в биохимической и медицинской литературе. В данной работе продемонстрирована хиральная инверсия, которая происходит в результате УФ облучения НПВП напроксена в составе диады с триптофаном. Показано, что обращение оптической конфигурации происходит в бирадикале, образованном в результате обратимого переноса атома водорода между хиральными центрами. Можно предположить, что хиральная инверсия НПВП, происходящая в живых организмах при обратимом связывании молекулы НПВП с транспортными белками и ферментами, может также протекать через стадию образования бирадикала.

Методология и методы исследования. Фотохимическая генерация парамагнитных частиц в биологических процессах успешно применяется со времен известной работы Жаботинского по фотогенерации катион-радикала никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) в процессе его окисления пероксидазой хрена [22]. Эта методика применялась также при изучении элементарных стадий ферментативного окисления и для моделирования процессов связывания лекарств с активными сайтами ферментов и рецепторов, а также с транспортными белками [23–24]. При этом считается, что понижение активационного барьера, которое в биологических системах происходит за счет образования водородных связей и других слабых взаимодействий между молекулой лекарства и аминокислотными остатками в активных центрах ферментов и рецепторов, в случае фотогенерации является результатом изменения окислительно-восстановительных свойств возбужденного хромофора. Главное достоинство метода заключается в увеличении концентрации промежуточных парамагнитных частиц, полученных в результате фотооблучения, по сравнению с ферментативными процессами, что позволяет изучать данные интермедиаты различными физико-химическими методами.

Выбор методов исследования обусловлен целями и задачами работы. Касательно связанной донорно-акцепторной системы лаппаконитин фотофизические характеристики были измерены при помощи методов фотохимии, таких как времяразрешенная флуоресцентная спектроскопия, стационарный фотолиз. Что касается диад с участием напроксена, короткоживущие интермедиаты были изучены при помощи методов спиновой химии (ХПЯ) и фотохимии (флуоресцентная спектроскопия). Идентификация соединений с обращенной оптической конфигурацией, получившихся в результате хиральной инверсии, осуществлялась методом ЯМР спектроскопии высокого разрешения. При этом анализ ЯМР спектров реакционной смеси в случае перекрывания линий включал процесс деконволюции сигналов мультиплетов.

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся следующие положения:

- 1) Использование фотофизических характеристик дитерпенового алкалоида – лаппаконитина и его модифицированных аналогов для установления корреляции «структура-свойство», включая оценку влияния заместителей на фотостабильность соединений.
- 2) Обнаружение стереоселективности констант скоростей фотоиндуцированного внутримолекулярного переноса электрона в (R,S) и (S,S)-диастереомерах диады «напроксен-триптофан».
- 3) Первое наблюдение изменения оптической конфигурации (хиральная инверсия) (R,S)-диастереомера этой диады, происходящее в бирадикале, образовавшемся под воздействием УФ облучения.
- 4) Первое наблюдение различий в коэффициентах усиления ХПЯ (спиновая селективность) диастереомеров при УФ облучении диад: (R)/(S)-напроксен-(S)-триптофан, (R)/(S)-напроксен-(S)-N-метилпирролидин.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные по эффектам химической поляризации, ЯМР, флуоресценции и стационарному фотолизу получены лично либо при непосредственном участии соискателя. Автор также лично участвовал в постановке задач, обсуждении результатов, формулировке выводов и написании публикаций по теме диссертационной работы. Теоретические расчеты эффектов ХПЯ в зависимости от магниторезонансных параметров, а также с учетом влияния ассоциации проводились И.

М. Магиным. Данные по рентгеноструктурному анализу диастереомеров диад были получены Д. А. Рычковым.

Апробация результатов. Результаты, представленные в диссертационной работе, докладывались и обсуждались на следующих конференциях: Международной Студенческой Научной Конференции «Студент и Научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2015 и 2016), Всероссийской научной конференции студентов-физиков (Омск, Россия, 2015), Всероссийской молодежной конференции «Успехи химической физики» (Черноголовка, Россия, 2016), International Conference RAHMS: Recent Advances in Health and Medical Sciences (Пафос, Кипр, 2016 и 2019), International Symposium on Chirality (Гейдельберг, Германия, 2016), «Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics» (Новосибирск, Россия, 2016), International Voevodsky Conference «Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes (VVV-100)» (Новосибирск, Россия, 2017), «Spin physics, spin chemistry and spin technology» (Новосибирск, Россия, 2018), Mogan Mountain International Summit on Green Pharmaceuticals, 2018 (China), Global Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems, 2019 (Париж, Франция).

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность выводов и результатов работы обеспечена комплексным подходом к экспериментальным исследованиям и их интерпретации с использованием современного экспериментального оборудования и современных экспериментальных и теоретических подходов. Полученные результаты находятся в согласии с имеющимися в литературе данными. Результаты работы опубликованы в международных журналах с высоким уровнем рецензирования, доложены на российских и международных конференциях с участием высококвалифицированных специалистов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Khramtsova, E.A., Ageeva, A.A., Stepanov, A.A., Plyusnin, V.F., Leshina, T.V. Photoinduced electron transfer in dyads with (R)-/(S)- naproxen and (S)-tryptophan // Z. Phys. Chem. – 2017. – V. 231. – N 3. – P. 609-623.

2. Ageeva, A. A., Khramtsova, E. A., Plyusnin, V. F., Stepanov A. A., Leshina T. V. A photochemical approach for evaluating the reactivity of substituted lappaconitines // Photochem. Photobiol. Sci. – 2018. – V. 17. – P. 192-199.

3. Ageeva, A. A., Khramtsova, E. A., Magin, M. A., Rychkov, D. A., Purto, P. A., Miranda, M. A., Leshina, T. V. Spin Selectivity in Chiral Linked Systems // Chem. Eur. J. – 2018. – V. 24. – N 15. – P. 3882-3892.

4. Ageeva, A. A., Khramtsova, E. A., Magin, I. M., Purto, P. A., Miranda, M. A., Leshina, T. V. Role of Association in Chiral Catalysis: From Asymmetric Synthesis to Spin Selectivity // Chem. Eur. J. – 2018. – V. 24. – N 70. – P. 18587-18600.

5. Ageeva, A. A., Babenko, S. V., Polyakov, N. E., Leshina, T. V. NMR investigation of photoinduced chiral inversion in (R)/(S)-naproxen–(S)-tryptophan linked system // Mendeleev Commun. – 2019. – V. 29. – N 3. – P. 260-262.

Соответствие специальности 02.00.04 «физическая химия». Диссертационная работа соответствует п. 8 «Динамика элементарного акта при химических превращениях», п. 9 «Элементарные реакции с участием активных частиц» и п. 10 «Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями осуществления химической реакции» паспорта специальности 02.00.04 – физическая химия. Соответствие содержания диссертационной работы специальности 02.00.04 – физическая химия, по которой она представляется к защите, подтверждается публикациями в соответствующих журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, приложения и списка литературы. Полный объем диссертации составляет 116 страниц с 66 рисунками и 7 таблицами. Список литературы содержит 126 наименований. Материалы диссертации изложены по главам следующим образом.

Первая глава представляет собой обзор литературы, в первом и втором разделах которого кратко описываются современные представления об основах действия лекарств за счет связывания с ферментами и рецепторами и роли донорно-акцепторных взаимодействий в этих процессах. В третьем разделе на примере антигиперлипидимических препаратов статинов описываются возможности метода ХПЯ для установления элементарных механизмов антиоксидантной активности статинов с использованием модельных процессов. Следующие четвертый и пятый разделы также посвящены описанию использования процессов с переносом электрона для моделирования взаимодействия лекарств (нифедипина, производного 1,4-дигидропиридина, и дитерпенового алкалоида лаппаконитина и ряда его производных) с

остатками аминокислот, расположенных в активных сайтах рецепторов. Обсуждаются возможные механизмы образования и диссоциации лиганд-рецепторных комплексов с участием этих лекарств. В шестом разделе рассматриваются результаты по изучению методами фотохимии и спиновой химии парамагнитных форм энантиомеров НПВП на примерах фотоиндуцированных процессов в модельных связанных системах. Там же проводится сравнение обнаруженных различий реакционной способности энантиомеров напроксена в составе модельных донорно-акцепторных систем с результатами биохимических исследований энантиомеров.

Во **второй главе** диссертации описаны объекты исследования, методики приготовления образцов, оборудование, использованное для получения результатов, а также детали экспериментов.

В главах 3–5 представлены результаты исследований и их обсуждение. **Третья глава** посвящена исследованию методами оптической спектроскопии и ЯМР фотофизических свойств и фотоиндуцированных превращений в природной связанной системе алкалоид-дитерпеноид – лаппаконитин и в ряду родственных соединений в растворах. Результатом исследования является установление корреляции «структура-свойство» для ряда замещенных лаппаконитинов и попытка использовать полученные результаты для объяснения особенностей связывания алкалоидов-дитерпеноидов с натриевыми каналами.

В **четвертой главе** методами флуоресцентной спектроскопии и ХПЯ изучаются фотоиндуцированные превращения диастереомеров диады, включающей (R)/(S)-напроксен и (S)-триптофан, в разных растворителях. В результате установлена стереоселективность процесса переноса электрона и детектирован параллельный процесс – частично обратимый перенос атома водорода, также происходящий под воздействием УФ облучения. В бирадикале, образованном в результате внутримолекулярного переноса атома водорода, впервые было обнаружено обращение конфигурации (R,S)-диастереомера диады (хиральная инверсия).

Пятая глава полностью посвящена количественному анализу эффектов ХПЯ диастереомеров двух диад, детектированных с помощью так называемых времяразрешенных и квазистационарных ХПЯ методик. В результате впервые было обнаружено и описано явление спиновой селективности – различие в коэффициентах усиления ХПЯ, сформированных в актах обратного внутримолекулярного переноса

электрона в диастереомерах. Также обнаружена зависимость величины различия в эффективностях ХПЯ диастереомеров от их соотношения в смеси, которая подвергается УФ облучению. Анализ этой зависимости позволил предположить участие в процессе переноса электрона димеров диастереомеров и существование различий в реакционной способности гомо- (R,S-R,S) или (S,S-S,S) и гетеро-димеров (R,S-S,S).

В **заключении** представлены основные результаты, полученные в данной диссертационной работе.

Глава 1. Литературный обзор

Использование модельных процессов при исследовании окислительно-восстановительных процессов с участием лекарств

Согласно современным представлениям действие лекарственного средства на живой организм осуществляется через взаимодействие молекулы действующего вещества лекарственного препарата со специальными белковыми структурами организма – ферментами или рецепторами. Это взаимодействие называют связыванием. В случае регулирования ферментативного процесса задача лекарства – блокировать действие фермента за счет замещения нативного субстрата в его активном сайте или за счет связывания с соседним сайтом, что приведет к замедлению ферментативного превращения субстрата и, как следствие, дальнейшей цепочки нежелательных реакций. Результат связывания лекарства с рецептором – воздействие на лечебную функцию белка рецептора, которое происходит в т. н. лиганд-рецепторном комплексе и осуществляется за счет обратимого изменения свойств рецептора, например, конформации. В итоге уменьшается или усиливается сигнал, который рецептор посылает клетке через систему импульсов и блокируются или открываются каналы, доставляющие различные вещества в соответствующие клетки.

1.1 Представление о лиганд-рецепторном комплексе

Рецепторы – белковые макромолекулы участвующие в химической передаче сигнала как между, так и внутри клеток. Они могут располагаться на поверхности клеточной мембраны или внутри цитоплазмы. Активированные рецепторы напрямую или косвенно регулируют клеточные биохимические процессы (например, ионную проводимость, фосфорилирование белков, транскрипцию ДНК, ферментативную активность). Молекулы (лекарств, гормонов, нейромедиаторов), которые связываются с рецепторами, называются лигандами. Это связывание может быть специфичным и обратимым. Лиганд может активировать или дезактивировать рецептор, в то время как активация может увеличивать или уменьшать конкретную клеточную функцию. Способность лекарства влиять на данный клеточный рецептор связаны с аффинностью/сродством (возможностью лекарства связываться с рецептором) и внутренней активностью (способностью лиганда вызывать активацию рецептора и

клеточный ответ). Аффинность и внутренняя активность лекарственного вещества в свою очередь определяются его химической структурой. Фармакологический эффект также определяется временем жизни лиганд-рецепторного комплекса (временем удерживания), которое определяется динамическими процессами (конформационными изменениями), определяющими скорость ассоциации и диссоциации комплекса. Более длительное время удерживания объясняет длительный фармакологический эффект. Тем не менее, длительное время удерживания может быть и потенциальным недостатком. Так, для некоторых рецепторов временное пребывание лекарств дает желаемый фармакологический эффект, тогда как длительное связывание с рецептором оказывается токсичным для рецептора. Современные представления о действии и специфичности лекарственного средства основаны на предположении, что первоначальный процесс действия лекарственного средства представляет собой образование обратимого комплекса между лекарственным средством и клеточным компонентом – рецептором [2].

В настоящее время считается, что образование лиганд-рецепторных и фермент-субстратных комплексов происходит за счет ряда нековалентных взаимодействий, таких как: водородные связи, диполь-дипольные взаимодействия между полярными группами лекарства и остатками аминокислот, расположенных в активных сайтах рецепторов, а также Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия [25]. При этом предполагается и образование состояний с переносом заряда между партнерами [2]. Для примера можно привести детально исследованное методом РСА связывание статинов с активным сайтом 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (**HMG CoA**) редуктазы, происходящее за счет следующих взаимодействий, представленных на рисунке 1 ниже.

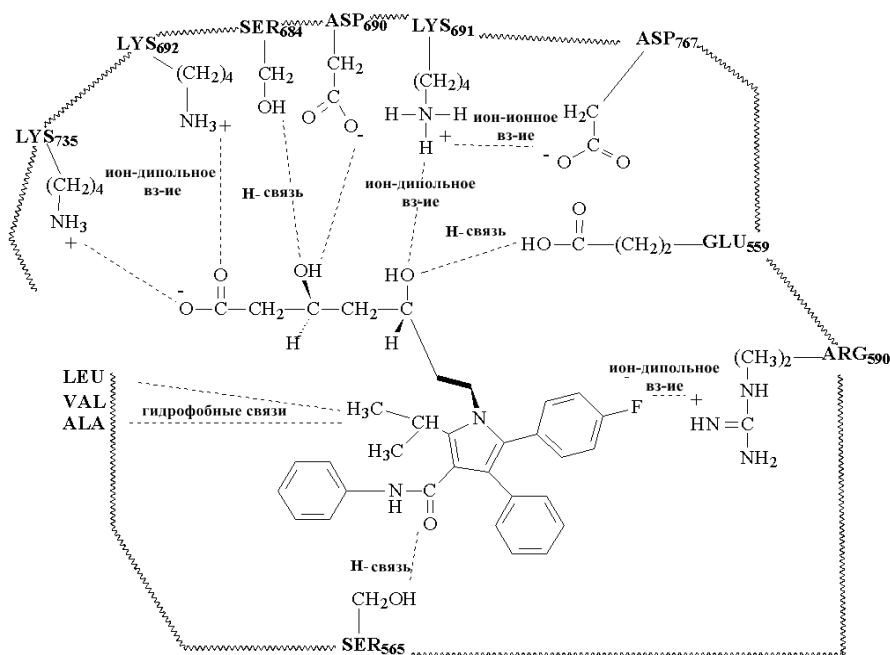


Рисунок 1. Связывающие взаимодействия HMG CoA редуктазы с аторвастатином [26].

Далее описываются рецепторы – кальциевые и натриевые каналы, поскольку в литературе имеются данные о том, что в процессах связывания лекарств с этими каналами играют роль окислительно-восстановительные свойства молекул [27]. Кроме того, в настоящее время ионные каналы представляют собой вторую по величине мишень для существующих лекарственных средств после рецепторов, сопряженных с G-белком [28].

1.2 Ионные каналы и их роль в функционировании организма

Ионные каналы – это трансмембранные белки, которые обеспечивают поток ионов через мембраны, как плазматические, так и принадлежащие внутриклеточным органеллам. Многие ионные каналы (такие как Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , а также некоторые Cl^- каналы) являются потенциал-зависимыми, в то время как у других (некоторые K^+ и Cl^- каналы) пропускание ионов регулируется вторичными посредниками и другими внутримолекулярными/межмолекулярными медиаторами. Большинство ионных каналов (напр. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и др.) имеют структурное сходство: они состоят из одной или нескольких порообразующих субъединиц, связанных с несколькими вспомогательными субъединицами, центральная пора, через которую происходит движение ионов, образована четырьмя или пятью трансмембранными альфа-спиралями. Открытие натриевых и кальциевых каналов плазматической мембраны приводит к поступлению этих ионов в клетку и деполяризации мембраны, в то время как открытие калиевых и

хлорных каналов – к гиперполяризации мембраны. Ионные каналы могут находиться в открытом и закрытом состоянии, а процесс перехода из одного состояния в другое обозначается как пропускание. Помимо этого, потенциал-зависимые каналы могут быть в инактивированном состоянии, что подразумевает их неспособность в данный момент времени отвечать на регуляторные сигналы (отсутствие проводимости на фоне стойкой деполяризации) [29].

Сайты связывания лекарств с ионными каналами хорошо известны и описаны. При действии лекарств на ионные каналы происходят конформационные изменения, которые происходят по мере того, как канал проходит серию трансформаций от открытого до закрытого состояний. При этом каждое из этих состояний канала имеет разную степень доступности или разное сродство для лекарства. Хорошо известно, что активные сайты многих рецепторов состоят из набора аминокислот, каждая из которых играет определенную роль в связывании и диссоциации лиганд-рецепторного комплекса. Так, активный сайт одного из наиболее изученных рецепторов кальциевых каналов L-типа образован шестью аминокислотными остатками, и пространственное расположение этих остатков различно для открытых и закрытых сайтов. Именно эти изменения пространственной структуры, определяющие состояние каналов, образуют основу терапевтического эффекта кальциевых антагонистов и широко используются в кардиологии. Один из наиболее используемых дигидропиридиновых препаратов – нифедипин образует комплекс с активным сайтом кальциевого рецептора с пространственным распределением, соответствующим закрытому каналу. Таким образом, связанный нифедипин препятствует изменению расположения аминокислот, которое, в свою очередь, является сигналом открытия канала. Класс кальциевых блокаторов проявляет значительную селективность к каналам L типа, в отличие от N, P, Q и R. Каналы L-типа (long-lasting large-capacitance, от англ. long-lasting — долгоживущий, large — большой; имеется в виду проводимость канала) медленно активируются при деполяризации клеточной мембраны и обуславливают медленный вход ионов Ca^{2+} в клетку и формирование медленного кальциевого потенциала, например, в кардиомиоцитах. Медленные кальциевые каналы образованы крупной $\alpha 1$ -субъединицей, формирующей канал, а также более мелкими дополнительными субъединицами — $\alpha 2$, β , γ , δ (см. рисунок 2).

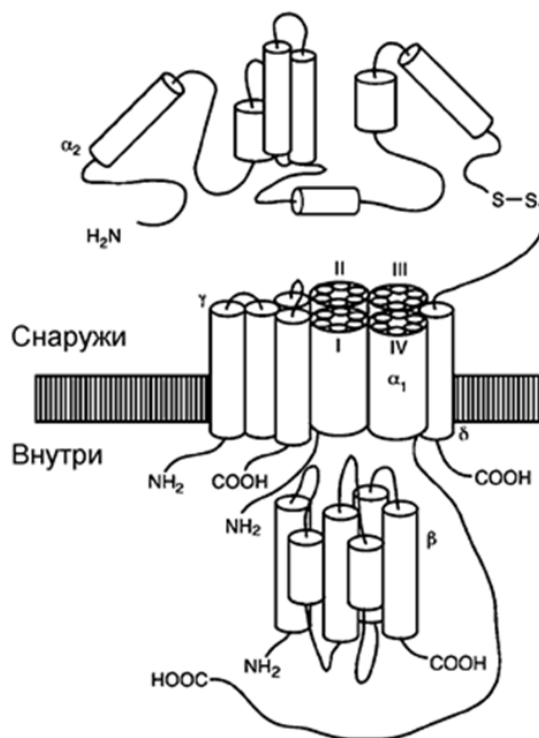


Рисунок 2. Схема строения кальциевого канала L-типа. Этот белковый канал построен из пяти субъединиц: α_1 , α_2 , β , γ и δ . Три из них (α_1 , γ и δ) прошивают плазматическую мембрану, причем их N- и C-концы расположены в цитоплазме. β -субъединица полностью находится в цитозольном пространстве клетки, а α_2 -субъединица, взаимодействующая через S-S-мостики с δ -субъединицей, выступает над наружной стороной мембраны. Все субъединицы, за исключением δ , состоят из нескольких компактных доменов, соединенных между собой петлями [30].

Отдельные аминокислотные остатки, образующие связывающий пакет дигидропиридинов с α_1 -субъединицей, были ранее установлены. В работе [31] был проведен мутагенез сайтов связывания с целью определения аминокислотных (АК) остатков, необходимых для связывания с дигидропиридинами. Было установлено, что взаимодействие дигидропиридина с тремя АК остатками канала L-типа в ШS5 и ШS6 (Tyr1393, Gln1397, Met1512) имеет решающее значение для чувствительности α_1A к дигидропиридину. Самой сильной структурной детерминантой, устраняющей чувствительность дигидропиридина у α_1A , является тирозин в положении Tyr1393, который по данным [31] стерически предотвращает связывание дигидропиридина.

Потенциал-зависимые натриевые каналы участвуют в генерации потенциала действия в различных клетках, в том числе в клетках скелетной мускулатуры, за счет осуществляемого ими транспорта ионов натрия внутрь клетки по электрическому и

концентрационному градиенту. Натриевые каналы являются молекулярными мишенями для лекарств, предотвращающих острую боль и применяемых для лечения сердечной аритмии, эпилепсии и биполярного расстройства. Лекарства-блокаторы натриевых каналов используются также для лечения хронической боли. Исследования сайт-направленного мутагенеза показали, что локальные анестетики и ряд других лекарств связываются со специфичным рецептором внутри поры натриевых каналов, образованных S6 сегментами в доменах I, III, и IV (см. рисунок 3). Это связывание блокирует ионное движение через пору и стабилизирует инактивированное состояние натриевых каналов.

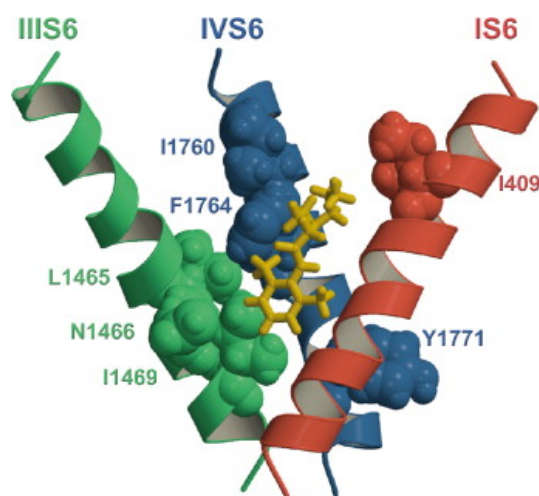


Рисунок 3. Модель связывания локального анестетика с сайтом рецептора, образованным трансмембранными сегментами IS6 (красный), IIIS6 (зеленый), и IVS6 (синий) Na^+ канала. Трехмерная модель предполагаемой ориентации АК остатков внутри поры Na^+ канала [32].

Кроме того, натриевые каналы являются молекулярными мишенями для большого числа нейротоксинов, которые вызывают паралич, блокируя нервно-мышечную функцию. Эти токсины действуют на пять или более различных сайтов рецептора и либо блокируют поры канала, либо изменяют кинетику или зависимость пропускания от напряжения. Алкалоиды и некоторые другие органические токсины растительного и животного происхождения связываются с сайтом рецептора и вызывают активацию натриевых каналов, которая деполяризует мембраны клеток нервов и мышц, что приводит к параличу [33–34].

Ниже в данном обзоре будет продемонстрировано, как взаимодействие молекул лекарств с этими каналами изучается с помощью модельных химических процессов. Моделями являются, как правило, элементарные окислительно-восстановительные

процессы с участием молекул лекарств, прежде всего, это перенос электрона. Будут рассмотрены элементарные превращения лекарств дигидропиридинового ряда, лаппаконитина и его производных при взаимодействии с аминокислотами, моделирующие связывание лекарств с аминокислотными остатками в калиевых и натриевых рецепторах.

Кроме того, окислительно-восстановительные свойства молекул, являющихся действующим началом ряда лекарственных препаратов и витаминов, и сами по себе широко исследуются биохимическими и физико-химическими методами [35–36]. Одним из таких примеров являются исследования окислительно-восстановительных свойств статинов, описанных в следующем разделе настоящего обзора.

1.3 Изучение природы антиоксидантной активности статинов на примере взаимодействия аторвастатина с фотогенерированными короткоживущими радикалами

В настоящее время известно, что свободные радикалы молекул лекарств также, как и активные формы кислорода, являются основным источником фототоксичности лекарственных препаратов, а также причиной многих заболеваний. В том числе атеросклеротическое поражение стенок сосудов относится к болезням, вызванным действием радикальных частиц в живом организме. Одной из популярных групп лекарственных препаратов, используемых для лечения и профилактики атеросклероза, являются статины, обладающие гиполипидемическим действием, а также антиоксидантной активностью. Основная функция статинов в живом организме – ингибирование начальной стадии биосинтеза холестерина, которая заключается в стереоспецифическом превращении 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзима А в мевалоновую кислоту (предшественник стеролов), катализируемое 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А редуктазой [37]. Статины являются конкурентными ингибиторами редуктазы: они блокируют её путем связывания с активным сайтом. Вторым важным направлением действия статинов является их антиоксидантная активность. В настоящее время установлено, что статины способны уменьшать уровень активных форм кислорода в клетках живых систем. Статины, например, могут замедлять окисление липидных каркасов липопротеидов низкой плотности, ведущее к разрушению клеточных мембран стенок сосудов. Среди различных способов влияния статинов на уровень свободных

радикалов рассматривается также и прямое акцептирование (действие в качестве радикальной ловушки). Так, работы [38–40] посвящены изучению возможности акцептирования статинами и их метаболитами активных (перокси- и гидроксид-) и стабильных радикалов. Стоит отметить, что термин статины объединяет соединения с различными структурами, которые включает лишь один общий фрагмент – остаток дигидроксигептановой кислоты или ее лактон (рисунок 4).

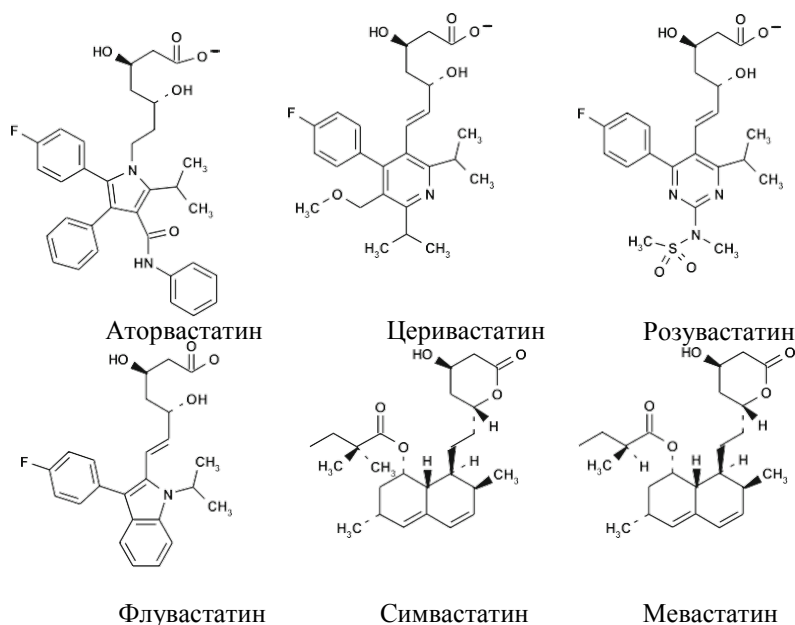


Рисунок 4. Химическая структура семейства гиполипидемических препаратов статинов [41].

Одним из наиболее широко назначаемых статинов является аторвастатин, который, как было установлено, является ловушкой для свободных радикалов. Детальный механизм модельного процесса, в котором аторвастатин взаимодействовал с радикальными частицами, полученными при фотолизе ацетофенона, был изучен в работе [41]. С помощью методов ЯМР, ХПЯ, фотохимии и хроматомасс спектрометрии авторам удалось установить, какие именно функциональные группы аторвастатина взаимодействуют с кетильными свободными радикалами. В процессе фотолиза ацетофенона возникали кетильный, метильный и фенилацетильный свободные радикалы и ион-радикалы. В результате анализа эффектов ХПЯ, зарегистрированных в отсутствие и присутствии аторвастатина, было установлено, что ацетофенон в отсутствие аторвастатина в водно-метанольной смеси разлагается по двум механизмам – фотовосстановление и реакция Норриша 1-го типа, причем последняя является минорным

путем. Показано, что при фотолизе ацетофенона в присутствии аторвастатина происходит ряд процессов, изображенных на рисунке 5. Это, прежде всего, перенос электрона от аторвастатина на триплетно-возбужденный ацетофенон с образованием катион-радикала аторвастатина (**ATR1**) и анион-радикала ацетофенона, при этом последний может протонироваться с образованием кетильного радикала (величина $pK_a=9.9$).

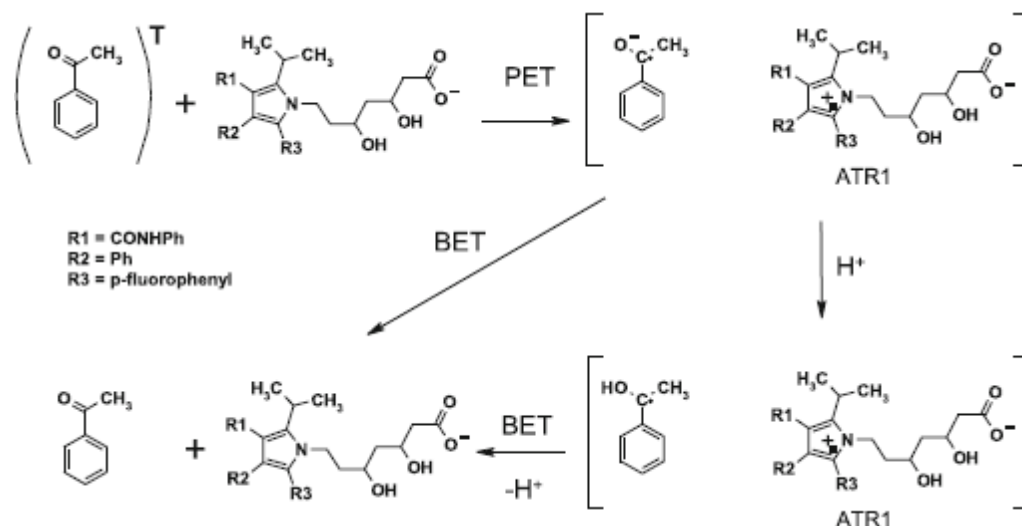


Рисунок 5. Схема фотоиндуцированного переноса электрона (**PET**) между триплетно-возбужденным ацетофеноном и аторвастатином [41].

Было также обнаружено образование дополнительных продуктов, включающих фрагменты аторвастатина, что указывает на возможность протекания реакции аторвастатина с кетильными радикалами (рисунок 6).

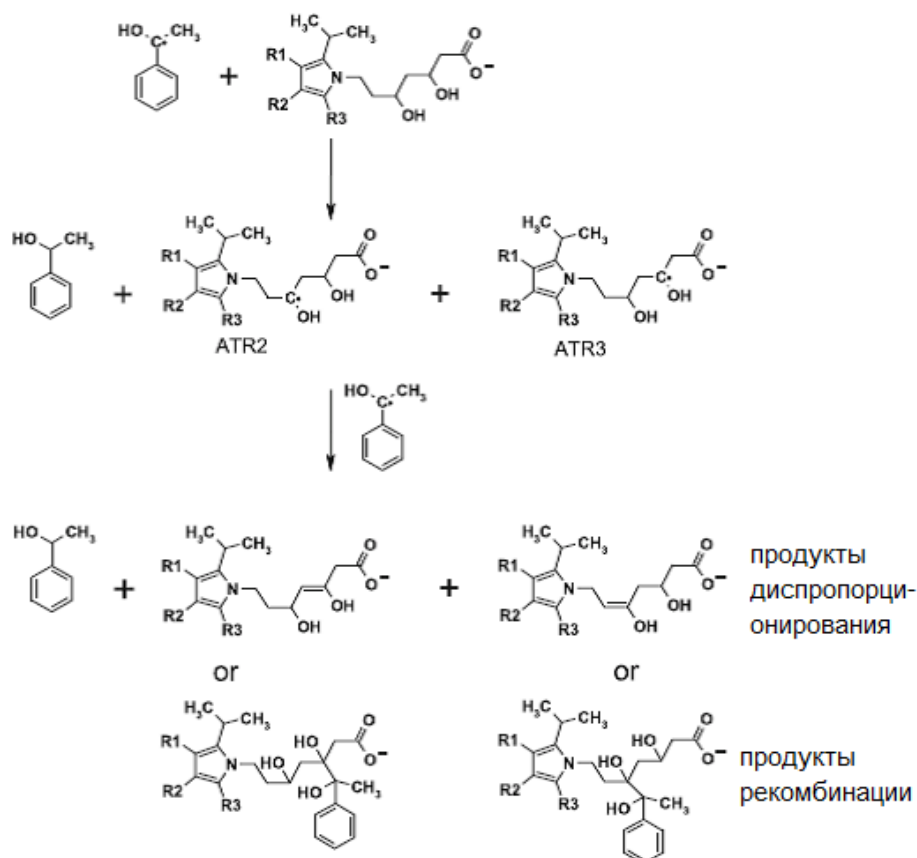


Рисунок 6. Схема реакций кетильного радикала с аторвастатином [41].

Продемонстрировано, что происходит отрыв атома водорода из двух возможных положений в молекуле аторвастатина от атомов углерода, связанных с гидроксигруппами, и образующиеся радикалы аторвастатина (ATR2, ATR3) рекомбинируют с кетильными радикалами с образованием пинаколов или енольных форм окисленного аторвастатина. Таким образом, аторвастатин уменьшает концентрацию триплетно-возбужденных молекул ацетофенона посредством переноса электрона, а также служит ловушкой короткоживущих кетильных радикалов. Самым важным результатом этого исследования является определение фрагмента молекулы ATR, который выступает в роли ловушки свободных радикалов – это остаток дигидроксигептановой кислоты, которая присутствует в молекулах всех статинов. Следовательно, антиоксидантные свойства по этому механизму могут демонстрировать и остальные статины. Это первый элементарный механизм антиоксидантного действия статинов, описанный в литературе.

В 2018 году возможность статинов выступать в качестве радикальных ловушек для ряда природных свободных радикалов, включая ROS, напрямую было детектировано при помощи метода ЭПР со спиновыми ловушками [42]. Авторы сравнивали

антиоксидантную активность двух статинов – флувастатина и правастатина в реакциях с супероксид-анионом, гидроксильным, третбутилпероксильным и нитроксильным радикалами. В результате, флувастатин и правастатин реагировали с супероксид-анионом, гидроксильным и нитроксильным радикалами, однако с третбутилпероксильным радикалом взаимодействовал только флувастатин, что привело авторов к выводу, что флувастатин может иметь потенциально больший эффект в предотвращении атеросклероза и ишемической болезни за счет ингибирования окисления липидов. Таким образом, можно заключить, что исследования *in vitro* на модельных системах могут предоставить информацию о механизме действия препаратов, которую нельзя получить в результате биохимических и медицинских исследований. Основная причина этих различий в том, что последние демонстрируют только суммарный эффект влияния препарата на множество жизненно важных показателей (содержание ROS, супероксид дисмутаза, каталазы, ряда других ферментов и т. д.), но ничего не могут сказать о механизме. А между тем, только знание механизма позволит прогнозировать действие новых препаратов.

