

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)  
Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской  
академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН

На правах рукописи



Томилин Феликс Николаевич

**ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ БИО- И НАНОСЕНСОРИКИ**

1.3.8. Физика конденсированного состояния

Диссертация на соискание учёной степени  
доктора физико-математических наук

Научный консультант:  
доктор физ.-мат. наук., профессор,  
Овчинников Сергей Геннадьевич

Красноярск – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. КВАНТОВОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ</b>	<b>17</b>
§1.1. Первопринципные методы	17
§1.2. Полуэмпирические методы	18
§1.3. Методы молекулярной механики	20
§1.4. Теория функционала плотности	20
§1.5. Расчёт электронных спектров поглощения и потенциальных поверхностей возбуждённых состояний	25
§1.6. Характеристики электронных спектров	27
§1.7. Модель поляризованного континуума и сольватационная модель	29
§1.8. Влияние времени релаксации растворителя на спектры поглощения и люминесценции	31
§1.9. Базисы	33
§1.10. Методология и идеология расчётных методов квантовой механики для кластеров	35
§1.11. Программное обеспечение	37
§1.12. Рекомендуемая литература к данному разделу	38
<b>ГЛАВА 2. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЯХ</b>	<b>40</b>
§2.1. Флуоресцеиновые красители	40
§2.2. Флуоресценция в протолитических формах флуоресцеина	50
§2.3. Влияние галоген замещения на структуру и электронные спектры ионных форм эозина и эритрозина	60
§2.4. Влияния сопряжения в цепи молекул сополифлуорена на фотофизические свойства	69
§2.5. Влияние фенантрена на фотофизические и спектральные характеристики сополифлуоренов	76
§2.6. Роль диметилтиомочевины в фотофизических процессах металлорганического люминофора <i>транс</i> -[Pb(DMTU-S) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ]	82

§2.7. Выводы	89
<b>ГЛАВА 3. НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДА</b>	<b>92</b>
§3.1. Открытие фуллеренов	92
§3.2. Водорастворимые формы фуллеренов – фуллеренолы	93
§3.3. Водорастворимые окси-полигидрокси фуллерены $C_{60}(OH)_xO_y$	99
§3.4. Расчёт эндоэдральных комплексов металлофуллеренолов $Gd@C_{82}O_xH_y$	104
§3.5. Анализ электронных структур фуллеренолов	111
§3.6. Структура и колебательная спектроскопия валентных изомеров фуллеренола $C_{82}$	115
§3.7. Влияние структуры валентных изомеров фуллеренолов $C_{82}$ с различным количеством функциональных групп на антиоксидантную активность	125
§3.8. Выводы	133
<b>ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ ФЕРОМОНОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОВЕДЕНИЯ ЛЕСНЫХ НАСЕКОМЫХ</b>	<b>135</b>
§4.1. Феромоны чешуекрылых и жёсткокрылых насекомых	135
§4.2. Оценка устойчивости феромонов чешуекрылых насекомых к различным факторам среды	141
§4.3. Оценка устойчивости феромонов жёсткокрылых насекомых к факторам среды	148
§4.4. Расчёт путей реакций молекул феромонов в основном и возбуждённом состояниях	153
§4.5. Выводы	158
<b>ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ С ПОМОЩЬЮ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ</b>	<b>160</b>
§5.1. Исследование процессов биолюминесценции $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротеина обелина	160

§5.2. Исследование состояния молекулы целентерамида в активном центре фотопротеина обелина	165
§5.3. Моделирование путей химических реакций образования активной формы Ca <sup>2+</sup> -регулируемого фотопротеина	174
§5.4. Фотофизические свойства целентерамида	181
§5.5. Влияние геометрии, растворителя и заместителей на фотофизические свойства целентеразина и его аддукта 2- гидропероксицелентеразина	188
§5.6. Выводы	194
<b>ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ</b>	<b>196</b>
§6.1. Аптамеры и их особенности строения	196
§6.2. Восстановление атомной структуры аптамера RE-31 по данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей	202
§6.3. Дизайн аптамеров против SARS-COV-2, основанный на знаниях о структуре и их взаимодействии	214
§6.4. Создание ДНК-аптамеров, нацеленных на нуклеокапсидный белок SARS-COV-2 и белок-связывающие эпитопы, для быстрой диагностики COVID-19	233
§6.5. Исследование структурных особенностей арабиногалактана	238
§6.6. Арабиногалактан как конъюгат для аптамера и магнитной наночастицы или противоопухолевых препаратов	242
§6.7. Выводы	251
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>253</b>
<b>СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ</b>	<b>258</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>271</b>



## ВВЕДЕНИЕ

### Общая характеристика работы

Создание новых функциональных систем с заданными свойствами является приоритетной и важной задачей физики конденсированного состояния. Интерес связан с новыми фундаментальными научными проблемами и физическими явлениями, а также с перспективами создания как оптических устройств, так и устройств электроники и спинтроники. Функциональные системы обладают широким спектром уникальных оптических и светоизлучающих, магнитных и электрических, химических и биологических свойств. Структура материала определяется составом, условиями получения и, в свою очередь, определяет физико-химические свойства. Фундаментальное исследование атомной и электронной структуры функциональных материалов позволяет разобраться с природой наблюдаемых в них физических явлений, и, на следующем этапе, перейти к созданию материалов с заданными свойствами. В современных условиях, в связи с возросшей производительностью компьютеров, для моделирования свойств имеющихся и новых материалов применяются методы на основе теории функционала плотности. Данные методы позволяют получать, на фундаментальном уровне, информацию об атомной структуре, электронном строении, фотофизических состояниях, физических и химических свойствах и т.д.

В работе исследованы функциональные материалы для оптоэлектроники, магнитных и биомедицинских применений и показано, что использование теории функционала плотности для моделирования структуры и свойств материалов позволяет описывать с хорошей точностью их основные свойства. Часто новые физические свойства возникают в результате изменения структуры соединений, при этом возможно последовательно рассматривать влияние структуры на формирование различных свойств и предсказывать новое применение уже существующим материалам после соответствующей модификации. Почти всегда интерпретация полученных расчётных данных ведёт к новому пониманию свойств функциональных материалов. Современные функциональные материалы, как

правило, очень сложны, и на протекающие в них процессы влияют многие факторы, которые часто зависят друг от друга. Теоретическое моделирование позволяет создать упрощённые модели объекта, которые описываются законами термодинамики, квантовой и классической механики и т.д. С помощью корреляции теоретических данных с экспериментальными можно получить более глубокое понимание процессов в исследуемом материале.

### **Актуальность темы исследования**

«Функциональные системы» должны иметь конкретные, желательно настраиваемые, физические и химические свойства для того, чтобы находить своё применение в науке и технике. К таким материалам можно отнести кристаллы в разных модификациях, композиты, сплавы, гибридные структуры, синтетические, биополимерные соединения, конъюгаты и т.д. При создании веществ с новыми свойствами иногда требуется усиление или, наоборот, подавления каких-либо имеющихся свойств в материале т.е. доработка (улучшение, тюнинг) материала. При этом в последнее время получают широкое распространение так называемые гибридные функциональные материалы – сочетающие в себе свойства других (двух или более) материалов. Для понимания процессов, приводящих к появлению тех или иных свойств материала, надо знать его атомную и электронную структуру, Имея данную информацию, возможно ускоренно и целенаправленно менять свойства материала.

Для получения информации о структуре вещества обширно используются такие экспериментальные подходы как дифракционные методы, оптическая спектроскопия, и другие. Несмотря на то, что экспериментальные методы хорошо развиты, обойтись без привлечения теоретических представлений, как правило, не удаётся. Более того, теоретические методы дают возможность «предсказывать» изменение структуры и свойств вещества при изменении внешних условий или при замещении какого-либо элемента. Определение пространственных структур с помощью дифракционных методов обеспечивает значительный прогресс в понимании механизмов формирования свойств новых функциональных

материалов с широким спектром применений в физике, химии и биологии, но пространственная структура обеспечивает информацию только о статическом состоянии материала. Основная проблема большинства экспериментальных методов заключается в том, что проводимые исследования атомной и электронной структур не дают прямой информации об объекте, поскольку условия измерения параметров очень часто отличаются от нормальных условий в основном состоянии. Восполнить этот пробел позволяют современные методы и подходы, основанные на теории функционала плотности, которые в настоящее время широко применяются для решения задач подобного уровня. А если говорить об исследованиях возбуждённых состояний, то применение расчётных методов становится необходимым для понимания сути происходящих процессов. При этом часто открываются новые интерпретации и появляются неожиданные сферы применения уже имеющихся материалов только на основании теоретических расчётов.

В работе изучены различные функциональные материалы: это и наноструктуры на основе углерода; органические красители и органические светоизлучающие полимеры; органические молекулы, выступающие в качестве коммуникации насекомых; фотопротеины; биополимеры на основе нуклеиновых кислот. Все эти материалы имеют широкое применение в электронике, спинтронике, в магнитных приложениях, в качестве красителей лазеров, OLED, катализе, в экологии, медицине, био- наносенсорике и т.д.

Работа нацелена на выявлении имеющихся и прогнозировании новых физических свойств посредством изменения структуры функциональных материалов. При исследовании данных материалов приходилось решать разнообразные задачи с помощью методов, основанных на теории функционала плотности.

## Цель и задачи диссертационной работы

Цель диссертационной работы: выявление взаимосвязи между структурой и физическими свойствами функциональных систем био- и наносенсорики с помощью теории функционала плотности.

Для достижения поставленной цели ставились следующие задачи:

1. Разработать подход, позволяющий определить влияние структуры молекулярных материалов на основе флуоресцеина, эозина, эритрозина и свойств среды на их фотофизические характеристики;
2. Выявить влияние замещения в цепи сополифлуорена на оптические свойства светоизлучающих молекул;
3. Выявить роль органических лигандов в формировании структуры кристаллов нового металлоорганического соединения *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] на их спектры поглощения и люминесценции;
4. Исследовать возможность формирования эндоэдральных комплексов гадолиния на основе высших фуллеренов и выяснить их магнитные и антиоксидантные свойства при взаимодействии с активными формами кислорода;
5. Определить атомную структуру допустимых валентных изомеров, возникающих при химической модификации фуллеренолов, с общей формулой C<sub>82</sub>O<sub>x</sub>H<sub>y</sub>;
6. Рассчитать фотофизические характеристики феромонных молекул и провести анализ структурных изменений в возбуждённом состоянии для оценки их устойчивости к внешнему воздействию;
7. Изучить влияние окружения на структуру лигандов фотопротеинов в процессе флуоресценции для моделирования фотофизических процессов с заданными свойствами;
8. Выявить конформации субстратов обелина, влияющие на различия спектров поглощения фотопротеинов в видимой области;
9. Разработать подход для получения атомной и электронной структуры биополимеров, использующий синхротронные данные малоуглового

рентгеновского рассеяния и методы теории функционала плотности;

10. Выявить механизмы формирования структуры сложных кластеров, содержащих арабиногалактан, магнитные наночастицы, лекарственные материалы и аптамеры;
11. На основе теории функционала плотности разработать процедуру предсказания новых аптамеров, направленных на решения задач практической медицины.

### **Научная новизна**

1. Разработан теоретико-экспериментальный подход, позволяющий расшифровать сложный контур в оптических спектрах красителей с множеством возможных ионных форм в протонных растворителях. Для этого подготовлена и апробирована методика расчёта с применением гибридного функционала плотности B3LYP, в комбинации с базисом, учитывающим диффузные и поляризационные функции и моделью континуального растворителя с учётом неравновесной релаксации растворителя.
2. Исследовано влияние структурных особенностей в цепи сополифлуорена на уменьшение ширины щели, что открывает возможности по созданию органических светоизлучающих молекул с заданными оптическими характеристиками.
3. Выявлена роль органических лигандов в формировании структуры кристаллов нового металлоорганического соединения и их спектров поглощения и люминесценции. Показана как природа химической связи приводит к высокому квантовому выходу.
4. Была предложена методика для анализа структуры, магнитных и антиоксидантных свойств молекул фуллеренолов. Для этого использовали данные о дипольных моментах, потенциале ионизации и сродства электронов, энергетических данных о граничных молекулярных орбиталях и химических индексов.
5. Определена атомная структура валентных изомеров фуллеренолов,

возникающая во время длительного синтеза.

6. Теоретическое исследование атомной и электронной структуры молекул феромонов в основном и возбуждённом состояниях позволило выявить их фотофизические характеристики и оценить устойчивость при различных факторах среды.
7. Предложена модель процесса флуоресценции фотопротеина обелина и показано, что при возбуждении светом происходит формирование «комплекса с переносом протона»
8. Была объяснена сложная люминесценция целентерамида, обусловленная излучением в ближней УФ-области и сине-зелёной области.
9. Выявлены основные причины, влияющие на различия в спектрах поглощения конформеров субстратов фотопротеинов в видимой области, что открывает возможность использования данных структур для моделирования субстратов в аминокислотном окружении.
10. Разработан подход для получения трёхмерной атомной структуры молекул аптамеров. Данный подход является универсальным для расшифровки данных малоуглового рентгеновского рассеяния синхротронного излучения для малых олигомеров в растворах и позволяет в будущем значительно упростить создание новых функциональных материалов.
11. Выявлен характер межмолекулярного взаимодействия в конъюгатах арабиногалактана, аптамеров и лекарственных материалов.
12. Разработан алгоритм проектирования новых аптамеров, использующий связь между структурой и свойствами молекул и результатами теории функционала плотности.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Комбинация экспериментальных данных и расчётов на основе теории функционала плотности позволяет проводить прогнозирование структуры и спектров флуоресценции ионных и молекулярных форм, экспериментальное определение которых невозможно.

2. Информация об антиоксидантных свойствах эндодральных комплексов Gd с фуллеренолами на основе  $C_{82}$  позволит применять данные соединения наноматериалов в медицине и в практике магнитно-резистивной томографии.
3. Результаты изучения систем с сополимерами показали, что поиск новых улучшенных для практики оптоэлектронных свойств в данных материалах можно заранее моделировать до их синтеза.
4. Универсальный подход для изучения устойчивости молекул феромонов с помощью методов функционала плотности позволяет получить основные физические характеристики молекул и оценить их устойчивость к различным факторам среды.
5. Методика по расчётам фотопротеинов и субстратов к ним, полученная в ходе исследования, может быть востребована для дальнейших работ в области создания новых биолюминесцентных материалов. На данный момент не все белки поддаются кристаллизации, и расчёты помогают разобраться с природой влияния аминокислотного окружения на свойства эмиттеров, что в свою очередь позволяет, путём замещения аминокислот создавать новые мутантные формы протеинов с заданными свойствами.
6. Разработан подход для получения молекулярной структуры аптамеров в комбинации малоуглового рентгеновского рассеяния и теоретического моделирования. Данный подход оригинален и технологичен, что открывает большие возможности по широкому применению данной методики для подбора новых функциональных аптамеров под конкретные задачи.

### **Основные научные положения, выносимые на защиту**

1. Рассчитаны спектры поглощения и испускания материалов для оптоэлектроники на основе флуоресцеина, эозина и эритрозина с помощью теории функционала плотности. В комбинации с экспериментальными данными, развит подход, который позволяет расшифровать сложные спектры систем с множеством таутомерных форм.
2. Влияние пути сопряжения на оптические характеристики сополифлуорена

- неоднозначно и зависит от того, как хромофорная группа включена в цепь. Наличие слабополярного растворителя приводит к незначительному батохромному сдвигу спектров поглощения для светоизлучающих сополимеров.
3. Роль органических лигандов в формировании структуры кристаллов металлоорганических соединений с гетерогенным локальным окружением и оптических свойств может быть не тривиальна. Теоретические расчёты позволяют прояснить природу химической связи, приводящей к высокому квантовому выходу люминесценции металлоорганического люминофора *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>].
  4. Эндоедральные комплексы Gd@C<sub>82</sub>O<sub>x</sub>H<sub>y</sub> имеют сложную структуру с различными функциональными группами, такими как карбокси-, гидрокси- и кислородных мостиков на углеродном каркасе, что подтверждается сопоставлением теоретических и экспериментальных данных. При этом данные комплексы обладают благоприятными антиоксидантными свойствами для биомедицинских применений.
  5. Результаты моделирования структурных и электронных свойств таких функциональных молекул как феромонов в основном и возбуждённом состоянии показывают наличие взаимосвязи между структурными характеристиками молекул и механизмами коммуникации насекомых.
  6. С применением методов теории функционала плотности построена модель фотофизических процессов фотопротеина обелина. Показано, что экспериментально наблюдаемая длина волны излучения соответствует процессам «с переносом протона» между эмиттером и функциональными группами в активном центре. Показана роль заместителей активного центра на формирование фотофизических свойств. Фотовозбуждение в верхние электронно-возбуждённые для молекулы целентерамида в состоянии на 260–300 нм вызывает дополнительную, к сине-зелёной, флуоресценцию в ближней УФ-области.
  7. Получена количественная картина связывания конъюгатов аптамеров с помощью анализа разложения энергии парного взаимодействия, тем самым,



создана основу для целенаправленного синтеза или улучшения имеющейся технологии синтеза конъюгатов аптамеров с различными материалами

8. Разработан подход для восстановления молекулярной структуры молекул аптамеров в сочетании малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и теоретического моделирования.
9. Разработанный алгоритм проектирования новых аптамеров, использующий связь между структурой, свойствами молекул и результатами теории функционала плотности позволяет конструировать новые функциональные материалы с оптимизацией ресурсов.

### **Личный вклад автора**

Все результаты, представленные в диссертации, получены автором, либо при его непосредственном участии. Автор ставил цели и задачи, проводил анализ экспериментальных данных, создавал методики расчётов, строил модели, выполнял расчёты, обеспечивал выполнение задач, предлагал физическую интерпретацию полученных результатов и участвовал в обсуждении результатов. Автор благодарен своим учителям проф. С. Г. Овчинникову и П. В. Аврамову за многолетнее успешное сотрудничество и консультирование на всех этапах подготовки работы.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность данных, полученных в представленной диссертации, обеспечена применением современных методов расчётов и базисов волновых функций с использованием стандартных и широко известных программ теории функционала плотности. Результаты, полученные для верификации новых методик, совпадали с известными литературными данными. Все полученные результаты расчётов воспроизводимы и повторяемы.

Основные результаты диссертационной работы представлялись и обсуждались на следующих конференциях, симпозиумах, совещаниях:

- на семинарах, коллоквиумах, открытых лекциях Института физики СО РАН им. Киренского (Красноярск), Сибирского федерального университета, Института катализа СО РАН им. Борескова (Новосибирск), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Цукуба, Япония), Института теоретической химии им. Фукуя университета Киото (Киото, Япония), Государственный Университет Нагой (Нагойя, Япония);

Представлялись в качестве стендовых, устных и приглашённых докладов на следующих международных конференциях:

- II International Conference Synchrotron Radiation Techniques for Catalysts and Functional Materials, Novosibirsk, Russia, 2023 г.; Международная конференция «Синхротронное излучение и интеллектуальные материалы» — IWSN 2023, Ростов на Дону, 2023 г.; Всероссийская научная конференции с международным участием «Енисейская фотоника — 2022», г. Красноярск, 2022 г; Functional Materials – ICFM-2021, Alushta, Crimea, 2021; XVIII молодёжная конференции с международным участием по люминесценции и лазерной физике. Иркутск-2021; 15th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2021; 14th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2019; XXV Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых учёных (ВНКСФ-25, Крым) 2019; 1st International Conference “Aptamers in Russia 2019”; XIX симпозиума «Сложные системы в экстремальных условиях». Российской академии наук». Красноярск, 2018; XVI Международная молодёжная конференция по люминесценции и лазерной физике, посвящённая 100-ю Иркутского государственного университета. Иркутск-2018; Четвёртый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии". Санкт-Петербург-2018; 14-я Российская школа-симпозиум «Фундаментальные основы атомистического многомасштабного моделирования». Новый Афон, Абхазия-2017; X юбилейной Межрегиональной научно-практической конференции, посвящённой 85-ю КГПУ им. В.П. Астафьева. Красноярск-2017; «Физика — наукам о жизни» Санкт-Петербург-2016; XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием. Красноярск-2016; XV

Международная молодёжная конференция по люминесценции и лазерной физике. Иркутск-2016; Ecological Modelling for Ecosystem Sustainability in the context of Global Change (ISEM 2013); XIII Международную конференцию по люминесценции и лазерной физике. Иркутск-2012; 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Гуэльф, Канада-2012; Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Экология. Человек. Общество», Украина, Киев-2012; 7th European Conference on Ecological Modeling, ЕСЕМ 2011, (Trento, Italy); VI Съезда российского фотобиологического общества, п. Шепси-2011; 16th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence., г. Лион, Франция-2010; Международной школы-конференции для студентов, аспирантов и молодых учёных «Фундаментальная математика и её приложения в естествознании» года, Уфа-2010; 15th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (15 ISBC) Shanghai, China-2008; The Chemistry and chemical technology in XXI, Томск-2007.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 28 статей в рецензируемых журналах из списка включённых ВАК РФ в Перечень ведущих рецензируемых научных изданий для публикации результатов диссертаций на соискание учёной степени доктора наук, 2 монографии, одна глава в монографии и 41 тезисов докладов.

### **Структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка цитируемой литературы. Общий объём составляет 312 страницы, включая 93 рисунка и 19 таблиц. Список цитированной литературы состоит из 469 наименований.

### **Благодарности фондам**

Работа выполнена при финансовой поддержке фондов: РФФИ (гранты: 07-04-96802-р\_енисей\_а; 08-04-05003-б; 09-04-00412-а; 07-04-00930-а; 09-02-92107-ЯФ\_а; 09-04-12022-офи\_м; 13-04-00375-а; 15-03-06786; 16-04-00132-А; 18-29-19003-мк; 18-44-242002-р\_мк; 19-02-00450-А; 19-54-53004-ГФЕН\_а); Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фондом поддержки научной и научно-технической деятельности №16-44-243019); СФУ (Молодёжный грант 2008 г; Государственное задание № 16.1455.2017/ПЧ (СФУ – ГЗ-14)); Сибирского отделения РАН и Китайской АН, (2009-2011, проект №2); ФЦП «Кадры» (2010-2012 № П333); Госпрограммы Правительства России (№ 11. G34.31.058); Госпрограммы Президента России «Научная школа» (№ 1044.2012.2.); Мегагранта Правительства России (075-15-2019-1886). Грант № 23-075-67362-1-0409-000242.

Работы выполнялись при технической поддержке: Межведомственного суперкомпьютерного центра Российской академии наук (МВС-100К и МВС-10П); Сибирского Суперкомпьютерного Центра СО РАН, ИВМиМГ, г Новосибирск; суперкомпьютерного комплекса МГУ – СКИФ МГУ «Чебышёв».

## ГЛАВА 1. КВАНТОВОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ

### §1.1. ПЕРВОПРИНЦИПНЫЕ МЕТОДЫ

Квантовая химия давно превратилась в инструмент, используемый широким кругом физиков, химиков, материаловедов и биологов во многих областях: физике твёрдого тела, органической и неорганической химии, молекулярной спектроскопии, биохимии и так далее. Широкое распространение получили программные комплексы, благодаря их ориентированию на широкий круг пользователей и повсеместному использованию компьютеров. Более того, за последнее время существенно вырос арсенал вычислительных методов. В этой связи необходимо иметь чёткое представление о задачах, для решения которых предназначены те или иные методы, и уметь выбрать те из них, которые необходимы и/или достаточны для достижения цели. В этой главе изложены основные квантовохимические методы, используемые в работе. Основную информацию по формализму, методам, подходам и базисам полезно смотреть в соответствующей литературе [указана в конце данной главы], здесь же будет изложена краткая информация с акцентом на применение.

Начать надо с *ab initio* методов. В переводе с латинского *ab initio* означает «из первых принципов». К данной группе относятся методы, в соответствии с которыми вычисление проводится исключительно на теоретической базе, то есть без введения в расчётную схему каких-либо параметров, полученных экспериментальным путём. При расчёте все величины имеют конкретный физический смысл. Такими методами являются: метод Хартри-Фока-Рутаана, разнообразные вариации конфигурационного взаимодействия, методы теории возмущения, а также метод объединённых кластеров. К преимуществу данного подхода следует отнести приемлемую точность расчёта, относительную универсальность. Недостатком же является ресурсоёмкость процедуры, поэтому группа *ab initio* методов стала применяться позднее полуэмпирических методов. Для учёта электронной корреляции часто используют теорию возмущения Мёллера-Плессе (MP), она позволяет с приемлемой точностью и временными затратами получать хорошие результаты. Сама теория возмущения применялась и раньше физиками и математиками, однако к задачам квантовой химии

она была адаптирована в 1934 году (в форме концепции), реализована позднее метода Хартри-Фока-Рутаана. Суть подхода заключается в том, что система делится на две части. Первая, упрощённая, точно решается, тогда как вторая рассматривается в виде возмущения первой. Существенным достоинством данной теории является то, что поправки к полной энергии системы, вычисленные в приближении Хартри-Фока, находятся неитерационным способом, то есть отсутствует необходимость многократного повторения большого объёма расчётов для достижения самосогласованного решения. Дальнейшее развитие теории продолжалось на протяжении второй половины XX века и шло в направлении более полного учёта корреляционной энергии. Так основные работы по теории возмущения второго порядка (MP2), учитывающей 60 – 90 % корреляционной энергии, относятся к 70-м годам прошлого века.

## §1.2. ПОЛУЭМПИРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Разработка и развитие полуэмпирических методов расчёта молекулярных структур составляет неотъемлемую часть квантовой химии. Эти методы используют как средство для расчёта свойств молекул, так и для построения молекулярных моделей. При удачном выборе модели можно объяснять и предсказывать свойства и их изменения в рядах химических соединений. Более того, появляется возможность интерпретации свойств на основе относительно простых качественных концепций. В методе Паризера-Парра-Попла (PPP), предназначенном для расчёта молекул органических соединений было использовано  $\pi$ -электронное приближение, но с включением параметров, описывающих электрон-электронное взаимодействие в явном виде, в одноэлектронный гамильтониан. Этот метод стал первым в ряду методов, основанных на уравнениях Хартри-Фока-Ругана и включающих приближение нулевого дифференциального перекрытия (Neglect of Differential Overlap — NDO), таких как CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap), INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap), MINDO (Modified Intermediate Neglect of

Differential Overlap), MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap) и др. Метод CNDO (Дж. Попл, Д. Сэнтри, Г. Сигал, 1965) открыл период разработки методов расчёта в полном валентном базисе, который фактически продолжается и в настоящее время. Этот метод впервые позволил проводить расчёты любых соединений лёгких элементов и составил серьёзную конкуренцию методам, основанным на построении модельных гамильтонианов (таких как расширенный метод Хюккеля, который используется в данное время в основном для получения стартовых орбиталей в неэмпирических расчётах).

Методы, основанные на приближении NDO, используют сейчас, главным образом, для исследования биологических объектов, а также электронных спектров органических соединений и комплексов переходных металлов. Дж. Дж. Стюартом (J.J. Stewart) в 1989 г. был разработан с применением новых принципов оценки параметров метод PM3 [1] (Parametric Method Number 3). В первых вариантах метода NDO параметры или определяли из свойств атомов, или даже рассчитывали. В последующем (особенно при получении параметров, описывающих отталкивание атомных остовов) широко использовали чисто молекулярные характеристики. Дж. Дж. Стюарт предложил полностью перейти на параметризацию, опираясь на экспериментальные данные о свойствах молекул: теплоте образования, дипольных моментах, потенциалах ионизации, геометрических параметрах. Была разработана методика, позволяющая автоматизировать поиск оптимальных значений параметров, базирующаяся на минимизации разности между экспериментальными и рассчитанными значениями некоторой функции, суммирующей данные по опорным величинам. Число параметров возросло до восемнадцати (одиннадцати для атома водорода): и шесть параметров функций отталкивания остовов. В настоящее время метод параметризован практически для всех атомов Периодической системы, причём число реперных соединений в некоторых работах достигает 657. Метод характеризуется большой надёжностью и может применяться для решения широкого круга химических задач. При этом, метод не стоит на месте и, примерно, каждые два-три года выходит новая версия метода (на 2021 г. известна версия PM7 [2]) которая реализована в свободно распространяемой программе MOPAC [2].

### §1.3. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ

К полуэмпирическим методам примыкает метод молекулярной механики, предполагающий, что для атомов в молекулах существуют некоторые типичные длины связей с окружающими атомами, валентные и торсионные углы, определяемые состоянием гибридизации данного атома и атомов, непосредственно связанных с ним. Зависимости энергии от отклонения внутренних координат от равновесных значений могут быть описаны параметрами силового поля; кроме того, принимают во внимание ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия. Параметры силового поля выбирают таким образом, чтобы они передавали известные из эксперимента свойства набора реперных соединений (геометрические характеристики, колебательные частоты). Метод позволяет определять равновесные геометрии, переходные состояния, выполнять конформационный анализ, оценивать относительные энергии различных изомерных структур, планировать синтез. Поскольку состояние электронной системы не принимается во внимание, методика не может быть использована для рассмотрения возбуждённых состояний и вообще тех явлений, которые определяются электронной структурой молекул. Наибольшее применение метод получил в органической химии и биохимии.

### §1.4. ТЕОРИЯ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ

Каждый из описанных выше подходов был ориентирован либо на скорость (полуэмпирические методы), либо на точность (*ab initio* методы) расчётов. Во многом благодаря развитию химии высокомолекулярных соединений и биохимии объект вычислений — молекула — неуклонно рос в размерах, а методов, способных моделировать большие молекулярные структуры с высокой точностью не было. Нужны были нестандартные решения, делающие задачу выполнимой не за счёт совершенствования собственно вычислительной процедуры, а за счёт радикального упрощения самой математической модели. В этой связи, в 60-е годы, начались работы



по изучению электронной плотности и её применению для расчётов. Какие же самые привлекательные стороны у этого подхода? Во-первых, она физически определена и измеряема в отличие от волновой функции, не имеющей физического смысла. Во-вторых, получение полной волновой функции электронов — задача, соответствующая  $3n$ -измерениям (или даже  $4n$ , если принимать во внимание спин), где  $n$ -полное число электронов, тогда как электронная плотность есть функция от трех координат независимо от числа электронов в молекуле. Здесь основная сложность заключается в том, существует ли взаимосвязь между электронной плотностью и энергией, и какова форма зависимости, если она существует? Все началось с работ П. Хоэнберга и В. Кона, которые доказали теорему о свойствах электронной плотности («Негомогенный электронный газ», 1964 год). Согласно теореме, энергия основного состояния молекулы является функционалом электронной плотности и энергия минимальна, если она (электронная плотность) является точной для основного состояния (функционал — соответствие числового ряда функции, которая, в свою очередь сопоставлена другому числовому ряду). Следует отметить, что теорема, являя строгое доказательство связи полной энергии с электронной плотностью, не даёт никакого правила в построении этого же функционала (что является главным недостатком теории). Нет и строгого универсального способа вычисления средних значений операторов физических величин с помощью  $\rho(r)$ , подобного методам расчёта для волновых функций. Поскольку вид функционала неизвестен, для его описания используются приближенные методы.

Методы теории функционала плотности стали использоваться после внедрения в расчётную схему орбиталей, предложенных У. Коном и Л. Дж. Шемом (КШ) в 1965 году (работа называлась «Самосогласованные уравнения, включающие обменные и корреляционные эффекты»). Основная идея теории состоит в разделении функционала кинетической энергии на две части, первая вычисляется точно с использованием формально построенных орбиталей, отвечающих системе невзаимодействующих электронов, вторая представляет собой поправку. Таким образом, описание молекулярной системы практически полностью соответствует хартри-фоковскому (что, несомненно, следует отнести к достоинству). Но не стоит забывать, что данные

орбитали сконструированы лишь так, чтобы давать наилучшее описание электронной плотности, и имеют мало общего с истинными хартри-фоковскими орбиталями. Спустя некоторое время (конец 70-х годов) было разработано приближение локальной плотности — простейшая форма теории. Это приближение основывается на том, в каждой точке молекулы с характерной для неё электронной плотностью свойства те же, что и в однородном электронном газе с той же плотностью. Общим случаем локальной плотности является приближение локальной спиновой плотности (LSDA — Local Spin Density Approximation). Точность методов, основанных на LSDA, сопоставима с методами Хартри-Фока. Все приближения метода КШ связаны со способами аппроксимации обменно-корреляционного потенциала. Отсутствие регулярного подхода к построению функционалов — главный недостаток DFT.