1.4 Радикальные формы 1,4-дигидропиридинов (ДГП) – синтетических аналогов НАДН и лекарств на их основе. Роль состояний с переносом заряда при моделировании взаимодействия нифедипина с активным сайтом кальциевого рецептора

Как упоминалось выше, в литературе предполагается, что радикальные формы лекарств могут возникать также при взаимодействии молекулы действующего вещества с ферментами и рецепторами. Наличие одноэлектронных стадий при окислении субстратов пероксидазой хрена, цитохромом P-450 и цитохромом C убедительно доказано [43].

При моделировании процесса связывания 1,4-дигидропиридинов с активными сайтами рецепторов кальциевых каналов при помощи 3D-QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) подхода Шляйфером [27] также постулировалось взаимодействие с участием переноса заряда для электрон-дефицитных 4-фенилдигидропиридинов. Данный постулат был основан на значительной корреляции между квантово-химическими расчетами (AM1 и RHF 6-31G) энергии HСМО* и экспериментально наблюдаемыми величинами изменений свободной энергии ΔG° в паре взаимодействующих партнеров.

Экспериментальным свидетельством в пользу участия соединений 1,4-дигидропиридинового ряда в реакциях с переносом электрона является цикл работ [44–47]. В этих работах на модельных системах с участием дигидропиридинов и акцепторов электрона в растворах изучались фотоиндуцированные превращения, включающие перенос электрона и протона (рисунок 7).

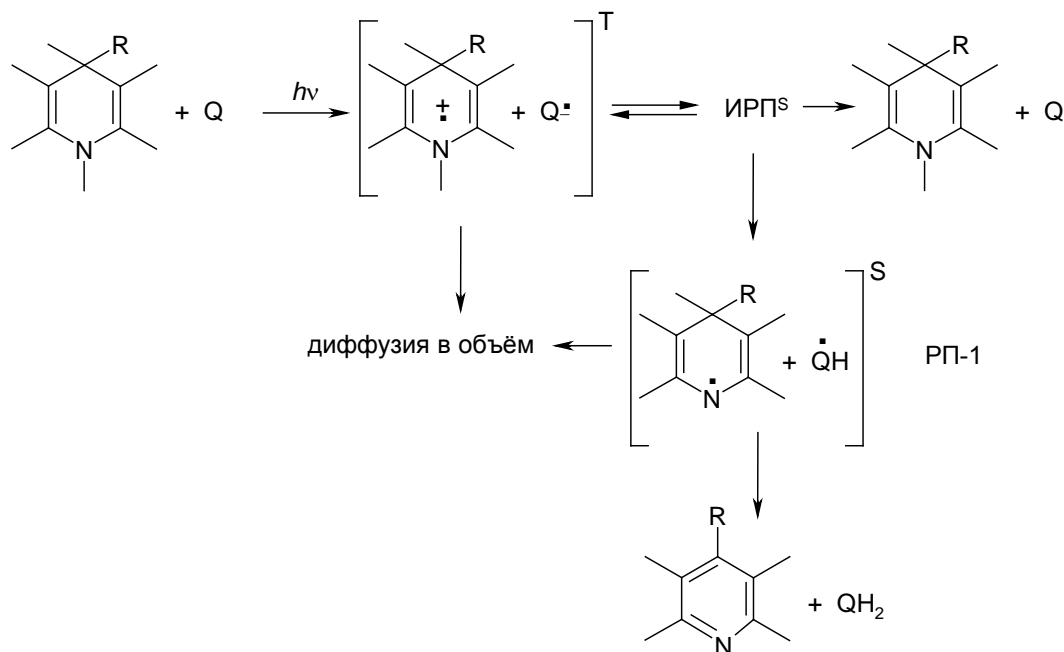


Рисунок 7. Механизм фотоокисления N-незамещенных 1,4-дигидропиридинов в присутствии хинонов в растворе, ИРП – ион-радикальная пара, РП – радикальная пара.

Ниже описываются элементарные стадии фотоиндуцированных взаимодействий в растворах 1,4-дигидропиридинов и самого нифедипина с аминокислотами, изученные методом ХПЯ.

Стоит отметить, что 1,4-дигидропиридины представляют интерес при моделировании биологических процессов по целому ряду причин. Во-первых, они являются синтетическими аналогами распространенного кофактора – НАДН, который участвует во многих процессах в живых системах. Во-вторых, обширная группа лекарственных препаратов – антагонистов кальция представлена производными 1,4-дигидропиридина (нифедипин, нитрендипин, нимодипин, амлодипин, лацидипин, фелодипин, никардипин, исрадипин, лерканидипин и др.) (рисунок 8). Отметим, что ряд из них до сих пор присутствует на рынке лекарств.

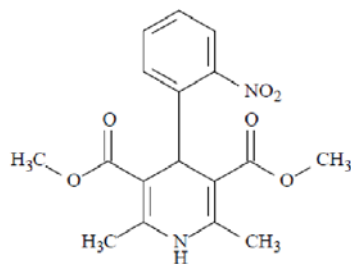


Рисунок 8. Химическая структура одного из представителей 1,4-дигидропиридинов – нифедипина [24].

В основе предложенного авторами подхода [24] для моделирования связывания известного антагониста Ca^{2+} с кальциевым рецептором лежит предположение об окислительно-восстановительном взаимодействии молекулы лекарства с активным сайтом рецептора. Выше упоминалось, что современные представления о действии и специфичности лекарственного средства основаны на предположении, что этот процесс включает образование обратимого комплекса между лекарством и клеточным компонентом – рецептором. При этом в работе [24], опираясь на результаты числового и химического моделирования предполагалось, что в результате переноса электрона между молекулой лекарства и остатками аминокислот в активном сайте рецептора может происходить химическая трансформация парамагнитных интермедиатов лекарства, которая послужит причиной следующей стадии лиганд-рецепторного взаимодействия – диссоциации лиганд-рецепторного комплекса. Для того, чтобы понять, о каких трансформациях идет речь, следует коснуться химических свойств нифедипина и его превращений в химических и биохимических процессах. Поскольку молекула содержит нитрогруппу, ее частичное восстановление считается основной причиной большинства побочных эффектов лекарств. Метаболизм нифедипина в печени цитохромом P-450 был детально изучен, и основным продуктом, как было установлено, является соответствующий нитрозопиридин. Также известно, что при УФ облучении нифедипин количественно превращается в нитрозоформу, которая является одним из короткоживущих интермедиатов, обнаруженных при УФ облучении в живых системах (рисунок 9). Еще одной структурной особенностью молекулы нифедипина является наличие нитрофенильной и дигидропиридиновой функциональных групп, которые в свою очередь, учувствуют в реакциях переноса электрона с донорами или акцепторами,

соответственно. Следует отметить также, что нифедипин нефотостабилен и может претерпевать фототрансформации даже находясь непосредственно в живом организме.

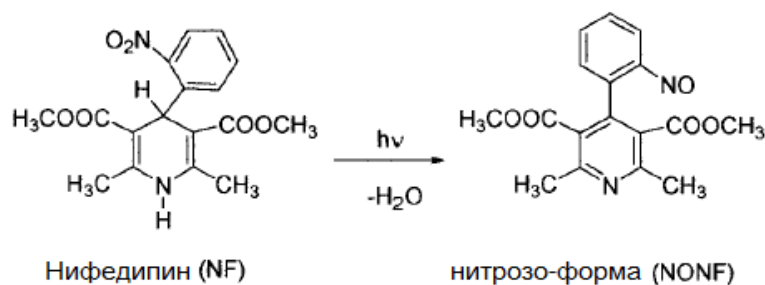


Рисунок 9. Фотопревращения нифедипина (NF) в нитрозоформу (NONF) [24].

Чтобы ответить на вопрос о том, какие именно химические взаимодействия происходят между лекарством и аминокислотным остатком в активном сайте клеточного рецептора, а также о том, как эти взаимодействия влияют на лиганд-рецепторное связывание, авторы использовали модельный процесс – реакцию нифедипина с тирозином в растворе при УФ облучении. Для детектирования парамагнитных интермедиатов в данной реакции были проведены измерения эффектов ХПЯ в водно-метанольной смеси. В результате эффекты ХПЯ были обнаружены на исходном тирозине и продукте превращения нифедипина – нитрозопиридине. Кроме того, авторам удалось обнаружить поляризованные сигналы, принадлежащие катиону пиридиния. Соотношение интенсивностей поляризованных сигналов тирозина указывает на формирование поляризации из нейтрального радикала тирозина. Стоит отметить, что исследования методом ХПЯ реакций с участием тирозина во всех случаях показывают образование нейтрального радикала, образующегося в результате быстрого протонирования соответствующего катион-радикала. Из анализа эффектов ХПЯ также следует, что образуется нейтральный радикал нитрозоформы с неспаренным электроном, расположенным в дигидропиридиновом кольце. Поскольку эффекты ХПЯ на исходном нифедипине не были обнаружены при реакции с тирозином, для проверки обратимости стадии переноса электрона, приводящей к образованию анион-радикала нифедипина, авторы расширили модельную систему, используя в качестве донора электрона трифениламин. В данной реакции эффекты ХПЯ были обнаружены на исходном нифедипине, а отношение интегральных интенсивностей поляризованных сигналов соответствовало отношению констант СТВ в анион-радикале нифедипина. Таким образом, был подтвержден перенос электрона между нифедипином и амином, и

предложен следующий механизм взаимодействия нифедипина с тирозином (см. схему на рисунке 10): первой стадией является перенос электрона с последующим переносом протона с катион-радикала тирозина на анион-радикал нифедипина, и образуется пара нейтральных радикалов, затем происходит трансформация радикала **1** в радикал дигидропиридина **2**, далее возможен либо перенос электрона с образованием нестабильного катиона пиридиния **3**, либо перенос атома водорода с образованием основного продукта фотолиза нифедипина – нитрозоформы.

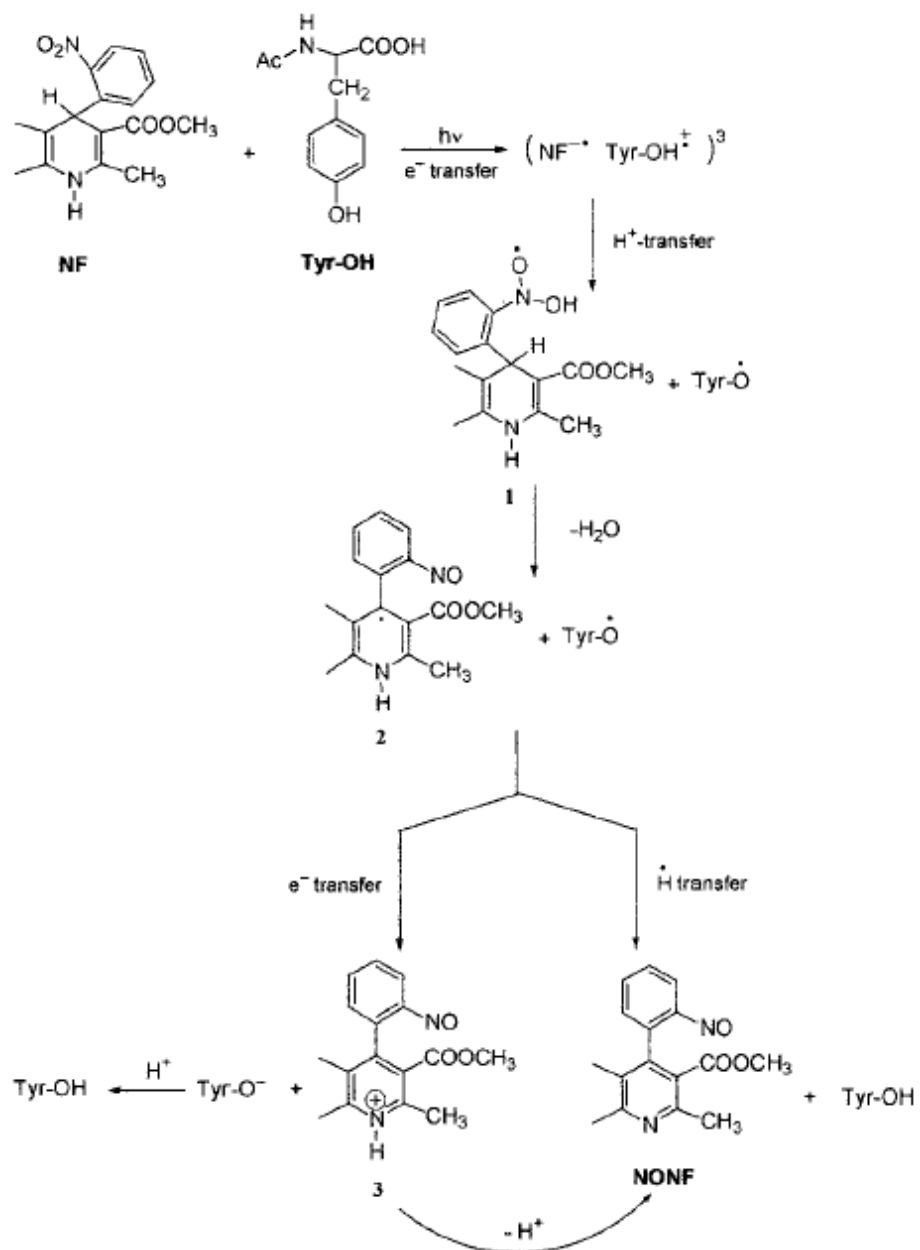


Рисунок 10. Механизм реакции нифедипина (NF) с тирозином (Tyr-OH) [24].

Исследование модельной реакции нифедипина с тирозином позволило авторам предложить следующую последовательность событий, происходящих в активном сайте

рецептора при образовании комплекса с лекарством. Реакция переноса электрона на нифедипин, включающая трансформацию нитро-группы в нитрозо-, приводит к ароматизации дигидропиридинового цикла и превращении в пиридиновый. Численное моделирование показало, что замена лиганда приводит, в свою очередь, к разрыву связи с аминокислотными остатками в активном сайте рецептора из-за изменения пространственной структуры комплекса (рисунок 11). Так как продукт реакции нитрозопиридин не способен связываться с сайтом рецептора, комплекс диссоциирует, таким образом освобождая рецептор и обеспечивая обратимость связывания, что является необходимым условием функционирования рецептора.

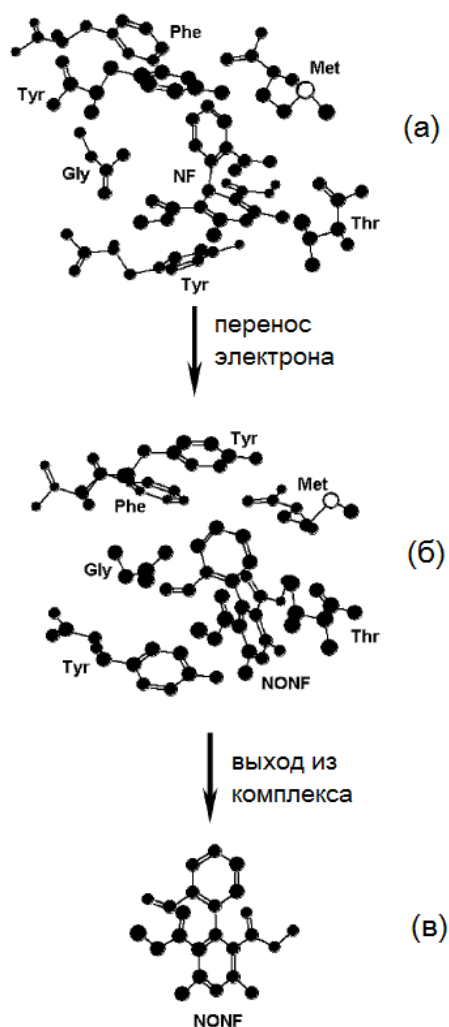


Рисунок 11. Схема трансформаций нифедипина (NF) в нитрозопиридин (NONF) в активном сайте кальциевого рецептора, образованного аминокислотными остатками: а) NF связан с активным сайтом рецептора, б) прерывание связывания из-за изменения пространственной структуры активного сайта после превращения NF в NONF в результате переноса электрона, в) выход NONF из активного сайта рецептора. Рисунок из работы [24].

Дальнейшее использование элементарных процессов, включающих перенос заряда для моделирования взаимодействия лекарства с рецептором, было применено при изучении других лекарственных соединений (лаптаконитин, напроксен), о которых речь пойдет ниже.

1.5 Структура и свойства радикальных форм природного алкалоида лаптаконитина. Моделирование процесса связывания лекарства с натриевыми каналами. Роль трансформации радикалов в процессе диссоциации лиганд-рецепторного комплекса

В рамках предложенной и апробированной модели донорно-акцепторных взаимодействий лекарства с рецептором было проведено дальнейшее моделирование связывания природного блокатора натриевых каналов – лаптаконитина с аминокислотными остатками [48] (рисунок 12).

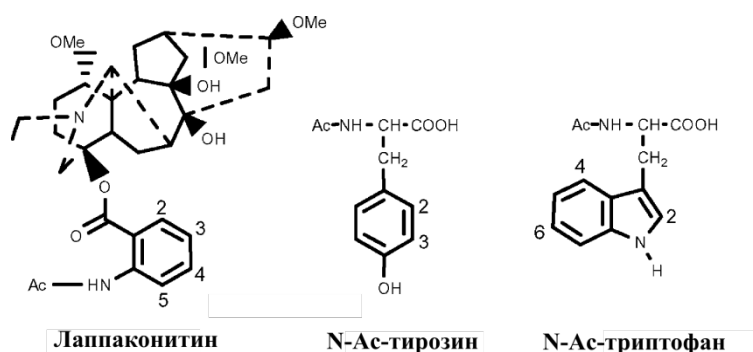


Рисунок 12. Химические структуры лаптаконитина и аминокислотных остатков [48].

Терапевтическое действие лаптаконитина обусловлено блокадой быстрого входящего натриевого тока через мембрану кардиомиоцита, что делает его в определённом диапазоне концентраций типичным антиаритмическим средством [49]. При этом существует точка зрения, что лаптаконитин необратимо связывается с сайтом 2 натриевого канала [6], для которого известна аминокислотная последовательность [50]. В работе [48] было проведено исследование фотоиндуцированного взаимодействия лаптаконитина с аминокислотами – триптофаном и тирозином, присутствующими в активном сайте натриевого канала. Было показано, что в присутствии доноров электрона лаптаконитин под действием света разлагается с образованием N-ацетилантракиноновой кислоты и 1a, 14a, 16b-триметокси-8,9-N-этил-18-нораконана. Эффекты ХПЯ были детектированы в полярных растворителях (ацетонитрил, метанол, ДМСО и вода) как на

исходных соединениях, так и на продукте N-ацетилантраниловой кислоте. Согласно анализу эффектов ХПЯ в реакционной смеси лаппаконитина и триптофана по правилам Каптейна, модифицированным Клоссом для ион-радикальных процессов [51], продукт геминальной рекомбинации образуется из триплетной ион-радикальной пары, образованной анион-радикалом лаппаконитина и катион-радикалом триптофана. Принимая во внимание, что в условиях проведенных экспериментов свет поглощался исключительно лаппаконитином (коэффициент молярного поглощения на длине волны 308 нм составляет $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), анализ термодинамических параметров системы по правилу Рэма-Веллера [52] показывает, что лаппаконитин реагирует посредством переноса электрона из триплетного возбужденного состояния. В случае реакции лаппаконитина с тирозином картина ХПЯ также соответствует ситуации одноэлектронного переноса.

В результате анализа эффектов ХПЯ, включая времяразрешенные измерения кинетики ХПЯ, было показано, что механизм взаимодействия лаппаконитина с триптофаном и тирозином включает три стадии (см. рисунок 13): 1) перенос электрона с аминокислоты на антраниловый фрагмент лаппаконитина; 2) протонирование анион-радикала лаппаконитина с образованием двух радикалов, находящихся в динамическом равновесии; 3) фрагментация радикала I, приводящая к образованию N-ацетилантраниловой кислоты и алициклического остатка лаппаконитина.

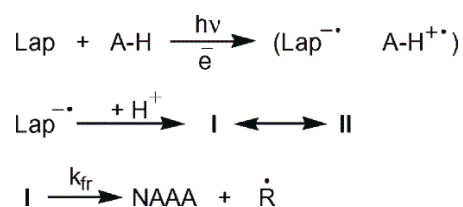


Рисунок 13. Фотоиндуцированные реакции лаппаконитина с аминокислотами (А-Н). Рисунок из работы [48].

Таким образом, в результате взаимодействия лаппаконитина с аминокислотами вслед за переносом электрона происходит быстрый распад радикалов, приводящий к образованию продуктов, не обладающих фармакологической активностью. Экстраполируя данные результаты на лиганд-рецепторное взаимодействие в активном сайте рецептора натриевого канала, можно ожидать, что при взаимодействии лаппаконитина с остатками аминокислот происходит перенос электрона, который приводит к разрыву эфирной связи и, следовательно, прекращению связывания лиганда с

рецептором. Этот факт говорит в пользу предположения авторов о том, что обратимость лиганд-рецепторного связывания может быть обусловлена химическими превращениями лекарств, находящихся в комплексе с рецепторами, но этот вывод находится в противоречии с данными работы [6]. Кроме того, согласно данным этой работы, нейромедиатор – лаппаконитин и нейротоксин – аконитин, похожие по строению соединения, демонстрируют одинаковое связывание. Между тем, если сравнивать модельные процессы с их участием, то для аконитина, анион-радикал которого не должен подвергаться никаким трансформациям, следует ожидать как раз необратимого связывания, которое может быть причиной отравления рецептора. Различия между лаппаконитином и аконитином будут обсуждаться в данной диссертации в разделе, посвященном влиянию заместителей на свойства алкалоидов-дитерпеноидов.

1.6 Фотофизические свойства и фотоиндуцированные превращения лаппаконитина и его производных

Кроме того, отрицательным свойством лаппаконитина, как лекарства является его неустойчивость под действием света. Так, в работах [36,48] было установлено, что непосредственно сам лаппаконитин подвергается фоторазложению с образованием короткоживущих парамагнитных интермедиатов – источников фототоксичности лекарства. Молекула лаппаконитина обладает бифункциональными свойствами: она содержит фрагмент антраниловой кислоты, выступающей в роли акцептора электрона, и аминогруппу в дитерпеновом фрагменте, обладающую электрон-донорными свойствами. Анализ эффектов ХПЯ показал, что распад происходит из триплетного состояния T_1 , а процесс начинается с внутри- или межмолекулярного обратимого переноса электрона, с последующим разрывом эфирной связи. Основными продуктами фотолиза являются четвертичная аммонийная соль 20-этил-1- α , 14- α , 16- β -триметоксиаконитан-4,8,9-триола (лаппаконин) и остаток замещенной антраниловой кислоты [53] (см. рисунок 14). Следует отметить, что метаболизм лаппаконитина также подробно исследовался [54] и в числе метаболитов присутствовали молекулы, структурно идентичные продуктам его фоторазложения.

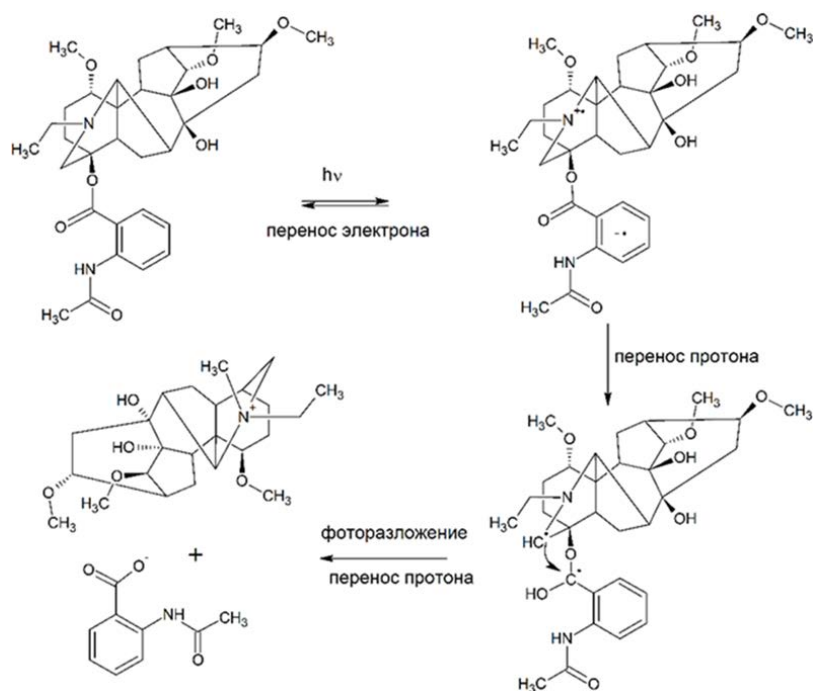


Рисунок 14. Механизм фоторазложения лаппаконитина [7].

Было также установлено большое влияние внутри- и межмолекулярных водородных связей на эффективность фоторазложения. Исследование фотореакции лаппаконитина в комплексе с глицирризиновой кислотой продемонстрировало существенное увеличение его фотостабильности [55]. Во-первых, внутримолекулярная водородная связь между амино- и карбонильной группой антранилового фрагмента лаппаконитина препятствует процессу деацилирования под воздействием УФ света. Во-вторых, значительно уменьшается эффективность внутримолекулярного переноса электрона между антраниловым фрагментом и аминогруппой дитерпеновой части. Это объясняется сохранением внутримолекулярной водородной связи в мицеллах глицирризиновой кислоты в условиях, когда отсутствует возможность конкуренции со стороны межмолекулярной водородной связи с растворителем. Существует точка зрения, что в этом случае вместо перехода в триплет с последующим переносом электрона происходит безызлучательная дезактивация синглетного возбужденного состояния. Подобное влияние водородных связей на фотофизические свойства было описано в литературе на примере родственных соединений – орто-аминоацетофенонов [56]. Кроме того, влияние заместителей, растворителя, температуры и давления на фотофизические свойства азотсодержащих гетероциклов и ароматических карбонильных соединений было описано в терминах электронных факторов для синглет-триплетного перехода. А

именно фотофизические свойства низшего возбужденного синглетного состояния $\pi\pi^*$ характера в основном определяются расположением $\pi\pi^*$ триплетного состояния относительно S_1 . Близкое расположение $\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$ синглетных состояний может вести к эффективной конверсии в основное состояние S_0 . Это явление (proximity effect) является результатом $\pi\pi^*$ - $\pi\pi^*$ колебательного взаимодействия, которое делает внеплоскостные колебания исключительно хорошими акцепторными модами для безызлучательного перехода [57]. Как было показано, для замещенных орто-аминоацетофенонов, внутримолекулярная водородная связь увеличивает эти колебательные взаимодействия и приводит к безызлучательной дезактивации. Влияние этих факторов связывают с изменением гибридизации атома азота в присутствии и отсутствии внутримолекулярной водородной связи [56]. Для того, чтобы проверить влияние растворителей на взаимодействие близко расположенных $\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$ синглетных состояний по аналогии с аминоацетофенонами, в работе [7] были проведены эксперименты по наблюдению эффектов ХПЯ при фотолизе лаппаконитина в водно-метанольных смесях с различным содержанием воды. Полученная зависимость эффектов ХПЯ от полярности растворителя отражает изменение концентрации бирадикал-цвиттериона, в котором эти эффекты формируются (см. рисунок 15).

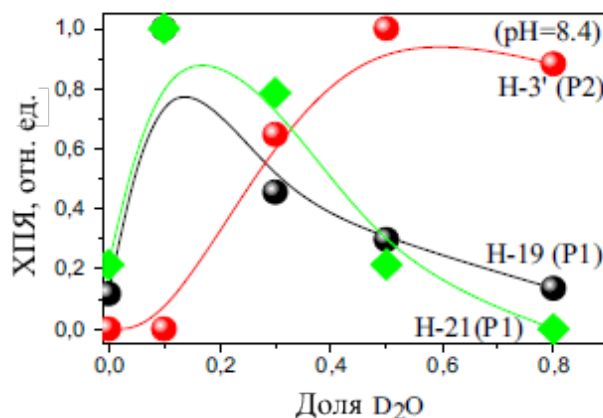


Рисунок 15. Зависимость эффектов ХПЯ, наблюдаемых при фотолизе 1 мМ лаппаконитина в различных водно-метанольных смесях. Красным обозначена поляризация ароматических протонов продукта деацилирования (P2); зеленым и черным обозначена поляризация протонов в продукте (P1), образованном в результате внутримолекулярного переноса электрона. Рисунок из работы [7].

В результате при увеличении концентрации воды (замена внутримолекулярной водородной связи на межмолекулярную) увеличивается эффективность процесса деацилирования. В то время как зависимость эффектов ХПЯ, сформированных в акте внутримолекулярного переноса электрона, имеет максимум. Начальный рост кривой, по-видимому, обусловлен заменой внутримолекулярной водородной связи на межмолекулярную. Последующий спад авторы связывают с процессом протонирования атома азота дитерпенового фрагмента, что, в свою очередь, уменьшает электрон-донорную способность этого азота и, следовательно, эффективность внутримолекулярного переноса электрона. Таким образом, качественно эта зависимость похожа на зависимость, обнаруженную для ортоаминоацетофенонов, так как отражает влияние полярности растворителя на соотношение процессов безызлучательной дезактивации и интеркомбинационной конверсии в триплетное возбужденное состояние.

Поскольку лаппаконитин относится к эфирам антраниловой кислоты, производные которой используются в качестве светофильтров и фотопротекторов [58], то было предположено, что на фотостабильность лаппаконитина можно воздействовать путем введения заместителей в различные части молекулы лекарства. Исследование ряда 20-дезэтил-лаппаконитинов методами ХПЯ и ЭПР показало, что снижение электрон-донорной способности аминного фрагмента значительно снижает эффективность внутримолекулярного переноса электрона и повышает фотостабильность препарата [59]. Дальнейшие исследования нового класса замещенных лаппаконитинов, полученных путем введения заместителей в антраниловый фрагмент, были проведены в работе [7]. Было показано, что введение заместителя в антраниловый фрагмент во всех случаях уменьшает степень фоторазложения относительно исходного лаппаконитина. Более того, разные эффекты ХПЯ были обнаружены для различных замещенных лаппаконитинов: часть производных демонстрирует эффекты ХПЯ, качественно схожие с таковыми для самого лаппаконитина, в то время как другая группа производных показала сильно отличающуюся картину ХПЯ. Так, основываясь на анализе эффектов ХПЯ, было предположено, что введение пиримидина и замещенного антрахинона в антраниловый фрагмент меняет механизм фоторазложения. В этом случае фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос электрона происходит с участием заместителей – акцепторов электрона. Кроме того, было изучено фотоиндуцированное взаимодействие ряда замещенных лаппаконитинов с аминокислотой N-ацетилтирозином. В этом случае

регистрируется перенос электрона, как и для незамещенного лапаконитина. При этом не наблюдалось образование продуктов фотодеструкции лапаконитина. Таким образом, было показано, что эффективность как внутримолекулярного, так и межмолекулярного переноса электрона уменьшается при введении заместителей в антраниловый фрагмент лапаконитина. Следовательно, уменьшается и степень фоторазложения производных лапаконитина, что объясняется способностью заместителей влиять на выход реакционноспособного триплетного состояния. В связи с этим была сформулирована гипотеза, согласно которой фотостабильность производных лапаконитина определяется фотофизическими характеристиками антранилового фрагмента, на которые можно воздействовать путем введения заместителей. Экспериментальная проверка этой гипотезы является одной из задач данной диссертационной работы.

1.7 Изучение методами фотохимии и спиновой химии парамагнитных форм энантиомеров лекарств на примерах фотоиндуцированных процессов в модельных связанных системах. Сравнение различий реакционной способности энантиомеров в составе модельных донорно-акцепторных систем с результатами биохимических исследований

Еще одним примером использования модельных систем для исследования механизмов действия лекарств являются хиральные системы. Хорошо известно, что энантиомеры хиральных лекарств – соединения, идентичные по физико-химическим свойствам, нередко обладают различной лечебной активностью [60]. Поскольку большинство хиральных лекарств выпускаются в виде рацемических смесей из-за дорогостоящих процедур разделения энантиомеров, причина данных различий представляет не только фундаментальный интерес, но и является актуальной проблемой медицины. Одним из ярких представителей лекарств, энантиомеры которого отличаются не только по силе, но и по направлению терапевтического действия, являются НПВП. Так, напроксен из класса 2-арилпропионовых кислот НПВП – один из немногих лекарственных препаратов, который выпускается исключительно в форме (S)-энантиомера. Считается, что (R)-энантиомер напроксена обладает высокой гепатотоксичностью [61]. Кроме того, (R)-напроксен не обладает противовоспалительной активностью, однако имеет терапевтическую активность в других направлениях [60, 62–63]. Механизм терапевтического действия НПВП заключается в ингибировании фермента

циклооксигеназы (ЦОГ 1 и 2), который участвует в окислении арахидоновой кислоты – предшественника простагландинов (медиаторов воспаления) [60, 62]. При этом (S)-профены связываются с ЦОГ 2 и демонстрируют противовоспалительную активность, тогда как (R)-профены оказывают анальгетический эффект, возникающий в результате ингибирования окисления эндоканнабиноидов [62]. Кроме того, производные НПВП в сочетании с коэнзимом А являются субстратами другого фермента – α -метилацил-КоА рацемазы (АМАСР), и могут существенно изменять активность данного фермента, участвующего в развитии различных типов опухолей [64]. При взаимодействии НПВП с АМАСР также происходит изменение оптической конфигурации энантиомеров (хиральная инверсия), и она более характерна для (R)-профенов. Процесс хиральной инверсии, как считается, конкурирует с канцерогенной активностью АМАСР, и это рассматривается как новый механизм противоопухолевой активности НПВП [64]. Кроме того, (R)-напроксен более активен в процессах метаболизма, в частности, под действием цитохрома Р450 [43]. Несмотря на многочисленные биохимические исследования, физико-химические причины различий в активности энантиомеров лекарств до сих пор не установлены. Пролить свет на эту проблему в последнее десятилетие помогли исследования элементарных взаимодействий с участием переноса заряда в модельных системах – диадах, которые включают энантиомеры напроксена, ковалентно связанные с хиральным донором электрона [11-16]. Данные связанные системы считаются моделями фермент-субстратного взаимодействия в рамках гипотезы, согласно которой различия между энантиомерами лекарств связаны с тем, что энантиомер в активном сайте фермента взаимодействует с другой хиральной частицей – остатком аминокислоты. Таким образом, фермент-субстратный комплекс можно представить как аналог диастереомера. Это важно, поскольку в диастереомере есть все физические предпосылки для различий в реакционной способности (R,S) и (S,S) конфигураций, например, в акте внутримолекулярного переноса электрона. Поэтому связанные системы, содержащие два хиральных центра, используются в качестве моделей для изучения различий в реакционной способности (S) и (R)-напроксена.

Впервые диады были предложены для исследования свойств энантиомеров хиральных лекарств в составе диастереомеров испанским профессором М. Мирандой с соавт. [65]. Затем в совместной работе с российскими учеными был синтезирован ряд диастереомеров, включающих энантиомеры напроксена, связанные с донором электрона

N-метилпирролидином различными мостиками, что позволило исследовать влияние расстояния и взаимного пространственного расположения донора и акцептора на процесс фотоиндуцированного переноса заряда [11-16]. Благодаря сочетанию методик времяразрешенной флуоресцентной спектроскопии и спиновой химии (ХПЯ), российским авторам удалось обнаружить состояния с частичным и полным переносом заряда, а также установить полную схему фотоиндуцированных взаимодействий в диадах напроксен-N-метилпирролидин.

Стоит отметить, что во всех системах хромофором являлся напроксен, у которого полосы поглощения относятся к $\pi\pi^*$ переходам, при этом оптическая конфигурация не влияет на спектральное распределение и коэффициенты молярного поглощения равны для каждой пары диастереомеров (рисунок 16).