Другим более совершенным является приближение градиентной коррекции (GGA — Generalized Gradient Approximation). В данном случае корреляционный и обменный потенциалы, образующие функционал, связаны не только с электронной плотностью, но и с первой и второй производной от неё. Вначале было предложено несколько функциональных зависимостей в виде поправок к LSDA (например, обменная поправка Бекке, 1988 год). Практически в то же время был предложен ряд функционалов с градиентной коррекцией в чистом виде. Один из наиболее удачных функционалов данной группы был предложен К. Ли, В. Янгом и Р. Г. Паром (LYP, 1988 год) [3]. Общее выражение для обменно-корреляционной энергии в этом приближении можно записать следующим образом:

$$\varepsilon_i^{GGA}[\rho] = \varepsilon_i^{LSDA}[\rho] + \Delta\varepsilon_i(\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho, \dots), i = x, c.,$$

где  $x$  — «обмен»,  $c$  — «корреляция». Здесь уместно упомянуть, что единого и последовательного способа ввода поправки  $\Delta\varepsilon_i$  не существует; предложены её различные приближённые формы. Параметры всех этих моделей найдены стандартным образом, принятым в DFT: проводится неэмпирический расчёт атомов благородных элементов в орбитальном приближении с максимально полным учётом обмена и корреляции (например, методом связанных кластеров в широком базисе), затем выделяются члены, связанные с обменной и

корреляционной энергиями, и под них «подгоняются» приближенные выражения для  $\epsilon_x[\rho]$  и  $\epsilon_c[\rho]$ .

Третью, и более совершенную форму, являет группа гибридных методов. Они вобрали в себя лучшее из приближений локальной плотности и градиентной коррекции и получили широкое распространение благодаря феноменально низким временным затратам в сочетании с точностью, которая сопоставима с точностью лучших *ab initio* методов (MP4(SDQ), QCISD и CCSD). Один из наиболее широко используемых гибридных GGA корреляционных функционалов в мире – функционал Lee, Yang и Parr (LYP). Он приводит к известному акрониму B3LYP [4]. Так как функционал LYP содержит и локальный, и нелокальный члены, то корреляционно-обменный функционал метода B3LYP в действительности имеет вид:  $E_{XC}^{B3LYP} = (1-a)E_X^{LSDA} + aE_X^{HF} + b\Delta E_X^{B88} + (1-c)E_C^{VWN} + cE_C^{LYP}$ , где  $a$ ,  $b$ ,  $c$  – константы, которые были подобраны Бекке с использованием надёжных экспериментальных данных для репрезентативного набора сравнительно простых химических соединений (так называемый *G1*-набор),  $E_X^{LSDA}$  – обменная энергия локальной спиновой плотности,  $E_X^{HF}$  – хартифокковская обменная энергия,  $\Delta E_X^{B88}$  – обменная поправка Бекке,  $E_C^{VWN}$  – корреляционная энергия однородного электронного газа,  $E_C^{LYP}$  – корреляционный функционал Ли, Янга и Парра.

В целом можно сказать, что волновая функция в методе Кона-Шэма аппроксимируется единственным детерминантом Слейтера, а кинетическая энергия записывается в предположении, что электроны не взаимодействуют. В этом отношении метод Кона-Шэма напоминает метод Хартри-Фока, уравнения которого получают из первых принципов на основании физически обоснованных приближений. С другой стороны, функционалы, описывающие обмен и корреляцию, часто содержат подгоночные параметры. Поэтому, строго говоря, метод КШ не является неэмпирическим методом квантовой химии. В то же время, он допускает последовательные модификации за счёт использования все более точных функционалов энергии, основанных на последовательной теории, как это имеет место в неэмпирической квантовой химии. По этой причине существует великое множество

функционалов (рисунок 1.1), которые имеют свои границы применимости и выбор подходящего функционала порой может вызывать известные трудности.

Available density functionals	
<b>Rung 1</b> Local spin-density approximation (LSDA)	<b>Exchange:</b> Slater, SR_LSDA <b>Correlation:</b> PW92, VWN5, srVWN, Liu-Parr, PK09, PW92RPA, srPW92, PZ81, VWN1, VWN1RPA, VWN2, VWN3, VWN4, Wigner <b>Exchange-correlation:</b> SPW92, LDA, SVWN5
<b>Rung 2</b> Generalized gradient approximation (GGA)	<b>Exchange:</b> PBE, B88, revPBE, AK13, B86, G96, mB86, mPW91, $\mu$ B88, $\mu$ PBE, srPBE, optB88, OPTX, PBEsol, PW86, PW91, RPBE, rPW86, SOGGA, $\omega$ PBE <b>Correlation:</b> PBE, LYP, P86, P86VWN5, PBEloc, PBEsol, srPBE, PW91, regTPSS <b>Exchange-correlation:</b> B97-D3(0), B97-D, PBE, BLYP, revPBE, BEEF-vdW, BOP, BP86, BP86VWN, BPBE, EDF1, EDF2, GAM, HCTH/93, HCTH/120, HCTH/147, HCTH/407, HLE16, KT1, KT2, KT3, mPW91, N12, OLYP, PBEOP, PBEsol, PW91, RPBE, rVV10, SOGGA, SOGGA11, VV10
<b>Rung 3</b> Meta-GGA	<b>Exchange:</b> TPSS, revTPSS, BLOC, modTPSS, oTPSS, PBE-GX, PKZB, regTPSS, SCAN, TM <b>Correlation:</b> TPSS, revTPSS, B95, oTPSS, PK06, PKZB, SCAN, TM, TPSSloc <b>Exchange-correlation:</b> B97M-V, B97M-rV, M06-L, TPSS, revTPSS, BLOC, M11-L, mBEEF, MGGA_MS0, MGGA_MS1, MGGA_MS2, MGGA_MVS, MN12-L, MN15-L, oTPSS, PKZB, revM06-L, SCAN, $\tau$ -HCTH, TM, VSXC
<b>Rung 4</b> Global hybrid GGA functionals	B3LYP, PBE0, revPBE0, B97, B1LYP, B1PW91, B3LYP5, B3P86, B1LYP, B1PW91, B3LYP5, B3P86, B3PW91, B5050LYP, B97-1, B97-2, B97-3, B97-K, BHLYP, HFLYP, MPW1K, MPW1LYP, MPW1PBE, MPW1PW91, O3LYP, PBEh-3c, PBE50, SOGGA11-X, WC04, WP04, X3LYP
<b>Rung 4</b> Global hybrid meta-GGA functionals	M06-2X, M08-HX, TPSSh, revTPSSh, B1B95, B3TLAP, BB1K, BMK, dIDF, M05, M05-2X, M06, M06-HF, M08-SO, MGGA_MS2h, MGGA_MVSh, MN15, MPW1B95, MPWB1K, PW6B95, PWB6K, revM06, SCAN0, $\tau$ -HCTHh, TPSS0
<b>Rung 4</b> Range-separated hybrid GGA functionals	$\omega$ B97X-V, $\omega$ B97X-D3, $\omega$ B97X-D, CAM-B3LYP, CAM-QTP00, CAM-QTP01, HSE-HJS, LC-rVV10, LC-VV10, LC- $\omega$ PBE08, LRC- $\mu$ BOP, LRC- $\omega$ PBE, LRC- $\omega$ PBEh, N12-SX, rCAM-B3LYP, $\omega$ B97, $\omega$ B97X, $\omega$ B97X-rV
<b>Rung 4</b> Range-separated hybrid meta-GGA functionals	$\omega$ B97M-V, M06-SX, M11, MN12-SX, revM11, $\omega$ B97M-rV, $\omega$ M05-D, $\omega$ M06-D3
<b>Rung 5</b> Double hybrid GGA functionals	DSD-PBEPBE-D3, $\omega$ B97X-2(LP), $\omega$ B97X-2(TQZ), XYG3, XYGJ-OS, B2PLYP, B2GPPLYP, DSD-PBEP86-D3, LS1DH-PBE, PBE-QIDH, PBE0-2, PBE0-DH
<b>Rung 5</b> Double hybrid meta-GGA functionals	$\omega$ B97M(2), PTPSS-D3, DSD-PBEP95-D3, PWPB95-D3
Specialized density functionals	SRC1-R1, SRC1-R2, SRC2-R1, SRC2-R2, BR89, B94, B94hyb, BR89B94h, BRSC, MB05, B05, BM05(XC), PSTS, MCY2

Рисунок 1.1 – Пример доступных для расчёта функционалов (около 200) в программе Q-CHEM (2021 г)

В заключение можно отметить, что методы теории функционала плотности позволили получить ряд электрофизических характеристик (дипольные моменты молекул и внешние электростатические поля), прогнозы спектров в диапазоне от

далёкой ИК-области до УФ, изучение путей химических реакций с высокой степенью точности. За столь впечатляющие результаты в 1998 году Нобелевскую премию разделили Джон Попл «за развитие вычислительных методов в квантовой химии» и Волтер Кон «за развитие теории функционала плотности».

## §1.5. РАСЧЁТ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ВОЗБУЖДЁННЫХ СОСТОЯНИЙ

При изучении фотохимического поведения молекул и расчёте их электронных спектров обычно необходимо получить данные не для одного, а для целого набора низших возбуждённых состояний. При этом существенна одинаковая точность расчёта для всех состояний, в частности должна быть обеспечена одинаковая степень учёта корреляционных эффектов. Это предъявляет весьма высокие требования к выбору метода расчёта, структуры активного пространства, атомного базиса. Кроме того, необходимо иметь в виду, что изучение потенциальных кривых, а тем более потенциальных поверхностей, требует выполнения большого числа расчётов, что подразумевает ещё одно требование к методу — его экономичность. Особые сложности возникают при изучении возбуждённых состояний соединений переходных металлов, например металлоорганических соединений, которым в настоящее время уделяется огромное внимание. Для них характерна высокая плотность возбуждённых состояний, причём в одной и той же энергетической области могут лежать состояния, относящиеся к разнообразным типам возбуждений: состояния с переносом заряда с металла или с  $\sigma$ -связи на лиганд, с лиганда на металл, внутрелигандные возбуждения,  $d-d$  переходы. Возбуждение может сопровождаться фотохимическими процессами различного типа: переносом заряда или энергии, разрывом или образованием новых химических связей, изомеризацией, образованием радикалов, безызлучательными переходами в основное состояние.

Форма потенциальных кривых определяет временные характеристики существования систем в возбуждённых состояниях и характер протекающих

процессов. Если энергия быстро уменьшается при увеличении межатомного расстояния металл-лиганд (потенциальная кривая имеет отталкивательный характер), то происходит быстрый отрыв этого лиганда. В то же время во многих случаях возбуждение приводит к переходу в состояния с относительно большими временами жизни и определенной структурой. Энергии этих состояний лежат в ограниченной области, что приводит к появлению псевдопересечений потенциальных поверхностей, седловых точек, конических пересечений. Это проявляется как в изменении формы спектров, так и в химических последствиях возбуждения.

Практика показала, что прямой расчёт методом конфигурационного взаимодействия не позволяет достаточно хорошо передать характеристики возбуждённых состояний, что связано прежде всего с использованием орбиталей, полученных в приближении ССП, которые оптимальны лишь для основного состояния. Это наводит на мысль использовать для расчёта много-конфигурационный метод самосогласованного поля. Современные программы позволяют выполнять расчёт с оптимизацией МО для каждого отдельно взятого состояния. Это гарантирует, что для данного состояния будут получены наилучшие орбитали и оптимальная энергия. Такой подход требует тщательного выбора активного пространства. Чтобы обеспечить одинаковое качество расчёта для всех состояний и ограничить объем вычислительной работы, обычно применяют своего рода компромисс: проводят усреднение матрицы плотности с указанием весового вклада каждого состояния.

Наконец, в последние годы разработан вариант метода функционала плотности для расчёта возбуждённых состояний — нестационарная теория функционала плотности [5,6] (Time Dependent Density Functional Theory — TD-DFT). Эта теория была разработана для изучения тех явлений, для которых необходимо рассматривать отклик системы на меняющееся во времени внешнее возбуждение. Именно к этому классу явлений относится поглощение света молекулярными системами. Вероятность поглощения определяется мнимой компонентой динамической поляризуемости системы, которая в свою очередь связана с реакцией (откликом) электронной плотности на внешнее возмущение. Полуса функции отклика плотности совпадают с энергиями переходов в возбуждённые состояния. Полуса находят путём

диагонализации матрицы специально сконструированного функционала. По своему смыслу эта теория близка к методу CI в приближении однократных возбуждений. По-видимому, метод даёт лучшие результаты в случае, если электронные переходы могут рассматриваться как «чистые» (или «почти чистые») переходы между двумя орбиталями.

Особые трудности возникают при изучении высоковозбужденных состояний. Это связано с тем, что наиболее сильный отклик на внешнее поле наблюдается в той области, где электронная плотность наиболее диффузна, т. е. на периферии молекулы. Между тем многие из известных обменно-корреляционных функционалов имеют неправильное асимптотическое поведение. Следствием является занижение рассчитанного порога ионизации и большие ошибки для состояний с высокой энергией. Большим преимуществом метода TD-DFT является то, что в отличие от методов, основанных на разложении по конфигурациям, он практически не ограничен размерами системы; кроме того, начиная с некоторого уровня результаты также перестают зависеть от атомного базиса. Расчёты методом TD-DFT вполне конкурентоспособны с гораздо более трудоёмким методом CASPT2. Широкое распространение метода TD-DFT обусловлено тем, что данный подход требует относительно небольшие затраты вычислительных ресурсов, обеспечивая при этом достаточно высокую точность. Энергетические характеристики возбуждённых состояний для биологических молекул, рассчитанные методом TD-DFT, показывают хорошее согласие с экспериментальными данными [7]

## **§1.6. ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ**

Электронные молекулярные спектры возникают при изменении электронной энергии молекул, если при этом не меняются колебательные и вращательные энергии. Электронные молекулярные спектры наблюдаются как в поглощении (спектры поглощения), так и в испускании (спектры люминесценции). При электронных переходах обычно изменяется электрический дипольный момент

молекулы. Электрический дипольный переход между электронными состояниями молекулы типа симметрии  $\Gamma'$  и  $\Gamma''$  разрешён, если прямое произведение  $\Gamma' \times \Gamma''$  содержит тип симметрии, по крайней мере, одной из компонент вектора дипольного момента  $d$ . В спектрах поглощения обычно наблюдают переходы из основного (полносимметричного) электронного состояния в возбуждённые электронные состояния. Очевидно, что для осуществления такого перехода типы симметрии возбуждённого состояния и дипольного момента должны совпадать. Так как электрический дипольный момент не зависит от спина, то при электронном переходе спин должен сохраняться, т.е. разрешены только переходы между состояниями с одинаковой мультиплетностью (интеркомбинационный запрет). Это правило, однако, нарушается для молекул с сильным спин-орбитальным взаимодействием, что приводит к интеркомбинационным квантовым переходам. В результате таких переходов возникают, например, спектры фосфоресценции, которые соответствуют переходам из возбуждённого триплетного состояния в основное синглетное состояние [8].

Молекулы в различных электронных состояниях часто имеют разную симметрию. В таких случаях условие  $\Gamma' \times \Gamma'' \subset \Gamma_d$  должно выполняться для точечной группы низкосимметричной конфигурации. Однако при использовании перестановочно-инверсионной (ПИ) группы такая проблема не возникает, так как ПИ группа для всех состояний может быть выбрана одинаковой. Для линейных молекул симметрии  $C_{xy}$  тип симметрии дипольного момента  $\Gamma_d = \Sigma^+(d_z) + \Pi(d_x, d_y)$ , поэтому для них разрешены только переходы  $\Sigma^+ - \Sigma^+$ ,  $\Sigma^- - \Sigma^-$ ,  $\Pi - \Pi$  и т. д. с дипольным моментом перехода, направленным по оси молекулы, и переходы  $\Sigma^+ - \Pi$ ,  $\Pi - \Delta$  и т. д. с моментом перехода, направленным перпендикулярно оси молекулы. Вероятность  $B$  электрического дипольного перехода с электронного уровня  $m$  на электронный уровень  $n$ , просуммированная по всем колебательно-вращательным уровням электронного уровня  $m$ , определяется формулой:  $B_{mn} = \frac{8\pi^3}{3h^2c} |M_{mn}|^2$ , где

$|M_{mn}| = \int \varphi_{en}^* d \varphi_{em} d\tau_e = \langle \varphi_{em} | d | \varphi_{en} \rangle$  – матричный элемент дипольного момента для перехода  $n - m$ ,  $\varphi_{en}$  и  $\varphi_{em}$  – волновые функции электронов. Интегральный



коэффициент поглощения, который можно измерить экспериментально, определяется выражением:  $\int K_\nu d\nu = N_m B_{mn} h \nu_{nm} = \frac{8\pi^3}{3hc} N_m \nu_{nm} |M_{mn}|^2$ , где  $N_m$  – число молекул в начальном состоянии  $m$ ,  $\nu_{nm}$  – частота перехода  $m \rightarrow n$ . Часто электронные переходы характеризуются силой осциллятора:  $f_{nm} = \frac{m_e h c^2 \nu_{nm}}{\pi e^3} B_{mn}$  где  $e$  и  $m_e$  – заряд и масса электрона. Для интенсивных переходов  $f_{nm} \sim 1$ . Среднее время жизни возбуждённого состояния:  $\tau_n = \frac{1}{8\pi h c \nu_{nm}^3} B_{mn}$ . Эти формулы справедливы также и для колебательных и вращательных переходов (в этом случае следует переопределить матричные элементы дипольного момента). Для разрешённых электронных переходов обычно коэффициент поглощения на несколько порядков больше, чем для колебательных и вращательных переходов. Иногда коэффициент поглощения достигает величины  $\sim 10^3 - 10^4 \text{ см}^{-1} \text{ атм}^{-1}$ , т.е. электронные полосы наблюдаются при очень низких давлениях ( $\sim 10^{-3} - 10^{-4}$  мм рт. ст.) и малых толщинах ( $\sim 10 - 100$  см) слоя вещества [8].