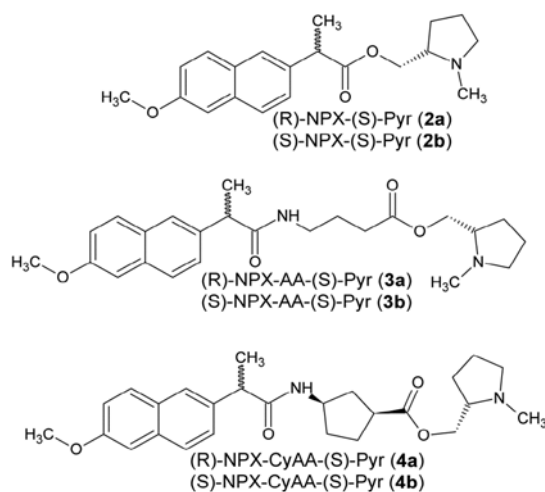


Рисунок 16. Структуры связанных систем с (R)/(S)-напроксом и (S)-N-метилпирролидином, изученных в работах [11-16].

Наиболее подходящим методом для регистрации переноса электрона в данных системах оказался метод ХПЯ. Стоит отметить, что ^1H ЯМР спектры (R,S)- и (S,S)-диастереомеров отличаются только химическими сдвигами N-CH₃ протонов. Эффекты ХПЯ наблюдались только на метильных, метиленовых и метиновых протонах пирролидинового фрагмента, что не противоречит предположению об образовании бирадикал-цвиттериона с положительным зарядом на пирролидине и отрицательным на напроксене. Действительно, в этом случае следует ожидать максимальной поляризации на ядрах с максимальными константами СТВ, в данном случае, на N-центрированном катион-радикале пирролидина. Анализ данных эффектов по правилам Каптейна,

модифицированных Клоссом [51], приводит к выводу, что синглетное возбужденное состояние диад тушится вследствие внутримолекулярного переноса электрона. При этом рекомбинирующим состоянием является бирадикал-цвиттерион в синглетном спиновом состоянии.

Известно, что эффективность процесса переноса электрона зависит от полярности среды: так, в высокополярных средах он более эффективен, в то время как в слабополярных средах более вероятно образование эксиплекса – состояния с частичным переносом заряда [66]. В связи с этим в работах [11-16] эффекты ХПЯ были изучены в средах с различной полярностью (рисунок 17).

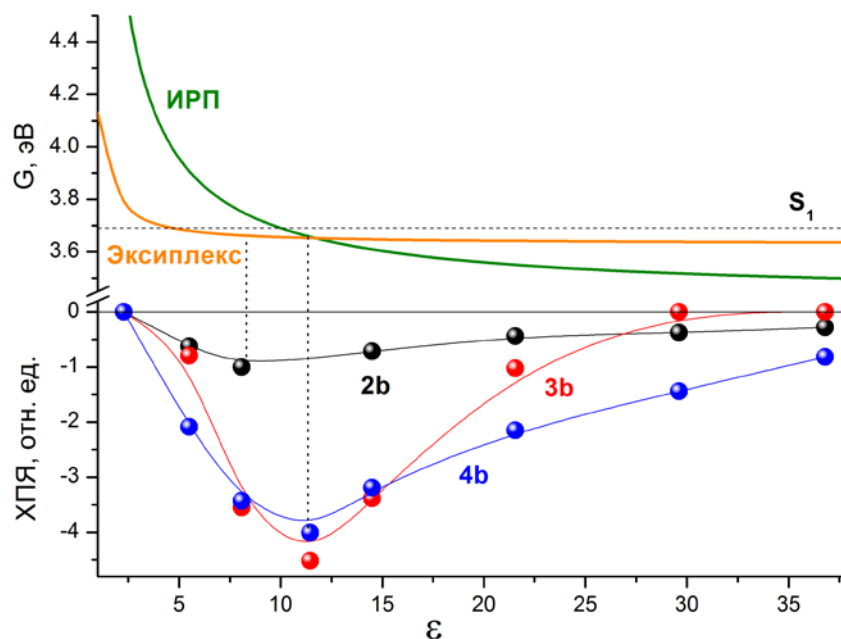


Рисунок 17. Рассчитанная в рамках критерия Рэма-Веллера-Захариаса [52] зависимость свободной энергии ион-радикальной пары катион-радикала N-метилпирролидина и анион-радикала метоксинафталина от полярности растворителя, вверху. Зависимость эффектов ХПЯ от полярности растворителя для диад 2-4, внизу [16].

Полученная экспериментальная зависимость представляет кривую с экстремумом, в то время как расчет предсказывает гладкую кривую. Данная форма зависимости указывает на формирование ХПЯ в нескольких процессах, вклад которых меняется в зависимости от полярности среды и структуры диады. Авторы приходят к выводу, что наблюдаемая поляризация формируется в результате обратного переноса электрона из двух спиновых состояний бирадикал-цвиттериона – синглетного и триплетного, однако превалирует вклад в наблюдаемую ХПЯ синглетного состояния. Авторы считают, что это

связано с образованием синглетного эксиплекса. Таким образом, основываясь на анализе эффектов ХПЯ, был представлен детальный механизм тушения синглетного возбужденного состояния напроксена N-метилпирролидином (см. рисунок 18).

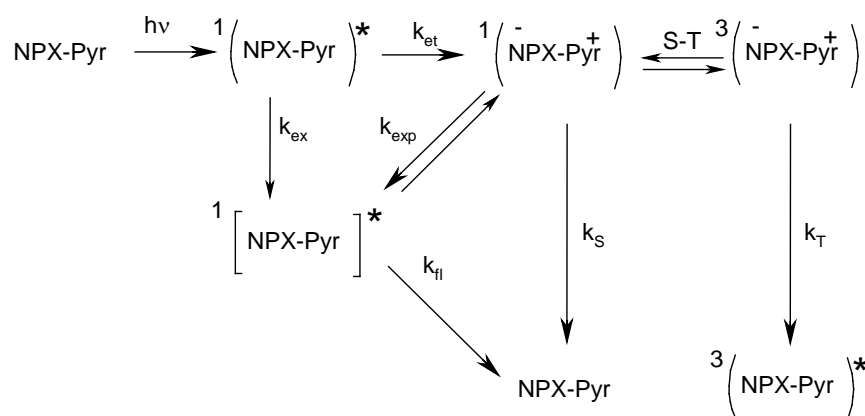


Рисунок 18. Механизм тушения синглетного возбужденного состояния напроксена в диадах [16].

Исследования тушения флуоресценции диад подтвердили предположение об образовании эксиплекса. Спектры флуоресценции диад по сравнению с исходным напроксом имеют две полосы эмиссии с максимумами на 350 нм и 520 нм, последняя, как было установлено, принадлежит эксиплексу. Уменьшение интенсивности полосы флуоресценции в диадах, по сравнению с исходным напроксом, связано с тушением хромофора за счет переноса электрона. Кроме того, время жизни флуоресценции диад порядка 2-3 нс, в то время как для исходного напроксена 12.8 нс. Экспериментальный спад кривых локально возбужденного состояния (ЛВ) и эксиплекса описывается биэкспоненциальной моделью. Например, для диады 2а в ацетонитриле характерны короткое (2.7 нс) и длинное (11.2 нс) время жизни ЛВ состояния и время роста (2.35 нс) и спада (8.2 нс) эксиплекса. Спектры флуоресценции и кинетики ее тушения были исследованы в растворителях с различной полярностью (см. рисунок 19).

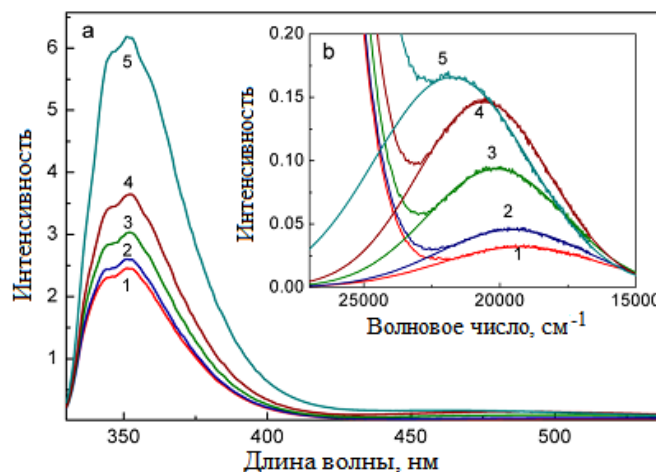


Рисунок 19. а) спектры флуоресценции диады 2b в смесях ацетонитрил/бензол (% объемная доля) 1) 100% CH₃CN ($\epsilon=36.8$), 2) 80% CH₃CN ($\epsilon=29.6$), 3) 60% CH₃CN ($\epsilon=21.6$), 4) 40% CH₃CN ($\epsilon=14.5$), 5) 20% CH₃CN ($\epsilon=8.1$); б) Полоса эксиплекса [16].

Как видно из рисунка 19, интенсивность и квантовый выход флуоресценции ЛВ состояния и эксиплекса растут с уменьшением полярности растворителя. Исходя из результатов фитирования кинетик флуоресценции ЛВ и эксиплекса в средах различной полярности в рамках вышеприведенной схемы, авторы работы [13] пришли к выводу, что существует два быстрых равновесия: «эксиплекс – ЛВ» и «эксиплекс – бирадикал-циттерийон». Авторы рассчитали кинетику флуоресценции ЛВ состояния и эксиплекса и сравнили с экспериментальными данными. Анализ зависимостей квантовых выходов флуоресценции эксиплекса от полярности растворителя подтвердил выводы, сделанные на основе данных ХПЯ о тушении возбужденного состояния диады посредством переноса электрона. Более того, была обнаружена значительная стереодифференциация времен жизни и квантовых выходов флуоресценции ЛВ и эксиплекса для диастеромеров. Дальнейшие исследования были посвящены изучению диад напроксена, связанных с N-метилпирролидином гибким (3) и жестким (4) мостиками. При этом квантовый выход флуоресценции ЛВ состояния выше для диады с гибким мостиком (3), в то время как квантовый выход флуоресценции эксиплекса выше для диады 4. Зависимость времен жизни флуоресценции от полярности растворителя представлена на рисунке 20.

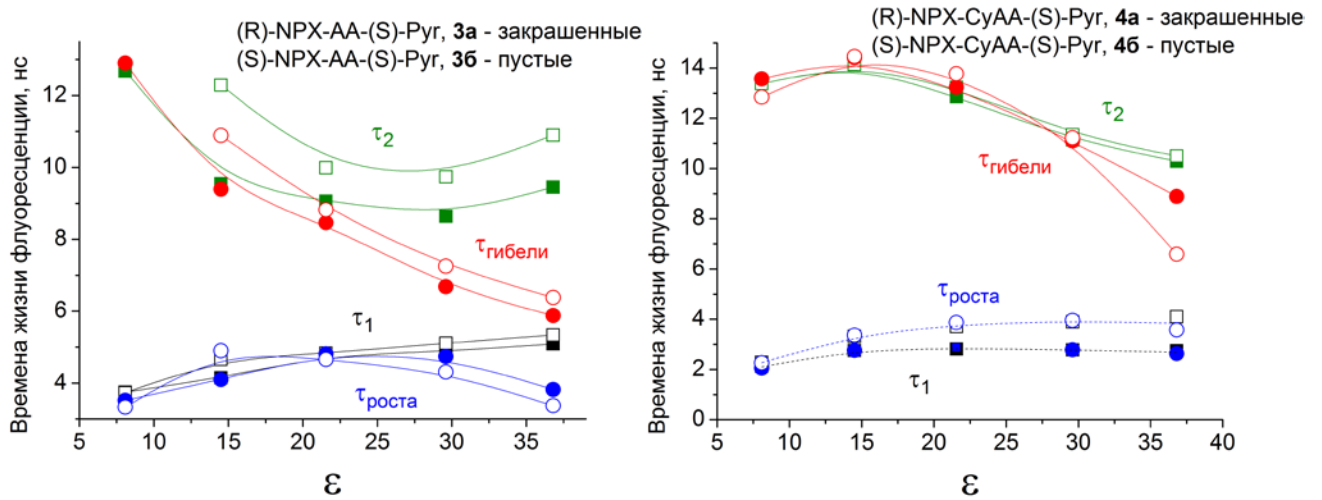


Рисунок 20. Зависимость времен жизни флуоресценции ЛВ состояния для диады 3 (слева) и 4 (справа) – квадраты, эксиплекса – круги, окрашенные – (R,S), пустые – (S,S) [16].

Симбатные изменения $\tau_{гибели}$ и τ_2 , а также $\tau_{роста}$ и τ_1 подразумевает взаимосвязь между процессами образования и гибели ЛВ состояния и эксиплекса (рисунок 20). Ввиду этого в работе [15] была предложена суммарная схема тушения хромофора напроксена донорами электрона (рисунок 21).

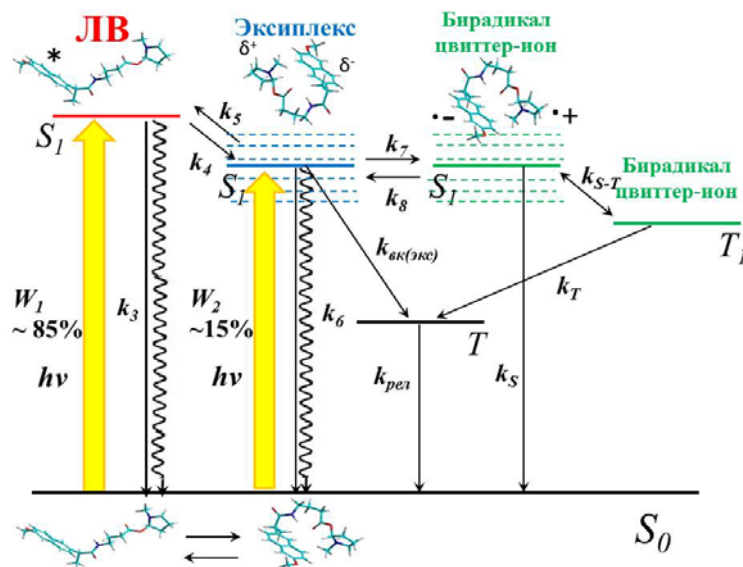


Рисунок 21. Механизм тушения возбужденного состояния напроксена в диадах 3 и 4. Пунктиром обозначена зависимость энергетических уровней эксиплекса и бирадикал-цвиттериона от полярности растворителя [15].

На данной схеме две различные конформации – развернутая и скрученная – переходят в ЛВ состояние и эксиплекса через пути W_1 и W_2 . Предположение о существовании двух конформаций связано с результатами аппроксимации

экспериментальных кинетических кривых: получить хорошее совпадение оказалось возможным только с учетом включения двух путей образования эксиплекса. Согласно схеме на рисунке 21, эксиплекс находится в динамическом равновесии с ЛВ (k_4 , k_5) и бирадикал-цвиттерионом (k_7 , k_8). Бирадикал-цвиттерион, в свою очередь, может находиться в синглетном или триплетном спиновом состояниях, которые имеют одинаковую энергию. Спиновая конверсия (k_{S-T}) происходит под действием магнитных взаимодействий в бирадикал-цвиттерионе. Обратный перенос электрона из обоих спиновых состояний бирадикал-цвиттериона приводит к образованию исходной диады в основном состоянии (k_S) и в триплетно-возбужденном состоянии (k_T). Эмиссия ЛВ и эксиплекса определяется константами скорости k_3 и k_6 . Эксиплекс также подвергается внутренней конверсии с константой скорости $k_{isc(exc)}$.

Кинетика гибели флуоресценции в работе [15] была проанализирована путем решения системы дифференциальных уравнений методом Рунге-Кутты, что позволило получить значения констант k_3 - k_7 . Примечательно то, что наблюдались различия в константах скоростей диастереомеров, в частности k_4 и k_7 , связанных с процессом переноса заряда. Наибольшие различия, наблюдаемые в полярных растворителях, характерны для величин констант k_7 (переход эксиплекса в бирадикал-цвиттерион). Константа k_4 (переход из ЛВ в эксиплекс) оказалась выше для (R,S)-диастереомеров для всех изученных диад (рисунок 22).

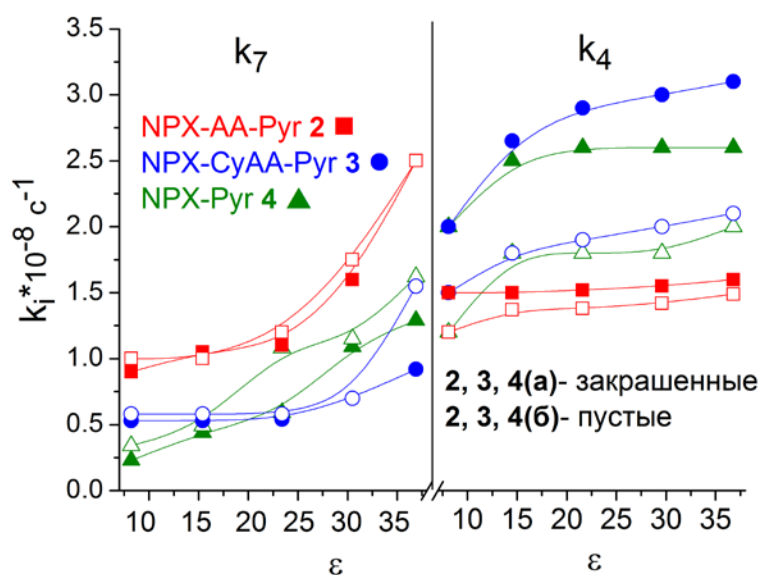


Рисунок 22. Зависимость констант скоростей k_4 , k_7 от полярности растворителя для диастереомеров диад 2-4 [15].

Основываясь на анализе квантовых выходов флуоресценции и констант скорости, авторы [15] пришли к следующим заключениям. Во-первых, диады с (R)-напроксеном более способны к переносу заряда, поскольку у них выше константы скорости образования и квантовые выходы флуоресценции эксиплекса, чем у диад с (S)-напроксеном. Во-вторых, в диадах с (S)-напроксеном эксиплекс образуется медленнее и распадается быстрее, о чем свидетельствуют более низкие квантовые выходы эксиплекса и более высокие квантовые выходы флуоресценции локально возбужденного состояния. В-третьих, стереодифференциация процессов с переносом заряда зависит от длины и структуры мостика, соединяющего донор и акцептор. Наибольшая стереодифференциация наблюдалась для диады с «коротким» мостиком, наименьшие эффекты были обнаружены для диады с «гибким» мостиком.

Совместное использование методик ХПЯ и оптической спектроскопии при изучении фотоиндуцированных взаимодействий энантиомеров напроксена с донором электрона в связанных системах позволило авторам проследить все короткоживущие интермедиаты – ЛВ состояние, эксиплекс и бирадикал-цвиттерион. При этом квантовые выходы и времена жизни флуоресценции данных интермедиатов зависят также от диэлектрической проницаемости среды. Следует отметить, что благодаря анализу эффектов ХПЯ авторам удалось выяснить химическую природу этой зависимости. В работе [15] был проделан также расчет зависимости эффективности ХПЯ от полярности растворителя, представленный на рисунке 23. Рассчитанные кривые согласуются с экспериментальными данными. Данный результат важен, поскольку он дает дополнительное подтверждение предложенного ранее механизма тушения напроксена на основе анализа кинетики тушения флуоресценции.

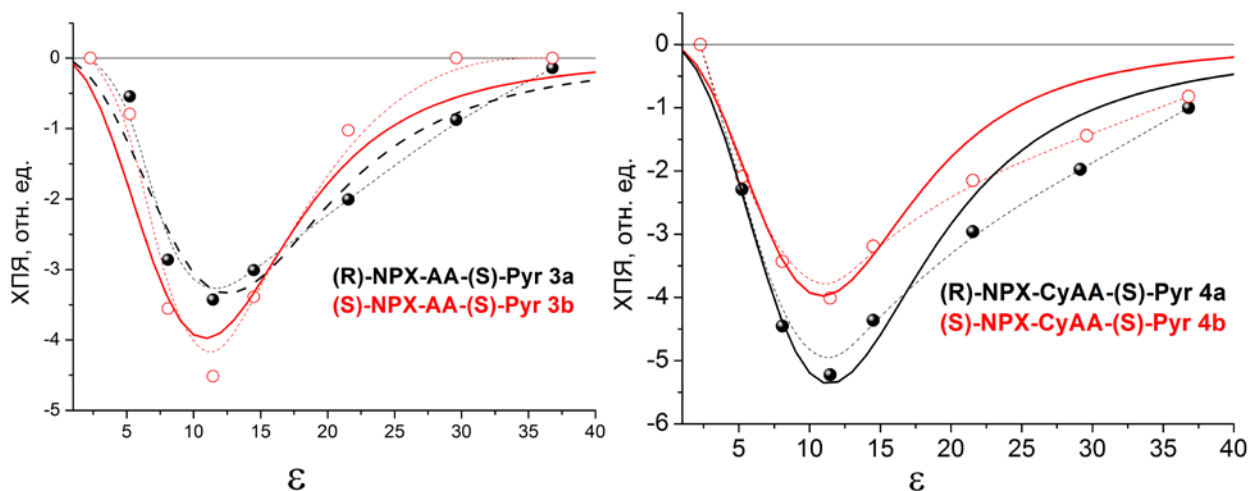


Рисунок 23. Зависимость эффектов ХПЯ от полярности растворителя для диады 3 (слева) и 4 (справа). Сплошные линии – результаты расчетов с использованием основного уравнения спиновой химии [15].

Результаты исследования модельных систем – диад 2-4 показали, что (R,S)-диастереомеры имеют большие квантовые выходы эксиплекса и константы скорости k_4 по сравнению с (S,S) аналогами. Это позволяет предполагать, что (R)-напроксен более склонен к процессам с участием переноса электрона. Действительно, по данным биохимических исследований (R)-напроксен более активен в процессах хирального метаболизма под действием цитохрома P450, который, как известно, включает стадии с переносом электрона. Вместе с тем (R)-напроксен продемонстрировал гораздо большую активность в хиральной инверсии тиоэфиров напроксен-Ко-А, которая индуцируется некоторыми ферментами (AMACR и др.). Что касается (S)-изомера, считается, что он является обратимым ингибитором фермента ЦОГ 2. В рамках разработанной модели большой квантовый выход ЛВ для (S,S)-диастереомеров может указывать на большую обратимость связывания. Кроме того, исследование стереодифференциации в диадах 2-4 показало зависимость данного эффекта от длины мостика. Максимальная близость донора и акцептора в диаде 2 приводит к наибольшей разнице в квантовых выходах флуоресценции (R,S) и (S,S)-диастереомеров. Это позволило авторам предположить, что различия в активности энантиомеров могут зависеть от пространственного расположения молекулы лекарства и аминокислотных остатков.

Таким образом, можно сделать вывод, что сочетание методик флуоресцентной спектроскопии и спиновой химии оказалось весьма продуктивным для исследования

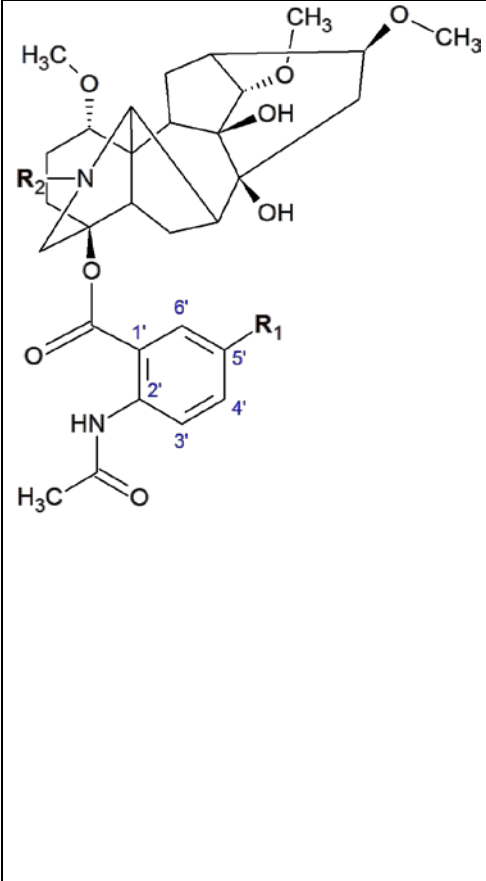
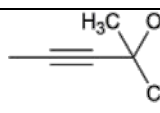
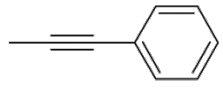
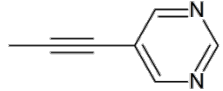
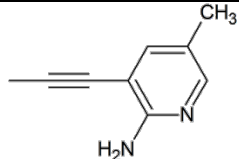
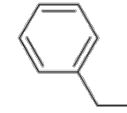
различия в свойствах энантиомеров, находящихся в составе диастереомеров, и может быть использовано при исследовании других хиральных систем.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Материалы и реактивы

Лаппаконитин, выделенный из экстракта корней аконита, был предоставлен Степановым А. А. из Группы спин-меченых ацетиленовых соединений ИХКГ СО РАН, также Степановым А. А. были синтезированы производные лаппаконитина, имеющие заместители в антраниловом фрагменте: соединения ЛК1-4 (см. таблицу 1): 4β-{2-Ацетиламино-5-[(5-гидрокси-5-метилгекса-1,3-диинил]бензоилокси}-1α,14α,16β-триметокси-20-этилаконитан-8,9-диол (ЛК1); 4β-[2-(N-ацетиламино) -5-(фенилэтинил)бензоилокси]-1α, 14α, 16β-триметокси-20-этилаконитан-8,9-диол (ЛК2); 4β-{2-(N-ацетиламино) -5-[(5-пиримидил)этинил]бензоилокси}-1α, 14α, 16β-триметокси-20-этилаконитан-8,9-диол (ЛК3); 4β-{2-Ацетиламино-5-[(2-амино-5-метилпиридил-3-ил)этинил]бензоилокси}-1α,14α,16β-триметокси-20-этилаконитан-8,9-диол (ЛК4) (чистота веществ определялась по температурам плавления соединений, элементному анализу и спектрам ¹H и ¹³C ЯМР), метиловый эфир напроксена, N-ацетилтриптофан и диада NPX-Trp (N-[2-(R, S)-2-(2-метоксинафталин-6-ил)пропаноил]-(S)-триптофан метиловый эфир)(чистота была определена при помощи ВЭЖХ). Диада NPX-СуАА-Pyr – [1R, 3S]-([S]-1-метилпирролидин-2-ил) метил 3-([R, S]-2-(6-метокинафталин-2-ил)пропанамид) циклопентанкарбоксилат была синтезирована в группе испанских учёных под руководством Миранды М. А. и любезно предоставлена для исследования (проверка чистоты осуществлялась при помощи ВЭЖХ). Производные лаппаконитина, содержащие заместители в дитерпеновом фрагменте (соединения ЛК5-6) – 4β-(2-ацетиламинобензоилокси)-1α, 14α, 16β-триметокси-аконитан-8,9-диол и 4β-(2-ацетиламинобензоилокси)-1α, 14α, 16β-триметокси-20-бензилаконитан-8,9-диол были синтезированы Панкрушиной Н. А. из Лаборатории терпеновых соединений НИОХ СО РАН (чистота проверялась по температуре плавления, данным масс-спектрометрии, ИК, УФ и ¹H и ¹³C ЯМР), метиловый эфир антраниловой кислоты был предоставлен Лузиной О. А. из Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН. Структуры изучаемых соединений представлены в таблице 1 и на рисунке 24 ниже.

Таблица 1. Структуры лаппаконитина и его производных, полученных путем введения заместителей в 5'-положение антранилового фрагмента и 20-N дитерпенового фрагмента.

	Заместители		Обозначение
	R ₁	R ₂	
	-H	-CH ₂ CH ₃	ЛК
		-CH ₂ CH ₃	ЛК1
		-CH ₂ CH ₃	ЛК2
		-CH ₂ CH ₃	ЛК3
		-CH ₂ CH ₃	ЛК4
	-H	-H	ЛК5
	-H		ЛК6

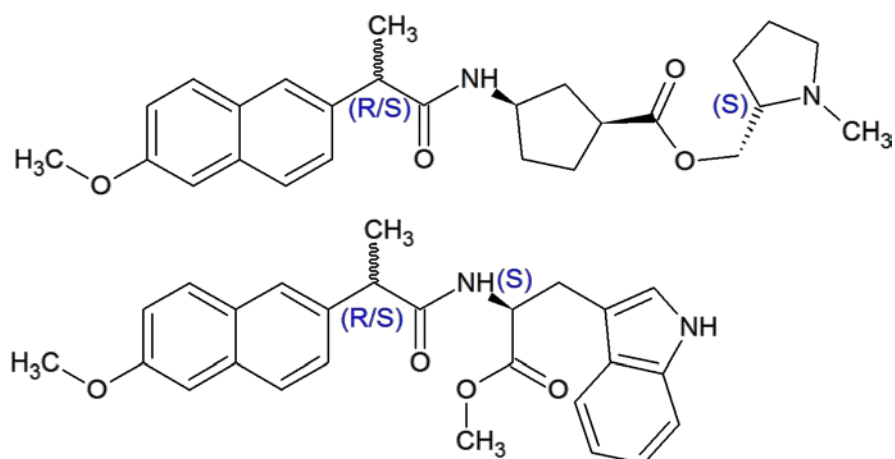


Рисунок 24. Структуры исследуемых диад (R)/(S)-NPX-CuAA-(S)-Pyr (вверху) и (R)/(S)-NPX-(S)-Trp (внизу).

Растворители для оптических экспериментов использовались без предварительной очистки: ацетонитрил «Криохром» (сорт 0, УФ поглощение на 200 нм 0,1/см), бензол и

метанол (Союзхимпром, химически чистые). Для записи спектров ЯМР и исследования ХПЯ диад использовались дейтероацетонитрил (D 99,8%) и дейтеробензол (D 99,5%) фирмы Aldrich. Для ЯМР экспериментов производных лаппаконитина использовался дейтерометанол (D 99,8%).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Метод Химической Поляризации Ядер (ХПЯ) в квазистационарном и времяразрешенном вариантах, приготовление растворов

ЯМР спектры регистрировались на спектрометрах Bruker AVHD 500 (магнитное поле 11.74 Тл, резонансная частота 500 МГц для ^1H , $\tau(90^\circ)=11,2$ мкс) и Bruker DPX 200 (магнитное поле 4.7 Тл, резонансная частота 200 МГц для ^1H , $\tau(90^\circ)=3,3$ мкс), который оборудован фотохимическим датчиком. Блок-схема экспериментальной установки представлена на рисунке 25.

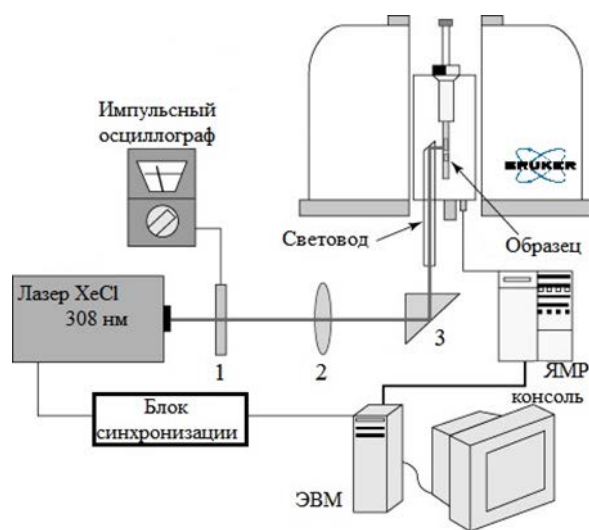


Рисунок 25. Блок-схема ЯМР спектрометра, приспособленного для фотохимических исследований [16].

1 – измеритель мощности, 2 – длиннофокусная собирающая линза, 3 – призма

В качестве источника света использовался эксимерный лазер Lambda-Physik EMG 101 (рабочая смесь ХеС1, $\lambda_{\text{возб}} = 308$ нм, подводимая к образцу энергия 20 мДж, длительность импульса 15 нс). УФ-импульс лазера и регистрирующий радиочастотный (РЧ) импульс ЯМР спектрометра синхронизованы по времени. Лазерный луч собирается длиннофокусной линзой, после чего отражается призмой в световод, по которому свет

проходит непосредственно в датчик спектрометра, где находится ампула с исследуемым образцом. Все оптические элементы, а также ЯМР ампула изготовлены из кварца, поскольку длина волны излучения лежит в УФ области, где кварц поглощает мало. Излучение попадает лишь в локальную область ампулы с образцом, подводимая энергия к образцу составляет примерно 20 мДж (этого достаточно для инициирования фотореакции).

Для измерения спектров ХПЯ использовались импульсные последовательности, позволяющие проводить эксперименты как с временным разрешением [56], так и в квазистационарных условиях [67]. Диаграмма времяразрешенного эксперимента приведена на рисунке 26, а квазистационарного на рисунке 27. Максимальное временное разрешение метода определяется длительностью детектирующего РЧ импульса (~ 1 мкс).

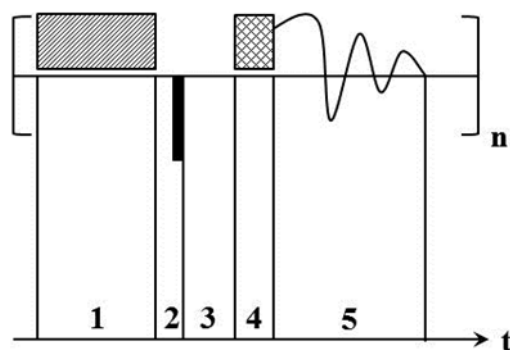


Рисунок 26. Временная диаграмма времяразрешенной импульсной последовательности [16].

- 1 – импульс неселективного преднасыщения равновесных сигналов (предназначен для подавления равновесного сигнала исходных соединений);
- 2 – лазерный импульс, инициирующий фотохимическую реакцию (15 нс);
- 3 – варьируемая временная задержка (0–500 мкс), задаваемая с шагом 50 нс;
- 4 – РЧ импульс регистрации длительностью 2–4 мкс;
- 5 – регистрируемый спад свободной индукции

Применение неселективного преднасыщения равновесной намагниченности дает возможность наблюдать только поляризованные сигналы и избавиться от сигналов исходных соединений в поляризованных спектрах. Варьирование задержки от лазерного импульса до РЧ импульса регистрации при используемом временном разрешении дает возможность надежно разделить вклады от первичных радикальных пар (нулевая задержка) и процессов в объеме (~ 50 мкс).

В том случае, когда интенсивность поляризации недостаточна для проведения время-разрешенных экспериментов, можно также применять квазистационарный вариант (рисунок 27).

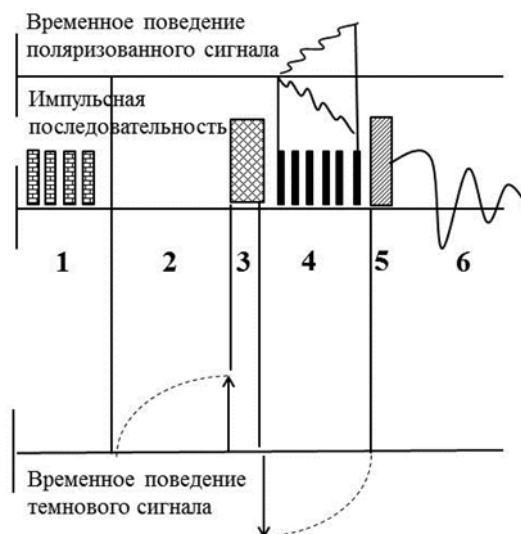


Рисунок 27. Временная диаграмма квазистационарной импульсной последовательности [16].

- 1 – процедура преднасыщения, аналогичная время-разрешенному эксперименту;
- 2 – временная задержка T ($2,56 \text{ с}$) $< T_1$ ($3\text{-}50 \text{ с}$, характерное время релаксации ядер диамагнитных соединений);
- 3 – 180-радиочастотный импульс;
- 4 – 32 импульса лазера с задержкой между ними t ($0,08 \text{ с}$), общей продолжительностью T ($2,56 \text{ с}$);
- 5 – регистрирующий радиочастотный импульс;
- 6 – регистрируемый спад свободной индукции

Преимущество квазистационарного эксперимента перед времяразрешенным в том, что он существенно повышает отношение «сигнал-шум». Временные задержки T и t на рисунке 27 подбираются таким образом, чтобы $T=32 \times t$, что необходимо для того, чтобы импульсы лазера не попадали более одного раза в одну и ту же область вращающегося образца, также это позволяет минимизировать темновой сигнал. Однако полностью исключить темновые сигналы удастся не всегда. Поэтому дополнительно записывался спектр по такой же квазистационарной схеме эксперимента, но без засветки лазером, этот темновой спектр затем вычитался из спектра ХПЯ, таким образом, получался спектр с только поляризованными сигналами. Для контроля фотостабильности исходного образца после ХПЯ экспериментов всегда записывался ЯМР спектр облученного образца.

Для изучения ХПЯ диад были приготовлены рабочие растворы с концентрацией 5×10^{-3} М в растворителях дейтероацетонитрил ($\epsilon = 37,5$) и дейтеробензол ($\epsilon = 2,28$) и их смесях. Для изучения эффектов ХПЯ в зависимости от полярности среды сток-растворы с одинаковой концентрацией диад смешивались в разных объёмных соотношениях. Для удаления кислорода растворы барботировали аргоном в течение 15 минут. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Эксперименты по измерению наблюдаемых коэффициентов ХПЯ для диастереомеров диад проводились следующим образом: для диады NPX-СуАА-Руг были приготовлены несколько образцов, содержащих смесь (R,S)- и (S,S)-диастереомеров в разных концентрационных соотношениях (устанавливались по интегральной интенсивности выбранных сигналов N-CH₃ группы в ¹H ЯМР спектре). Затем записывался поляризованный спектр, в котором измерялась интегральная интенсивность этих же сигналов. Для диады NPX-Трр проводили аналогичные измерения, с той разницей, что интегральные интенсивности ароматических протонов «напроксенового» фрагмента для (R,S)- и (S,S)-диастереомеров под светом и в темноте измерялись в разных экспериментах (поскольку для них не отличались химические сдвиги измеряемых протонов). Значения наблюдаемых коэффициентов в этом случае были получены путем усреднения результатов, измеренных для ряда образцов. Коэффициент усиления ХПЯ равен отношению интегральных интенсивностей поляризованного сигнала и равновесного в ЯМР спектре, деленному на концентрацию бирадикал-цвиттериона. Оценка концентрации бирадикал-цвиттериона диады NPX-Трр проводилась с учетом поглощаемой хромофором энергии, объема облученного образца и квантового выхода бирадикал-цвиттериона (φ_{BZ}), полученного из данных по тушению флуоресценции диад:

$$\varphi_{BZ} = k_{ET} \times \tau_{fl} = (1 - \varphi_{fl}), \quad (1)$$

где k_{ET} – константа скорости переноса электрона (c^{-1}), τ_{fl} – время жизни флуоресценции (с), φ_{fl} – квантовый выход флуоресценции. Тогда

$$[BZ] = (1 - 10^{-\epsilon Cl}) \frac{\lambda E \varphi_{BZ}}{hc N_A V}, \quad (2)$$

где ϵ – коэффициент молярного поглощения диады на длине волны $\lambda = 308$ нм ($M^{-1} \times cm^{-1}$), C – концентрация диады (М), l – длина оптического пути (см), λ – длина волны лазерного света (нм), E – энергия лазерного импульса (Дж), V – объем облученного образца (л), N_A – число Авогадро (моль⁻¹), h – константа Планка (Дж \times с), c – скорость света (м \times с⁻¹).

В случае диады NPX-СуАА-Руг квантовый выход бирадикал-цвиттериона принимался равным квантовому выходу эксиплекса [15].

В дальнейшем проводился анализ отношения коэффициентов усиления ХПЯ диастереомеров, равного

$$K = \frac{I_{pol}^{RS} I_{eq}^{SS} [BZ]_{SS}}{I_{eq}^{RS} I_{pol}^{SS} [BZ]_{RS}}, \quad (3)$$

где I_{pol} – интенсивность поляризованных сигналов ароматических протонов в положении 8' нафталинового кольца диады NPX-Trp или CH_3 – протонов N-метилпирролидинового фрагмента диады NPX-СуАА-Руг, I_{eq} – интенсивность равновесных сигналов тех же протонов. Доля облучённого образца, аппаратное усиление и количество накоплений во всех экспериментах были одинаковыми.

2.2.2 Оптические методы: спектрофотометрия, флуоресценция (стационарная и времяразрешенная), стационарный фотолиз

Флуоресценция

Измерение спектров и кинетики флуоресценции проводились на спектрофлуориметре FLS920 фирмы Edinburgh Instruments с высокой чувствительностью и высоким спектральным разрешением. Спектрофлуориметр включает в себя: ксеноновую дуговую лампу CW450Вт; монохроматоры возбуждения и регистрации с компьютерным управлением и регулировкой щели со спектральным разрешением до 0,06 нм; фотоумножитель на микроканальной пластине с холодильниками Пельтье. Конструкция спектрофлуориметра позволяет существенно подавить рассеянный свет.

При регистрации кинетики люминесценции использовался лазерный диод EPLED, излучающих на длине волны 300 нм с длительностью импульса 0.6–0.75 нс (спектральная ширина импульса ~5 нм) и диодный лазер EPL-375 (излучение на 375 нм, длительность импульса 60 пс). Регистрация светового импульса, рассеянного матовым кварцевым стеклом, позволяет определять аппаратную функцию (АФ) регистрирующей системы. Обработка кинетических кривых (программы фирмы Edinburg Instruments – DATA PROCESSING и FAST) совместно с АФ за счет математической свертки позволяет определять времена фотофизических процессов с разрешением около 20 пс (при

использовании лазера EPL-375) и 100 пс (при облучении образцов лазерными диодами EPLED). Блок-схема установки представлена на рисунке 28.

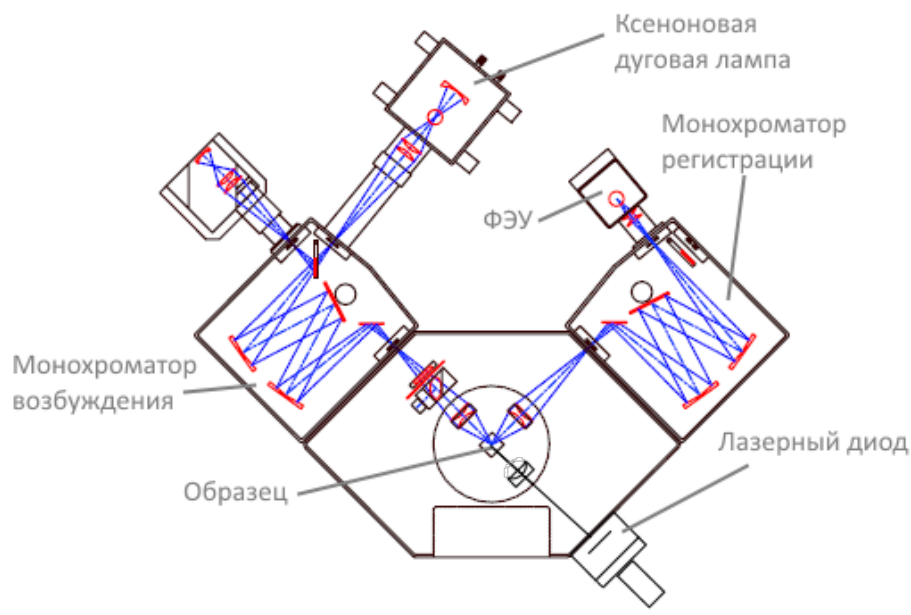


Рисунок 28. Блок-схема спектрофлуориметра FLS920 Edinburgh Instruments.

Для регистрации спектров флуоресценции в метаноле были приготовлены растворы 3×10^{-5} М лапаконитина и его производных, 10^{-4} М метилового эфира антраниловой кислоты. Для удаления кислорода из растворов их барботировали аргоном в течение 30 мин. При регистрации спектров флуоресценции ширина щели монохроматора составляла 1 нм, длины волн возбуждения представлены в таблице 2.

Таблица 2. Условия эксперимента при регистрации спектров и кинетик флуоресценции.

Вещество	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{набл}}$, нм	ϵ_{308} , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Метилловый эфир антраниловой кислоты (МА)	300	410	2100±100
NPX-Trp	300	350	870±20
NPXOMe	300	350	850±10
N-AcTrp	280	330	65±5
Лаппаконитин (ЛК)	300	400	3900±100
Производные лаппаконитина			
ЛК1	300	390	1900±200
ЛК2	300	400	36000±1000
ЛК3	300	390	13700±700
ЛК4	300	440	6400±300
ЛК5	300	375	3900±200
ЛК6	300	370	3900±200

При регистрации кинетик флуоресценции ширина щели монохроматора составляла 20 нм, а время измерения – 50 нс, длины волн наблюдения – максимумы эмиссии (указаны в таблице). Для исследования спектров флуоресценции диады были приготовлены растворы с концентрацией 2×10^{-4} М (такая концентрация выбиралась для того, чтобы оптическая плотность поглощающего вещества на длине волны возбуждения составляла $D \sim 0,1$) в различных растворителях: ацетонитрил ($\epsilon = 36,8$ [68]) и бензол ($\epsilon = 2,28$ [69]). Для получения зависимостей квантового выхода и времен жизни флуоресценции от полярности, рабочие растворы с равными концентрациями смешивались в разных объемных пропорциях, значение диэлектрической проницаемости среды для смеси при температуре 20°C известны из литературы [70]. Все измерения проводились в кювете для анаэробных исследований при комнатной температуре.

Оптическая чистота растворителя и оптическая плотность вещества в ходе эксперимента контролировалась с помощью спектрофотометра Agilent8453. Коэффициенты молярного поглощения для диастереомеров диад, а также лаппаконитина, были измерены по четырём точкам.

Квантовые выходы флуоресценции рассчитывались согласно стандартной методике [71]. Согласно этой методике, квантовый выход рассчитывается относительно

известного стандарта, структурно похожего на исследуемое соединение (в случае диад – NPX с $\varphi_{NPX} = 0,47$ [72], в случае лапаконитина и его производных – антрацен с $\varphi = 0.27$ [73]) по формуле (4):

$$\varphi = \frac{A_{ст} F n^2}{A F_{ст} n_{ст}^2} \varphi_{ст}, \quad (4)$$

где φ – квантовый выход флуоресценции, A – поглощение вещества на длине волны возбуждения флуоресценции (300 нм), F – площадь под спектром флуоресценции, n – показатель преломления растворителя; индекс *ст* соответствует величинам, соответствующим стандарту. Данная методика позволяет учитывать разные растворители, небольшую разницу в концентрациях стандарта и исследуемого соединения.

Стационарный фотолиз

В стационарных экспериментах в качестве источника ультрафиолетового излучения использовалась ХеСl эксимерная разрядная лампа (максимум излучения 308 нм) производства Института сильноточной электроники СО РАН (Томск, Россия) с полушириной светового импульса 5 нм, длительностью импульса 1 мкс, частотой 200 кГц и полным световым потоком 8×10^{15} фотонов / (см²×с) [74].

Оптическая плотность регистрировались с использованием спектрофотометра Varian Cary 50 (Varian Inc.). Для удаления кислорода образцы барботировались аргоном в течение 30 минут. Запись оптических спектров поглощения проводилась в кювете для анаэробных исследований с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

Для измерения интенсивности излучения при расчетах квантовых выходов использовался измеритель мощности света SOLO 2 (Gentec, Канада) с фотодиодной головкой PH100-SiUV.

Расчет квантовых выходов фоторазложения лапаконитина и его производных проводился с использованием зависимости изменения оптической плотности образца от времени облучения (рисунок 29).

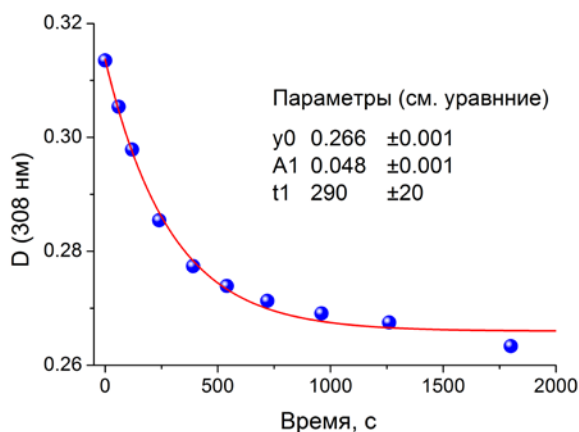


Рисунок 29. Зависимость изменения оптической плотности лаппаконитина в метаноле от времени облучения ХеСІ эксимерной лампой ($\lambda_{\text{возб}} = 308 \text{ нм}$).

Данная зависимость аппроксимировалась экспоненциальным спадом следующего вида:

$$A(t) = y_0 + A_1 \exp(-t/t_1), \quad (5)$$

с использованием функции фитирования, которая оптимизировала параметры y_0 , A_1 и t_1 , при этом величина $(y_0 + A_1)/y_0$ соответствует отношению коэффициентов молярного поглощения исходного лаппаконитина и основного продукта фотореакции – N-ацетилантраниловой кислоты (из литературных данных $\epsilon_{308} = 3300 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [75]). Используя данный подход, мы определили разницу в коэффициентах поглощения. Скорость реакции определялась по следующему выражению:

$$W_R = \frac{dN}{dt} = \frac{A_1 V N_A}{t_1 \Delta \epsilon}, \quad (6)$$

где $\Delta \epsilon$ – разница коэффициентов молярного поглощения ($\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$), V – облученный объем образца (мл), N_A – число Авогадро (моль^{-1}), A_1/t_1 – производная (5). В результате, квантовый выход фоторазложения равен

$$\varphi = \frac{W_R}{W_A}, \quad (7)$$

Где W_A – скорость поглощения света, определяемая из

$$W_A = \frac{I_a \lambda_{\text{ex}}}{hc} (1 - 10^{-A_0}), \quad (8)$$

где I_a – интенсивность света, $\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ нм}$, h – постоянная Планка, c – скорость света.

Глава 3. Исследование фотофизических свойств природного дитерпенового алкалоида – лаппаконитина и его производных

Дитерпеновые алкалоиды представляют собой большую группу природных соединений, обладающих высокой физиологической активностью, среди которых есть как блокаторы натриевых каналов (лекарства антиаритмики), так и нейротоксины. Так, дитерпеновый алкалоид аконитин – один из сильнейших растительных ядов используется фармакологами для развития модели сердечной аритмии. Долгое время полагали, что лаппаконитин аналогичен по механизму действия аконитину, но менее токсичен. Однако более детальное изучение этого алкалоида привело к неожиданному результату: будучи близким по химическому строению к аконитину, лаппаконитин обладает иным, во многом противоположным механизмом действия. Этот механизм сводится к блокаде быстрого входящего натриевого тока через мембрану кардиомиоцита, что делает его в определенном диапазоне концентраций типичным антиаритмическим средством, в то время как аконитин усиливает этот ток, приводя к исключительно проаритмическим эффектам. В результате лаппаконитин можно рассматривать как природный антагонист аконитина [49]. Противоположные лечебные эффекты очень близких по строению соединений (см. рисунок 30) принято объяснять особенностями их связывания с рецепторами натриевых каналов. При этом в литературе ключевым считается вопрос о природе влияния заместителей, в частности, расположенных в дитерпеновой части молекулы [6].

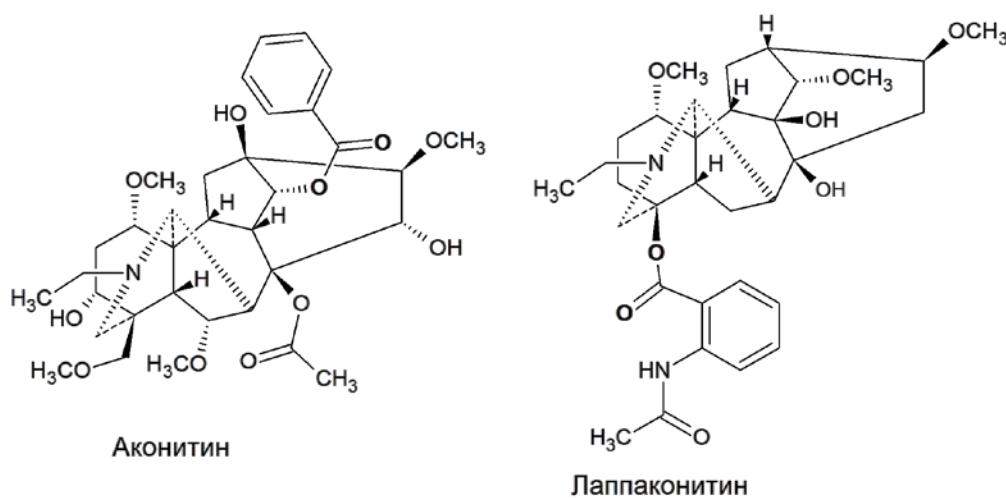


Рисунок 30. Химическая структура представителей класса дитерпеновых алкалоидов: нейротоксина аконитина и действующего вещества лекарства против аритмии I-го класса – лаппаконитина.

В настоящее время лаптаконитин интенсивно исследуется и был установлен ряд его полезных свойств. Так, он является сильным анальгетиком, не вызывающим привыкание [77–79], широко используется для лечения рака [80] и постхирургической боли во многих странах, а также обладает антиаритмической [78, 81], противовоспалительной [82, 83] и антибиотической активностью [84]. Кроме того, гидробромид лаптаконитина (препарат Аллапинин) используется как лекарство против аритмии в нашей стране. С другой стороны, клиническая эффективность применения гидробромида лаптаконитина представляется неоднозначной – его антиаритмическое действие, по разным оценкам, реализуется у 21–78% пациентов [85]. Не менее важно и то, что при применении препарата достаточно высок риск развития различных побочных эффектов. В связи с этим не ослабевает интерес к поиску новых, близких к лаптаконитину или содержащих его комбинированных соединений, которые не уступают ему по эффективности антиаритмического действия и при этом активны в меньших дозировках. Таким образом, чтобы расширить спектр функциональных производных лаптаконитина для биологического скрининга, химики из НИОХ и ИХКГ СО РАН синтезировали ряд его производных [86, 87], которые были исследованы в данной работе. Другой важный аспект использования ЛК касается его потенциальной фототоксичности, поскольку ЛК содержит хромофорную группу – антраниловый фрагмент. Однако ответ на этот вопрос не столь очевиден, поскольку лаптаконитин относится к эфирам антраниловой кислоты, многие производные которой, напротив, обладают высокой фотостабильностью и используются в качестве светофильтров и фотопротекторов в солнцезащитных средствах [58].

Между тем ранее было показано, что сам лаптаконитин под воздействием фотооблучения разлагается с образованием короткоживущих парамагнитных интермедиатов – потенциальных источников фототоксичности лекарственных препаратов (см. главу 1). Поскольку видно, что фотостабильность разных эфиров антраниловой кислоты кардинально меняется в зависимости от строения, естественно предположить, что путем варьирования заместителей в антраниловом и дитерпеновом фрагментах можно воздействовать и на фотостабильность ЛК. В настоящей работе сделана попытка проследить связь между природой заместителей и степенью фоторазложения на примере ряда замещенных ЛК. В качестве стандарта было выбрано соединение, содержащее тот же хромофор – метиловый эфир антраниловой кислоты

(МА). На рисунке 31 ниже приведены спектры поглощения ряда лаптаконитинов в метаноле.

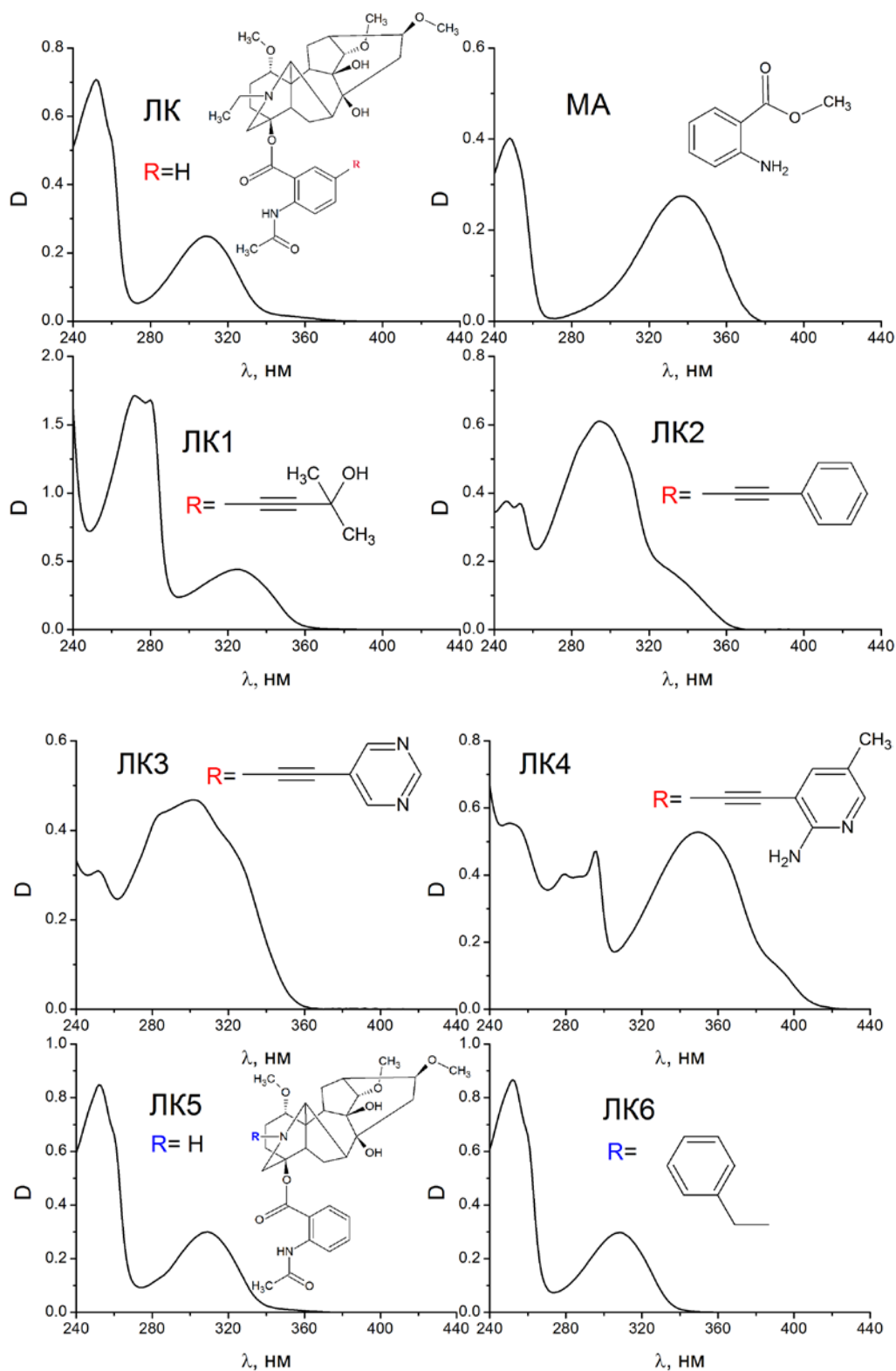


Рисунок 31. Оптические спектры поглощения лаптаконитина ($\approx 6 \times 10^{-5}$ М), метилового эфира антраниловой кислоты (5×10^{-5} М) и производных лаптаконитина (1×10^{-5} М) в метаноле.

Сдвиг полосы поглощения лаптаконитина в коротковолновую область и уменьшение ее интенсивности по сравнению с МА можно объяснить уменьшением сопряжения между атомом азота и ароматическим кольцом вследствие ацелирования [88].

УФ-облучение ЛК эксимерной лампой на 308 нм приводит к изменению оптического спектра поглощения в результате фоторазложения (рисунок 32).

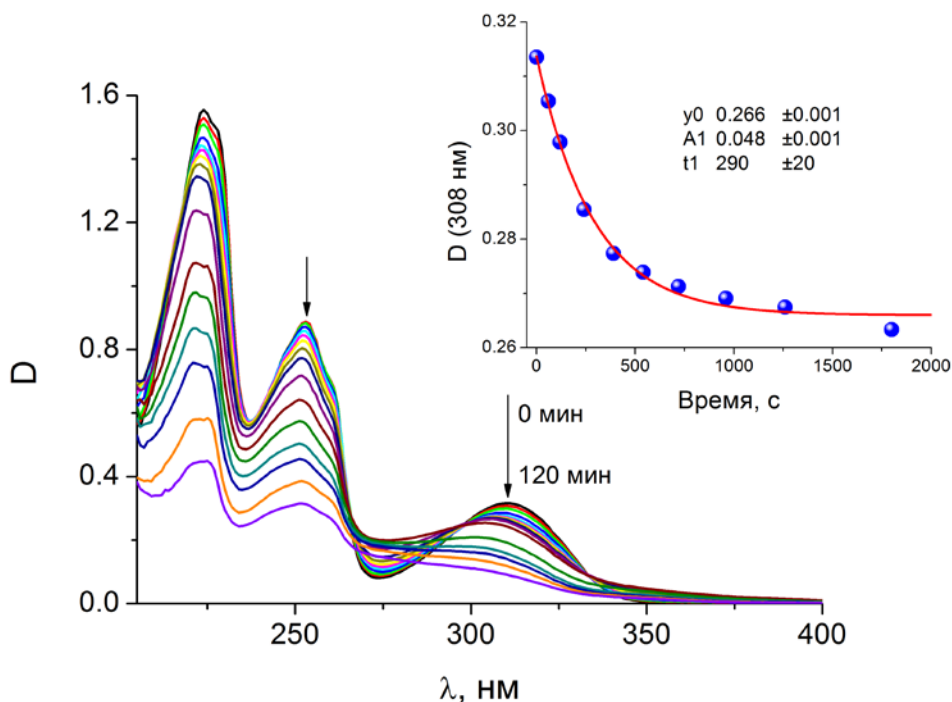


Рисунок 32. Оптические спектры поглощения лаптаконитина (8×10^{-5} М) в метаноле, насыщенном аргоном, в различные моменты времени после облучения на 308 нм. На вставке зависимость оптической плотности от времени облучения: голубые точки – экспериментальные данные, красная линия – результат аппроксимации моноэкспоненциальным спадом.

Согласно рисунку 32 при фотолизе ЛК протекает не один процесс: примерно после 20 мин фотооблучения изобестическая точка на 298 нм исчезает и начинается следующая фототрансформация. Для того чтобы понять, какие именно процессы происходят на начальном участке и при продолжении облучения, продукты фотолиза параллельно детектировались по спектрам ^1H ЯМР (рисунок 33).

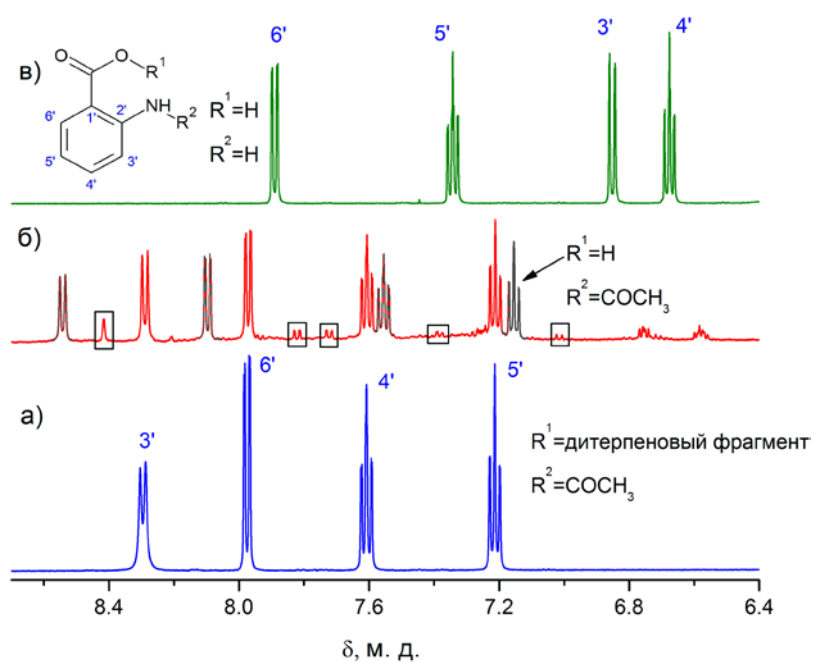


Рисунок 33. ¹H ЯМР спектр лаппаконитина до фотолиза (а); спектр реакционной смеси лаппаконитина после УФ-облучения на 308 нм в течение 120 мин (б): серым цветом выделены сигналы основного продукта – N-ацетилантралиловой кислоты, в прямоугольниках – продукты перегруппировки фото-Фриса; (в) – антралиловая кислота.

При сравнении ЯМР спектров антралиловой кислоты, лаппаконитина и реакционной смеси в области резонанса ароматических протонов можно заключить, что в результате фотолиза лаппаконитина происходит накопление основного продукта реакции – N-ацетилантралиловой кислоты и ее дальнейший фотолиз с образованием продуктов деацилирования и перегруппировки фото-Фриса [89]. Так, два дублета на 7.70 и 8.00 м.д. и синглет на 8.40 м.д. предположительно относятся к продуктам перегруппировки (5-метил-2-аминобензойная и 5-ацето-2-аминобензойная кислоты). Два дублета на 7.26 и 7.00 м.д. относятся к 3-ацето-2-аминобензойной кислоте или 3-метил-2-аминобензойной кислоте, при этом соответствующие два триплета перекрываются с сигналами основного продукта и исходного соединения (7.20-7.30 м.д., 7.50-7.60 м.д.). Полученные результаты вполне укладываются в схемы фотопревращений ЛК, предложенные по результатам анализа спектров ХПЯ [7]. Полная схема фотопревращений лаппаконитина представлена на рисунке 34 ниже.

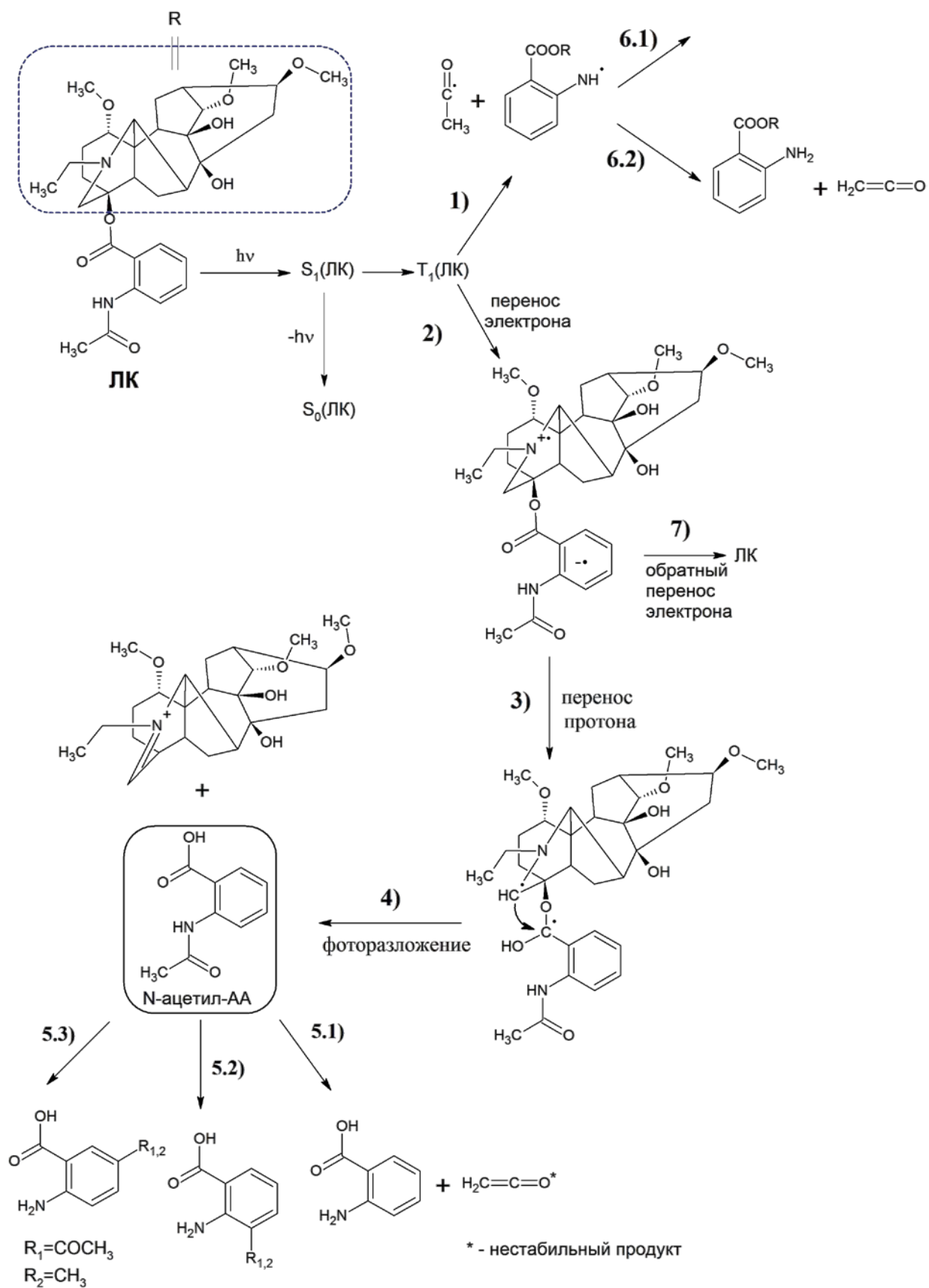


Рисунок 34. Схема фотопревращений лапаконитина под действием УФ света.

Стадии 1–4 и 6–7 ранее были установлены при анализе эффектов ХПЯ, стадии 5.1–5.3 были предложены в данной работе на основе ЯМР анализа продуктов фоторазложения. Несмотря на то, что процесс образования 3-ацето-2-аминобензойной и 5-ацето-2-аминобензойной кислот является минорным, он включает образование короткоживущих свободных радикалов, которые, как известно, могут быть причиной повреждения клеточных структур, таких как клеточные мембраны или ДНК.

Чтобы проследить роль синглет-триплетной конверсии в процессе фотодеградациии молекулы ЛК, с учетом уже имеющихся данных ХПЯ о том, что ЛК возбуждается в синглетное состояние и разлагается из триплетного [7], в настоящей работе сравнивались квантовые выходы флуоресценции и фоторазложения.

Спектры флуоресценции лаппаконитина и эфира антраниловой кислоты в метаноле имеют максимумы флуоресценции на 375 и 410 нм, соответственно (рисунок 35).

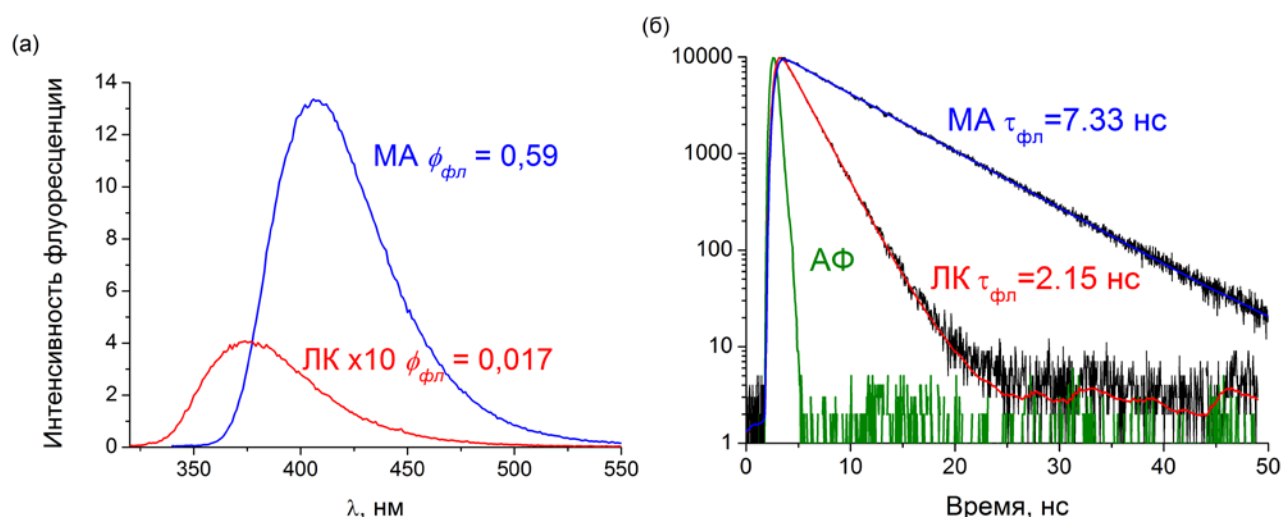


Рисунок 35. Спектры флуоресценции лаппаконитина и эфира антраниловой кислоты в метаноле, $\lambda_{\text{возб}}=300$ нм (а), кинетики спада флуоресценции лаппаконитина и эфира антраниловой кислоты в максимумах полос флуоресценции на 375 и 410 нм ($\lambda_{\text{возб}}=300$ нм), АФ-аппаратная функция (б).