## §1.7. МОДЕЛЬ ПОЛЯРИЗОВАННОГО КОНТИНУУМА И СОЛЬВАТАЦИОННАЯ МОДЕЛЬ

Модель поляризованного континуума – РСМ (Polarized Continuum Model) [9] представляет собой точное решение электростатической задачи об определении энергии взаимодействия точечных зарядов с окружающим их однородным непрерывным диэлектриком с заданной диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$ . В этом методе вместо решения уравнения Пуассона в трёхмерном пространстве надо решить соответствующие уравнения на ограничивающей растворитель поверхности – поверхность исключённого из растворителя объёма; объём, занимаемый растворителем, лежит вне объёма, ограниченного этой поверхностью, а сам субстрат полностью лежит внутри этого объёма [10]. Модель основана на

разделении растворенного вещества и растворителя, в виде бесструктурного бесконечного континуума, главной характеристикой, которой является диэлектрическая проницаемость и плотность. Вокруг молекулы растворенного вещества строится замкнутая поверхность, которая является границей между растворенным веществом и растворителем. Внутри полости, заключённой поверхностью, диэлектрическая проницаемость равна 1 (как в вакууме), за её пределами значение величины равно рассматриваемому растворителю (например, 78,4 для воды при 25° С). При динамических процессах, описание модели растворителя изменяется. Тем не менее, общий физический подход, содержится как в статических, так и в динамических случаях. На растворенных атомах или атомных группах, строится полость в виде огибающей сферы. Это необходимо для того, чтобы имитировать форму молекулы реально растворенного вещества. Для выравнивания поверхности могут быть добавлены другие сферы, в приближении так называемого растворителя, исключая поверхность. Процедура формирования полости может постоянно уточняться. Радиусы атомных сфер являются важными параметрами: они оптимизированы обеспечить сольватационные свободные энергии близкие к экспериментальным данным для большого набора неорганических и органических молекул. Как правило, в стационарных условиях для диэлектрической проницаемости используется значения, которые зависят только от температуры и давления. Тем не менее, при изучении динамических процессов, необходимо учитывать время релаксации поляризации растворителя. Тогда при характеристическом времени меньше, чем время релаксации растворителя, наблюдается задержка в отклике растворителя.

Расширенный и дополненный метод РСМ получил название метода сольватационной модели [11] (SMD, Density-based Solvation Model), основанной на анализе электронной плотности растворенной молекулы, взаимодействующей со средой растворителя. Данная модель не предполагает использование растворителя в явном виде, а только в виде диэлектрической среды с поверхностным натяжением на границе растворитель/растворенное вещество. Как известно, метод SMD включает поправки, связанные с кавитацией растворителя,

дисперсией и возможными изменениями в структуре локального растворителя, и поэтому даёт более точные энергии сольватации по сравнению с моделью поляризуемого континуума (PCM). Универсальность заключается в применении этой модели к любому заряженному или незаряженному растворенному веществу в растворителе, для которого известны немного дескрипторов, таких как: диэлектрическая константа, коэффициент преломления, величина поверхностного натяжения и параметры кислотности или основности [11].

В данной модели наблюдаемая свободная энергия сольватации представлена выражением:  $\Delta G_S^0 = \Delta G_{ENP} + \Delta G_{CDS} + \Delta G_{conc}^0$ , где  $E$  обозначает электронную,  $N$  — ядерную,  $P$  — поляризационную составляющую. Ядерная составляющая отвечает за разность полной энергии равновесной системы в газовой и жидкой среде. Если геометрии считать одинаковыми, то вместо  $ENP$  компоненты останется только  $EP$ . Аббревиатура  $CDS$  указывает на изменение энергии, связанное с кавитацией растворимого вещества ( $C$ ), с изменением в дисперсионной энергии ( $D$ ) и локальными изменениями структуры растворимого вещества ( $S$ ). Последнее слагаемое учитывает изменение концентрации между стандартным газовым и стандартным жидким состоянием. Если они одинаковы, то это слагаемое предполагается равным 0.

## **§1.8. ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ РЕЛАКСАЦИИ РАСТВОРИТЕЛЯ НА СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ**

Как правило, в стационарных условиях для  $\epsilon$  используются значения, которые зависят только от температуры и давления. Однако, когда изучаются динамические процессы, необходимо учитывать время релаксации поляризации растворителя. Если изучаемый процесс имеет характеристическое время меньше, чем время релаксации растворителя, то наблюдается задержка в отклике растворителя. Это может быть описано термином «быстрой» диэлектрической постоянной —  $\epsilon_f$ , которая находится в равновесии с растворенным веществом, в то время как

остальная часть задерживается или даже замораживается, если электронная плотность растворенного вещества меняется очень быстро. «Быстрая» диэлектрическая постоянная зависит от релаксационного механизма растворителя (переориентации молекул, колебаний атомов, электронной поляризации, и т.д.).

Она определяется как:  $\varepsilon_f(\omega) = \varepsilon_\infty + (\varepsilon - \varepsilon_\infty) \sum_k \frac{g_k}{1 - \omega^2 \tau_k^2}$ , где  $\tau_k$  характеристическое

время релаксации  $k$ -го механизма,  $\varepsilon_\infty$  предел диэлектрической постоянной для бесконечно быстрых процессов,  $\{g_k\}$  относительный вес  $k$ -го механизма такой, что  $\sum_k g_k = 1$ ;  $\{g_k\}$  и  $\{\tau_k\}$  известны экспериментально для многих широко используемых растворителей.

В случае поглощения или излучения фотонов, с последующим электронным переходом, когда электронная плотность зарядов растворенного вещества меняется быстро, то можно предположить, что  $\varepsilon_f = \varepsilon_{opt} = n^2$ , где  $n$ -показатель преломления растворителя,  $\varepsilon_{opt}$  – оптическая диэлектрическая постоянная. Это означает, что только электроны растворителя, способны передвигаться для того, чтобы оставаться в равновесии с растворенным веществом, в то время как молекулярные движения растворителя заморожены в ходе процесса. При расчётах с использованием TD-DFT для исследования вертикальных электронных переходов в стандартных методиках полагают, что  $\varepsilon_f = \varepsilon_{opt}$ .

С другой стороны, можно разделить заряд растворителя на быструю и медленную компоненты, чтобы воспроизвести часть сольватационного реакционного поля, которое всегда находится в равновесии с растворенным веществом и замороженной частью, соответственно. Они связаны отношением с

общим зарядом сольватации:  $\sigma'_{fast}(s) = \frac{\varepsilon_f - 1}{\varepsilon - 1} \sigma'(s)$ ,  $\sigma'_{slow}(s) = \frac{\varepsilon - \varepsilon_f}{\varepsilon - 1} \sigma'(s)$ , где  $\sigma(s)$

зарядовая плотность молекулы растворителя. Данный подход получил название расчёт TD-DFT с учётом неравновесной сольватации [12].

## §1.9. БАЗИСЫ

При выборе методики решения уравнения Шрёдингера, важно учитывать форму волновой функции. Волновую функцию было принято рассматривать в качестве линейной комбинации достаточно простых функций (например, функции Гаусса), называемой базисом или базисным набором. Каждая функция характеризуется некоторым числом подгоночных коэффициентов, обеспечивающих гибкость базиса. В соответствии с вариационным принципом, чем больше базисных функций, тем более точные решения могут быть получены. Но не стоит забывать о временных затратах: чем больше базисных функций (чем более гибкий базисный набор), тем больше времени потребуется для решения уравнения Шрёдингера.

Одним из первых появился минимальный базисный набор. Он был разработан под началом Р. Ф. Стюарта и Джона Попла в 1969 году. В данном базисе осуществляется представление атомных орбиталей слетеровского типа в виде комбинации гауссовых функций. Наиболее популярным в своё время был минимальный базисный набор STO-3G. Данный базис достаточно экономичен, но обладает одним существенным недостатком — он очень жёсткий, не способен подстраивать свой размер в зависимости от окружения атома, и характеризуется практически сферическим распределением заряда. В свете последнего, погрешность расчёта закономерно увеличивается с усложнением электронной структуры.

Более совершенными являются валентно-расщеплённые базисные наборы. Они представляют атомную орбиталь в виде двухвалентных функций одинаковой симметрии. Одна из них является более сжатой, а другая — диффузной. Наиболее распространёнными базисами этого типа являются 3-21G и 6-31G. Валентно-расщепленные базисные наборы были описаны в Работе Дж. С. Бинкли, Джона Попла и В. Дж. Гера 1980 года «Базисные наборы малого валентного расщепления для элементов второго периода».

Дальнейшим усовершенствованием базисных наборов было введение поляризационных базисных функций. Причиной этого послужил недостаток, присущий предыдущей группе базисов и заключающийся в том, что центр тяжести

отрицательного заряда совпадает с ядром атома, но это не всегда так. Среди поляризационных базисных наборов получил распространение 6-31G(d, p). Базисный набор 6-31G\*\*[13] (или 6-31G(d, p)) – это валентно-расщепленный базис, в котором атомные орбитали внутренней оболочки представлены шестью гауссовыми функциями, валентные атомные орбитали состоят из двух базисных функций каждая: первая из которых представляет собой линейную комбинацию трёх простых гауссовых функций, а вторая – одну простую гауссову функцию. Для учёта эффекта смещения «центра тяжести» отрицательного заряда атомных орбиталей относительно ядра, что наиболее характерно для высоко полярных молекул и малых циклов, в базисный набор включены функции более высокого побочного квантового числа: *d*-типа для тяжёлых атомов и *p*-типа для водорода. Введение поляризационных наборов *d*-типа в валентные *s*- и *p*-функции обозначается знаком «\*» или буквой (*d*). Добавление поляризационных наборов *p*-типа к атомным орбиталям водородных атомов обозначаются либо вторым знаком «\*», либо буквой (*p*). Базис 6-31G\*\* позволяет корректно описывать энергетические и геометрические характеристики органических соединений: длины связей, валентные углы, дипольный момент, распределение электронной плотности и прочее. Наиболее эффективно использование данного базиса для молекул среднего размера, до 100-150 атомов.

Базис *cc-pVDZ* относится к корреляционно-согласованным базисным наборам [14] серии *cc-pvXz*, где *X* – число базисных функций валентной *sp*-группы (*X* = 2, 3, 4 или, иначе, D, T, Q). Функции *sp*-группы берутся из расчётов методом самосогласованного поля, а экспоненциальные параметры поляризующих функций оптимизируются в расчётах методом конфигурационного взаимодействия. Для лучшей передачи корреляционных эффектов существенно включение в базис диффузных *sp*-функций. Базисный набор *cc-pVDZ* позволяет корректно описывать длины связей, валентные углы, дипольный момент, распределение электронной плотности и прочие структурные и спектральные характеристики органических молекул [15,16]. Базисные наборы хорошо моделируют электронейтральные системы. В анионах, когда электрон слабо связан с ядром, в базисный набор включают

диффузные функции  $s$ - и  $p$ -типа с малыми значениями экспоненциальных коэффициентов, что определяет большой размер и удалённость этих функций от ядра. Такие функции обозначают символом «+».

## §1.10. МЕТОДОЛОГИЯ И ИДЕОЛОГИЯ РАСЧЁТНЫХ МЕТОДОВ КВАНТОВОЙ МЕХАНИКИ ДЛЯ КЛАСТЕРОВ

В принципе, приближенное решение электронного уравнения Шрёдингера молекулы может быть получено методом Хартри-Фока, Кона-Шэма или любым методом, учитывающим электронную корреляцию. На практике поступают следующим образом (рисунок 1.2). Начинается с того, что задаётся приближительная геометрия молекулы или кристалла в виде координат ядер. Затем, как правило, в рамках МО ЛКАО выбирают базис. В принципе, на этом этапе, исходная информация и ограничивается. Далее проводится последовательный самосогласованный квантовохимический расчёт с вычислением всех необходимых интегралов; если возможно, учитывается симметрия молекулы, что ускоряет расчёт.

Строгость расчёта и, как следствие, его сложность, может быть различной. На расчёты в значительной степени влияет размер системы, а также базис, и, в итоге, доступность вычислительных ресурсов. Как правило относительно имеющихся ресурсов и корректируется постановка задачи и используемые методы. Очевидно, что чем более высокого уровня расчёт, тем больше можно доверять полученным данным. Пропорционально уровню расчёта растут и финансовые и временные затраты. Ранжировать методы можно в следующем порядке повышения точности расчёта энергии: HF~PBE<PBE0~B3LYP~MN15~MP2<MP4~CISD<CCSD(T)...

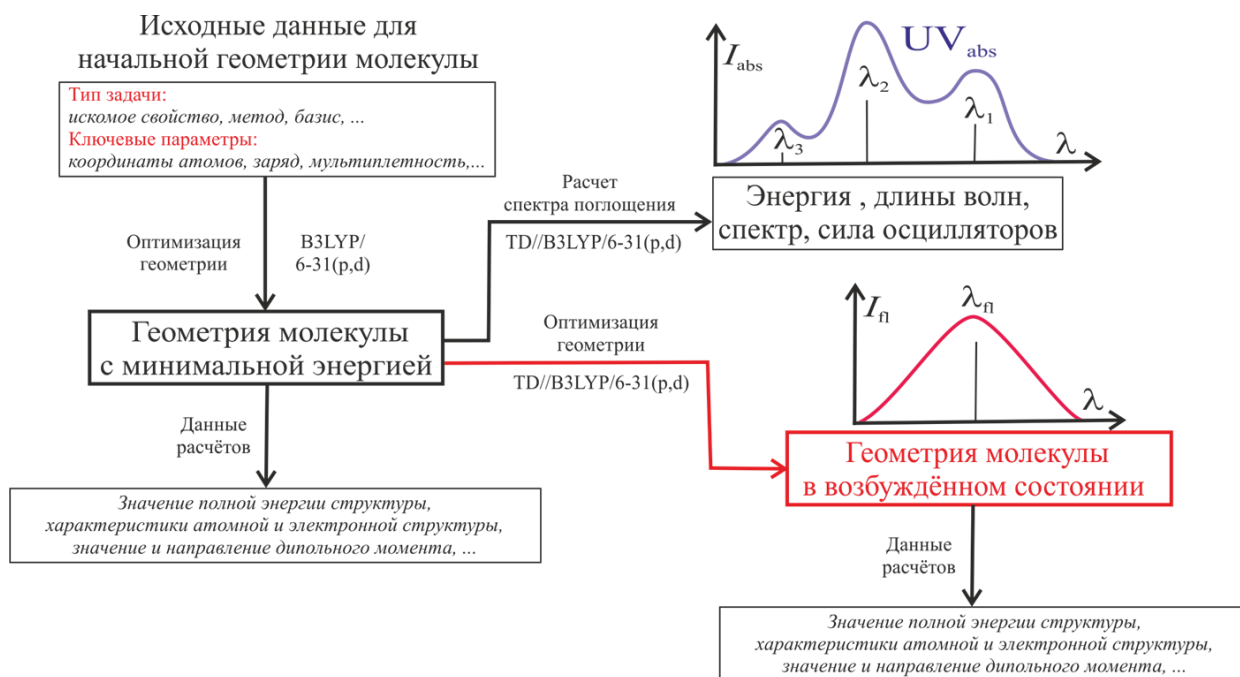


Рисунок 1.2 – Схема расчётов

В то же время, для многих целей, в практике химических исследований достаточно ограничиться весьма умеренным уровнем расчёта. Более того, в случаях, когда исследуются ряды соединений и важны лишь относительные, а не абсолютные значения энергии и других характеристик, можно не вычислять интегралы, возникающие в схеме расчёта, а оценивать их значения на основании некоторой экспериментальной информации. При этом оказывается, что значительную часть интегралов, считая их малыми, можно приравнять нулю, соответствующим образом эффективно изменив величины параметров. Такие методы называются полуэмпирическими: расчёт с их помощью значительно проще и быстрее неэмпирических методов; подчас он даёт и лучшие результаты. Это достигается за счёт удачной параметризации и одновременно выявляет основной недостаток полуэмпирических методов — плохую переносимость параметров от одного класса соединений к другому.