Значения времен жизни и квантовых выходов флуоресценции лаппаконитина и его производных, полученные согласно методикам, описанным в экспериментальной части, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Данные флуоресценции и фоторазложения лаппаконитина и его производных в метаноле.

Соединение	$\phi_{\text{фл}} (\lambda_{\text{возб}}=300 \text{ нм})$	$\Phi (\lambda_{\text{возб}}=308 \text{ нм})$	$\tau_{\text{фл}}, \text{нс}$
МА	0.59	-	7.3
N-ацетил-МА*	0.13	-	3.6
ЛК	0.017	0.19	2.1
ЛК1	0.027	0.16	2.4
ЛК2	0.042	0.056	3.1
ЛК3	0.023	0.15	2.5
ЛК4	0.030	0.023	3.2
ЛК5	0.17	0.48	1.2
ЛК6	0.025	0.35	1.8

* данные из [75].

Сравнение квантовых выходов и времен жизни флуоресценции указывает на значительное уменьшение данных величин относительно выбранного стандарта МА. Кроме того, значения $\tau_{\text{фл}}$ и $\phi_{\text{фл}}$ N-ацетил-МА согласно литературным данным почти в 2 раза больше, чем у лаппаконитина. В литературе различия в $\phi_{\text{фл}}$ для МА и его N-ацелированного производного объясняются изменениями электрон-донорной способности -NRH группы вследствие деацелирования [75]. Кроме того, укорочение времени жизни флуоресценции ЛК (2.1 нс) по сравнению с N-ацетил-МА (3.6 нс), вероятно, отражает процессы тушения антранилового фрагмента через ранее описанный перенос электрона от аминогруппы алкалоида на антраниловый фрагмент.

В связи с этим можно сделать вывод, что различия между $\phi_{\text{фл}}$ и $\tau_{\text{фл}}$ ЛК и МА связаны со следующими факторами: 1) тушением возбужденного состояния ЛК по механизму переноса электрона; 2) наличием в ЛК ацильной группы, приводящей к потере плоскостности молекулы и уменьшению донорной способности аминогруппы по отношению к ароматическому фрагменту.

Как упоминалось ранее в главе 1, эффективность интеркомбинационных переходов в карбонильных соединениях с орто-заместителями в ароматическом фрагменте зависит от колебательного взаимодействия между близкорасположенными уровнями $S_1(\pi-\pi^*)$ и $S_2(n-\pi^*)$ [56, 57]. Эффективное взаимодействие данных уровней приводит к безызлучательной дезактивации, в то время как внутримолекулярные водородные связи,

изменяя гибридизацию атома азота, наоборот, ведут к интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние. Резонно предположить, что введение заместителей как в дитерпеновую часть, так и в антраниловый фрагмент лаптаконитина также влияет на эффективность интеркомбинационной конверсии за счет стерических и электронных эффектов.

Сравнение квантовых выходов флуоресценции и фоторазложения для производных, замещенных в антраниловом фрагменте, указывает на то, что между данными величинами существует обратная зависимость (рисунок 36).

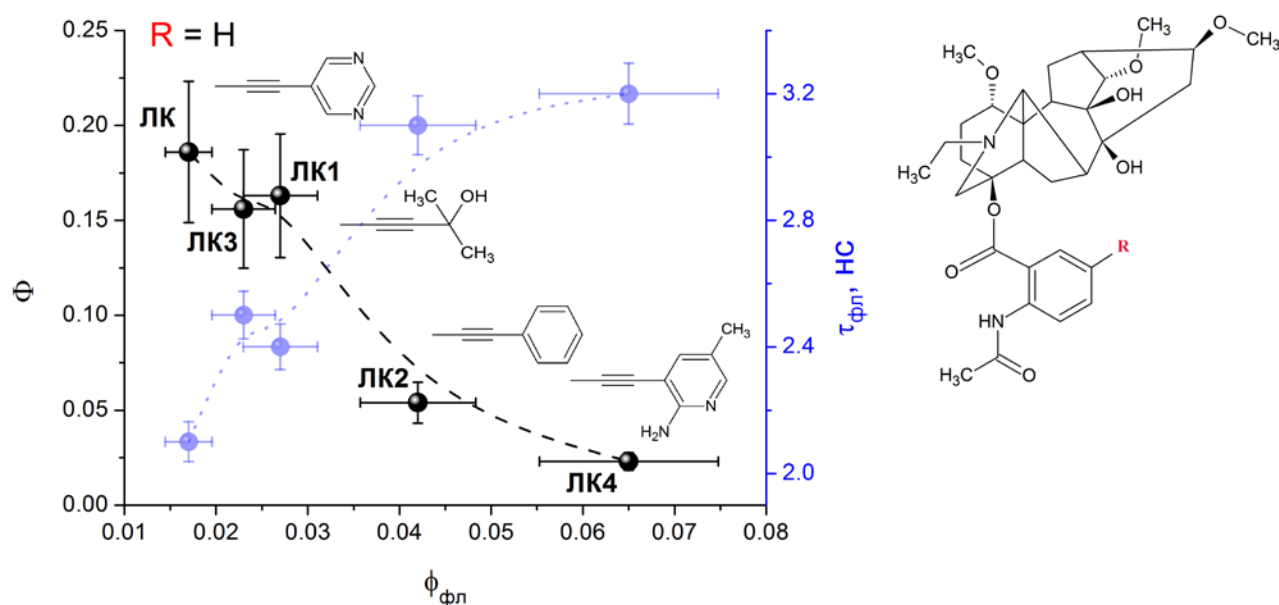


Рисунок 36. Корреляция между временами жизни флуоресценции ($\tau_{фл}$), квантовыми выходами флуоресценции ($\Phi_{фл}$) и фоторазложения (Φ) ЛК и его производных.

Рассмотрим подробнее данную корреляцию, поскольку с её помощью можно попытаться обнаружить проявление как электронных, так и стерических эффектов заместителей. При этом разумно считать, что ЛК2, содержащий на конце ацетиленового мостика фенил, обладающий электронным эффектом близким к нулю согласно классификации Гаммета [90], отражает в основном стерическое влияние заместителя. Сравнение времен жизни ЛК и ЛК2 показывает, что введение в антраниловый фрагмент объемного заместителя стабилизирует S_1 состояние, что, в свою очередь, приводит к увеличению $\Phi_{фл}$ и уменьшению Φ . Согласно исследованиям фотофизических свойств родственных соединений – орто-аминоацетофенонов, квантовый выход флуоресценции напрямую зависит от конфигурации атома азота орто-заместителя: переход в

пирамидальную конфигурацию дестабилизирует S_1 состояние, облегчая переход в T_1 состояние [56].

Тогда очевидно, что изменения в величинах $\phi_{\text{фл}}$ и Φ остальных замещенных ЛК являются результатом сочетания этого стерического влияния и электронных эффектов. Производные ЛК3 и ЛК1 по своим свойствам оказываются приближенными к незамещенному ЛК, по-видимому, из-за компенсации стерического эффекта электронными акцепторными: мезомерным для пиримидинового и индукционным для гидроксиизопропильного. Заместители-акцепторы, уменьшающие электронную плотность на ароматическом фрагменте, приводят к уменьшению $\phi_{\text{фл}}$ и увеличению Φ , соответственно. Расположенный в нижней части графика ЛК4, напротив, проявляет электрон-донорный мезомерный эффект, который складывается со стерическим. Резонно предположить, что в данном случае происходит смещение электронной плотности в сторону антраилового фрагмента. Это стабилизирует флуоресцирующее S_1 состояние, увеличивая $\phi_{\text{фл}}$, и уменьшает долю триплетного состояния, из которого происходит фотораспад. Различия времен жизни флуоресценции ЛК подтверждают эти выводы.

Отдельно следует остановиться на не укладывающихся в корреляцию производных ЛК5 и ЛК6, которые содержат заместители у атома азота дитерпенового фрагмента. Как видно из данных Таблицы 3, синглетное возбужденное состояние ЛК5 и ЛК6 тушится очень эффективно и также эффективно происходит фотораспад. Можно предположить, что замена $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ группы на $-\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ уменьшает донорные свойства этого атома азота, что приводит к уменьшению эффективности процесса переноса электрона и к изменению механизма фотораспада.

Таким образом, полученные результаты показывают, что электронные и стерические эффекты во многом определяют фотофизические свойства и реакционную способность лаптаконитина и его производных. А поскольку под реакционной способностью в данном случае понимается процесс фоторазложения, то на основе установленной корреляции «структура-свойство», можно оценивать фототоксичность потенциальных лекарственных средств. Отметим, что данный подход может быть использован для соединений, в которых реакционная способность зависит от интеркомбинационной конверсии, т.е. в случаях, когда исходное и реагирующее состояние имеют разную мультиплетность.

С помощью представлений о влиянии заместителей и роли Н-связей можно попытаться понять различия в активности других дитерпеноидов-алкалоидов, в частности, аконитина, который очень близок по строению к ЛК. Так, хорошо известно, что взаимодействие лекарства с аминокислотными остатками, расположенными в активном сайте рецептора, также зачастую включает образование межмолекулярных водородных связей (см. главу 1). О связи между прочностью внутримолекулярных водородных связей в молекуле ЛК и его реакционной способностью уже говорилось выше (см. Литературный обзор). Следует отметить, что, согласно литературным данным, в алкалоидах-дитерпеноидах существенны и другие водородные связи, возникающие в дитерпеновом фрагменте. Так, в зависимости от наличия или отсутствия внутримолекулярной водородной связи между Н-N и О-C₁ реализуются различные конформации кольца А (кресло или лодка) (рисунок 37) [91].

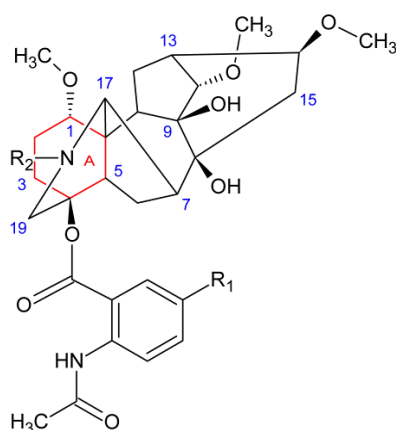


Рисунок 37. Кольцо А (красное) ЛК, которое может принимать конформации кресло или лодка в зависимости от наличия или отсутствия внутримолекулярной водородной связи между Н-N и О-C₁.

Тогда резонно предположить, что образование Н-связей в процессе связывания соединений этого класса с рецепторами может привести к изменению конформации молекулы лекарства. В этом случае даже небольшое различие в расположении заместителей в молекулах лаппаконитина и аконитина (рисунок 38), в частности ОН-групп, может повлиять на прочность связывания и стать одной из причин широко обсуждаемого в литературе различия в их биологической активности. Ещё одной причиной того, что ЛК – лекарство, а аконитин – яд может быть различие в свойствах заместителей: остатков антралиловой кислоты у ЛК и бензойной кислоты у аконитина. Если принять точку зрения, что необратимое связывание в лиганд-рецепторном

комплексе отравляет рецептор и его диссоциация является необходимым процессом, то можно объяснить разницу между ЛК и аконитином именно различием между свойствами антраниловой и бензойной кислот. Так, ЛК в результате переноса электрона при связывании в активном сайте рецептора с остатком аминокислоты распадается на антраниловую кислоту и норкарнан, обеспечивая, таким образом, диссоциацию лиганд-рецепторного комплекса. В случае с аконитином такого распада не будет, поскольку известно, что при фотолизе аконитина происходит только обратимый перенос электрона (см. рисунок 38).

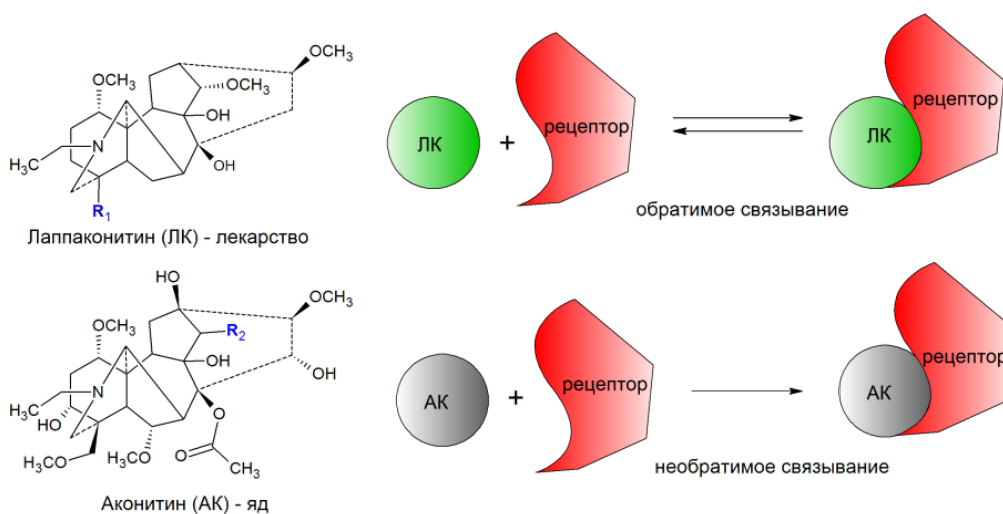


Рисунок 38. Возможное различие в биологической активности антиаритмического средства – лаппаконитина, содержащего остаток антраниловой кислоты (R₁) и нейротоксина – аконитина, в котором (R₂) – остаток бензойной кислоты, обусловленное различиями в механизмах связывания с рецепторными натриевыми каналами.

И в заключении обсуждения особенностей связывания дитерпеноидов-алкалоидов из аконита с натриевыми рецепторами важно отметить, что кроме вышерассмотренных стерических и электронных эффектов в молекулах этих соединений присутствует большое количество хиральных атомов с различной оптической конфигурацией. Так, в молекуле аконитина 15 оптических центров, а лаппаконитина – 12 (см. рисунок 38). Между тем, согласно данным литературного обзора (см. главу 1), системы даже с двумя хиральными центрами различной оптической конфигурации могут значительно отличаться по своим свойствам. Следующие главы настоящей работы будут посвящены детальному изучению влияния хиральных центров на свойства диастереомеров на примере модельных связанных систем, включающих хиральное лекарство – (S)-напроксен и его (R) аналог.

Глава 4. Роль хиральной конфигурации в фотоиндуцированных взаимодействиях в связанной системе NPX-Trp с двумя хиральными центрами

Выбор систем для исследования особенностей реакционной способности хиральных молекул в данной диссертации обусловлен следующими обстоятельствами. Это описанные в обзоре литературы НПВП для которых, с одной стороны, характерны существенные различия в лечебных свойствах энантиомеров и с другой, известен клеточный механизм терапевтического действия. Так, в настоящее время хорошо известно, что этот механизм заключается в ингибировании ферментов ЦОГ 1 и ЦОГ 2 (см. главу 1), представляющих собой белковую структуру, включающую последовательности аминокислотных остатков. В связи с этим, особый интерес при исследовании элементарных процессов фермент-субстратного и лиганд-рецепторного взаимодействия представляют системы, в которых молекулы лекарств ковалентно связаны с аминокислотными остатками. В качестве такой системы была выбрана диада, содержащая (R)/(S)-напроксен и (S)-триптофан (NPX-Trp). Ранние исследования диады NPX-Trp оптическими методами (флуоресцентная спектроскопия, лазерный импульсный и стационарный фотолиз) показали, что в этой системе происходит эффективный синглет-синглетный перенос энергии с триптофана на напроксен по механизму Фёрстера, приводящий к эмиссии исключительно «напроксенового» фрагмента [92]. Кроме того, авторы наблюдали стереоселективное уменьшение интенсивности флуоресценции напроксена в диаде, что объяснялось предположением об образовании эксиплекса. Однако, согласно критерию Рэмма-Веллера-Захариса, в данной системе возможен не только частичный (образование эксиплекса), но и полный перенос заряда [52]. Для этого изменение свободной энергии Гиббса в донорно-акцепторной системе, которое описывается нижеприведенным выражением, должно быть отрицательным:

$$\Delta G = \left[E_{ox} \left(\frac{D}{D^+} \right) - E_{red} \left(\frac{A^-}{A} \right) \right]_{\epsilon_0} - \frac{e^2}{\epsilon \cdot r} + \Delta G_{solv} - E_{(00^1NPX^*)}, \quad (9)$$

$\Delta G_{solv} = \frac{e^2}{2} \left(\frac{1}{R^{D^+}} + \frac{1}{R^{A^-}} \right) \left(\frac{1}{\epsilon} - \frac{1}{\epsilon_0} \right)$, где ΔG – изменение энергии Гиббса реакции, E_{ox} и E_{red} – полуволновые полярографические потенциалы окисления и восстановления, $E_{ox} = 1.0$ эВ, $E_{red} = -2.6$ эВ, e – заряд электрона, ϵ – полярность среды, r – расстояние между партнерами, ΔG_{solv} – изменение энергии Гиббса за счет сольватации частиц растворителем, E – энергия

S_1 возбужденного состояния напроксена ($E=3.7$ эВ) [65], R^{D+} и R^{A-} – радиусы частиц партнеров, ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость среды, в которой измерены значения потенциалов окисления/восстановления. В нашем случае среда – ацетонитрил, где $\Delta G_{solv} = 0.2$ эВ и ΔG , согласно выражению (9), является отрицательной величиной (0.08 эВ).

4.1 Стереоселективность процесса переноса электрона

Для исследования процессов с переносом заряда в системе NPX-Trp в данной работе с помощью флуоресцентной спектроскопии сделаны попытки проследить факторы, управляющие тушением возбужденных состояний в диастереомерах диады. Спектры поглощения и флуоресценции диастереомеров диады NPX-Trp, а также отдельных хромофоров – N-ацетилтриптофана и метилового эфира напроксена представлены на рисунке 39.

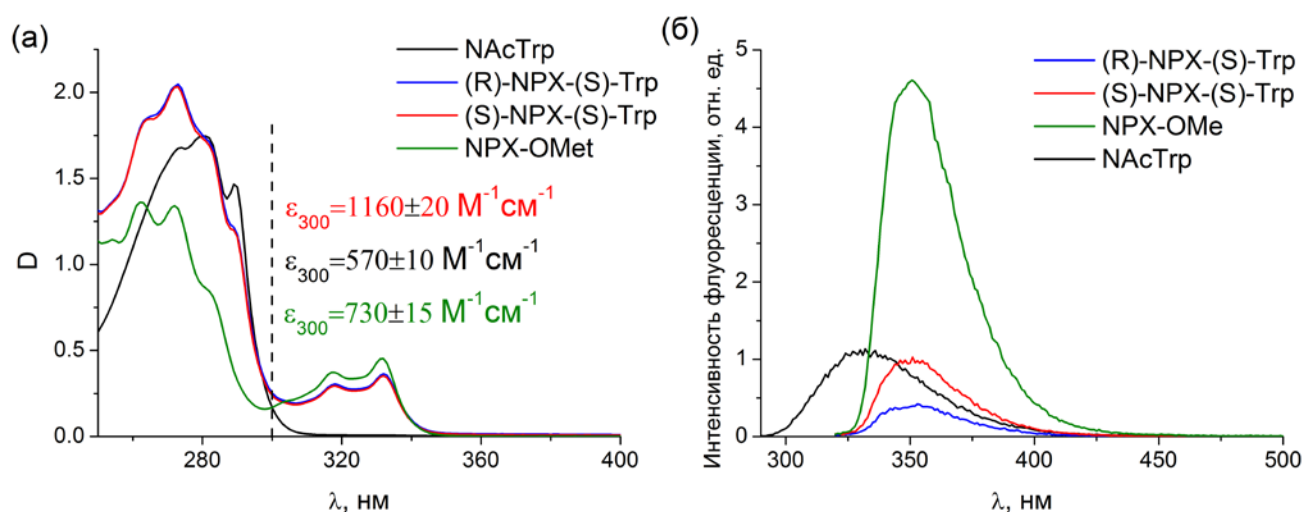


Рисунок 39. а) Оптические спектры поглощения и коэффициенты молярного поглощения на длине волны возбуждения в экспериментах по флуоресценции для N-ацетилтриптофана (NAcTrp), метилового эфира напроксена (NPX-OMe) и (R)/(S)-NPX-(S)-Trp в ацетонитриле; б) спектры флуоресценции диады (R)/(S)-NPX-(S)-Trp по сравнению с NPX-OMe и NAcTrp в ацетонитриле.

Максимумы полос флуоресценции (350 нм) совпадают для диастереомеров диад и метилового эфира напроксена, но имеют разную интенсивность. Более того, в данной работе не удалось зарегистрировать флуоресценцию от триптофанового остатка в диаде. Измерения флуоресценции реперного соединения – N-ацетилтриптофана в ацетонитриле показали, что максимум полосы флуоресценции находится на 330 нм и $\phi_{fl} = 0.16$.

Полученные данные согласуются с работой [92], в которой отсутствие флуоресценции остатка триптофана в диаде объяснялось переносом энергии с синглетного возбужденного состояния триптофана на напроксен. Поскольку хорошо известно, что эффективность процессов с переносом заряда зависит от диэлектрической проницаемости среды, то кинетики и спектры флуоресценции были изучены в средах с различной полярностью. Пример характерной кинетической кривой тушения флуоресценции представлен на рисунке 40.

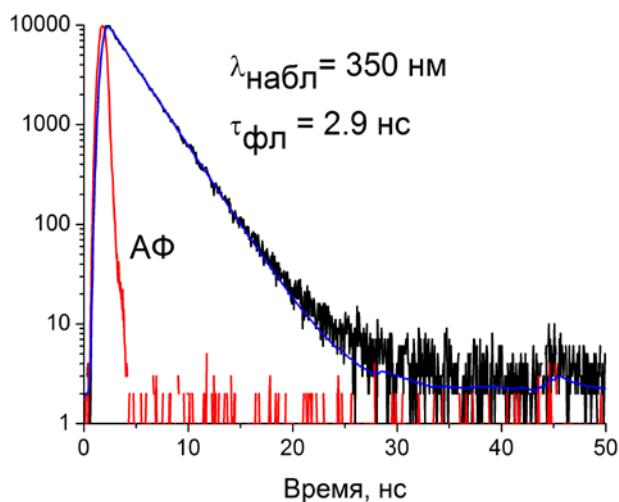


Рисунок 40. Кинетики спада флуоресценции (S)-NPX-(S)-Trp в ацетонитриле в максимуме полосы флуоресценции на 350 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 300$ нм), АФ-аппаратная функция.

Данный спад хорошо описывается моноэкспоненциальной функцией. Для диастереомеров диады было обнаружено более эффективное тушение флуоресценции по сравнению с метиловым эфиром напроксена, что указывает на дополнительные каналы тушения. Вместе с тем, при сравнении времен жизни и квантовых выходов флуоресценции диастереомеров диады наблюдается стереодифференциация (таблица 4).

Таблица 4. Квантовые выходы и времена жизни флуоресценции, константы скорости переноса электрона $(1 - \varphi_{\text{фл}})/\tau_{\text{фл}}$ в средах различной полярности (смесь ацетонитрил-бензол).

ε	(R)-NPX-(S)-Trp			(S)-NPX-(S)-Trp		
	$\tau_{\text{фл}}$, нс	$\varphi_{\text{фл}}$	$k \times 10^{-8}$, с^{-1}	$\tau_{\text{фл}}$, нс	$\varphi_{\text{фл}}$	$k \times 10^{-8}$, с^{-1}
36,8	$1,2 \pm 0,1$	$0,036 \pm 0,005$	$8,0 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,3$	$0,11 \pm 0,02$	$3,1 \pm 0,3$
29,6	$1,2 \pm 0,1$	$0,038 \pm 0,006$	$8,0 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,3$	$0,11 \pm 0,02$	$3,1 \pm 0,3$
21,55	$1,3 \pm 0,1$	$0,051 \pm 0,008$	$7,3 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,3$	$0,12 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,3$
16,1	$1,4 \pm 0,1$	$0,053 \pm 0,008$	$6,7 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,3$	$0,13 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,3$
8,08	$1,5 \pm 0,2$	$0,057 \pm 0,009$	$6,3 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,3$	$0,13 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,3$
2,28	$1,5 \pm 0,2$	$0,067 \pm 0,01$	$6,2 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	$0,13 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,3$

Стереодифференциация в данной системе также была установлена ранее [92], а ее источником, по мнению авторов, является частичный перенос заряда (образование эксиплекса). Однако напрямую зарегистрировать образование эксиплекса в этой диаде по спектрам флуоресценции не удалось ни в работе [92], ни в настоящей диссертации.

В литературе также имеются данные по лазерному импульсному фотолизу диады NPX-Trp, а также напроксена [93]. В этом случае квантовый выход триплета NPX в диаде $^3\text{NPX}^*\text{-Trp}$ по крайней мере в 10 раз меньше такового для свободного напроксена ($\varphi_{\text{T}}=0,28$). Последнее связывается с эффективным тушением синглетного возбужденного состояния напроксена триптофаном. Отсутствие триплета подтверждается в работе [93] также отсутствием фотопродуктов взаимодействия диады NPX-Trp с кислородом, которые обычно получают именно из триплетного состояния.

Вся совокупность литературных и собственных экспериментальных данных, таких как: низкий квантовый выход флуоресценции локального возбужденного состояния NPX в диаде NPX-Trp, измеренный в данной работе и приведенный в [92], маленький квантовый выход триплета в этом процессе [93], отсутствие флуоресценции триптофана (на основании [92] и собственных экспериментов), приводит к выводу, что одним только переносом энергии от триптофана к NPX эти результаты объяснить невозможно. Резонно

предположить, что тушение возбужденных состояний хромофоров в этом случае происходит по нескольким каналам, одним из которых является перенос электрона.

Для того, чтобы проверить гипотезу о возможном внутримолекулярном переносе электрона между (R)/(S)-NPX и (S)-Тгр в связанной системе, были изучены эффекты ХПЯ в растворителях с различной полярностью. Типичная картина эффектов ХПЯ диады представлена на рисунке 41.

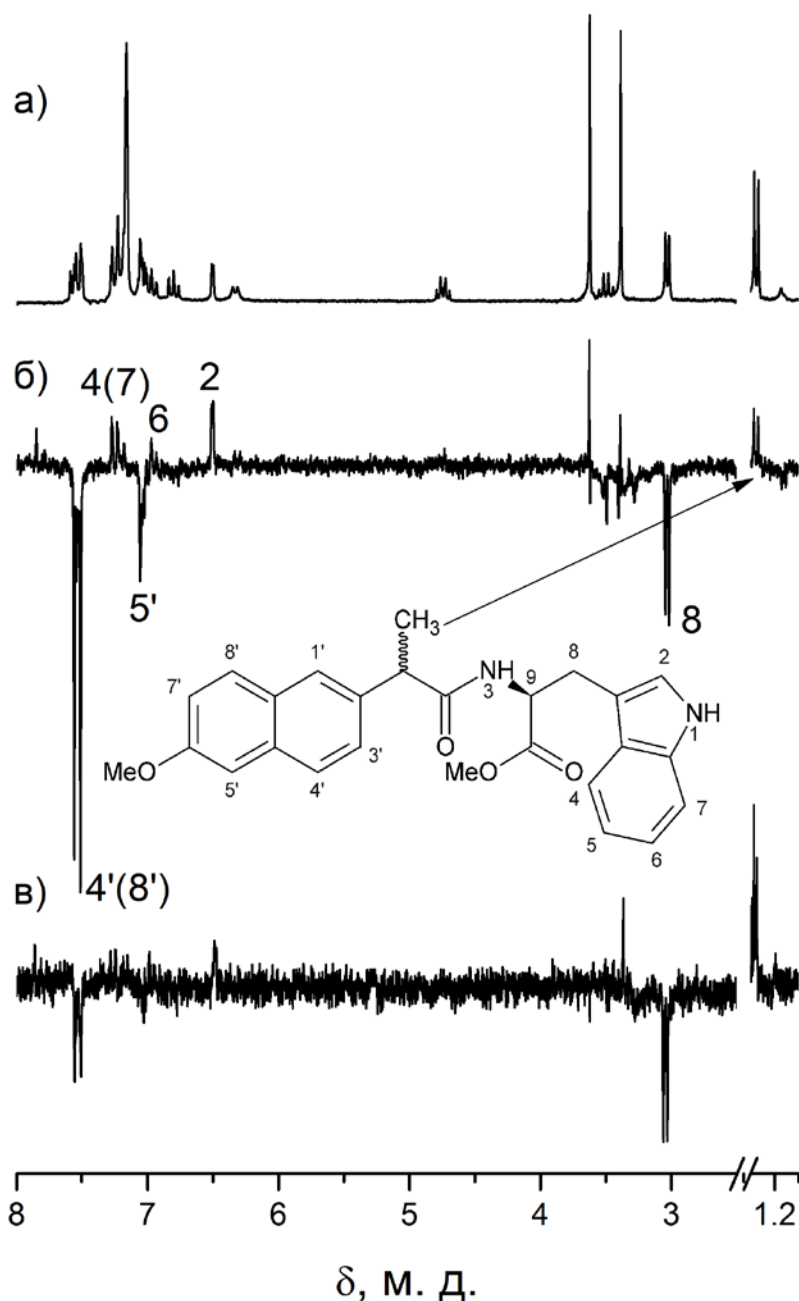


Рисунок 41. ^1H ЯМР спектр 5 мМ (R)-NPX-(S)-Тгр в смеси растворителей 40%-ацетонитрил- d_3 , 60% бензол- d_6 (а), квазистационарный спектр ХПЯ (б), времяразрешенный спектр ХПЯ (в).

Как видно из рисунка 41, наблюдается следующая поляризация: эмиссия (E) в области резонанса ароматических протонов 4' (или 8') и 5' фрагмента напроксена и для β -CH₂ протонов остатка триптофана. В области резонанса ароматических протонов 2, 4(7), 6 индольного кольца наблюдается абсорбция (A). Сигнал, расположенный на 1.25 м.д., принадлежащий CH₃-группе напроксена, присоединенной к хиральному атому углерода, также демонстрирует эффекты ХПЯ, однако вклад этих эффектов различен для времяразрешенного и квазистационарного экспериментов. В спектре ¹H ЯМР после фотолиза были обнаружены дополнительные сигналы продуктов в области резонанса метильных протонов. Поскольку ХПЯ сигнала метильных протонов не могла быть сформирована в акте переноса электрона (из-за отсутствия на этих ядрах спиновой плотности в бирадикал-цвиттерионе), то очевидно, что эти сигналы относятся к параллельному радикальному процессу фотопревращений диады. Большая химическая поляризация на метильных протонах во времяразрешенном эксперименте указывает на то, что эти продукты также образуются в геминальной паре. Таким образом, можно заключить, что тушение возбужденного состояния диады происходит под действием нескольких процессов.

Поскольку ранее было предположено, что одним из каналов тушения возбужденного состояния диады является перенос электрона, то следует ожидать образования соответствующего бирадикал-цвиттериона, в котором отрицательный заряд сосредоточен на фрагменте напроксена, а положительный на триптофане (рисунок 42).

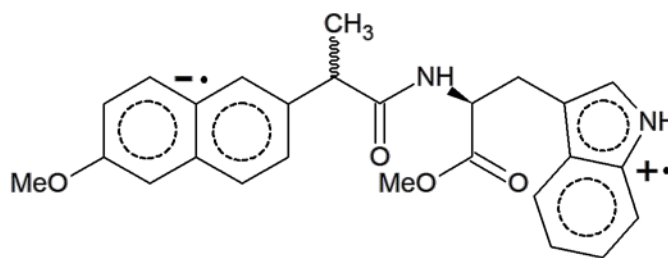


Рисунок 42. Структура бирадикал-цвиттериона диады NPX-Trp.

При этом такой бирадикал-цвиттерион может образоваться двумя путями: 1) при тушении синглетно-возбужденного состояния напроксена триптофаном и 2) при тушении напроксом в основном состоянии синглетно-возбужденного триптофана (показано зелеными стрелками на рисунке 43).

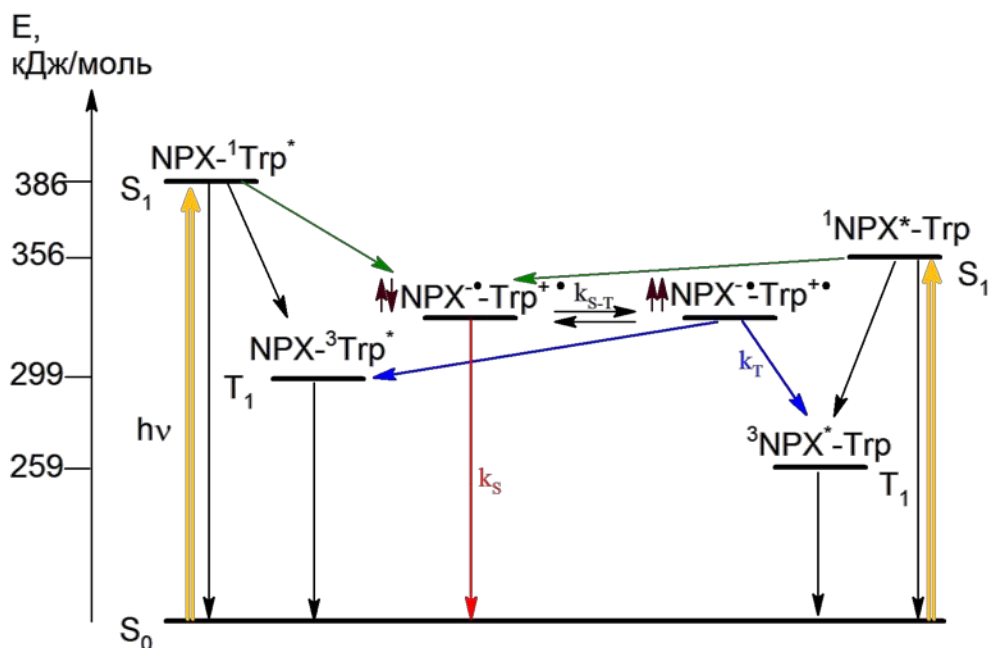


Рисунок 43. Схемы уровней и механизм тушения возбужденного состояния хромофоров диады NPX-Trp: голубые стрелки обозначают обратный перенос электрона из триплетного спинового состояния (k_T) с последующим образованием поляризованной диады (не показана), красная стрелка обозначает обратный перенос электрона из синглетного спинового состояния (k_S), соответственно, в данной системе $k_T > k_S$.

Однако в условиях проведения эксперимента ($\lambda_{\text{возб}} = 308$ нм) поглощает свет преимущественно напроксен (97%). Стоит отметить, что основной вклад в формирование эффектов ХПЯ вносит внутримолекулярный перенос электрона в соответствии с тем, что константа скорости тушения синглетного возбужденного состояния диады ($6 - 8 \times 10^8 \text{ c}^{-1}$) на порядок выше, чем скорость бимолекулярного процесса ($W = 2 \times 10^9 \times 5 \times 10^{-3} = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$). Тем не менее, увеличение интенсивности поляризации в квазистационарном спектре по сравнению со времяразрешенным указывает на вклад от бимолекулярного процесса. В обоих процессах (внутри- и межмолекулярном переносе электрона) эффекты ХПЯ идентичны.

Знаки ХПЯ всех поляризованных сигналов, кроме принадлежащих метильным протонам, были проанализированы с использованием правил Каптейна, модифицированных Клоссом, с учетом возможности рекомбинации бирадикал-цвиттериона из обоих (синглетного и триплетного) спиновых состояний [51].

Поскольку значение g-фактора напроксена выше (2.0030) [94], чем триптофана (2.0027) [95], константы СТВ для ароматических протонов нафталина и индола –

отрицательные, а для β -CH₂ положительная [96–98], то перенос электрона происходит между возбужденным напроксеном и основным состоянием триптофана (таблица 5).

Таблица 5. Анализ знаков ХПЯ, сформированных в акте обратного переноса электрона.

сигнал	знак	μ	ε	Δg	аств	γ
4' (8')	E	-	+	+	-	-
β -CH ₂	E	-	+	-	+	-

Дополнительным доказательством образования бирадикал-цвиттериона в результате внутримолекулярного переноса электрона является соответствие отношения интегральной интенсивности сигналов ХПЯ отношению констант СТВ. Так, значения констант СТВ ароматического протона 8' напроксена – 0.495 мТл и β -CH₂ группы триптофана – 0.7–1.0 мТл, а отношение этих констант равно 1.0 и 1.7. Отношение интегральных интенсивностей сигналов этих протонов во время разрешенном эксперименте равно 1.0 и 1.66. Таким образом, соотношение интенсивностей соответствует распределению спиновой плотности в бирадикал-цвиттерионе. При этом анализ знаков ХПЯ, проведенный согласно вышеописанным правилам, показывает, что обратный перенос электрона преимущественно происходит из триплетного спинового состояния бирадикал-цвиттериона.

Появление поляризованных сигналов в области резонанса метильных протонов напроксена указывает на протекание еще одного обратимого процесса – переноса атома водорода из хирального центра напроксена в нейтральном бирадикале. Отсутствие ХПЯ на самом СН протоне может быть следствием малых значений соответствующей константы СТВ в нейтральном бирадикале, образовавшемся после переноса этого атома водорода (см. рисунок 44). Согласно правилам Каптейна, наблюдаемые эффекты ХПЯ могли сформироваться в нейтральном бирадикале в синглетном спиновом состоянии, который, в свою очередь, образуется из синглетного возбужденного состояния диады (таблица 6). Такой бирадикал получается в результате последовательной перегруппировки – миграции свободной валентности, которая характерна для парамагнитных форм аминокислот (рисунок 44) [99].

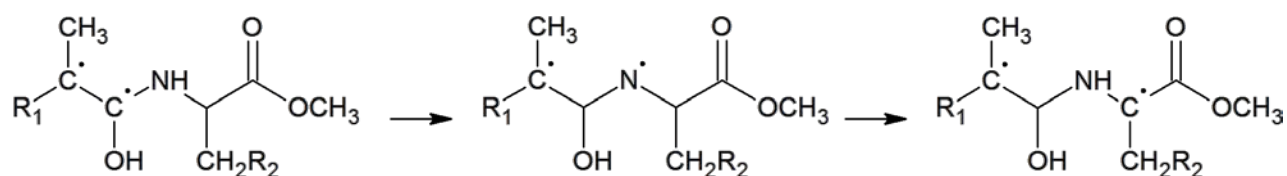


Рисунок 44. Схема последовательной миграции свободной валентности в бирадикале, R_1 – 6-метоксинафталин-2-ил, R_2 – индол-3-ил.

Очевидно, что времяразрешенный спектр ХПЯ является суперпозицией эффектов ХПЯ, сформированных в бирадикал-цвиттерионе и бирадикале (см. таблицы 5, 6 и рисунок 41). В то же время квазистационарный спектр содержит все линии, которые должны быть поляризованы в акте обратного переноса электрона и только малую долю поляризованных метильных протонов от нейтрального бирадикала. Этот факт свидетельствует о том, что данный бирадикал не образуется в результате бимолекулярного тушения.

Таблица 6. Анализ знаков ХПЯ, сформированных в акте обратного переноса атома водорода.

сигнал	знак	μ	ε	Δg	аств
CH ₃	A	-	+	-	+
β -CH ₂	E	-	+	+	+

Кроме того, отсутствие зависимости ХПЯ метильных протонов от полярности растворителя наряду с существованием таковой для других протонов (рисунок 45) служит дополнительным подтверждением двух параллельных процессов фотолиза диады.

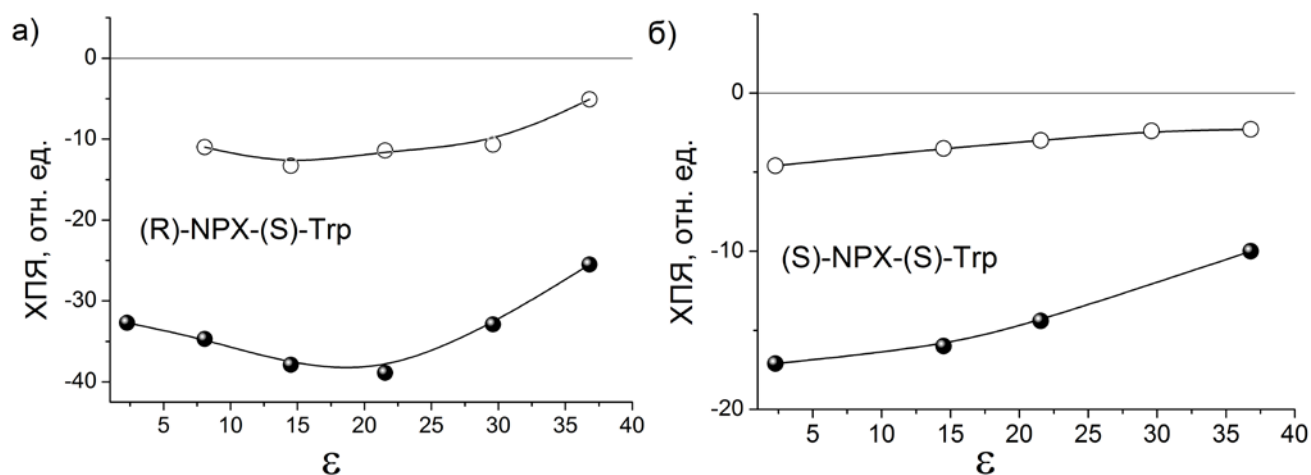


Рисунок 45. Зависимость эффектов ХПЯ β -CH₂ (Trp) (○) и ароматических протонов (NPX) (●) для (R,S) (а) и (S,S) (б) от полярности растворителя (смеси ацетонитрил/бензол).

При обсуждении зависимостей от полярности необходимо отметить, что ХПЯ в связанных системах определяется не только значениями констант СТВ и разницей g -факторов, но и расстоянием между радикальными центрами, что имеет решающее значение [100–102]. Зависимость ХПЯ от полярности растворителя отражает изменение уровня энергии бирадикал-цвиттериона в средах с различной диэлектрической проницаемостью, где также меняются время жизни и константа рекомбинации. В исследуемой системе уменьшение эффективности ХПЯ в сильнополярных средах (ацетонитрил), наиболее вероятно, является результатом перераспределения величин констант рекомбинации из синглетного (k_S) и триплетного (k_T) спиновых состояний бирадикал-цвиттериона [12, 15].

Еще одной характерной особенностью данной связанной системы является различие в эффектах ХПЯ диастереомеров (рисунок 46). Так, для (R,S)-диастереомера интенсивность поляризации $8'$ ($4'$) и β -CH₂ протонов заметно выше по сравнению с (S,S), а поляризация $5'$ протона и вовсе отсутствует в (S,S). Природа данных эффектов будет подробно обсуждена в следующем разделе.

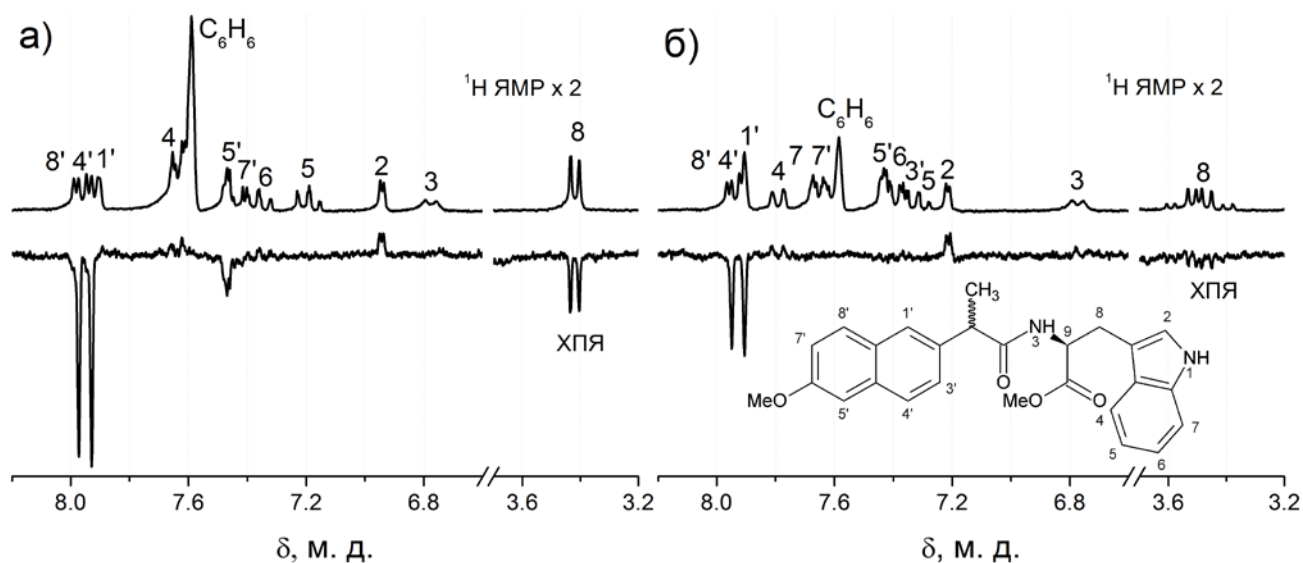


Рисунок 46. ¹H ЯМР и квазистационарные спектры ХПЯ (R,S) (а) и (S,S)-диастереомеров (б) диады NPX-Trp (5мМ) в смеси растворителей 40% бензол-d₆/60% ацетонитрил-d₃.

Таким образом, анализ эффектов ХПЯ позволяет выделить несколько элементарных процессов, которые происходят после УФ облучения диады NPX-Trp: внутримолекулярный перенос электрона и его бимолекулярный аналог, а также перенос атома водорода.

4.2 Хиральная инверсия

Наличие процесса переноса атома водорода позволило предположить, что обратный перенос в нейтральном бирадикале, в котором парамагнитные центры являются также и прохиральными, может привести к обращению оптической конфигурации исходного соединения, т.е. хиральной инверсии. В принципе, в случае участия в реакции свободных радикалов можно ожидать образования диастереомеров со всеми конфигурациями, изображенными на рисунке 47.

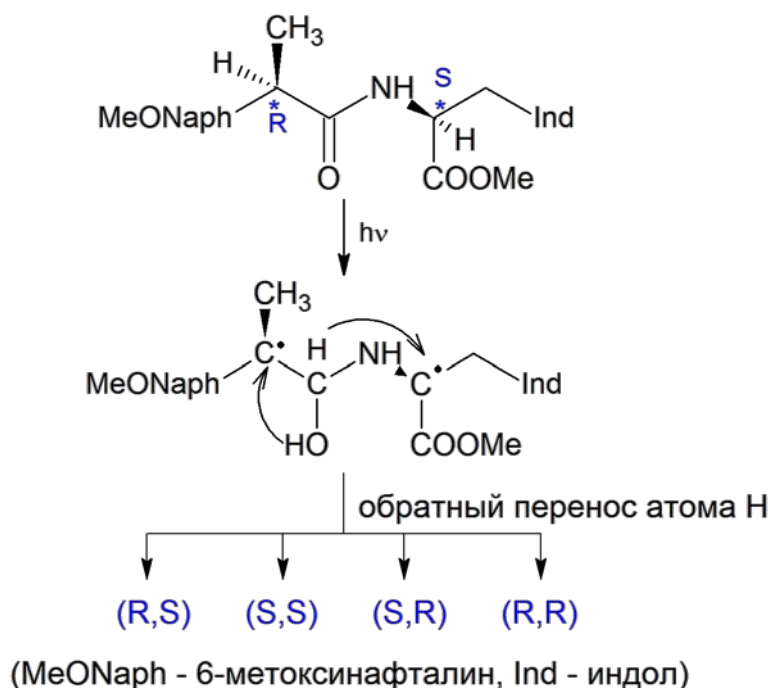


Рисунок 47. Схема фотоиндуцированной хиральной инверсии через стадию образования бирадикала в диаде NPX-Trp.

Отметим, что лекарства из подкласса 2-арилпропионовых кислот НПВП, к которым относится напроксен, являются одними из наиболее изученных на предмет хиральной инверсии в живых организмах [21] (также см. Введение). Однако, несмотря на интенсивные исследования инверсии, происходящей в живых организмах биохимическими методами *in vitro* и *in vivo*, элементарные стадии данного процесса не установлены. При этом рассматриваемые в литературе механизмы хиральной инверсии, происходящей под действием ферментов, позволяют предполагать участие радикальных стадий. Хотя про фотоиндуцированную инверсию НПВП на данный момент ничего не известно, попытка выяснить возможность изменения оптической конфигурации в парамагнитных предшественниках хиральных молекул представляется целесообразной.

Для проверки гипотезы о возможности протекания фотоиндуцированной хиральной инверсии в исследуемой системе были тщательно проанализированы спектры ЯМР диастереомеров до и после фотолиза. Стоит отметить, что ЯМР является одним из широко применяемых методов изучения хиральных соединений, поскольку для многих диастереомеров наблюдаются различия в величинах химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия [103]. В частности, для доказательства хирального обращения напроксена и других НПВП, происходящего под действием фермента АМАСР, использовался ЯМР [64].

В настоящей работе сравнение ^1H и ^{13}C ЯМР спектров диастереомеров диады показало, что в случае углерода они отличаются незначительно: только для атома углерода, образующего хиральный центр триптофанового фрагмента, обнаружены различия в химических сдвигах. Поэтому анализ продуктов фоторазложения был проведен по спектрам ^1H . В исследуемой диаде наибольшие различия в спектрах ЯМР, ожидаемо, оказались у алифатических протонов, связанных с хиральными центрами (рисунок 48). Однако не для всех групп различие в хим. сдвигах сигналов протонов диастереомеров достаточно велико для надежного отнесения линий диастереомеров: для $\text{CH}(\text{CH}_3)$ и $\text{CH}(\text{CH}_2)$ сигналы (R,S) и (S,S) частично перекрываются (рисунок 48). Для количественного анализа перекрывающихся сигналов был проведен анализ полной формы линии экспериментального ЯМР спектра с использованием функции Лоренца.

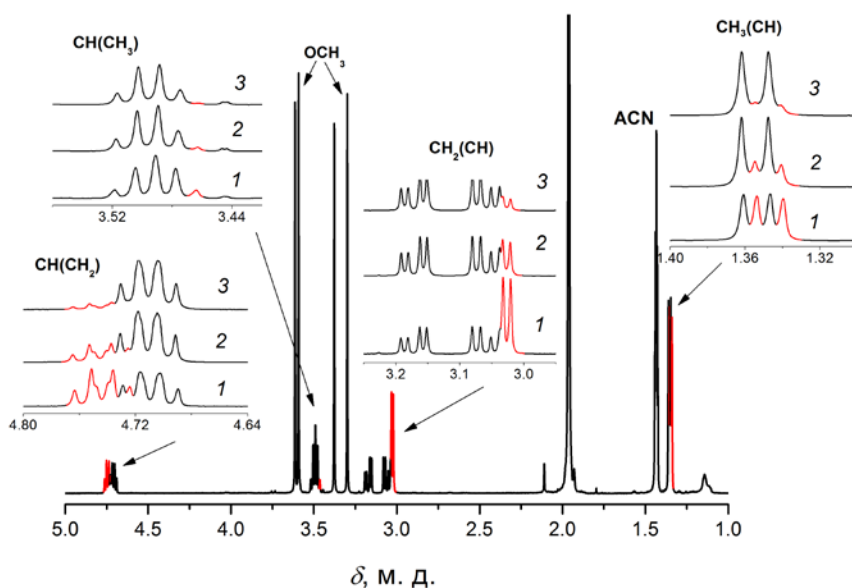


Рисунок 48. ^1H ЯМР спектр различных смесей (R,S) и (S,S)-диастереомеров диады, во вставках – увеличенные области резонанса алифатических протонов, связанных с хиральными центрами.

Отношение концентраций (R,S)/(S,S): (1) – 1:1; (2) – 3:1; (3) – 5:1.

Стоит отметить, что протоны индольного кольца диастереомеров диады также различаются, однако в данной области накапливаются сигналы от других продуктов разложения, что затрудняет анализ. Литературные данные о фотоиндуцированных процессах в амидах, к которым относится исследуемая система, позволяют ожидать образования следующих соединений: глицина, 3-метилениндолина, оксиндола, N-формилкинуренина, 3-гидроксипирролиндола, а также других производных напроксена и триптофана (рисунок 49) [104–106]. Продукты фотоокисления диады NPX-Trp также были выделены и идентифицированы по помощи хроматомасс спектрометрии в работе [93]. Авторы детектировали N-формилкинуренин и 3-гидроксипирролиндол, предположительно, образованные в результате реакции триптофанового фрагмента с синглетным кислородом. В наших экспериментах N-формилкинуренин не обнаружен, поскольку облучение диады проводилось в растворах, насыщенных аргоном.

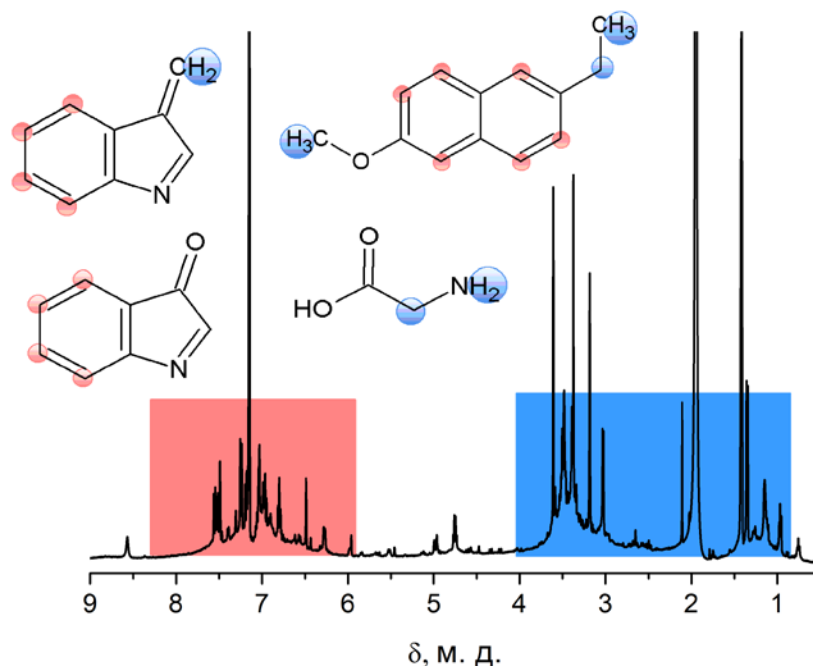


Рисунок 49. ^1H ЯМР 10 мМ (R)-NPX-(S)-Trp в смеси растворителей 40% ацетонитрил- d_3 /60% бензол- d_6 после 45 мин фотолиза. Области резонанса протонов ожидаемых продуктов (оксиндола, 3-метилениндолина, глицина и 2-этил-6-метоксинафталина) обозначены цветом.

После УФ-облучения (R,S)-диастереомера в спектре обнаружено появление мультиплетов в области резонанса алифатических протонов с константами спин-спинового расщепления, соответствующими (S,S)-диастереомеру.

В области резонанса метильных протонов после фотолиза наблюдается появление отдельных хорошо различимых сигналов, соответствующих (S,S)-диастереомеру с

константой спин-спинового взаимодействия ${}^3J=7.1$ Гц (рисунок 50). На рисунке 50(а) для сравнения приведен спектр смеси (R,S)/(S,S) в соотношении концентраций 1:3.

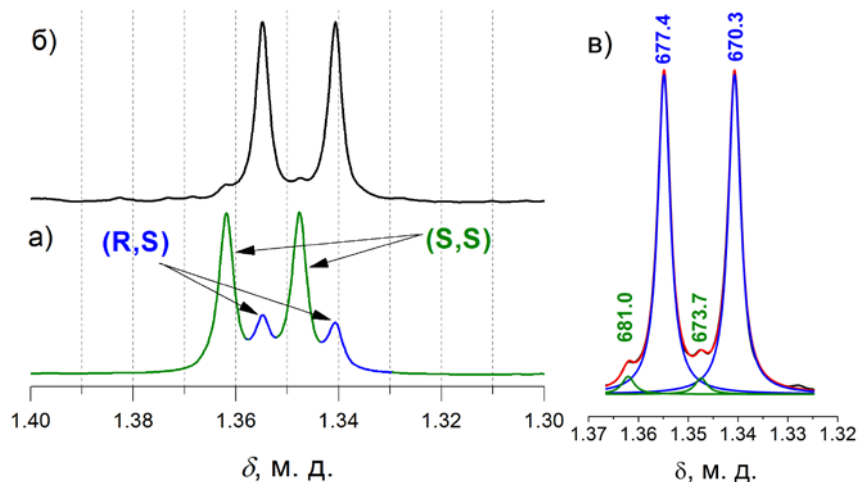


Рисунок 50. ${}^1\text{H}$ ЯМР сигналы $\text{CH}_3(\text{CH})$ протонов в смеси диастереомеров диады NPX-Трр (отношение концентраций (S,S)/(R,S) = 3/1) (а) и (R,S)-изомера после 15 мин УФ-облучения (б) в смеси растворителей 40% ацетонитрил- d_3 /60% бензол- d_6 . Справа на рисунке (в) представлена деконволюция сигнала CH_3 протонов после фотолиза (R)-NPX-(S)-Трр: синие линии – компоненты мультиплета (R,S), зеленые – (S,S), красная линия – сумма мультиплетов.

Для $\beta\text{-CH}_2$ протонов диастереомеров отличается не только хим. сдвиг, но и структура мультиплета. Для (R,S) – это дублет, соответствующий A_2X системе (${}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta} = 5.8$ Гц), в то время как для (S,S) – это мультиплет, соответствующий ABX системе (${}^2J_{\text{H}\beta_1\text{H}\beta_2} = 14.6$ Гц, ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta_1} = 5.5$ Гц, ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta_2} = 6.6$ Гц) (рисунок 51).

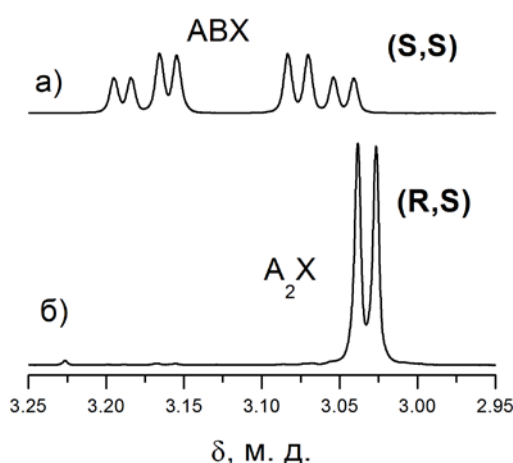


Рисунок 51. ${}^1\text{H}$ ЯМР спектр $\beta\text{-CH}_2$ протонов диастереомеров диады NPX-Трр в смеси растворителей 40% ацетонитрил- d_3 /60% бензол- d_6 .

После фотолиза (R,S)-диастереомера в области резонанса метиленовых протонов также присутствует продукт фоторазложения диады – триптофан, который имеет такую же структуру мультиплета, как и (S,S)-диастереомер. Благодаря сравнению смеси (S,S)-диады и (S)-N-ацетилтриптофана, а также добавке реперного соединения в реакционную смесь после фотолиза, удалось установить присутствие сигналов (S,S)-диастереомера после фотооблучения (R,S) (рисунок 52).

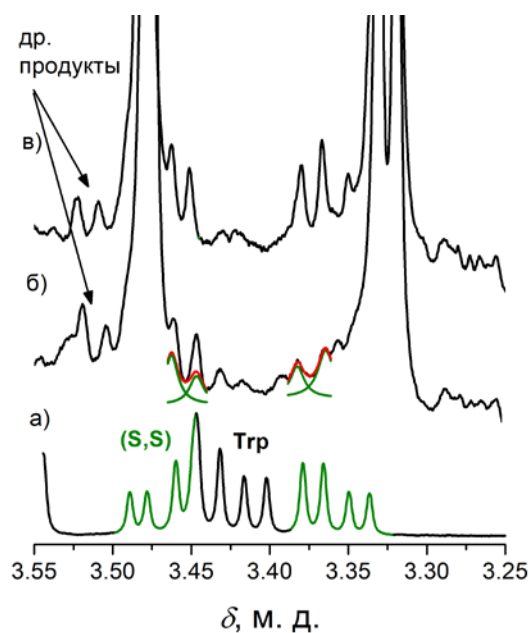


Рисунок 52. Область резонанса β -CH₂ протонов в ¹H ЯМР спектрах: (а) смеси (S)-NPX-(S)-Trp (компоненты соответствующего мультиплета выделены зеленым) и (S)-N-ацетилтриптофана (черный); (б) (R)-NPX-(S)-Trp после 45 мин УФ-облучения; (в) та же реакционная смесь после облучения с добавлением (S,S)-диастереомера.

В области резонанса СН(СН₃) протонов напроксена также накапливаются сигналы от некоторых продуктов фотодеструкции (предположительно, метиленовые протоны глицина, 3-метилениндолина и др. продуктов) и поэтому только при помощи моделирования возможна идентификация сигналов, которые можно отнести к (S,S)-диастереомеру (рисунок 53).

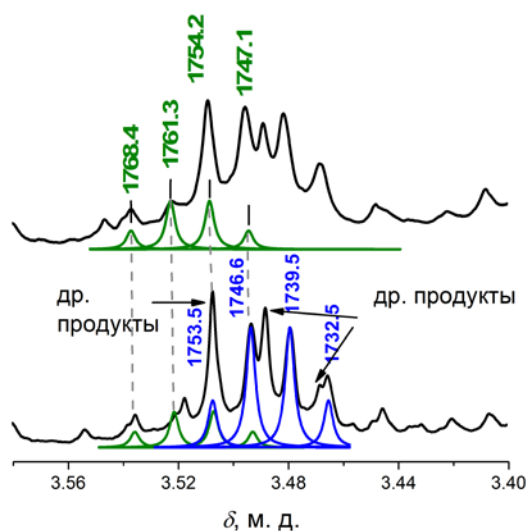


Рисунок 53. Область резонанса $\text{CH}(\text{CH}_3)$ протонов в ^1H ЯМР спектрах: (R)-NPX-(S)-Тгр после 15 мин УФ облучения (вверху), та же реакционная смесь после фотолиза с добавлением (S,S)-диастереомера (внизу). Моделирование формы линии для (R,S) представлено синим цветом, для (S,S) – зеленым.

Метиновый протон триптофана после фотолиза представляет одну группу линий, которая по ширине и форме отлична от исходного соединения. Очевидно, что несколько сигналов перекрываются в этой области. Стоит отметить, что, как и в случае метиленовых $\beta\text{-CH}_2$ протонов, форма мультиплетов различна для диастереомеров (рисунок 54).

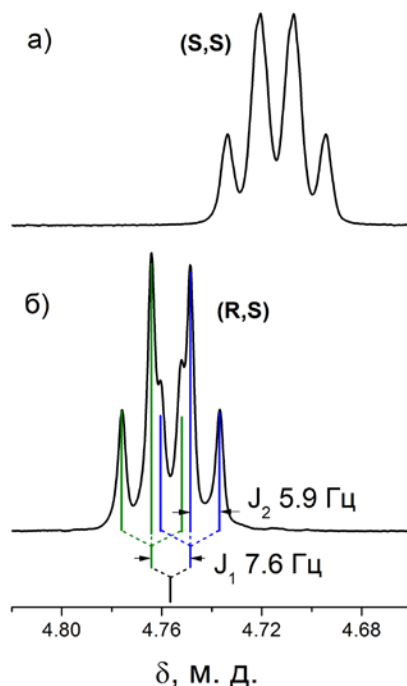


Рисунок 54. Область резонанса $\text{CH}(\text{CH}_2)$ протонов в ^1H ЯМР спектрах (S,S)- (а) и (R,S)- (б) диастереомеров NPX-Тгр в смеси растворителей 40% ацетонитрил- d_3 /60% бензол- d_6 .

Для (R,S) – это дублет триплетов dt ($^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta} = 5.9$ Гц, $^3J_{\text{H}\alpha\text{NH}} = 7.6$ Гц), а для (S,S) – дублет дублетов дублетов ddd ($^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta 1} = 5.5$ Гц, $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta 2} = 6.6$ Гц, $^3J_{\text{H}\alpha\text{NH}} = 7.4$ Гц). С учетом этого удается описать экспериментальный спектр после фотолиза (R,S). Он включает сигнал исходного соединения и сигнал (S,S)-диастереомера (рисунок 55).

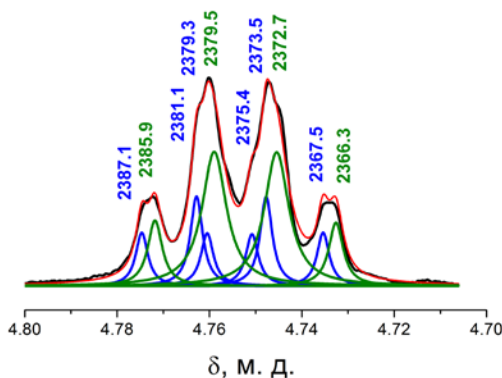


Рисунок 55. Область резонанса $\text{CH}(\text{CH}_2)$ протонов в ^1H ЯМР спектре после 30 мин УФ-облучения (R)-NPX-(S)-Trp (черный) и моделирование формы линии, где синим цветом обозначены компоненты мультиплета (R,S), зеленым – (S,S), красная линия – сумма мультиплетов.

Сравнение интегральных интенсивностей протонов исходного – (R,S) и (S,S)-диастереомера приводит к следующему результату. Степень конверсии по данным для метильных и метиленовых протонов не превышает 2-3%. Однако, в области резонанса метиновых протонов проявляются другие сигналы со структурой, подобной исходному. Предположительно это могут быть другие диастереомеры, образование которых в принципе возможно в акте обратного переноса атома водорода в бирадикале, в котором парамагнитные центры являются также и прохиральными (рисунок 47).

Однако, ввиду отсутствия соединений-свидетелей подтвердить их образование не представляется возможным. Отметим, что УФ облучение (S,S)-диастереомера приводит в большей степени к деструкции, чем к появлению (R,S) аналога. Это различие в поведении диастереомеров соответствует литературным данным о большей склонности к хиральной инверсии именно (R)-изомеров напроксена, а также других НПВП [17, 20, 21].

Таким образом, в работе описан первый пример хиральной инверсии, происходящий с участием бирадикала, образовавшегося под действием УФ облучения. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что за время жизни бирадикала, образованного в результате переноса атома водорода, в нем может происходить

изменение оптической конфигурации. Несмотря на малую степень конверсии (R)-изомера, детектированной в настоящей работе, этот результат может быть полезен для интерпретации спонтанных изменений оптических конфигураций аминокислот в составе белков, которые находят у пациентов с болезнями Альцгеймера и Паркинсона [107, 108].

Глава 5. Спиновая селективность в процессе фотоиндуцированного переноса электрона в связанных системах, содержащих (S) и (R)-напроксен

Как упоминалось ранее в главе 4, при сравнении эффектов ХПЯ диастереомеров NPX-Trp было обнаружено их различие. Для (R,S)-конфигурации наблюдается бóльшая поляризация на 4'(8')-протонах и 5' «напроксенового» фрагмента (поляризация на 5' протонах отсутствует в спектре ХПЯ (S,S)) (см. рисунок 56).

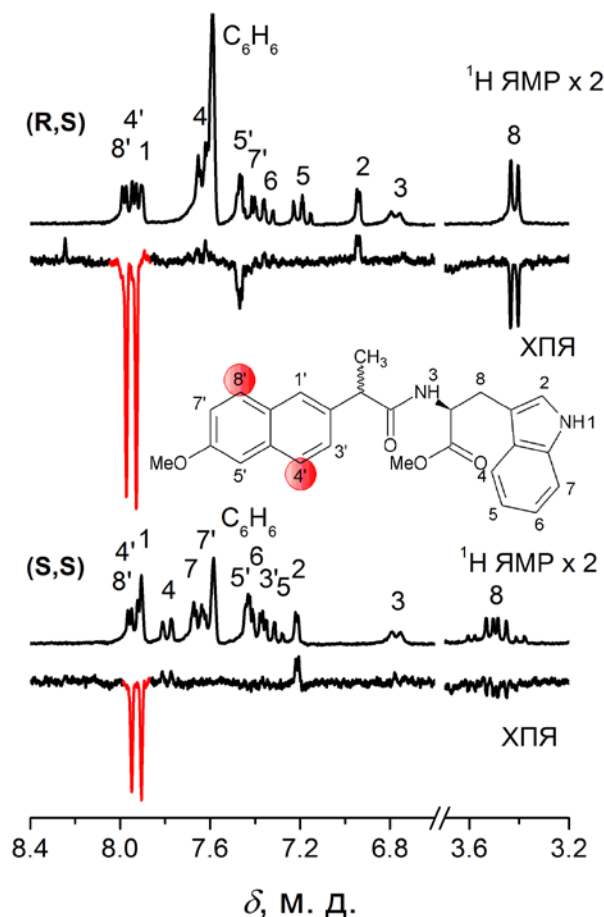


Рисунок 56. ¹H ЯМР и ХПЯ спектры диастереомеров диады NPX-Trp (5мМ) в смеси растворителей 40% бензол-d₆/60% ацетонитрил-d₃. Красным обозначены сигналы, демонстрирующие наибольшие различия в эффектах ХПЯ.

Что касается β -CH₂ протонов, наблюдаемое различие в эффектах ХПЯ трудно интерпретировать, поскольку существенно отличается структура сигналов в спектрах ЯМР (см. рисунок 51). Причина – разница между химическими сдвигами двух метиленовых протонов для (R,S) и (S,S)-конфигурации, которая для (S,S)-диастереомера сравнима с величинами спин-спинового взаимодействия между ними (ABX система) и больше таковой для (R,S) аналога (A₂X). Поэтому далее будут обсуждаться только

отличия в коэффициентах ХПЯ ароматических протонов, расположенных в 4' и 8' положениях.

В данной работе под коэффициентом усиления ХПЯ понимается коэффициент усиления сигнала ЯМР по сравнению с равновесным, отнесенный к одной радикальной паре (в нашем случае одному бирадикал-цвиттериону). Методика определения отношения коэффициентов усиления ХПЯ (К) диастереомеров подробно описана в экспериментальной части. Напомним, что ХПЯ в исследуемом процессе формируется в результате синглет-триплетной конверсии в бирадикал-цвиттерионе, который, в свою очередь, образуется в результате внутримолекулярного переноса электрона. Таким образом, у диады NPX-Trp в акте обратного переноса электрона коэффициент усиления значительно выше для (R,S)-диастереомера. Подобные эффекты наблюдались в различных смесях растворителей ацетонитрил/бензол, при этом максимальное значение величины К достигает 2. Для того, чтобы проверить является ли данный эффект особенностью системы NPX-Trp или характерен и для процессов переноса электрона у других диад, включающих энантиомеры напроксена, мы сравнили различия в эффектах ХПЯ диастереомеров другой диады – NPX-СуАА-Руг, где донором является N-метилпирролидин [15]. Оказалось, что у диастереомеров этой диады наблюдается различие в хим. сдвигах N-CH₃ протонов пирролидинового фрагмента. Типичная картина поляризации представлена на рисунке 57.