## §1.11. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Современные квантовохимические методы реализованы в нескольких компьютерных программах, это, прежде всего, GAMESS [17,18], TURBOMOL, QCHEM, GAUSSIAN, VASP [19], CRYSTAL [20,21], SPARTAN, ADF, и т.д [22]. Они, как правило, работают на современных суперкомпьютерах под управлением ОС LINUX, в разных вариациях. Программы находят равновесную геометрию молекул, в том числе в условиях растворителя, и твёрдых тел, рассчитывают энергетические характеристики в основном и возбуждённом состоянии находят дипольный момент, электростатический потенциал, электронную плотность и т.д. Программы могут считать с учётом электронной корреляции на основе теории возмущений, конфигурационного взаимодействия, связанных кластеров и функционала плотности. Дополнительно программные комплексы позволяют проводить моделирование химических реакций. В зависимости от поставленной задачи, программы позволяют использовать различные подходы с разной степенью точности и вычислительной нагрузкой.

Для построения начальной геометрии и визуализации рассчитанных структур в работе использовался молекулярный редактор Avogadro [23]. Это расширенный молекулярный редактор, разработанный для использования на нескольких платформах, в частности на ОС Windows, применяемый в вычислительной химии, молекулярном моделировании. Avogadro – бесплатная система проектирования и моделирования, которая подходит как для небольших молекул, так и для биомолекул, содержащих в структуре несколько тысяч атомов.

**§1.12. РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА К ДАННОМУ РАЗДЕЛУ**

1. Абаренков И.В. Начала квантовой химии / В.Ф. Братцев, А.В. Тулуб. - М., 1989.
2. Базилевский М. В. Метод молекулярных орбит и реакционная способность органических молекул / М. В. Базилевский. — М.: Химия, 1969.
3. Бандура А. В. Неэмпирические расчёты кристаллов в атомном базисе с использованием интернет-сайтов и параллельных вычислений / А. В. Бандура, Р.А. Эварестов. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004.
4. Берсукер И.Б. Электронное строение и свойства координационных соединений. Л: Химия, 1986. 348 с.
5. Блохинцев Д.И. Основы квантовой механики / Д. И. Блохинцев. — М.: Лань, 2004.
6. Буркерт У. Молекулярная механика / Н. Элинджер. — М.: Мир, 1986.
7. Грибов Л.А., Муштакова СП. Квантовая химия. М.: Гардарики. 1999. 389 с.
8. Дмитриев И. С. Квантовая химия — её прошлое и настоящее / С. Г. Семенов. — М.: Атомиздат, 1980.
9. Дмитриев И. С. Электрон глазами химика / И. С. Дмитриев. — Л.: Химия, 1983.
10. Жидомиров ГМ. Прикладная квантовая химия / А.А. Багатурьянц, И.А. Абронин. — М.: Химия, 1979.
11. Заградник Р. Основы квантовой химии / Р. Заградник, Р. Полак. — М.: Мир, 1990.
12. Майер И. Избранные главы квантовой химии. Доказательства теорем и вывод формул / И. Майер. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006.
13. Мелёшина А. М. Курс квантовой механики для химиков / М.: Высш, шк., 1980.
14. Минкин В. И. Квантовая химия органических соединений. Механизмы реакций / В. И. Минкин, Б.Я. Симкин, Р.М. Миняев. — М.: Химия, 1986.
15. Минкин В. И. Теория строения молекул/В.И. Минкин, Б.Я. Симкин, Р.М. Миняев. – Ростов н/Д, Феникс, 1997.
16. Немухин А.В. Молекулярное моделирование с программой PC GAMESS: от двухатомных молекул до ферментов / Б.Л. Григоренко, А.А. Грановский // Вест. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. — 2004. - Т. 45. - № 2. - С. 75-102.

17. Полуэмпирические методы расчёта электронной структуры: в 2 т. / под ред. Дж. Сигала. — М.: Мир, 1980.
18. Степанов Н. Ф. Квантовая механика и квантовая химия / М.: Мир, 2001
19. Сыркин Я. К. Химическая связь и строение молекул / М.Е. Дяткина. — М.; Л.: Госхимиздат, 1946.
20. Уилсон У. Электронные корреляции в молекулах / М.: Мир, 1987.
21. Физические методы исследования неорганических веществ / под ред. А.Б. Никольского. — М.: Издательский центр «Академия», 2006.
22. Фларри Р. Группы симметрии. Теория и химические приложения / М.: Мир, 1983.
23. Фларри Р. Квантовая химия / М.: Мир, 1985.
24. Фудзинага С. Метод молекулярных орбиталей / М.: Мир, 1983.
25. Цирельсон В. Г., Бобров М. Ф. Квантовая химия молекул. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2001. 110 с.
26. Цирельсон В. Г. Квантовая химия. Молекулы, молекулярные системы и твёрдые тела. БИНОМ., 2012. 496 с.
27. Цюликке Л. Квантовая химия: Т. 1. Основы и общие методы / М.: Мир, 1976.
28. Jensen F. Introduction to computational chemistry, 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons. 2007. 599 p.
29. Handbook of Theoretical and Computational Nanotechnology / Eds. M. Rieth, W. Schommers. American Scientific Publishers, 2006.
30. Levine I. N. Quantum Chemistry. Boston: Allyn and Bacon, Inc., 2000. 751 p.
31. Dmitri G. Fedorov. Complete Guide to the Fragment Molecular Orbital Method in GAMESS: From One Atom to a Million, at your Service / Book 2023. doi:10.1142/13063

## ГЛАВА 2. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ОРГАНИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЯХ

### §2.1. ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ

Флуоресцеиновые красители представляют собой гомологичный ряд соединений на основе флуоресцеина с постепенным замещением атомов водорода атомами галогенов (бром, йод). Красители многоступенчато диссоциируют, это приводит к разнообразию их ионных и таутомерных форм в широком интервале рН, вследствие этого их широко применяют для различных приложений. Флуоресцеин и его производные – хорошо известные флуоресцентные зонды [24–27]. Благодаря высокой поглощающей способности, квантовому выходу и фотостабильности красители на основе флуоресцеина используются как флуоресцентные сенсоры для маркировки и визуализации бесцветных систем таких как живые клетки [25–27], системы доставки лекарств [28], ферменты [29], белки [30], мицеллы [31], углеродные нанотрубки [32], сенсоры на основе FRET [33,34], а также спектральные индикаторы рН [25,27,29,32–36], вязкость [36] и давление [37] изменяются в локальной среде. Из-за изменений в структуре хромофора при протонировании флуоресцеин может быть использован для изучения ионной связи в протонодонорных биологических макромолекулах и полимерах [38].

Благодаря протеканию трёхступенчатой диссоциации в водных растворах флуоресцеиновые красители (эозин, эритрозин) могут пребывать в дианионной, моноанионной, нейтральной и катионной формах и дополнительно иметь ряд таутомеров одного и того же ионного состояния. Из-за того, что протонирование/депротонирование зачастую происходит в хромофорной группе, подобные изменения самым радикальным образом сказываются на спектрах поглощения и испускания. В отличие от хорошо изученных спектров поглощения, спектры испускания не до конца понятны из-за их сильного перекрытия, а также переноса протона в электронно-возбуждённых состояниях. Наименее изученными являются флуоресцентные свойства красителей (эозин, эритрозин), содержащих тяжёлые атомы (Br, I), у которых определенными считаются только

характеристики дианионной формы. По мере уменьшения рН уменьшается амплитуда спектра, происходит его батохромный сдвиг. Это связано с увеличением доли анионов, спектр которых смещён в красную область и имеет меньшую амплитуду по сравнению с дианионной формой. Один из способов изучения энергетической структуры молекул, когда экспериментальное исследование затруднено – квантовохимический расчёт.

Красителями или красящими веществами называют интенсивно окрашенные органические соединения, которые обладают способностью придавать окраску различного рода материалам. Наибольшее применение красители находят для украшения волокнистых материалов растительного и животного происхождения (хлопок, шерсть, шёлк, лен, кожа, бумага), регенерированной целлюлозы, искусственных и синтетических волокон. Применяются для окрашивания резины, пластических масс, жиров, восков, мыла, в производстве карандашей, полиграфических красок, лакокрасочных материалов, для получения чернил, туши, в производстве материалов для цветных фотографий и т.д. Из органических красящих веществ в лакокрасочном производстве используются главным образом окрашенные соединения, нерастворимые в воде и в связующих веществах, а также водорастворимые красители, предварительно переведённые в нерастворимые окрашенные соли. Все эти нерастворимые красящие вещества органического происхождения называются органическими пигментами [39–44].

От характера преобразования поглощённой энергии зависит специфика практического использования красителей. Красители, преобразующие поглощённую световую энергию в тепловую и передающие её в окружающую среду в виде тепла, используются именно как красители (в узком смысле этого слова). Красители, преобразующие поглощённую световую энергию в энергию химического процесса превращения веществ (например, галогенидов серебра в фотоэмульсии), используются в производстве кинофотоматериалов в качестве оптических сенсibilизаторов — веществ, повышающих чувствительность фотоплёнки к световым лучам определенной части спектра. Красители, преобразующие частично поглощённую световую энергию в тепловую, а частично

излучающие её в виде световых лучей иной (большей) длины волны, используются в качестве люминофоров и флуоресцентных (оптических) отбеливателей [39–44].

Флуоресценция – люминесценция, затухающая в течении короткого времени после прекращения возбуждения. Более длительная люминесценция называется фосфоресценцией; такое разделение люминесценции устарело и приобрело условный смысл качественных характеристики её длительности. Флуоресценция, как правило, – результат спонтанных квантовых переходов, поэтому её длительность определяется временем жизни возбуждённого состояния. Флуоресценция наблюдается в атомных и молекулярных газах. Многие органические вещества обладают флуоресценцией в жидких и твёрдых растворах, а также в кристаллическом состоянии. В общем случае флуоресценцией называют разрешённый по спину излучательный переход между двумя состояниями одинаковой мультиплетности: между синглетными уровнями  $S_1 \rightarrow S_0$  или триплетными  $T_1 \rightarrow T_2$ . Типичное время жизни такого возбуждённого состояния составляет  $10^{-11}$ – $10^{-6}$  с. Время жизни – это средний период времени, в течение которого флуорофор находится в возбуждённом состоянии. Флуоресцентные спектральные данные обычно представляют в виде спектров испускания. Спектр испускания флуоресценции – это зависимость интенсивности флуоресценции от длин волн (нм) или волновых чисел ( $\text{см}^{-1}$ ). Основное, первое и второе электронные состояния обозначают  $S_0$ ,  $S_1$  и  $S_2$  соответственно. Поглощение и испускание света хорошо иллюстрирует диаграмма Яблонского. Такое представление используется, чтобы наглядно показать мгновенную природу поглощения света. Этот процесс происходит примерно за  $10^{-15}$  с, время, слишком короткое для заметного смещения ядер (принцип Франка-Кондона). За поглощением света обычно следует несколько других процессов. Возбуждение флуорофора, как правило, происходит до некоторого высшего колебательного уровня состояний ( $S_1$  либо  $S_2$ ). За некоторыми редкими исключениями, для молекул в конденсированной фазе характерна быстрая релаксация на самый нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . Этот процесс называется внутренней конверсией и происходит большей частью за  $10^{-12}$  с. Поскольку типичные времена затухания флуоресценции близки к  $10^{-8}$  с, внутренняя

конверсия обычно полностью заканчивается до процесса испускания. Следовательно, испускание флуоресценции чаще всего осуществляется из термически равновесного возбуждённого состояния. Аналогично поглощению обратный переход электронов на самый нижний электронный уровень также приводит к колебательно возбуждённому состоянию [39–44].

Для явления флуоресценции известно несколько основных характеристик. Существующие исключения редки. Если какая-либо из перечисленных характеристик отсутствует у флуорофора, делается вывод о некоторых особых свойствах этого соединения. Как правило, всегда наблюдается сдвиг (стоксов сдвиг) испускания относительно поглощения в сторону больших длин волн, т.е. потеря энергии (исключение — атомы в газовой фазе). Потери энергии между возбуждением и испусканием неизменно наблюдаются для флуоресцирующих молекул в растворах. Одной из основных причин возникновения стоксова сдвига — быстрая релаксация на нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . К тому же обычно происходит переход на возбуждённые колебательные уровни состояния  $S_0$ , что приводит к дополнительной потере колебательной энергии. Стоксов сдвиг увеличивается благодаря влиянию растворителя на флуорофоры и реакциям в возбуждённых состояниях. В газовой фазе у атомов и молекул не всегда имеется стоксов сдвиг. Испускание без сдвига наблюдают тогда, когда концентрации газа достаточно малы для того, чтобы возбуждённые молекулы не претерпевали столкновений с другими молекулами до процесса испускания. Такие столкновения приводят к релаксации. В жидкой фазе процессы соударения происходят непрерывно. Спектр испускания флуоресценции обычно не зависит от длины волны возбуждения. При возбуждении на высшие электронные и колебательные уровни избыток энергии быстро расходуется, переводя флуорофор на самый нижний колебательный уровень состояния  $S_1$ . Эта релаксация происходит за время порядка  $10^{-12}$  с и является, по-видимому, результатом сильного перекрывания множества состояний с примерно равными энергиями. Благодаря такой быстрой релаксации длина волны возбуждения обычно не влияет на спектр испускания [39–44].

Обычно спектр испускания флуоресценции представляет собой зеркальное отражение спектра поглощения (правило Лёвшина), точнее, того поглощения, которое соответствует переходу из  $S_0$  в  $S_1$ . Симметричная природа этих спектров определяется тем, что и поглощение, и испускание обусловлены одними и теми же переходами, а также сходством колебательных энергетических уровней состояний  $S_0$  и  $S_1$ . Для многих молекул различное распределение электронов в состояниях  $S_0$  в  $S_1$  существенно не влияет на эти уровни энергии. Согласно принципу Франка — Кондона, все электронные переходы происходят без изменения межъядерного расстояния. В результате, если данная вероятность перехода (фактор Франка — Кондона) между нулевым и вторым колебательными уровнями максимальна при поглощении, соответствующий переход будет наиболее вероятен также и в испускании. Квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны возбуждения (закон Вавилова) [39–44].

В 1871 году знаменитый немецкий химик Адольф Байер сообщил о синтезе интенсивно флуоресцирующего красителя, названного флуоресцеином. Галогенпроизводные гомологи флуоресцеина — эозин, эритрозин. и другие красители также хорошо распространены из-за люминесцентных свойств, однако при введении в молекулу тяжёлых атомов, это приводит к снижению квантового выхода флуоресценции двухзарядных анионов  $R^{2-}$  этих соединений. «Дигидроксиксантеновые красители получают из ж-дигидроксипроизводных ароматического ряда». Одним из ярчайших представителей предоставленного ароматического ряда считается флуоресцеин. Эозин (тетрабромфлуоресцеин) является ярким розовым красителем, получается при бромировании флуоресцеина в спиртовой среде, в присутствии окислителей ( $NaClO_3$ ) и при кипении для того, чтобы уменьшить расход брома. Окраски на шёлке обладают красивой яркой жёлтой флуоресценцией. Эритрозин (тетрайодфлуоресцеин) является ярким красным красителем. Его получают подобным способом, используют йод, а в качестве окислителя — йодат калия. По сравнению с флуоресцеином, устойчивость окрасок этих красителей выше, однако не сильно. «Поэтому главные области их применения — производство чернил, художественных красок (в виде лаков, точнее



солей с металлами), губной помады и румян, крашение бумаги и пищевых продуктов, а также в качестве сенсibilизаторов в фотографии, в производстве цветных карандашей» [39–44].