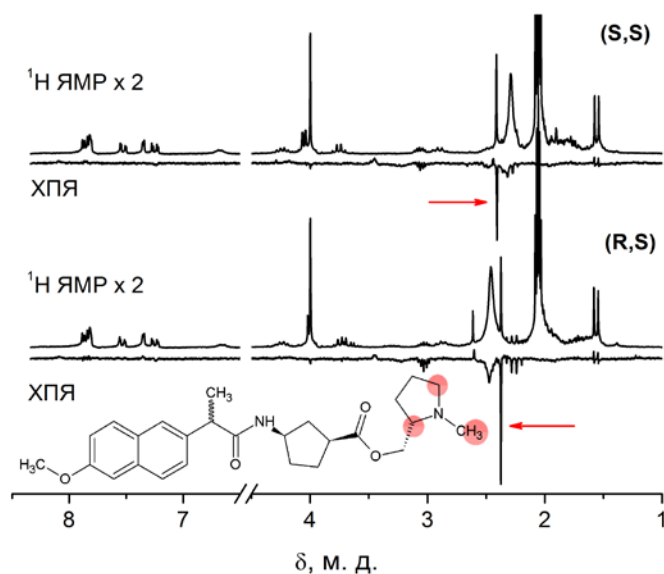


Рисунок 57. ¹H ЯМР и ХПЯ спектры диастереомеров диады NPX-СуАА-Руг (5 мМ) в ацетонитриле-d₃. Сигналы эмиссии в области 2.3 м.д. принадлежат N-CH₃ протонам (красные стрелки).

Наибольшие эффекты ХПЯ наблюдаются на N-CH₃ протонах пирролидинового фрагмента в соответствии с распределением спиновой плотности в бирадикал-цвиттерионе, где один из парамагнитных центров локализован на атоме азота. В этой диаде отношение коэффициентов усиления ХПЯ (R,S)/(S,S) диастереомеров составляет 2.3, что близко к таковому у диады с триптофаном.

Согласно установленной ранее схеме тушения возбужденного состояния напроксена N-метилпирролидином, в этой системе существует быстрое динамическое равновесие между эксиплексом и бирадикал-цвиттерионом, к которому чувствителен наблюдаемый коэффициент ХПЯ [15]. В связи с этим в настоящей работе анализировались коэффициенты усиления ХПЯ в полярном растворителе ацетонитриле, где равновесие эксиплекс – бирадикал-цвиттерион максимально сдвинуто в сторону бирадикал-цвиттериона, а эффективность ХПЯ зависит преимущественно от магниторезонансных параметров и времен жизни бирадикал-цвиттериона.

Для того, чтобы установить природу различий в коэффициентах усиления ХПЯ диастереомеров, были проведены расчеты различия вероятностей рекомбинации для ансамблей α и β ядерных спинов, т. е. гиперполяризации в зависимости от магниторезонансных параметров – констант СТВ и Δg , а также динамических параметров – времен жизни бирадикал-цвиттериона в рамках теории радикальных пар для высоких магнитных полей. Расчет проводился в рамках двухпозиционной модели и с использованием функции Грина [109, 110] (детальное описание расчета приводится в Приложении). В качестве модели пространственного движения радикальных центров системы выбрана двухпозиционная модель, предполагающая, что система может находиться в двух состояниях: нереакционноспособном состоянии I, когда реакционные центры находятся вне зоны контакта и реакционноспособном состоянии II непосредственного контакта радикальных центров. Общее время жизни системы – τ_c . На протяжении этого времени система многократно переходит из состояния I в состояние II и обратно. Суммарное время, которое система проводит в состоянии II – τ_r . Время, проводимое системой в реакционной зоне (τ_r) много меньше полного времени жизни системы (τ_c).

Далее была сделана попытка проследить, какие изменения магниторезонансных и динамических параметров приводят к двукратному различию в эффектах ХПЯ диастереомеров. Известно, что зависимость эффектов ХПЯ от константы СТВ имеет

колоколообразную форму для долгоживущих ион-радикальных пар [111]. При этом положение экстремума определяется следующим соотношением $a=2\Delta gB_0$. В исследуемых системах мы использовали следующие магниторезонансные параметры. Для поляризованных протонов $8'(4')$ «напроксенового» фрагмента в диаде NPX-Trp константа СТВ $a = 0.5$ мТл и $2\Delta gB_0 = 2 \times 3 \times 10^{-4} \times 4.7 \times 10^3 = 2.82$ мТл [95, 112]. В случае диады с пирролидином константа СТВ метильных протонов N-CH₃ равна 2.9 мТл, а эффективная константа 4.5 мТл и $2\Delta gB_0 = 2 \times 1 \times 10^{-3} \times 4.7 \times 10^3 = 9.4$ мТл [95]. Поскольку величины $2\Delta gB_0$ для обеих диад выше, чем константа СТВ, бóльшая поляризация (R,S)-диастереомеров будет соответствовать бóльшей константе СТВ для этой оптической конфигурации (качественная иллюстрация приведена на рисунке 58).

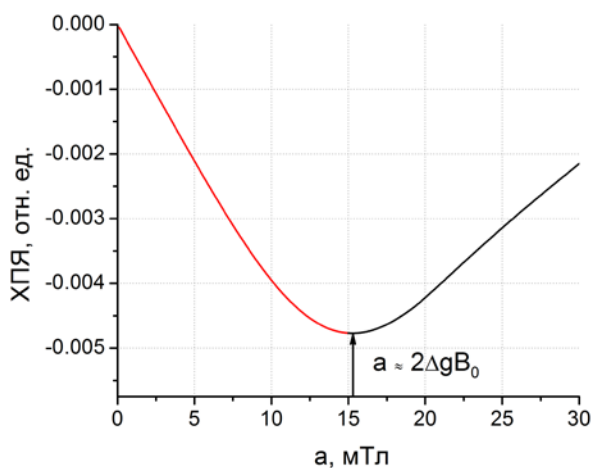


Рисунок 58. Качественный вид зависимости ХПЯ от величины константы СТВ.

Однако расчеты зависимости гиперполяризации от магниторезонансных параметров в рамках использованного одноядерного приближения возможны только для одной диады с пирролидином, для которой можно выделить группу из трех ядер с превалирующими константами СТВ (N-CH₃) (результаты расчетов приведены на рисунке 59) [111]. В случае диады NPX-Trp константы СТВ ароматических протонов не являются превалирующими в бирадикал-цвиттерине, и форма зависимости может значительно отличаться от представленной на рисунке 58 выше.

Если принять время жизни бирадикал-цвиттериона равное 10 нс, что близко к экспериментальным значениям – 7 и 9 нс для (R,S) и (S,S), соответственно [15], время пребывания в реакционной зоне $\tau_r=1$ нс и экспериментальное значение $\Delta g = 1 \times 10^{-3}$, тогда величины констант СТВ диастереомеров будут отличаться в 2 раза. Такой же результат будет наблюдаться при пропорциональном изменении величины Δg (рисунок 59).

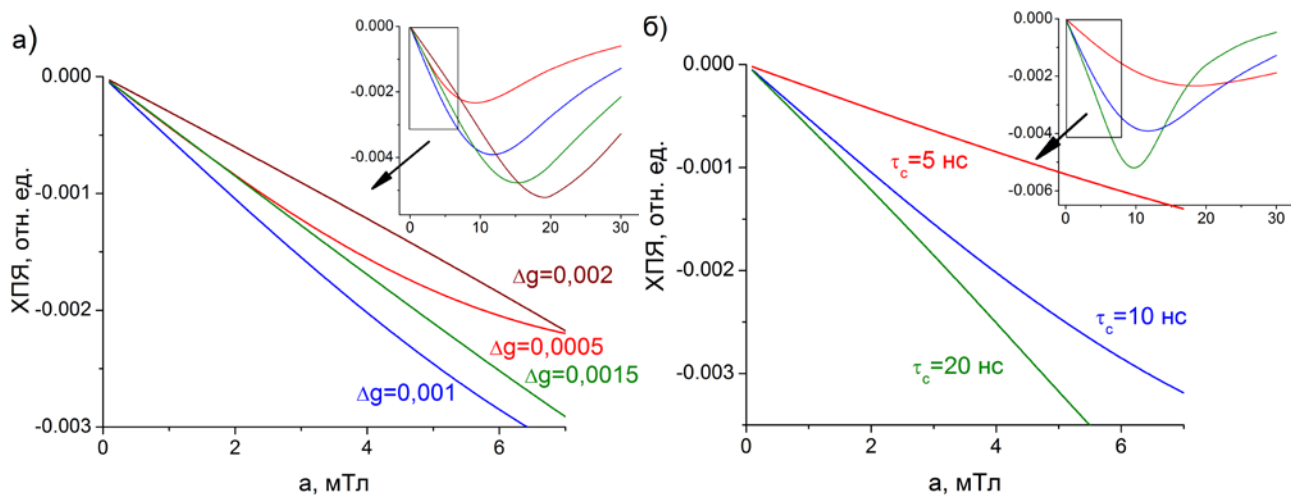


Рисунок 59. Начальный участок зависимости эффектов ХПЯ от константы СТВ а) при $B = 4.7$ Т, $\tau_c = 10$ нс, $\tau_r = 1$ нс и различных значениях Δg ; б) при $B = 4.7$ Т, $\tau_r = 1$ нс, $\Delta g = 0.001$ и различных значениях τ_c . Полный вид зависимостей представлен во вставках.

Однако, двукратные изменения g -факторов не представляются реальными. Согласно литературным данным g -факторы оптических изомеров хиральных радикалов отличаются на несколько единиц в четвертом знаке после запятой [113]. Что касается времен жизни бирадикал-цвиттериона τ_c , то экспериментальные данные указывают на гораздо меньшую разницу – 7 и 9 нс. Стоит отметить, что изменение времени пребывания в реакционной зоне τ_r при постоянном значении τ_c также могло бы приводить к изменению величины ХПЯ. Однако расчеты с варьированием размера реакционной зоны проводились ранее и показали, что изменение τ_r не может обеспечить наблюдаемый эффект [15].

Таким образом, сравнение результатов расчета и экспериментальных данных указывает на то, что наиболее вероятная причина различия эффектов ХПЯ – разница констант СТВ диастереомеров. Это также подтверждают и литературные данные об ЭПР исследованиях стабильных хиральных радикалов и бирадикалов в растворах и в твердости [114, 115].

Ощутимое различие в химических сдвигах протонов $N-CH_3$ группы (R,S) и (S,S)-диастереомеров позволило также для увеличения точности измерений соотношения коэффициентов ХПЯ проводить их в смеси двух диастереомеров в одном образце, варьируя соотношение концентраций (см. рисунок 60).

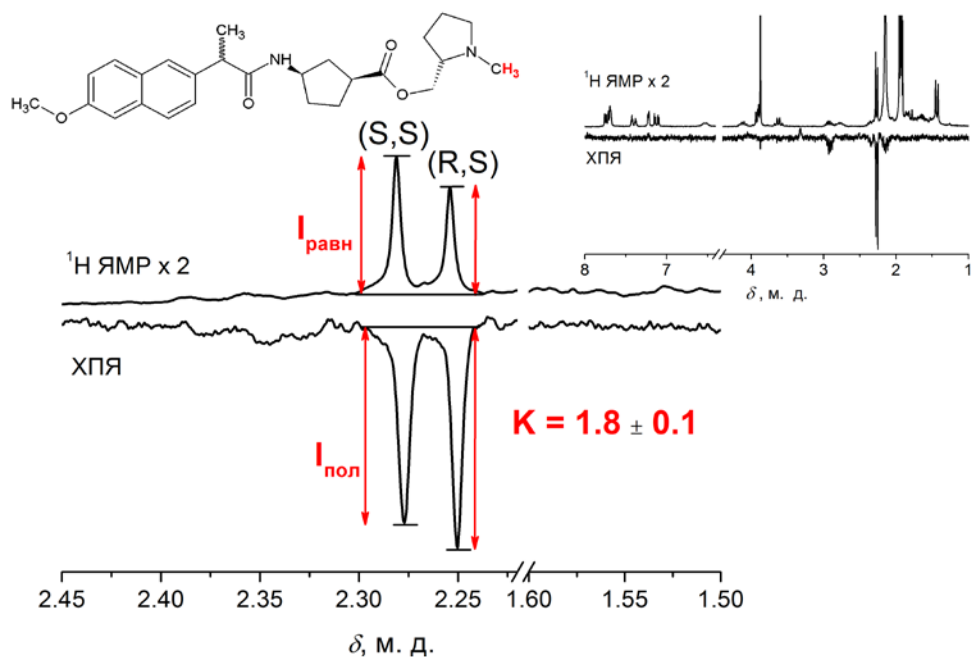


Рисунок 60. ^1H ЯМР и ХПЯ N-CH_3 -протонов (S,S) (слева) и (R,S)-NPX-СуАА-Руг (справа) в смеси диастереомеров (R,S)/(S,S) = 0.8 в ацетонитриле- d_3 . Во вставке представлены полные спектры.

В ходе этих экспериментов была установлена еще одна особенность эффектов ХПЯ в хиральных системах – зависимость коэффициента усиления ХПЯ от соотношения концентраций диастереомеров при облучении их смеси (см. таблицу 7).

Таблица 7. Отношения равновесных сигналов CH_3 протонов N-метилпирролидинового фрагмента (R,S) и (S,S)-NPX-СуАА-Руг до УФ-облучения и отношение коэффициентов усиления ХПЯ (K) для этих диастереомеров.

Отношение концентраций до облучения (R,S)/(S,S)	Отношение коэффициентов усиления ХПЯ диастереомеров, K
0.4	1.70 ± 0.09
0.7	1.80 ± 0.09
0.8	1.8 ± 0.1
1.0	1.9 ± 0.1
1.3	2.0 ± 0.1
1.8	2.3 ± 0.1
2.1	2.3 ± 0.1
2.3	2.3 ± 0.1

Наличие зависимости отношения коэффициентов ХПЯ (К) от соотношения концентраций диастереомеров в смеси прямо указывает на влияние межмолекулярного взаимодействия на перенос электрона в диадах. Анализ литературных данных о склонности замещенных нафталинов, включая напроксен, образовывать ассоциаты, позволяет предположить, что таким процессом могла бы быть самоассоциация диад, например, образование димеров [115–118]. Поскольку исследуемые системы NPX-Trp и NPX-CyAA-Pyr содержат «напроксеновую» часть и «хвост» – донорную группу и мостик, включающий амидный фрагмент -C(O)NH-, то возможно также образование ассоциатов за счет водородных связей между амидными группами двух молекул. Данные рентгеноструктурного анализа монокристалла для диады с триптофаном подтвердили образование ассоциатов за счет Н-связей (рисунок 61) [119].

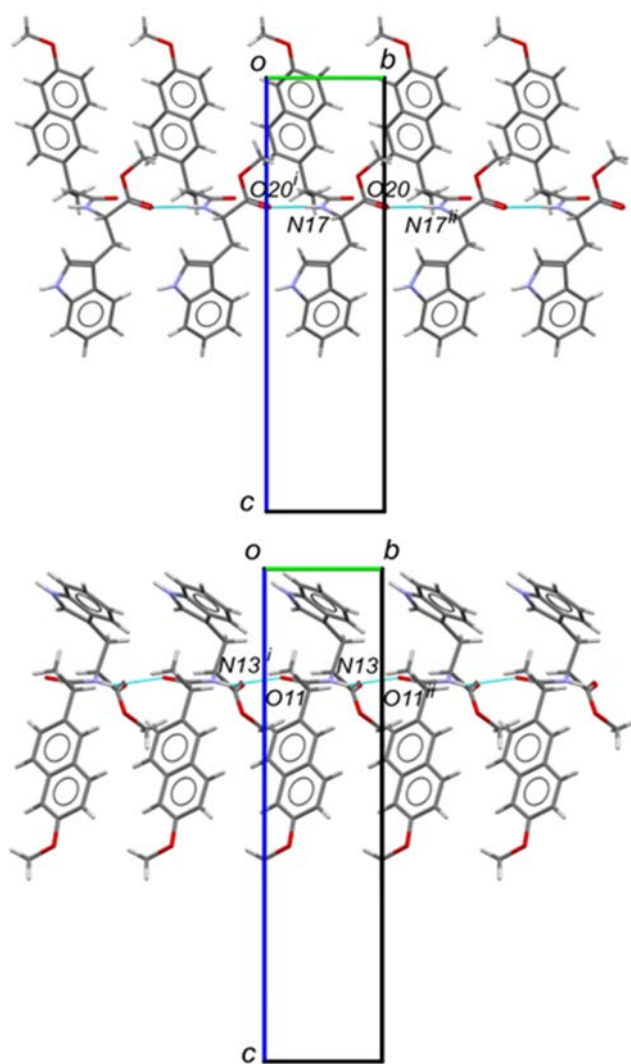


Рисунок 61. Кристаллическая упаковка вдоль осей *b* и *c* (сверху вниз) для (S)-NPX-(S)-Trp.

Данные рентгеноструктурного анализа монокристалла при комнатной температуре.

Согласно литературным данным в исследуемых растворах возможно не только образование димеров, но описаны и столкновительные комплексы с участием амидной группы, а также индольного кольца с ароматическими растворителями, включая бензол [120, 121]. Кроме того, необходимо отметить различия во влиянии полярных (в частности, ацетонитрила) и неполярных растворителей: первые способствуют образованию самоассоциатов, а вторые образуют вышеупомянутые комплексы с растворенными веществами [114, 120] (рисунок 62).

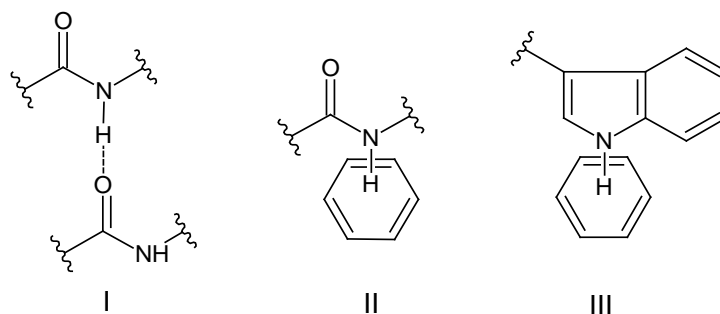


Рисунок 62. Примеры самоассоциации (I) и столкновительных комплексов (II и III) с ароматическими растворителями, которые образуют активные группы, входящие в состав диад [122].

По-видимому, с этими обстоятельствами связаны изменения в величинах K в различных смесях растворителей $\%CD_3CN/\%C_6D_6/\%H_2O$ (объемные доли): 1.5 ± 0.1 (19.9/80/0.1) $<$ 1.7 ± 0.1 (59.8/40/0.2) $<$ 2.0 ± 0.1 (79.7/20/0.3). Резонно предположить, что изменения K для диастереомеров диады NPX-Trp в смеси растворителей, содержащих различные объемные доли ацетонитрила и бензола, могут быть результатом ассоциации диастереомеров в ацетонитриле и образования слабых столкновительных комплексов между диадой и бензолом [114, 121]. Доля ассоциатов диад и слабых столкновительных комплексов может варьироваться в зависимости от концентрации бензола в смеси.

Кроме того, изменения химических сдвигов протонов диад в зависимости от содержания воды в растворах, а также изменение химических сдвигов самой воды позволяет предположить, что она также может влиять на процесс ассоциации диад (рисунок 63).

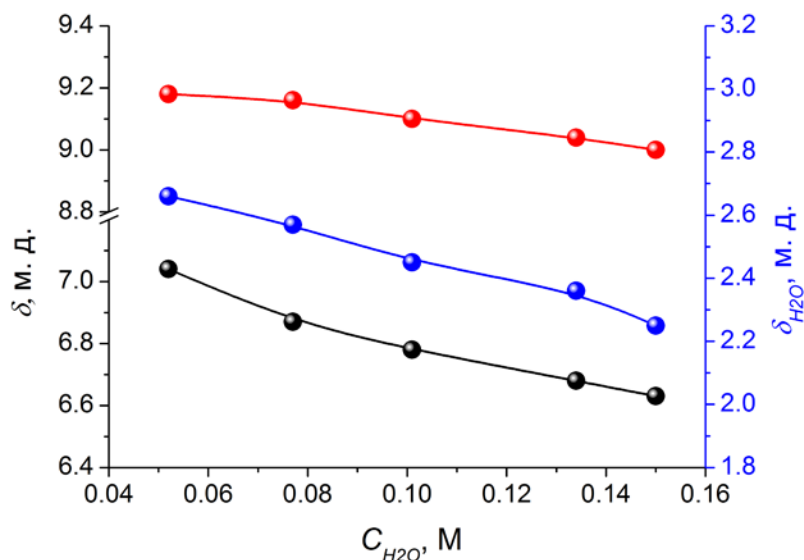


Рисунок 63. Зависимость химических сдвигов протонов NH индольного фрагмента (красный), NH(C=O) (черный) диады (R)-NPX-(S)-Trp (1×10^{-3} M) и воды (синий) от концентрации воды в смеси растворителей $CD_3CN/C_6D_6/H_2O$.

Принимая во внимание эти данные, а также результаты рентгеноструктурных исследований диады с триптофаном, указывающие на димеризацию за счет амидных групп, можно предложить схему, представленную на рисунке 64. Это примеры двух процессов, протекающих в растворах диад, где вода может как конкурировать с ассоциацией, так и включаться в состав ассоциата. Данные в пользу последнего предоставляют рентгеноструктурные исследования различных ассоциатов [123].

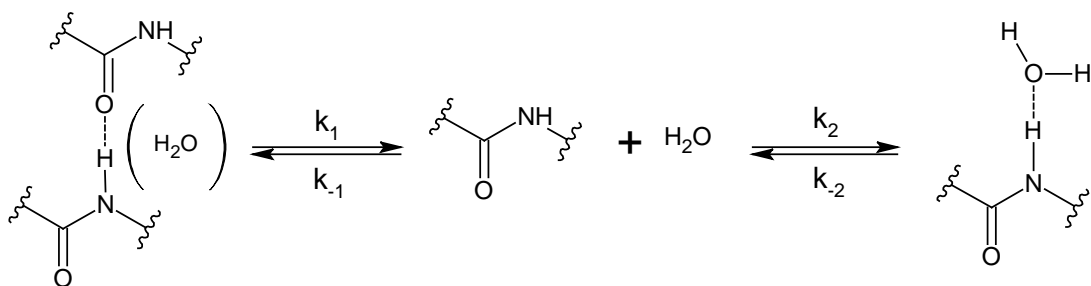


Рисунок 64. Возможное участие молекул воды в образовании водородных связей и димеризации диады.

С учетом всего изложенного можно ожидать, что различия в эффектах сольватации диастереомеров диад могут вести к различиям в конформациях бирадикал-цвиттериона и, следовательно, к различиям в эффективности синглет-триплетной конверсии, которая отвечает за формирование эффектов ХПЯ.

Для проверки гипотезы о воздействии ассоциации диад на эффективность переноса электрона в диастереомерах была предпринята попытка рассчитать коэффициенты ХПЯ в рамках схемы, где поляризация формируется в гомо- и гетеро-димерах диад: (R,S-R,S), (S,S-S,S) и (R,S-S,S). За основу модели была взята популярная концепция Франка, описывающая спонтанное хиральное обогащение в природных процессах [124]. Она основана на простой идее: оптический изомер действует как катализатор в реакции собственного воспроизводства и в то же время ингибирует образование своего оптического антипода. Применение данной модели к нашему случаю будет означать, что перенос электрона должен происходить более эффективно в гомо- (D_{SS-SS}/D_{RS-RS}), чем в гетеро-димерах (D_{RS-SS}) диад (рисунок 65). Мерой эффективности в представленной схеме являются коэффициенты усиления ХПЯ (α и β).

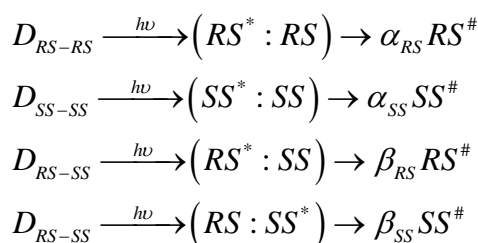
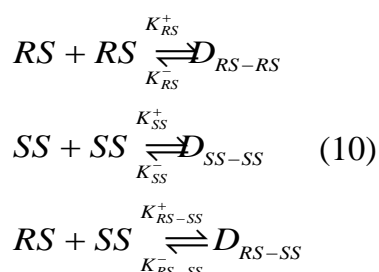


Рисунок 65. Фотоиндуцированный перенос электрона в гомо- (D_{RS-RS} , D_{SS-SS}) и гетеро-димерах (D_{RS-SS}) диад. Решетка обозначает поляризованную диаду, α и β - коэффициенты усиления ХПЯ, $\alpha \gg \beta$.

В расчете принималось, что концентрация димеров значительно выше, чем мономеров, а величины ХПЯ в соответствии с экспериментальными данными в (R,S-R,S) димерах в два раза выше, чем в (S,S-S,S) аналогах. Концентрации димеров рассчитывали методом стационарных концентраций.



$$\begin{aligned}\frac{d[D_{RS-RS}]}{dt} &= K_{RS}^+ [RS]^2 - K_{RS}^- [D_{RS-RS}] = 0 \\ \frac{d[D_{SS-SS}]}{dt} &= K_{SS}^+ [SS]^2 - K_{SS}^- [D_{SS-SS}] = 0 \\ \frac{d[D_{RS-SS}]}{dt} &= K_{RS-SS}^+ [RS] \cdot [SS] - K_{RS-SS}^- [D_{RS-SS}] = 0\end{aligned}\quad (11)$$

Отсюда константы стабильности димеров:

$$\begin{aligned}K_{RS} &= \frac{K_{RS}^+}{K_{RS}^-} = \frac{[D_{RS-RS}]}{[RS]^2} \\ K_{SS} &= \frac{K_{SS}^+}{K_{SS}^-} = \frac{[D_{SS-SS}]}{[SS]^2} \\ K_{RS-SS} &= \frac{K_{RS-SS}^+}{K_{RS-SS}^-} = \frac{[D_{RS-SS}]}{[RS] \cdot [SS]}\end{aligned}\quad (12)$$

Соотношение между начальной концентрацией диастереомеров $[RS]_0$ и $[SS]_0$ и текущей концентрацией димеров и мономеров равно:

$$\begin{aligned}[RS]_0 &= [RS] + 2[D_{RS-RS}] + [D_{RS-SS}] \\ [SS]_0 &= [SS] + 2[D_{SS-SS}] + [D_{RS-SS}]\end{aligned}\quad (13)$$

Поскольку, как упоминалось выше, считается, что концентрация димеров значительно выше, чем мономеров, то:

$$\begin{aligned}[RS]_0 &= 2[D_{RS-RS}] + [D_{RS-SS}] \\ [SS]_0 &= 2[D_{SS-SS}] + [D_{RS-SS}]\end{aligned}\quad (14)$$

Используя уравнение 12, получаем:

$$K_{RS} [RS]^2 = \frac{1}{2} (2K_{SS} [SS]^2 + [RS]_0 - [SS]_0) \quad (15)$$

Далее, подставляя (15) в (14), после преобразований получаем биквадратное уравнение (16) относительно $[SS]$:

$$\left(K_{RS-SS}^2 \frac{K_{SS}}{K_{RS}} - 4K_{SS}^2 \right) [SS]^4 + \left(4K_{SS} [SS]_0 + K_{RS-SS}^2 \frac{[RS]_0 - [SS]_0}{2} \right) [SS]^2 - [SS]_0^4 K_{RS} = 0 \quad (16)$$

Решая это уравнения и выбирая корень, имеющий физическое значение, получаем (17) для равновесной концентрации (S,S)-диастереомера:

$$[SS]^2 = \frac{1}{4} \frac{8K_{SS} K_{RS} [SS]_0 - K_{RS-SS}^2 ([SS]_0 - [RS]_0) - \sqrt{K_{RS-SS}^4 ([SS]_0^2 - 2[SS]_0 [RS]_0 + [RS]_0^2) + 16K_{SS} K_{RS} K_{RS-SS}^2 [SS]_0 [RS]_0}}{K_{SS} (4K_{SS} K_{RS} - K_{RS-SS}^2)} \quad (17)$$

С учетом уравнений (10), (12) и (14) отношение величин ХПЯ (I) для (R,S) и (S,S) будет определяться уравнением (18):

$$\frac{I_{RS}}{I_{SS}} = \frac{\alpha_{RS}[D_{RS-RS}] + \beta_{RS}[D_{RS-SS}]}{\alpha_{SS}[D_{SS-SS}] + \beta_{SS}[D_{RS-SS}]} = \frac{\beta_{RS}[RS]_0 + (\alpha_{RS} - \beta_{RS})([RS]_0 - [SS]_0 + 2K_{SS}[SS]^2)}{\beta_{SS}[SS]_0 + (\alpha_{RS} - \beta_{RS})2K_{SS}[SS]^2} \quad (18)$$

Если разделить отношение в уравнении (18) на начальную концентрацию диастереомеров, то получится величина $K_C = I_{RS}[SS]_0 / I_{SS}[RS]_0$ – расчетный аналог экспериментальной величины K . На рисунке 66 представлены зависимости экспериментальных K и рассчитанных K_C от соотношения концентраций диастереомеров.

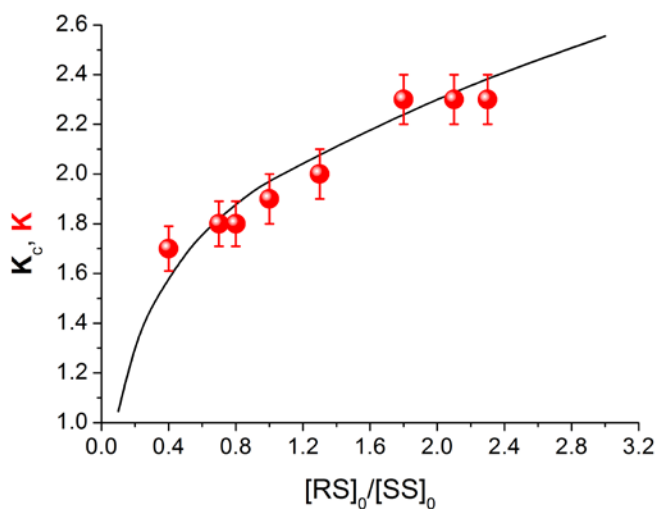


Рисунок 66. Экспериментальная (K , красные точки) и расчетная (K_C , черная линия) зависимости отношений коэффициентов усиления ХПЯ от отношения концентраций диастереомеров диады NPX-СуАА-Руг.

Таким образом, соответствие результатов моделирования и экспериментальной зависимости коэффициента усиления ХПЯ (K_C и K) от отношения концентрации диастереомеров в облучаемой смеси может служить свидетельством в пользу гипотезы о возможности влияния димеризации на эффективность переноса электрона в диадах.

В заключение отметим, что согласно результатам данной работы, а также анализу литературных данных [100–102] наиболее вероятной причиной различий коэффициентов ХПЯ диастереомеров является различие констант СТВ в образованных из них бирадикал-цивиттерионах. В свете гипотезы о том, что перенос электрона происходит именно в гомо- и гетеро-димерах диад, резонно предположить, что одной из причин различий в эффективности обратного переноса электрона могут быть различия в конформациях димеров.

Полученные результаты о различии в распределении спиновой плотности также позволяют ожидать различия и электронных плотностей парамагнитных интермедиатов диастереомеров. Это, в свою очередь, может быть одной из причин различий в лечебной активности энантиомеров лекарств при условии, что фермент-субстратное и лиганд-рецепторное взаимодействие включает стадии с переносом заряда. Напомним, что установление природы различий в активности энантиомеров в биологических процессах до сих пор считается одной из важнейших нерешенных проблем в биологической химии [125].

Основные результаты и выводы

- 1) Обнаружена корреляция между квантовыми выходами флуоресценции и квантовыми выходами фоторазложения для дитерпенового алкалоида лаппаконитина и его замещенных аналогов. Ожидается, что существование корреляции «структура-свойство» позволит использовать фотофизические характеристики для оценки потенциальной фототоксичности биологически активных лаппаконитинов и других соединений, в которых фоторазложению предшествует интеркомбинационная конверсия.
- 2) Совместный анализ данных ХПЯ и времяразрешенной флуоресценции позволил обнаружить внутримолекулярный фотоиндуцированный перенос электрона между донорным и акцепторным фрагментами диады (S)/(R)-NPX-(S)-Trp и установить различие в его скоростях (стереоселективность) для (R,S)- и (S,S)-диастереомеров.
- 3) С помощью анализа спектров ^1H ЯМР диады (R)-NPX-(S)-Trp обнаружено изменение оптической конфигурации (хиральная инверсия), происходящее под действием УФ облучения. На основании анализа эффектов ХПЯ, сформированных в образовавшемся при облучении бирадикале, предложен механизм хиральной инверсии. Обращение конфигурации происходит в акте обратимого переноса атома водорода между парамагнитными центрами, которыми являются прохиральные атомы углерода «напроксенового» и «триптофанового» фрагментов бирадикала.
- 4) Обнаружены различия в коэффициентах усиления ^1H ХПЯ (спиновая селективность), возникающие при УФ облучении диастереомеров диад, содержащих (S)/(R)-напроксен и доноры электрона: (S)-триптофан и (S)-N-метилпирролидин. Показано, что спиновая селективность обратного переноса электрона может быть связана с различием магниторезонансных параметров в промежуточных бирадикал-цвиттерионах диастереомеров.

Приложение

В основе расчетов эффектов ХПЯ лежит упрощенная схема фотопревращений для диады NPX-СуАА-Пур, представленная на рисунок П-1.

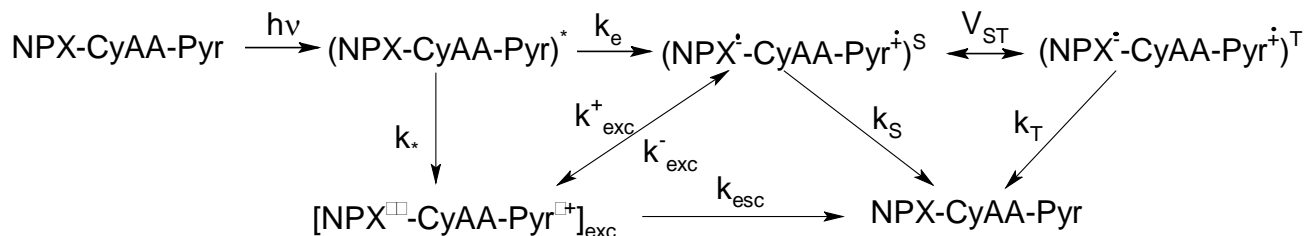


Рисунок П-1. Схема фотоиндуцированных процессов в диаде NPX-Пур.

Расчеты эффектов ХПЯ были проведены в рамках формализма матрицы плотности и решения стохастического уравнения Луивилля с использованием функции Грина и обратного преобразования Лапласа [110,126]. Вероятность рекомбинации радикальной пары определяется вектором спинового состояния

$$\hat{w} = \hat{U}(1 + \hat{g}\hat{U})^{-1} \hat{g}\rho_0,$$

где матрица \hat{U} – набор констант скорости рекомбинации для определенных спиновых состояний, матрица \hat{g} описывает спиновую динамику РП, а ρ_0 – исходная матрица плотности РП.

В качестве модели пространственного движения радикальных центров выбрана двухпозиционная модель, предполагающая, что система может находиться в двух состояниях – неактивном состоянии I, когда реакционные центры находятся вне зоны контакта и активном состоянии II непосредственного контакта радикальных центров (рисунок П-2).