В зависимости от pH растворителя флуоресцеин проявляет многообразие протолитических и таутомерных форм (рисунок 2.1), отличающихся структурой хромофора и спектральными свойствами. Поэтому флуоресцеин хорошо подходит для исследований, связанных с детектированием макро- и микроскопических изменений кислотности [35,45], при ионном связывании с положительно заряженными биологическими макромолекулами и полимерами. За исключением экстремально кислых и щелочных сред диссоциация флуоресцеина (R) в водных растворах протекает в три ступени [46]:



где константа  $K_{a(1-z)}$  отвечает равновесию  $\text{H}_i\text{R}^z \leftrightarrow \text{H}_{i-1}\text{R}^{z-1} + \text{H}^+$ .

Моделирование структуры, электронных и колебательных спектров дианионов ( $\text{R}^{2-}$ ) и других протолитических форм флуоресцеина в разных растворителях широко представлено в литературе [47–62]. Симметрия молекулы является важной характеристикой при моделировании спектральных свойств. Например, для дианиона флуоресцеина интенсивная флуоресценция связана с симметрией [51], а протонирование уменьшает симметрию молекулы, что увеличивает число разрешённых электронных состояний и вероятность безызлучательных процессов.

Ранее расчёты флуоресцеина проводились как полуэмпирическими методами (ZINDO [47], INDO/S [48]), так и с помощью DFT методов [49–62]. В последнем случае использовались различные функционалы (B3PW91 [51], BP86 [61], B3LYP [59]), базисы (6-31G\*\* [61], 6-311G\*\* [50], 6-311G\*\*++ [48], LANI2DZ [59]) и способы учёта растворителя в неявном (SCRF-PCM [61], IEF-PCM [48] [59]) и явном виде [48]. Результаты расчётов основной полосы поглощения дианиона

флуоресцеина (в зависимости от функционала, базиса и модели учёта растворителя) лежат в пределах от 421-453 нм для газовой фазы, 441-470 нм в воде (экспериментальное значение максимума поглощения составляет 490 нм). Учёт растворителя по сравнению с газовой фазой даёт красный сдвиг до 10 нм. Увеличение базисного набора через добавление гауссовых и диффузных функций позволяет улучшить результат на 10-15 нм. В итоге манипуляции с базисами и моделями растворителя суммарно дают сдвиг до 25 нм относительно газовой фазы, это, тем не менее, нельзя считать удовлетворительным при сопоставлении с экспериментальными данными, если стоит задача расшифровать сложный контур в спектрах поглощения и флуоресценции.

Спектры поглощения и испускания флуоресцеина в широком интервале рН в видимой области легко измеряются или взяты, например, из работ [46,63,64]. Однако корректное сопоставление этих результатов с теоретическими связано с преодолением ряда проблем: широкие и зачастую перекрывающиеся вибронные полосы поглощения и испускания различных протолитических и таутомерных форм (рисунок 2.1) затрудняют соотнесение экспериментальных и теоретических данных для чисто электронных переходов; различные протолитические и таутомерные формы могут присутствовать в растворе одновременно с различным вкладом [46,63]; конкуренция излучательного процесса и переноса протона в возбуждённом состоянии может приводить к тому, что поглощает одна протолитическая форма, а излучает – другая [46,63,64].

Для преодоления указанных трудностей и повышения информативности совместного использования спектральных и теоретических методов приходится использовать новые подходы. В работе найден оптимальный по результативности квантовохимический способ расчёта молекулы флуоресцеина. Для определения количества флуоресцирующих ионных форм использован анализ распределения положения электронного перехода в широком диапазоне рН. Метод линейной регрессии положения максимумов поглощения и испускания экспериментальных и рассчитанных электронных переходов использован для выбора реализуемых экспериментально наборов таутомерных форм.

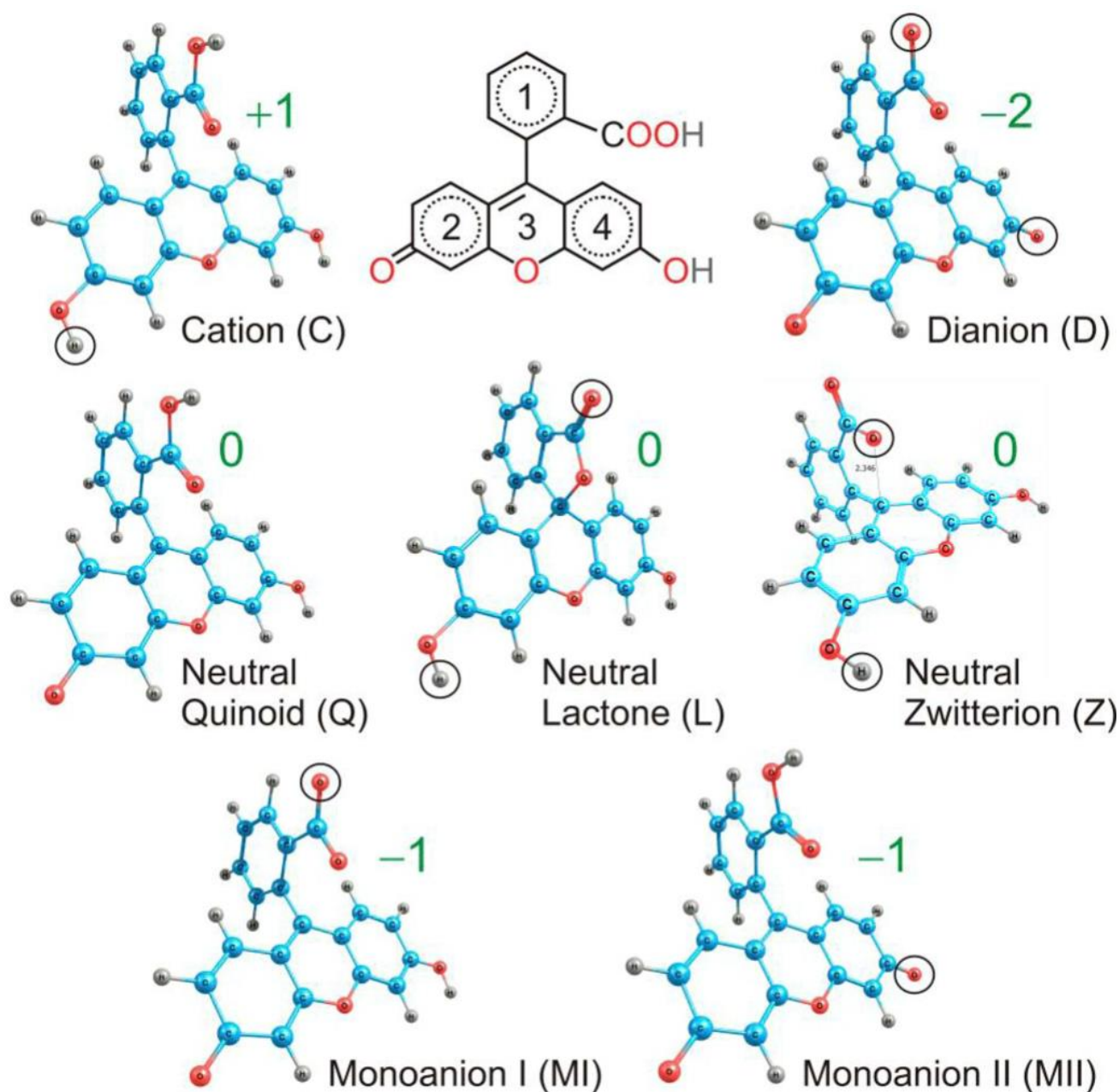


Рисунок 2.1 – Структура ионных форм флуоресцеина. Окружностью обведены отличающиеся части протонированных форм от хиноидной формы

При вариации pH флуоресцеин изменяет ионную форму в соответствии со значением протолитических констант равновесия (2.1) - (2.3). Учитывая значения констант, а также результатов работы [46] можно выделить четыре значения pH (10.5, 5, 3, 0.5), при которых в основном состоянии формируется преимущественно та или иная ионная форма. Спектры поглощения при данных pH представлены на рисунке 2.2 a-d.

Наличие нескольких максимумов и/или плеч в одном контуре свидетельствует:

- 1) о присутствии колебательной структуры рассматриваемого электронно-колебательного состояния;
- 2) об одновременном существовании нескольких ионных и/или таутомерных форм с характерными максимумами;
- 3) о наложении высоковозбужденных электронно-колебательных состояний.

В работе ограничились анализом первых полос поглощения  $S_0 \rightarrow S_1$  выше 370 нм, так как анализ высоковозбужденных состояний  $S_0 \rightarrow S_n$  сопряжён с проблемой однозначного соотнесения с уровнем возбуждения.

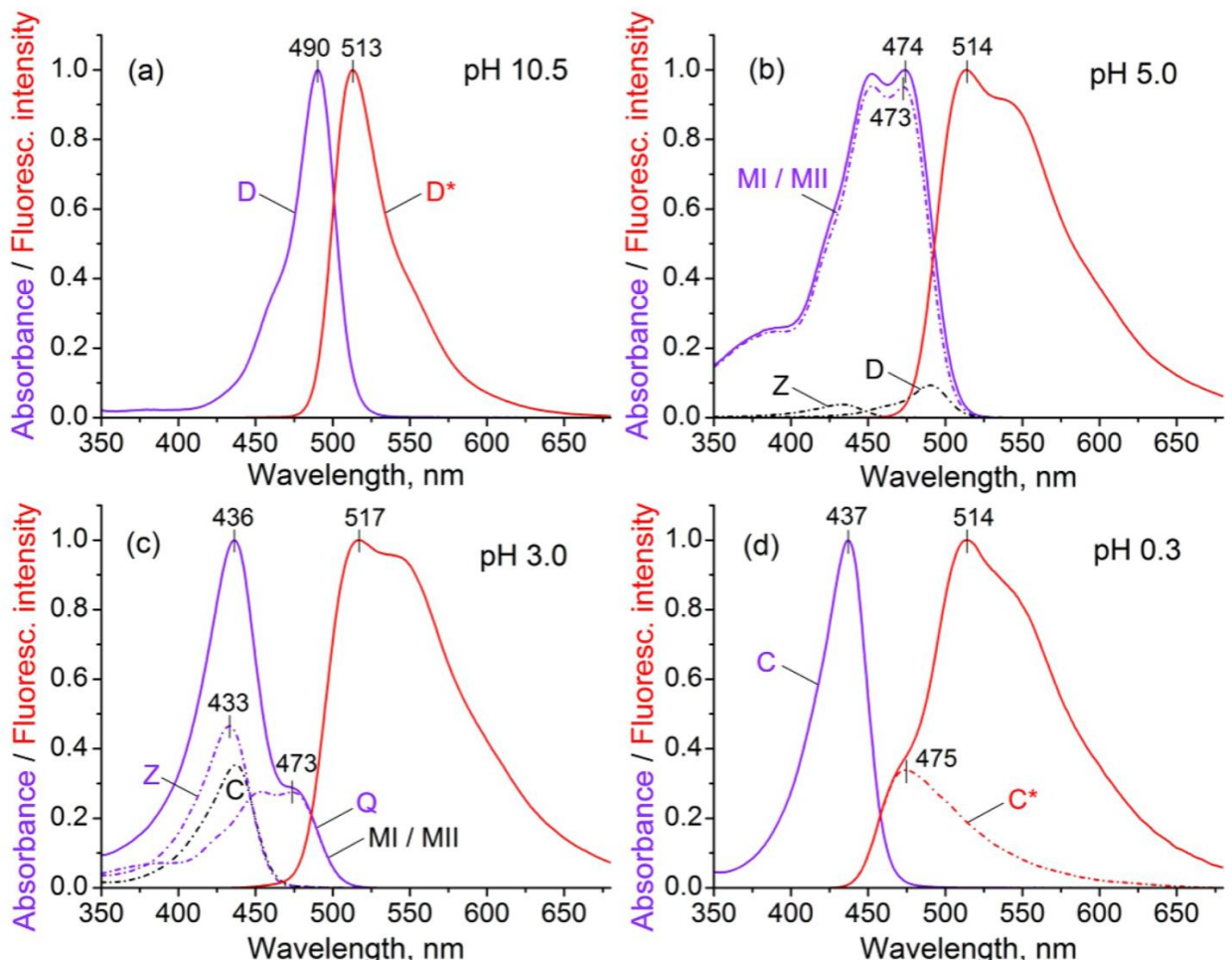


Рисунок 2.2 – Экспериментальные спектры поглощения и испускания флуоресцеина при различных значениях pH [65]. Фиолетовая линия – спектры поглощения, красная – флуоресценция. Теоретическое разложение спектра на индивидуальные таутомерные формы – пунктирные линии

При анализе спектров поглощения различных ионных можно опираться на оригинальные данные, а также на данные из работы [46], где использован метод глобального анализа формы контуров флуоресцеина при различных рН. При рН 10.5 (рисунок 2.2 а) флуоресцеин находится в форме дианиона (D) с максимумом 490 нм. Коротковолновое плечо в области 465 нм в спектрах поглощения D, имеет, согласно устоявшемуся мнению, колебательную природу и проявляется зеркально симметричных спектрах испускания D. При рН около 5 (рисунок 2.2 б) флуоресцеин имеет два максимума (452 и 474 нм), однако именно длинноволновый пик соотносят с основным поглощением моноанионной формы. Плечо на 385 нм, по-видимому, принадлежит одному из высоковозбужденных состояний. При рН 3 (рисунок 2.2 с) флуоресцеин находится в нейтральной форме, которая может быть представлена несколькими таутомерами (L, Z, Q), при этом отчётливо выделяются длины волн 436 и 477 нм. Результаты [46] позволили соотнести коротковолновый пик с Z формой, а длинноволновый с Q формой (лактонная форма бесцветна). Катионная форма (C) при рН 0.5 имеет максимум на 437 нм (рисунок 2.2 d). Дополнительно к нашим результатам в работе [46] было показано, что спектр цвиттериона близок к спектру катиона, но сдвинут в синюю область на 3 нм, а хиноидная форма близка к моноанионной. Кроме того, нейтральная форма представлена смесью L (70%), Z (15%) и Q (15%) нейтральных форм.

Ситуацию с соотношением пиков испускании к различным ионным состояниям осложняет конкуренция излучательного процесса и переноса протона в возбуждённом состоянии, которая может приводить к тому, что поглощает одна протолитическая форма, а излучает – другая. В литературе нет единого мнения по поводу числа флуоресцирующих форм. Так автор [63] полагает, что испускают только катионная, моноанионная и дианионная формы (нейтральная форма в возбуждённом состоянии переходит в моноанионную). Авторы работ [46,64] утверждают, что моноанионная хиноидная форма флуоресцеина также флуоресцирует, следовательно, излучают четыре ионных формы.

Не вызывает сомнения положение максимума испускания дианиона на 513 нм. Спектр испускания катиона также может быть получен в «чистом» виде в более

кислых растворах, чем рН 0.5, где пик катиона проявляется в виде плеча в районе 470 нм [63]. Максимум испускания для остальных ионных форм находится в районе 515-517 нм (рисунок 2.2, b-d), однако сам контур значительно уширен по сравнению с контуром дианиона. При рН 5 наблюдается уширение контура вблизи 494 нм и появление плеча в районе 550 нм, которое при уменьшении рН постепенно исчезает. Такая близость значений максимума для ионных форм, кроме D и C, может быть связана с тем, что широкий спектр испускания представляется собой совокупность спектров испускания нескольких ионных форм с различным квантовым выходом [63], из которых дианионная имеет максимальное значение.

## **§2.2. ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ В ПРОТОЛИТИЧЕСКИХ ФОРМАХ ФЛУОРЕСЦЕИНА**

Для разработки общего подхода к моделированию различных протолитических форм флуоресцеина проведено сравнение результативности использования различных базисов и способа учёта растворителя на примере дианиона флуоресцеина, т.к. данная ионная форма получена экспериментально в «чистом» виде. Квантовохимические расчёты ионных форм флуоресцеина проводились с помощью метода функционала плотности B3LYP. Для вычисления длин волн использовали метод TD-DFT. Для учёта влияния растворителя (воды) использовали модель поляризованного континуума (PCM) Томаса, были проведены расчёты спектров как с учётом равновесной сольватации (PCM), так и без (PCM\* – см. главу 1).

Расчёты проводились следующим образом. Атомная структура дианиона флуоресцеина полностью оптимизирована для основного состояния в симметрии  $C_1$  с использованием B3LYP функционала как в газовой фазе, так и с учётом растворителя. Затем на основании данной геометрии рассчитывались спектры поглощения с помощью TD. Для PCM геометрии в основном состоянии проведены расчёты спектров, как с учётом равновесной сольватации (PCM), так и без (PCM\*)



(рисунок 2.3 а). Далее на основании полученных геометрий из основного состояния проводили полную оптимизацию структуры в возбуждённом состоянии в симметрии  $C_1$  с использованием ВЗLYP функционала в газовой фазе. При учёте воды отдельно искали геометрию при равновесной сольватации (PCM), так и без (PCM\*). Всё это проводили последовательно в 6-31(p,d), 6-311(p,d), 6-311(p,d)++, cc-pVDZ, aug-cc-pVDZ базисах (рисунок 2.3 б).

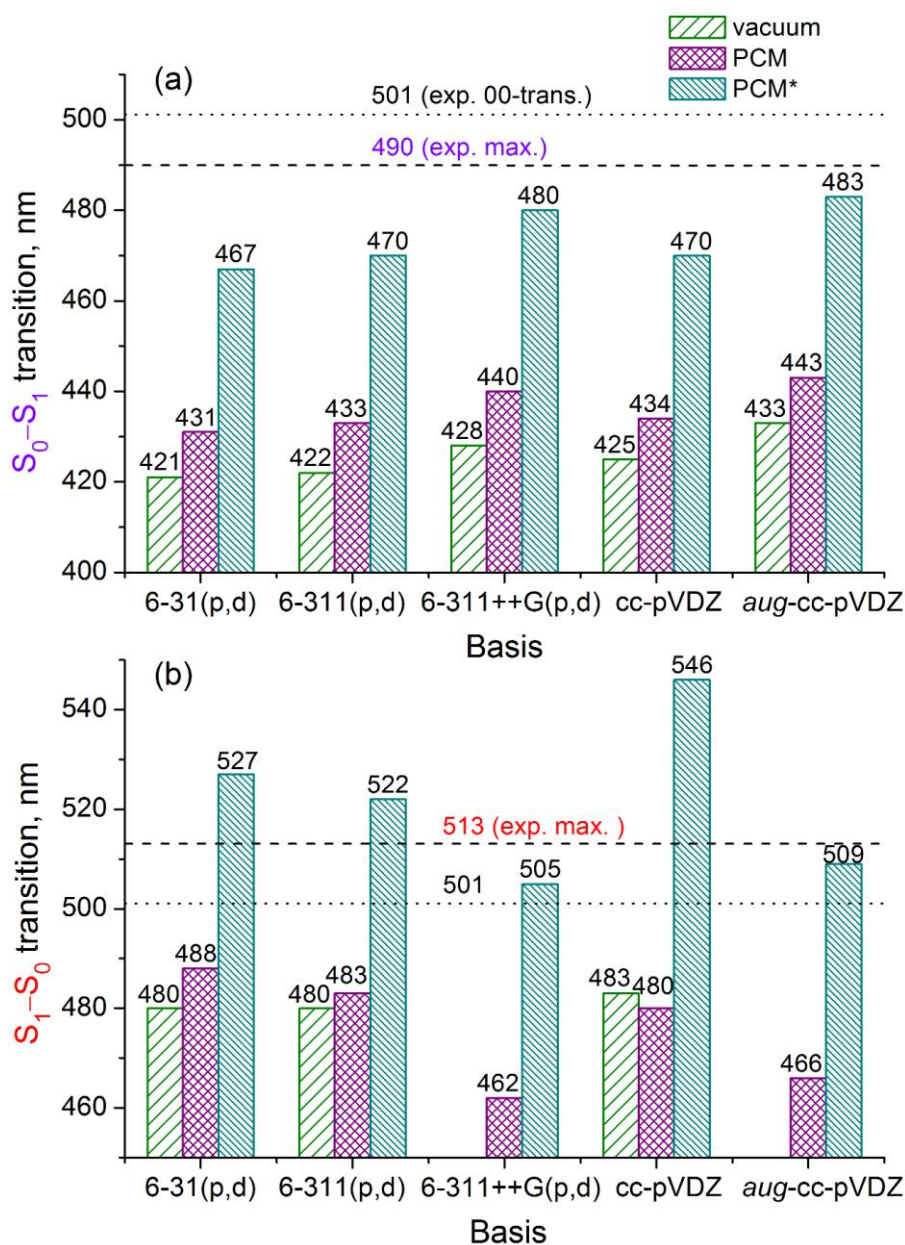


Рисунок 2.3 – Результаты расчёта положения перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  (а) и  $S_1 \rightarrow S_0$  (б) дианиона флуоресцеина в различных базисах с учётом растворителя методом ВЗLYP. Экспериментальные значения [65] соответствуют максимумам в спектрах поглощения и испускания

С ростом базисного набора для каждого типа расчёта полученная длина волны перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  увеличивается и приближается к экспериментально наблюдаемой величине (рисунок 2.3 а). Аналогичная тенденция наблюдается и при переходе от вакуума к РСМ моделям. При этом резкий скачок расчётных величин (до 40 нм) и их приближение к экспериментальным данным происходит в случае применения адиабатического приближения. Расчёты показывают важность учёта «диффузных» функций, которые используют при моделировании анионов, возбуждённых состояний и слабых взаимодействий. Этот эффект для молекулы дианиона флуоресцеина особенно хорошо виден при переходе от базиса 6-311(p,d) к 6-311(p,d)++: приближение к экспериментальному значению на 6, 7, 10 нм для вакуума, РСМ и РСМ\* соответственно, а при переходе от базиса cc-pVDZ к aug-cc-pVDZ: приближение к экспериментальному значению на 8, 7, 13 нм для вакуума, РСМ и РСМ\* соответственно (рисунок 2.3 а). При этом простое увеличение базисных функций (от 6-31(p,d) до 6-311(p,d)) практически не приводит к улучшению результата расчёта. Таким образом, по результатам расчёта длины волны перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  флуоресцеина лучшим базисом для дианиона является aug-cc-pVDZ в приближении РСМ\*. Для других ионных форм флуоресцеина (с зарядом  $-1 e^-$  и тем более нейтральных молекул и катионов) преимущество aug-cc-pVDZ и 6-311(p,d)++ над базисом 6-31(p,d) будет небольшим. В целом все результаты предсказуемо улучшаются при росте базисных наборов. Отдельно произведён расчёт в базисе РСМ\*//B3LYP/aug-cc-pVTZ в геометрии, полученной в базисе aug-cc-pVDZ. Различие по всем длинам волнам между этими базисами составляет не более 2 нм, что говорит о насыщении базисного набора.

При расчёте переходов с переносом заряда хорошо себя зарекомендовали LC-функционалы (LC-BOP, CAM-B3LYP [4]). Для дианиона флуоресцеина сделана проверка на основе этих функционалов, они неизменно показывали результаты, худшие по сравнению с B3LYP. Подобная ситуация наблюдается в работе Zhou [58], где был использован функционал CAM-B3LYP, который дал величину перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  в 439 нм (2.83 eV), при этом отстройка от эксперимента составила 0.31 eV (2.52 eV из эксперимента [25]). Дополнительно выполнены расчёты для



ионной формы MI с использованием CAM-B3LYP, где также результаты оказались хуже по сравнению с B3LYP на 0,3 eV. Для переходов с переносом заряда также существует параметр  $\Lambda$  [66], который является критерием для разделения валентных состояний от переходов с переносом заряда и ридберговских переходов. Локальные возбуждения имеют относительно большое перекрытие,  $0,45 < \Lambda < 0,89$ , что указывает на то, что занятые и виртуальные орбитали, участвующие в возбуждении, занимают аналогичные области пространства. Для все рассчитанных переходов  $0,50 < \Lambda < 0,75$ , что говорит о том, что перенос заряда не играет существенной роли в молекуле флуоресцеина при поглощении или излучении. Это находит подтверждение в работе Zhang [67], где экспериментально показано, что фотоиндуцированный перенос заряда для флуоресцеина играет наименьшую роль из всего ряда ксантеновых красителей.

Таким образом, для основного состояния поиск геометрии таутомерных форм флуоресцеина в симметрии  $C_1$  в дальнейшем осуществлялся с помощью PCM/B3LYP/aug-cc-pVDZ, при этом длину волны перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  и силы осцилляторов всех ионных форм получали с помощью TD/PCM\*/B3LYP/aug-cc-pVDZ. Для возбуждённого состояния флуоресцеина геометрию искали с помощью PCM\*/B3LYP/aug-cc-pVDZ, при этом длину волны перехода  $S_1 \rightarrow S_0$  с помощью TD/PCM\*/B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Изменение зарядового состояния флуоресцеина приводит к перераспределению частичных зарядов атомов всей молекулы. Из-за большого объёма данных удобнее рассматривать заряды не на отдельных атомах, а на группах атомов. Для анализа распределения зарядов в структуре красителя выбрали четыре цикла: 1, 2, 3, 4 (рисунок в таблица 2.1). Общий заряд цикла получали путём сложения частичных зарядов (по Лёвдину) атомов углерода и кислорода (цикла 3), входящих в данный цикл (таблица 2.1). Исходя из распределения зарядов по циклам можно найти общие черты, по которым ионные формы флуоресцеина можно разбить на четыре группы (таблица 2.1). К первой группе отнесены формы D и MII, у которых наблюдается большой отрицательный заряд на трицикле ( $-1,1 \div -1,2 e^-$ ). Ко второй группе можно отнести MI и Q формы, у

которых значения зарядов на циклах 2-4 близки ( $-0,1 \div -0,2 e^-$ ). К третьей группе – Z и C, где наблюдается большой положительный заряд на трицикле. Лактонная форма представлена распределением зарядов на трициклах, отличающихся от остальных ионных форм, близким к нулю. Обнаруженные закономерности распределения зарядов на трицикле предположительно проявляются в сходстве/различии спектров поглощения различных ионных форм.

Таблица 2.1 – Распределение зарядов ( $e^-$ ) на циклах по Лёвдину в структурах ионных форм флуоресцеина в основном состоянии, PCM/B3LYP/*aug-cc-pVDZ*

	Группа	Ионная форма	Заряд				
			Трицикл	Цикл			
				2+3+4	1	2	3
1	D (2-)	-1,16	-0,85	-0,38	-0,40	-0,38	
	MII (1-)	-1,07	0,07	-0,34	-0,39	-0,34	
2	MI (1-)	-0,21	-0,79	0,31	-0,29	-0,23	
	Q (0)	-0,11	0,11	0,33	-0,27	-0,17	
3	C (1+)	0,89	0,11	0,31	0,27	0,31	
	Z (0)	0,61	-0,61	0,40	-0,20	0,41	
4	L (0)	0,07	-0,07	0,25	-0,43	0,25	

Молекулярные орбитали, участвующие в переходах, показаны на рисунке 2.4. Формы D и MII (группа 1) имеют схожие занятые и виртуальные орбитали, локализованные на тройном хромофорном кольце. То же самое верно для форм MI и Q (группа 2), а также для формы C (группа 3). Локализация участвующих в возбуждении орбиталей на хромофоре приводит к большим значениям силы осцилляторов (от 0,84 до 1,16) для этих форм. Напротив, в Z-форме (группа 3) только виртуальная орбиталь центрируется на хромофоре, в то время как занятая орбиталь расположена в основном на кольце 1, производя гораздо меньшие значения силы осциллятора 0,18. Наконец, занятые и виртуальные орбитали L-формы (группа 4) полностью локализованы на хромофоре и кольце 1 соответственно. Такая локализация даёт очень маленькие силы осциллятора – 0,09.

Существует корреляция между силами осцилляторов и экспериментальными коэффициентами экстинкции, за исключением хиноидной Q-формы (таблица 2.2).

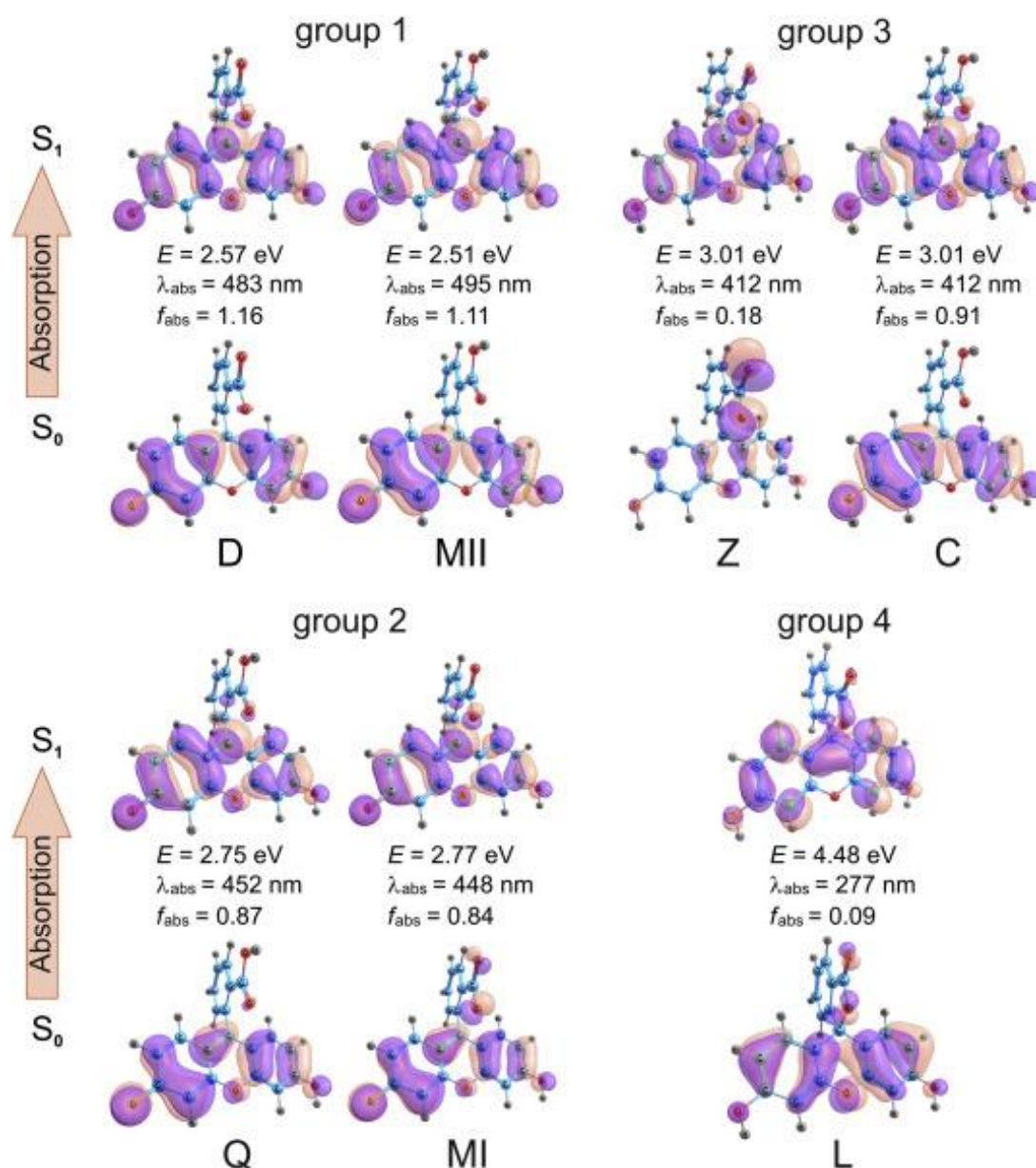


Рисунок 2.4 – Пары занятых и виртуальных молекулярных орбиталей, участвующие в возбуждениях при геометрии основного состояния. Показаны энергии возбуждения (E), соответствующие длины волн поглощения ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) и силы осцилляторов ( $f_{\text{abs}}$ )

Электронное возбуждение приводит к искажению геометрии основного состояния, в основном влияя на несколько двугранных углов во всех протолитических / таутомерных формах. В возбуждённом состоянии формы Q и MII являются наиболее искажёнными, что объясняет их большой стоксов сдвиг