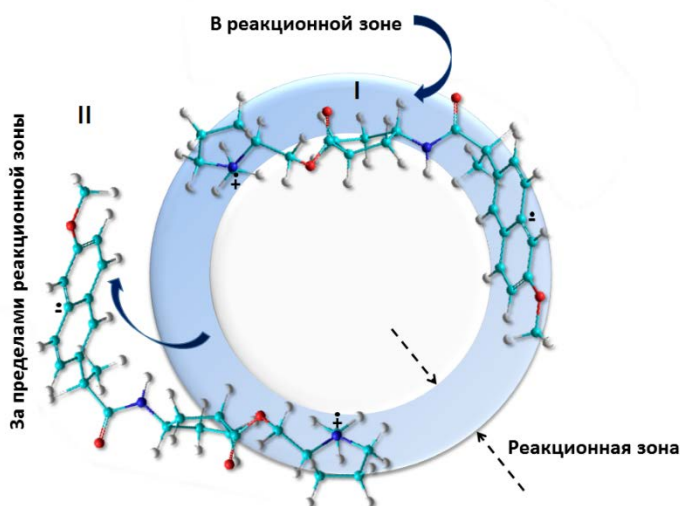


Рисунок П2. Схема двухпозиционной модели пространственного движения радикальных центров.

Общее время жизни равно τ_c . На протяжении этого времени система многократно переходит из состояния I в состояние II, и обратно. Суммарное время, которое система проводит в состоянии II, – τ_r . Время, проводимое системой в реакционной зоне (τ_r) много меньше полного времени жизни системы (τ_c). Исходное спиновое состояние РП синглетное, реакционноспособное состояние может быть, как синглетным, так и триплетным. Чтобы определить вероятность рекомбинации, необходимо найти τ_s – время, которое система проводит в реакционной зоне, находясь в реакционноспособном синглетном состоянии. Вероятность рекомбинации синглетного спинового состояния из синглетного предшественника описывается как $w^s = \frac{U_0 \tau_s}{1 + U_0 \tau_s}$, где U_0 – квазимономолекулярная константа скорости рекомбинации.

В рамках схемы фотоиндуцированных процессов в диаде (рисунок П-1), выражение для вероятности рекомбинации принимает следующий вид

$$w = \frac{U_s \tau_s + k_r \tau_r + U_s k_r \cdot (\tau_s^2 - \tau_r^2)}{1 + U_s \tau_s + k_r \tau_s + U_s k_r \cdot (\tau_s^2 - \tau_r^2)} \cdot \rho,$$

где $\rho = \frac{\left(\frac{k_{exc}^+ \cdot k_*}{k_{exc}^{esc} + k_{exc}^-} + k_e \right)}{(k_e + k_*)} \rho_0$ – эффективная матрица плотности РП, $U_s = k_s + \frac{k^{esc}}{k_{exc}^{esc} + k_{exc}^+} \cdot k_{exc}^-$ –

эффективная константа рекомбинации для синглетного состояния. Времена жизни для

синглетного и триплетного состояний для РП, образованной из синглетного состояния и

$$\tau_T = \frac{1}{2} \left(g(0) - \frac{|g(i\delta)|^2}{\operatorname{Re}(g(i\delta))} \right), \quad g(s) - \text{Лаплас-образ функции пространственного движения,}$$

которая в данном случае
$$g(s) = \frac{s + \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_2}}{s \cdot \left(s + \frac{1}{\tau_2} + \frac{1}{\tau_c} \right) + \frac{1}{\tau_1} \cdot \left(s + \frac{1}{\tau_c} \right)}, \quad \tau_1 = \frac{\tau_r}{n+1}, \quad \tau_2 = \frac{\tau_c}{n}, \quad n -$$

количество повторных контактов, $\delta = \frac{\Delta\omega}{2} \pm \frac{a}{4}$ - параметр синглет-триплетного

смешивания для проекций ядерных спинов.

Список литературы

1. Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y.M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U.G., Lopez, M.G., Olaso-Gonzalez, G., Petry, A., Schulz, R., Vina, J., Winyard, P., Abbas, K., Ademowo, O.S., Afonso, C.B., Andreadou, I., Antelmann, H., Antunes, F., Aslan, M., Bachschmid, M.M., Barbosa, R.M., Belousov, V., Berndt, C., Bernlohr, D., Bertrán, E., Bindoli, A., Bottari, S.P., Brito, P.M., Carrara, G., Casas, A.I., Chatzi, A., Chondrogianni, N., Conrad, M., Cooke, M.S., Costa, J.G., Cuadrado, A., My-Chan Dang, P., De Smet, B., Debelec-Butuner, B., Dias, I.H.K., Dunn, J.D., Edson, A.J., El Assar, M., El-Benna, J., Ferdinandy, P., Fernandes, A.S., Fladmark, K.E., Förstermann, U., Giniatullin, R., Giricz, Z., Görbe, A., Griffiths, H., Hampl, V., Hanf, A., Herget, J., Hernansanz-Agustín, P., Hillion, M., Huang, J., Ilikay, S., Jansen-Dürr, P., Jaquet, V., Joles, J.A., Kalyanaraman, B., Kaminsky, D., Karbaschi, M., Kleanthous, M., Klotz, L.O., Korac, B., Korkmaz, K.S., Koziel, R., Kračun, D., Krause, K.H., Křen, V., Krieg, T., Laranjinha, J., Lazou, A., Li, H., Martínez-Ruiz, A., Matsui, R., McBean, G.J., Meredith, S.P., Messens, J., Miguel, V., Mikhed, Y., Milisav, I., Milković, L., Miranda-Vizueté, A., Mojović, M., Monsalve, M., Mouthuy, P.A., Mulvey, J., Münzel, T., Muzykantov, V., Nguyen, I.T.N., Oelze, M., Oliveira, N.G., Palmeira, C.M., Papaevgeniou, N., Pavićević, A., Pedre, B., Peyrot, F., Phylactides, M., Pircalabioru, G.G., Pitt, A.R., Poulsen, H.E., Prieto, I., Rigobello, M.P., Robledinos-Antón, N., Rodríguez-Mañas, L., Rolo, A.P., Rousset, F., Ruskovska, T., Saraiva, N., Sasson, S., Schröder, K., Semen, K., Seredenina, T., Shakirzyanova, A., Smith, G.L., Soldati, T., Sousa, B.C., Spickett, C.M., Stancic, A., Stasia, M.J., Steinbrenner, H., Stepanić, V., Steven, S., Tokatlidis, K., Tuncay, E., Turan, B., Ursini, F., Vacek, J., Vajnerova, O., Valentová, K., Van Breusegem, F., Varisli, L., Veal, E.A., Yalçın, A.S., Yelisyyeva, O., Žarković, N., Zatloukalová, M., Zielonka, J., Touyz, R.M., Papapetropoulos, A., Grune, T., Lamas, S., Schmidt, H.H.H.W., Di Lisa, F., Daiber, A. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS) // *Redox. Biol.* – 2017. – V. 13. – P. 94-162.
2. Nogrady, Th., Weaver, D. F. *Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach.* – New York: Oxford University Press, 2005. – 649 p.
3. Lhiaubet-Vallet, V., Miranda, M. A. *CRC handbook of organic photochemistry and photobiology // Phototoxicity of drugs / Eds. A. Griesbeck, M. Oelgemöller, F. Ghetti.* – Boca Raton: CRC Press, 2012. – V. 2. – P. 1541-1555.
4. Nguyen, L. A., He, H., Pham-Huy, C. Chiral drugs: an overview // *Int. J. Biomed. Sci.* – 2006. – V. 2. – N 2. – P. 85-100.
5. Wang, F. P., Chen, Q. H., Liu, X. Y. Diterpenoid alkaloids // *Nat. Prod. Rep.* – 2010. – V. 27. – N 4. – P. 529-570.
6. Wright, S. N. Irreversible Block of Human Heart (hH1) Sodium Channels by the Plant Alkaloid Lappaconitine // *Mol. Pharmacol.* – 2001. – V. 59. – N 2. – P. 183-192.
7. Schlotgauer, A.A., Klimentiev, V.I., Kornievskaya, V.S., Polyakov, N.E., Stepanov, A.A., Vasilevsky, S.F., Leshina, T.V. Influence of Substituents on the Lappaconitine

- Acetylenic Derivatives Photodegradation // *Appl. Magn. Reson.* – 2015. – V. 46. – P. 559-573.
8. Rentsch, K.M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2002. – V. 54. – P. 1-9.
 9. Brocks, D. R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics // *Biopharm. Drug Dispos.* – 2006. – V. 27. – P. 387-406.
 10. Patocka, J., Dvorak, A. Biomedical aspects of chiral molecules // *J. Appl. Biomed.* – 2004. – V. 2. – P. 95-100
 11. Magin, I. M., Polyakov, N. E., Khramtsova, E. A., Kruppa, A. I., Tsentalovich, Yu. P., Leshina, T. V., Miranda, M. A., Nuin, E., Marin, M. L. Spin Effects in Intramolecular Electron Transfer in Naproxen-N-methylpyrrolidine Dyad // *Chem. Phys. Lett.* – 2011. – V. 516. – P. 51-55.
 12. Magin, I. M., Polyakov, N. E., Khramtsova, E. A., Kruppa, A. I., Stepanov, A. A., Purtov, P. A., Leshina, T. V., Tsentalovich, Yu. P., Miranda, M. A., Nuin, E., Marin, M. L. Spin Chemistry Investigation of Peculiarities of Photoinduced Electron Transfer in Donor–Acceptor Linked System // *Appl. Magn. Reson.* – 2011. – V. 41. – P. 205-220.
 13. Khramtsova, E. A., Plyusnin, V. F., Magin, I. M., Kruppa, A. I., Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Nuin, E., Marin, M. L., Miranda, M. A. Time-Resolved Fluorescence Study of Exciplex Formation in Diastereomeric Naproxen–Pyrrolidine Dyads // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – V. 117. – P. 16206-16211.
 14. Magin, I. M., Polyakov, N. E., Kruppa, A. I., Purtov, P. A., Leshina, T. V., Kiryutin, A. S., Miranda, M. A., Nuin, E., Marin, M. L. Low Field Photo-CIDNP in the Intramolecular Electron Transfer of Naproxen–Pyrrolidine Dyads. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2016. – V. 18. – P. 901-907.
 15. Khramtsova, E. A., Sosnovsky, D. V., Ageeva, A. A., Nuin, E., Marin, M. L., Purtov, P. A., Borisevich, S. S., Khursan, S. L., Roth, H. D., Miranda, M. A., Plyusnin, V. F., Leshina, T. V. Impact of Chirality on the Photoinduced Charge Transfer in Linked Systems Containing Naproxen Enantiomers // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2016. – V. 18. – P. 12733-12741.
 16. Храмова, Е. А. Фотоиндуцированные процессы переноса заряда в хиральных связанных системах: Дис. канд. хим. наук: 02.00.04 / Е. А. Храмова. Ин-т неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН. - Новосибирск, 2016. – 103 с.
 17. Davies N. M. Chiral inversion // *Chirality in Drug Design and Development* / Eds. I. K. Reddy, R. Mehvar. – Boca Raton: CRC Press, 2004. – P. 309-345.
 18. Adams, S.S., Bresloff, P., Mason, C.G. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (—)-isomer // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1976. – V. 28. – P. 256-257.
 19. Kaiser, D.G., Van-Giessen, G.J., Reischer, R.J., Wechter, W.J. Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomer in humans // *J. Pharm. Sci.* – 1976. – V. 65. – P. 269-273.
 20. Aboul-Enein, H.Y., Wainer, I.W. The impact of stereochemistry on drug development and use. – New York: John Wiley and Sons, 1997. – 728 p.

21. Wsol, V., Skalova, L., Szotakova, B. Chiral inversion of drugs: coincidence or principle? // *Curr. Drug Metab.* – 2004. – V. 5. – P. 517-533.
22. Атауллаханов, Ф. И., Жаботинский, А. М., Фотоиндуцированное восстановление феррипероксидазы 1. Реакция с никотинамидаденин-динуклеотидом. // *Биофизика.* – 1975. – Т. 20. – С. 596-601.
23. Afanasyeva, M.S., Taraban, M.B., Purtov, P.A., Leshina, T.V., Grissom, C. B. Magnetic spin effects in enzymatic reactions: radical oxidation of NADH by horseradish peroxidase II // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – N 26. – P. 8651-8658.
24. Polyakov, N. E., Taraban, M. B., Leshina, T. V. Photo-CIDNP study of the interaction of tyrosine with nifedipine. An attempt to model the binding between calcium receptor and calcium antagonist nifedipine // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – V. 80. – N 3. – P. 565-571.
25. Pan, A.C., Borhani, D. W., Dror, R. O., Shaw, D. E. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics // *Drug Discov. Today.* – 2013. – V. 18. – N 13-14. – P. 667-673.
26. Roche, V. F. Antihyperlipidemic statins: A self-contained, clinically relevant medicinal chemistry lesson // *Am. J. Pharm. Educ.* – 2005. – V. 69. – N 4. – P. 546-560.
27. Schleifer, K.-J. Stereoselective Characterization of the 1,4-Dihydropyridine Binding Site at L-Type Calcium Channels in the Resting State and the Opened/Inactivated State // *J. Med. Chem.* – 1999. – V. 42. – N 12. – P. 2204-2211.
28. Alexander, S.P., Mathie, A., Peters, J.A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – V. 164. – N S1. – P. S1-S2.
29. Салмина, А.Б., Шнайдер, Н.А., Михуткина, С.В. Современные представления об ионных каналах и каналопатиях (обзор литературы) // *Сибирское медицинское обозрение.* – 2005. – № 1. – С. 75-78.
30. Фундаментальная и клиническая физиология: учеб. для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А.Г. Камкина, А.А. Каменского. – М.: Академия, 2004. – 1072 с.
31. Wappl, E., Mitterdorfer, J., Glossmann, H., Striessnig, J. Mechanism of dihydropyridine interaction with critical binding residues of L-type Ca²⁺ channel alpha 1 subunits // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – N 16. – P. 12730-12735.
32. Catterall, W. A., Swanson, T. M. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels // *Mol. Pharmacol.* – 2015. – V. 88. – N 1. – P. 141-150.
33. Catterall, W.A. Sodium Channels // *Encyclopedia of Neuroscience* / Ed. L. R. Squire. – Amsterdam: Elsevier, 2009. – P. 65-71.
34. Triggle, D. J. The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels // *Eur. J. Pharmacol.* – 1999. – V. 375. – N 1-3. – P. 311-25.
35. Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Salakhutdinov, N. F., Konovalova, T. A., Kispert, L. D. Antioxidant and redox properties of supramolecular complexes of carotenoids with β -glycyrrhizic acid // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – V. 40. – N 10. – P. 1804-1809.

36. Polyakov, N. E., Leshina, T. V. Redox reactions of natural alkaloid lappaconitine // *Russ. Chem. Bull.* – 2007. – V. 56. – N 4. – P. 631-642.
37. Istvan, E. S., Deisenhofer, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase // *Science.* – 2001. – V. 292. – N 5519. – P. 1160-1164.
38. Wassmann, S., Laufs, U., Müller, K., Konkol, C., Ahlbory, K., Bäumer, A.T., Linz, W., Böhm, M., Nickenig, G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – V. 22. – N 2. – P. 300-305.
39. Franzoni, F., Quinones-Galvan, A., Regoli, F., Ferrannini, E., Galetta, F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins // *Int. J. Cardiol.* – 2003. – V. 90. – P. 317-321.
40. Puttananjaiah, M.-K.H., Dhale, M.A., Gaonkar, V., Keni, S. Statins: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors demonstrate anti-atherosclerotic character due to their antioxidant capacity // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2011. – V. 163. – N 2. – P. 215-222.
41. Schlotgauer, A.A., Petrova, S.S., Kruppa, A.I., Leshina, T. V. Photoinduced Interaction of Atorvastatin with Acetophenone // *Appl. Magn. Reson.* – 2015. – V. 46. – P. 219-237.
42. Umeda, R., Takanari, H., Ogata, K., Matsumoto, S., Kitano, T., Ono, K., Tokumaru, O. Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2019. – V. 64. – N 1. – P. 20-26.
43. Miners, J. O., Coulter, S., Tukey, R. H., Veronese, M. E., Birkett, D. J. Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen // *Biochem. Pharmacol.* – 1996. – V. 51. – N 8. – P. 1003-1008.
44. Taraban, M. B., Kruppa, A. I., Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Lūsis, V., Muceniece, D., Duburs, G. The mechanisms of the oxidation of NADH analogues 1. Photochemical oxidation of N-unsubstituted 1,4-dihydropyridines by various acceptors // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 1993. – V. 73. – N 2. – P. 151-157.
45. Kruppa, A. I., Taraban, M. B., Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Lūsis, V., Muceniece, D., Duburs, G. The mechanisms of the oxidation of NADH analogues 2. N-Methyl-substituted 1,4-dihydropyridines // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 1993. – V. 73. – N 2. – P. 159-163.
46. Polyakov, N. E., Taraban, M. B., Kruppa, A. I., Avdievich, N. I., Mokrushin, V. V., Schastnev, P. V., Leshina, T. V., Lūsis, V., Muceniece, D., Duburs, G. The mechanisms of oxidation of NADH analogues 3. Stimulated nuclear polarization (SNP) and chemically induced dynamic nuclear polarization (CIDNP) in low magnetic fields in photo-oxidation reactions of 1,4-dihydropyridines with quinones // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 1993. – V. 74. – N 1. – P. 75-79.
47. Polyakov, N. E., Kruppa, A. I., Leshina, T. V., Lūsis, V., Muceniece, D., Duburs, G. The mechanism of oxidation of NADH analogues 4. Photooxidation of N-acetyl-substituted 1,4-dihydropyridine in the presence of quinones // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 1997. – V. 111. – N 1-3. – P. 61-64.
48. Polyakov, N. E., Khan, V. K., Taraban, M. B., Leshina, T. V., Luzina, O. A., Salakhutdinov, N. F., Tolstikov, G.A. Mechanisms of photoinduced electron transfer

- reactions of lappaconitine with aromatic amino acids. Time-resolved CIDNP study // *Org. Biomol. Chem.* – 2005. – V. 3. – P. 881-885.
49. Соколов, С.Ф. Аллапинин® и современные подходы к лечению нарушений ритма сердца // *Русский медицинский журнал.* – 2012. – №4. – С. 177-181.
 50. Gellens, M. E., George, A. L., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., Kallen, R. G. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89. – N 2. – P. 554-558.
 51. Closs, G. L., Czeropski, M. S. Amendment of the CIDNP Phase Rules. Radical Pairs Leading to Triplet States // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – V. 99. – P. 6127-6128.
 52. Weller, A. Photoinduced electron transfer in solution: exciplex and radical ion pair formation free enthalpies and their solvent dependence // *Z. Phys. Chem.* – 1982. – V. 133. – P. 93-98.
 53. Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Tkachev, A. V., Nikitina, I. A., Pankrushina, N. A.. Phototransformation products of the alkaloid lappaconitine: Multinuclear NMR study // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 2008. – V. 197. – N 2-3. – P. 290-294.
 54. Yang, S., Zhang, H. J., Beier, R. C., Sun, F., Cao, X., Shen, J., Wang, Z., Zhang, S. Comparative Metabolism of Lappaconitine in Rat and Human Liver Microsomes and in vivo of Rat Using Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole / Time-of-Flight Mass Spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Analysis.* – 2015. – V. 110. – P. 1-11.
 55. Polyakov, N. E., Khan, V. K., Taraban, M. B., Leshina, T. V., Salakhutdinov, N. F., Tolstikov, G. A.. Complexation of Lappaconitine with Glycyrrhizic Acid: Stability and Reactivity Studies // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – V. 109. – N 51. – P. 24526-24530.
 56. Shimada, H., Nakamura, A., Yoshihara, T., Tobita, S. Intramolecular and intermolecular hydrogen-bonding effects on photophysical properties of 2-aminoacetophenone and its derivatives in solution // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2005. – V. 4. – P. 367-375.
 57. Lai, T. I., Lim, E. C.. Proximity effect and excited-state dynamics of 9-carbonyl-substituted anthracenes // *J. Am. Chem. Soc.* – 1985. – V. 107. – N 5. – P. 1134-1137.
 58. Beeby, A., Jones, A.E. The Photophysical Properties of Menthyl Anthranilate: A UV-A Sunscreen // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – V. 72. – P. 10-15.
 59. Polyakov, N. E., Simaeva, O. A., Taraban, M. B., Leshina, T. V., Konovalova, T. A., Kispert, L. D., Nikitina, I. A., Pankrushina, N. A., Tkachev, A. V. CIDNP and EPR Study of Phototransformation of Lappaconitine Derivatives in Solution // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – V. 114. – N 13. – P. 4646-4651.
 60. Chiral drugs: chemistry and biological action / Eds. Lin G.-Q., You Q.-D., Cheng J.-F. – Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. – 472 p.
 61. Ximenes, V. F., Morgon, N. H., Robinson de Souza, A. Solvent-dependent inversion of circular dichroism signal in naproxen: An unusual effect! // *Chirality.* – 2018. – V. 30. – N 9. – P. 1049-1053.
 62. Duggan, K. C., Hermanson, D. J., Musee J., Prusakiewicz, J. J., Scheib, J. L., Carter, B. D., Banerjee, S., Oates, J. A., Marnett, L. J. (R)-Profens are Substrate-selective Inhibitors

- of Endocannabinoid Oxygenation by COX-2 // *Nature Chem. Biol.* – 2011. – V. 7. – P. 803-809.
63. Duggan, K. C., Walters, M. J., Musee, J., Harp, J. M., Kiefer, J. R., Oaters, J. A., Marnett, L. J. Molecular Basis for Cyclooxygenase Inhibition by the Non-steroidal anti-inflammatory Drug Naproxen // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 34950-34959.
64. Woodman, T. J., Wood, P. J., Thompson, A. S., Hutchings, T. J., Steel, G. R., Jiao, P., Woodman, T P., Threadgill, Lloyd, M. D. Chiral Inversion of 2-arylpropionyl-CoA Esters by Human α -methylacyl-CoA Racemase 1A (P504S)—a Potential Mechanism for the Anti-cancer Effects of Ibuprofen // *Chem. Commun.* – 2011. – V. 47. – P. 7332-7334.
65. Jiménez, M. C., Pischel, U., Miranda, M. A. Photoinduced processes in naproxen-based chiral dyads // *J. Photochem. Photobiol. C.* – 2007. – V. 8. – N 3. – P. 128-142.
66. Kavarnos, G.J. Fundamental concepts of photoinduced electron transfer // *Photoinduced Electron Transfer I. Topics in Current Chemistry* / Ed. J. Mattay. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1990. – P. 21-58.
67. Goetz, M. Pseudo steady-state photo-CIDNP measurements // *Chem. Phys. Lett.* – 1992. – V. 188. – N 5-6. – P. 451-456.
68. Cunningham, G. P., Vidulich, J. A., Kay, R. L. Several properties of acetonitrile-water, acetonitrile-methanol, and ethylene carbonate-water systems // *J. Chem. Eng. Data.* – 1967. – V. 12. – N. 3. – P. 336-337.
69. Mariott A. A., Smith E. R. Table of dielectric constants of pure liquids. – Washington, D.C.: U.S. Gov. Print. Office, 1951. – 44 p.
70. Ахадов Я. Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов. – М.: Наука, 1977. – 400 с.
71. Eaton, D. F. Reference materials for fluorescence measurement // *Pure Appl. Chem.* – 1988. - V. 60. – N 7. – P. 1107-1114.
72. Pischel, U., Abad, S., Miranda, M. A. Stereoselective fluorescence quenching by photoinduced electron transfer in naphthalene-amine dyads // *Chem. Comm.* – 2003. – V. 9. – P. 1088-1089.
73. Dawson, W. R., Windsor, M. W. Fluorescence yields of aromatic compounds // *J. Phys. Chem.* – 1968. – V. 72. – N 9. – P. 3251-3260.
74. Sosnin, E., Oppenländer, T., Tarasenko, V. Applications of capacitive and barrier discharge excilamps in photoscience // *J. Photochem. Photobiol. C.* – 2006. – V. 7. – N 4. – P. 145-163.
75. Beeby, A., Jones, A. E. Photophysical properties of N-acetyl-menthyl anthranilate // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2001. – V. 64. – N 2-3. – P. 109-116.
76. Hadley, S.G., Keller, R.A. Direct Determination of the Extinction Coefficients For Triplet + Triplet Transitions in Naphthalene, Phenanthrene, and Triphenylene // *J. Phys. Chem.* – 1969. – V. 73. – N 12. – P. 4351-4355.
77. Singhuber, J., Zhu, M. Y., Prinz, S., Kopp, B. Aconitum in Traditional Chinese Medicine – a Valuable Drug or an Unpredictable Risk // *J. Ethnopharmacol.* – 2009. – V. 126. – P. 18-30.

78. Heubach, J. F., Schüle, A. Cardiac Effects of Lappaconitine and N-deacetylappaconitine, Two Diterpenoid Alkaloids from Plants of the Aconitum and Delphinium Species // *Planta Med.* – 1998. – V. 64. – P. 22-26.
79. Ameri, A. The Effects of Aconitum Alkaloids on the Central Nervous System // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – V. 56. – P. 211-235.
80. Solyanik, G. I., Fedorchuk, A. G., Pyaskovskaya, O. N., Dasyukevich, O. I., Khranovskaya, N. N., Aksenov, G. N., Sobetsky, V. V. Anticancer Activity of Aconitine-Containing Herbal Extract BC1 // *Exp. Oncol.* – 2004. – V. 26. – P. 307-311.
81. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J. A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia // *Pain.* – 1988. – V. 32. – P. 77-78.
82. Wang, Y. Z., Xiao, Y. Q., Zhang, C., Sun, X. M. Study of Analgetic and Antiinflammatory Effects of Lappaconitine gelata // *J. Tradit. Clin. Med.* – 2009. – V. 29. – P. 141-145.
83. Shaheen, F., Ahmad, M., Khan, M. T. H., Jalil, S., Ejaz, A., Sultankhodjaev, M. N., Arfan, M., Choudhary, M. I., Atta-ur-Rahman. Alkaloids of Aconitum leave and Their Anti-Inflammatory, Antioxidant and Tyrosinase Inhibition Activities // *Phytochemistry.* – 2005. – V. 66. – P. 935-940.
84. Ahmad, M., Ahmad, W., Ahmad, M., Zeeshan, M., Obaidullah, Shaheen, F. Norditerpenoid Alkaloids from the Roots of Aconitum heterophyllum Wall with Antibacterial Activity // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2008. – V. 23. – P. 1018-1022.
85. Столярук, В.Н., Цорин, И.Б., Вититнова, М.Б., Никифорова, Т.Д., Муринов, Ю.И., Юнусов, М.С., Крыжановский, С.А. Сравнительное изучение антиаритмической активности лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124 на модели аконитиновой аритмии // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2017. – № 2. – С. 12-15.
86. Степанов, А. А., Василевский, С. Ф., Толстикова, Г. А. Этилирование лаппаконитина как путь модификации алкалоидов // *Химия в интересах устойчивого развития.* – 2010. – № 18. – С. 505-510.
87. Pankrushina, N. A., Nikitina, I. A., Anferova, N. V., Osadchii, S. A., Shakirov, M. M., Shults, E. E., Tolstikov, G. A. Study of alkaloids of the Siberian and Altai flora: Synthesis of N(20)-deethylappaconitine derivatives // *Rus. Chem. Bull.* – 2003. – V. 52. – N 11. – P. 2490-2499.
88. Ungnade, H. E. Ultraviolet Absorption Spectra of Acetanilides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1954. – V. 76. – N 20. – P. 5133-5135.
89. Staudmayer, R., Roberts, T. D. Neighboring group participation in photolysis of o-substituted aryls // *Tetrahedron Lett.* – 1974. – V. 15. – N 13. – P. 1141-1144.
90. Гаммет, Л. Основы физической органической химии: пер. с англ. – М.: Мир, 1972. – 535 с.
91. Tashkhodzhaev, B. Conformational analysis of lappaconitine and heteratisine // *Chem. Nat. Compd.* – 2010. – V. 46. – P. 421-425.

92. Vayá, I., Pérez-Ruiz, R., Lhiaubet-Vallet, V., Jiménez, M.C., Miranda, M.A. Drug–protein interactions assessed by fluorescence measurements in the real complexes and in model dyads // *Chem. Phys. Lett.* – 2010. – V. 486. – P. 147-153.
93. Vayá, I., Andreu, I., Jimenez, M. C., Miranda, M. A. Photooxygenation mechanisms in naproxen–amino acid linked systems // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2014. – V. 13. – P. 224-230.
94. Schwarz, W., Dangel, K.-M., Bargon, J., Jones II, G. CIDNP studies of photoinitiated electron-transfer reactions. Sensitized isomerization of an electron-acceptor norbornadiene // *J. Am. Chem. Soc.* – 1982. – V. 104. – N 21. – P. 5686-5689.
95. Saprygina, N. N., Morozova, O. B., Gritsan, N. P., Fedorova, O. S., Yurkovskaya, A. V. ¹H CIDNP study of the kinetics and mechanism of the reversible photoinduced oxidation of tryptophyltryptophan dipeptide in aqueous solutions // *Russ. Chem. Bull.* – 2011. – V. 60. – P. 2579-2587.
96. Wegner, M., Fischer, H., Koeberg, M., Verhoeven, J. W., Oliver, A. M., Paddon-Row, M. N. Time-resolved CIDNP from photochemically generated radical ion pairs in rigid bichromophoric systems // *Chem. Phys.* – 1999. – V. 242. – N 2. – P. 227–234.
97. Landolt-Börnstein Numerical data and functional relationships in science and technology, New Series, Group II / Eds. H. Fischer, K. H. Hellwege. – Berlin: Springer, 1987. – 664 p.
98. Walden, S. E., Wheeler, R. A. Distinguishing Features of Indolyl Radical and Radical Cation: Implications for Tryptophan Radical Studies // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100. – N 5. – P. 1530-1535.
99. Bonifačić, M., Armstrong, D., Carmichael, I., Asmus, K. β -Fragmentation and Other Reactions Involving Aminyl Radicals from Amino Acids // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – N 3. – P. 643-649.
100. Bargon, J. CIDNP from geminate recombination of radical-ion pairs in polar solvents // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – V. 99. – N 25. – P. 8350-8351.
101. Schaffner, E., Fischer, H. Singlet and Triplet State Back Electron Transfer from Photogenerated Radical Ion Pairs Studied by Time-Resolved CIDNP // *J. Phys. Chem.* – 1996. – V. 100. – N 5. – P. 1657-1665.
102. Werner, U., Staerk, H. Magnetic Field Effect in the Recombination Reaction of Radical Ion Pairs: Dependence on Solvent Dielectric Constant // *J. Phys. Chem.* – 1995. – V. 99. – N 1. – P. 248-254.
103. Shen, Z., Lv, C., Zeng, S. Significance and challenges of stereoselectivity assessing methods in drug metabolism // *J. Pharm. Anal.* – 2016. – V. 6. – N 1. – P. 1-10.
104. Schöneich, C. Novel chemical degradation pathways of proteins mediated by tryptophan oxidation: tryptophan side chain fragmentation // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2017. – V. 70. – N 5. – P. 655-665.
105. Coyle, J. D. Electron-transfer photochemistry of organic amides and imides // *Pure Appl. Chem.* – 1988. – V. 60. – N 7. – P. 941-946.

106. Boscá, F., Miranda, M. A., Vañó, L., Vargas, F. New photodegradation pathways for Naproxen, a phototoxic non-steroidal anti-inflammatory drug // *J. Photochem. Photobiol. A*. – 1990. – V. 54. – N 1. – P. 131-134.
107. Твердислов, В.А., Яковенко, Л.В., Жаворонков, А.А. Хиральность как проблема биохимической физики // *Российский химический журнал*. – 2007. – № 1. – С.13-23.
108. Raskatov, J.A., Teplow, D.B. Using chirality to probe the conformational dynamics and assembly of intrinsically disordered amyloid proteins // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – N 1. – P. 12433-12440.
109. Doktorov, A. B., Mikhailov, S. A., Purtov, P. A. Theory of geminate recombination of radical pairs with instantaneously changing spin-Hamiltonian. I. General theory and kinematic approximation // *Chem. Phys.* – 1992. – V. 160. – N 2. – P. 223-237.
110. Magin, I. M., Purtov, P. A., Kruppa, A. I., & Leshina, T. V. (2005). Peculiarities of Magnetic and Spin Effects in a Biradical/Stable Radical Complex (Three-Spin System). Theory and Comparison with Experiment // *J. Phys. Chem. A*. – 2005. – V. 109. – N 33. – P. 7396-7401.
111. Spin polarization and magnetic effects in chemical reactions / Salikhov K. M., Molin Y. N., Sagdeev R. Z., Buchachenko A. L. – Amsterdam: Elsevier, 1984. – 419 p.
112. Bernstein, J. *Polymorphism in Molecular Crystals*. – New York: Oxford University Press, 2002. – 424 p.
113. Gilbert, B. C., Larkin, J. P., Norman, R. O. C. Electron spin resonance studies. Part XXXIV. The use of the aci-anion from nitromethane as a spin trap for organic radicals in aqueous solution // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* – 1972. – V. 2. – N. 9. – P. 1272-1279.
114. Mäurer, M., Stegmann, H. B. Chiral recognition of diastereomeric esters and acetals by EPR and NMR investigations // *Chem. Ber.* – 1990. – V. 123. – N 8. – P. 1679-1685.
115. Dubinets, N. O., Safonov, A. A., Bagaturyants, A. A. Structures and Binding Energies of the Naphthalene Dimer in Its Ground and Excited States // *J. Phys. Chem. A*. – 2016. – V. 120. – N 17. – P. 2779-2782.
116. Aladekomo, J. B., Birks, J. B. “Excimer” Fluorescence. VII. Spectral Studies of Naphthalene and Its Derivatives // *Proc. R. Soc. London Ser. A*. – 1965. – V. 284, 551-565.
117. Pracz, M., Frańska, M., Frański, R. Mass spectrometric study of naproxen dimer anions generated from racemate and pure enantiomers // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2012. – V. 4. – N 1. – P. 231-238.
118. Kerr, H., Softley, R., Suresh, K., Hodgkinson, P., Evans, I. Structure and physicochemical characterization of a naproxen–picolinamide cocrystal // *Acta Crystallogr. Sect. C*. – 2017. – V. 73. – P. 168-175.
119. Ageeva, A. A., Khramtsova, E. A., Magin, I. M., Rychkov, D. A., Purtov, P. A., Miranda, M. A., Leshina, T. V. (2018). Spin Selectivity in Chiral Linked Systems // *Chem. Eur. J.* – 2018. – V. 24. – N 15. – P. 3882-3892.

120. Pejov, L. A gradient-corrected density functional study of indole self-association through N–H··· π hydrogen bonding // *Chem. Phys. Lett.* – 2001. – V. 339. – N 3-4. – P. 269-278.
121. Muñoz, M., Ferrero, R., Carmona, C., Balón, M. Hydrogen bonding interactions between indole and benzenoid- π -bases // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2004. – V. 60. – N 1-2. – P. 193-200.
122. Hatton, J. V., Richards, R. E. Solvent effects in N.M.R. spectra of amide solutions // *Mol. Phys.* – 1962. – V. 5. – N 2. – P. 139-152.
123. Zemtsova, V.M., Fedorov, A.Y., Fedorova, E.A., Boa, C., Arkhipov, S.G., Rychkov, D.A., Minkov, V.S., Pulham, C.R., Boldyreva, E.V. A novel crystal form of metacetamol: the first example of a hydrated form // *Acta Cryst. C.* – 2019. – V. 75. – P. 1465-1470.
124. Frank, F. C. On spontaneous asymmetric synthesis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1953. – V. 11. – P. 459-463.
125. Banik, S. D., Nandi, N. Chirality and protein biosynthesis // *Top Curr. Chem.* – 2013. – V. 333. – P. 255-305.
126. Purtov, P.A., Doktorov, A.B. The Green function method in the theory of nuclear and electron spin polarization. I. General theory, zero approximation and applications // *Chem. Phys.* – 1993. – V. 178. – P. 47-65.

Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам ИХКГ им. В. В. Воеводского СО РАН: научному руководителю д.х.н., профессору Т.В. Лёшиной, сотрудникам лаборатории Магнитных явлений, д.х.н., профессору В.Ф. Плюснину, к.ф.-м.н. Е. М. Глебову, а также к.х.н. А.А. Степанову (группа СПАС ИХКГ СО РАН).