(103 и 131 нм) по сравнению с другими формами (26–55 нм), как видно из рассчитанных длин волн в таблице 1. А значительный Stokes сдвиг в форме Q согласуется с более ранними предсказаниями расчётов LR-PCM/TD-B3LYP (130 нм) [58]. Результаты квантовохимических расчётов синглетных электронных переходов  $S_0 \rightarrow S_1$  и  $S_1 \rightarrow S_0$  сопоставлены с максимумами длин волн спектров поглощения и испускания разных ионных форм флуоресцеина. Соответствующие параметры суммированы в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Теоретические и экспериментальные оптические свойства ионных форм флуоресцеина

Форма	Заряд	Поглощение					Флуоресценция		
		Теория <sup>a</sup>			Эксп. <sup>b</sup>		Теория <sup>a</sup>		Эксп. <sup>b</sup>
		Группа (заряд) <sup>c</sup>	$\lambda_{\text{abs}}$ , нм	$f_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{abs\_max}}$ , нм	$\epsilon_{\text{max}}$ , $10^4$ мол л <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	$\lambda_{\text{fl}}$ , нм	$f_{\text{fl}}$	$\lambda_{\text{fl\_max}}$ , нм
D	-2	1 (-1,16)	483	1,16	490	8,0	509	1.05	513
MI	-1	2 (-0,21)	448	0,84	474	2,9	483	0.69	? <sup>d</sup>
MII	-1	1 (-1,07)	495	1,11			626	0.35	–
L	0	4 (0,07)	277	0,09	–	–	284	0.14	–
Z	0	3 (0,61)	412	0,18	436	1,3	467	0.06	? <sup>d</sup>
Q	0	2 (-0,11)	452	0,87	477	0,4	555	0.57	? <sup>d</sup>
C	+1	3 (0,89)	412	0,91	437	5,3	453	0.14	473 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>B3LYP/aug-cc-pVDZ/PCM\*,  $\lambda_{\text{abs}}$  и  $f_{\text{abs}}$  длина волны поглощения (abs) и сила осциллятора перехода  $S_0 \rightarrow S_1$ , соответственно;  $\lambda_{\text{fl}}$  и  $f_{\text{fl}}$  длина волны флуоресценции (fl) и сила осциллятора перехода  $S_1 \rightarrow S_0$  соответственно. <sup>b</sup>В данной работе измерено:  $\lambda_{\text{abs\_max}}$  и  $\lambda_{\text{fl\_max}}$  - максимальные длины волн в спектрах поглощения и флуоресценции, соответственно;  $\epsilon_{\text{max}}$  - молярный коэффициент экстинкции при  $\lambda_{\text{abs\_max}}$ . <sup>c</sup>Протолитические формы сгруппированы в соответствии с зарядом по Лёвдину на трицикле в основном состоянии. <sup>d</sup>Значения  $\lambda_{\text{fl\_max}}$  для моноанионной, хиноидной и цвиттерионной форм, отмеченные знаком «?» не может быть определен однозначно. <sup>e</sup>Взято из [63]

В спектрах поглощения наблюдается однозначное соотнесение результатов расчёта и эксперимента во всех случаях, за исключением лактонной формы. Полосы поглощения лактонной формы флуоресцеина расположены в УФ области, где также лежат высоковозбужденные состояния красителей, поэтому сопоставить теорию с экспериментом не представляется возможным. Для моноанионной формы таутомерам MI и MII была предположительно сопоставлена одна и та же длина волны. В спектрах испускания однозначное соответствие экспериментальных и теоретических результатов установлено для дианионной и катионной форм. Для моноанионной, хиноидной и цвитерионной форм экспериментальные значения длин волн испускания обозначены «?» (таблица 2.2).

Для поиска ответственных форм в экспериментальном контуре флуоресценции был применён подход, который используют для верификации методов в теории функционала плотности. На рисунке 2.5 приведена зависимость экспериментальных длин волн поглощения D, MI, Q, Z, C и испускания D, C от расчётных, которая оказалась линейной с высоким линейным коэффициентом корреляции  $R = 0.986$ . Найденная линейная регрессия говорит о корректности единого теоретического подхода при описании различных ионных форм флуоресцеина.

Одинаковые спектральные свойства в поглощении для Z и C форм обнаружены как в расчёте (412 нм), так и в эксперименте (436, 437 нм). Близкие спектральные свойства в поглощении показывают MI и Q формы: 448, 452 нм – расчёт (разница 4 нм), 474 и 477 нм – эксперимент (разница 3 нм), соответственно. Подобная разница (около 2 нм) обнаружена в положении 00-перехода между моноанионной и нейтральной формами при совместном анализе спектров поглощения и испускания (рисунок 2.5). Полученное согласие между электронной структурой, рассчитанными спектральными характеристиками и экспериментальными данными говорит об адекватности теоретического подхода.

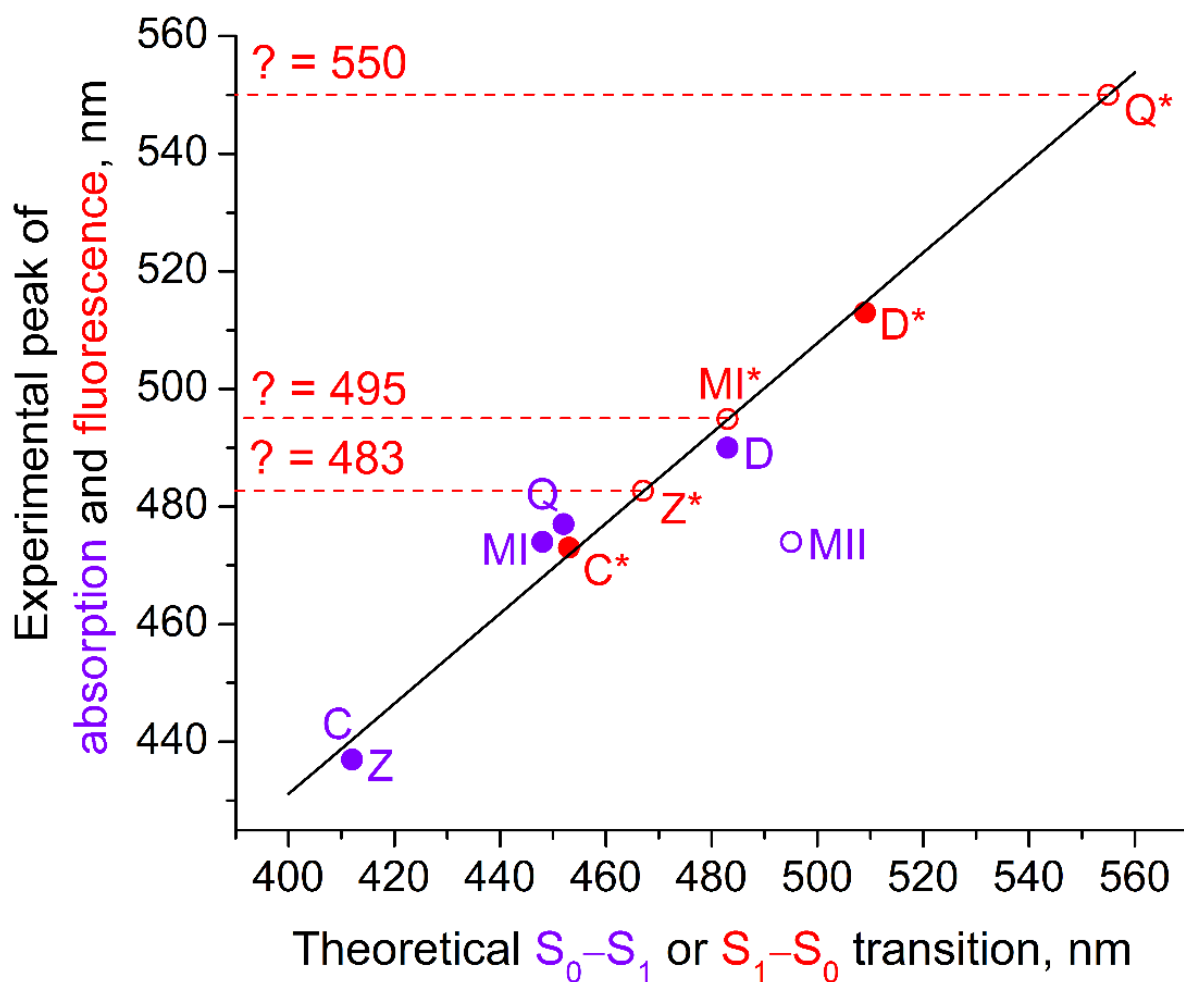


Рисунок 2.5 – Корреляция между расчётными и экспериментальными длинами волн в спектрах поглощения (тёмные фиолетовые кружки) и флуоресценции (закрашенные красные кружки) различных протолитических и таутомерных форм. Пустые кружки (обсуждаемые результаты) показывают теоретические прогнозы для случаев, когда экспериментальные значения недоступны (флуоресценция для ионных форм MI\*, Q\* и Z\*)

Найденные совпадения спектральных свойств MI и Q форм, а также C и Z форм соответствуют группам 2 и 3 (таблица 2.1) по заряду на трицикле. Совпадение в расчётах заряда на трицикле наблюдается у D и MII (группа 1, таблица 2.1), что соответствует близким длинам волн в расчётах (483, 495 нм, соответственно). Обнаруженные закономерности говорят о том, что именно трицикл флуоресцеина является хромофором. Найденная линейная регрессия может быть использована для прояснения «спорных» моментов, касающихся выбора таутомерных форм и экспериментальных значений электронных переходов. Например, как было

показано в работе [64] при равновесии (2) из двух таутомерных форм моноаниона (MI, MII) экспериментально реализуется MI форма с длиной волны 474 нм. Точка, соответствующая форме MI, ложится на линию регрессии, что является дополнительным аргументом в пользу существования данной таутомерной формы. MII выпадает из найденной линейной зависимости (рисунок 2.5).

С использованием полученной линейной корреляции было предложено решение для определения экспериментального значения длин волн испускания MI, Q и Z («?» в таблице 2.2). Определенные методом экстраполяции линейной зависимости длины волн испускания хиноида, моноаниона и цвиттериона составляют 549, 494 и 482 нм, соответственно. Линии 549 и 494 нм действительно присутствуют в сложном контуре испускания (рисунок 2.6).

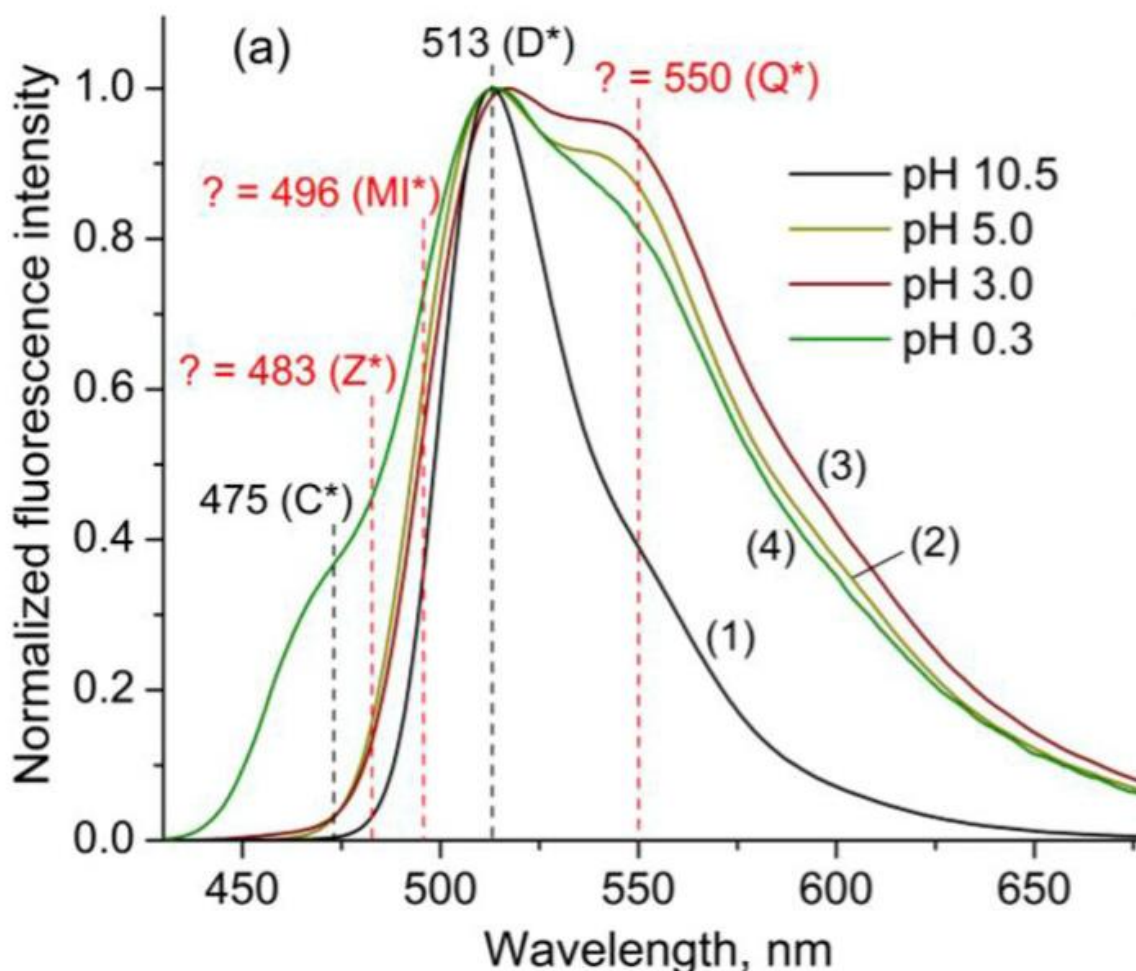


Рисунок 2.6 – Наложение предсказанных (рисунок 2.5) длин волн для MI, Z, Q на экспериментальные спектры испускания флуоресцеина при разных pH. Пики для форм MI\*, Z\* и Q\* определяются с использованием линейной регрессии

Вклад полосы цвиттериона на 482 нм незначителен. Это совпадает с мнением авторов [46,64], которые полагают, что испускание цвиттериона нельзя наблюдать из-за перехода этой формы в возбуждённом состоянии в катионную и моноанионную.

Резюмируя, можно сказать, что при  $0,5 < \text{pH} < 6$ , форму контура испускания можно интерпретировать как результат испускания различных ионных форм, сформировавшихся как в результате прямого возбуждения, так и в результате переноса протона во флуоресцентном состоянии флуоресцеина. Так, уширение в области 495 нм можно отнести к присутствию MI формы. Пик в районе 550 нм можно соотнести с появлением хиноидной формы, а пик 474 нм при низких pH ( $\text{pH} < 0,5$ ) с катионной формой. При этом доминирующей флуоресцентной формой в широком интервале pH остаётся дианионная форма с испусканием на 513 нм, положение которой во многом определяет максимум испускания смеси ионных форм.

### **§2.3. ВЛИЯНИЕ ГАЛОГЕН ЗАМЕЩЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ ИОННЫХ ФОРМ ЭОЗИНА И ЭРИТРОЗИНА**

Важным фактором влияния электронодонорных и электроноакцепторных заместителей на электронный спектр поглощения и вероятность электронных переходов является снятие запретов по симметрии. Введение заместителей в общем случае снимает запрет и увеличивает интенсивность поглощения света, что наблюдается при галогензамещении водорода на бром и йод для флуоресцеиновых красителей. В зависимости от pH флуоресцеин и его галогензамещённые гомологи в основном состоянии в водном растворе могут существовать в четырёх различных ионных формах: дианион при  $14 > \text{pH} > 4,0-4,5$ , моноанион при  $8,5-9,0 > \text{pH} > 2,0-2,5$ , нейтральная молекула при  $6,0-6,5 > \text{pH} > 0-0,5$  и катион при  $4,0-4,5 > \text{pH} > 0$  (таблица 2.3). Только для двух форм флуоресцентных красителей (дианион и катион) можно измерить спектр поглощения отдельной ионной формы: при очень



щелочных и очень кислых условиях. Для моноанионных и нейтральных частиц можно выбрать рН, при котором данная форма будет преобладать. При рН 3,0 нейтральная форма представляет основную вклад (82–85%), в то время как моноанионная и катионная формы составляют 3–4% и 11–14% соответственно. При рН 0,3 преобладает катион (> 98–99%). При рН 5,0 флуоресцеин в основном существует в виде моноаниона (81–83%), а остальные доли нейтральных молекул (13–14%) и дианиона (3%) довольно низки. При рН 3,0 нейтральная форма представляет основную вклад (82–85%), в то время как моноанионная и катионная формы составляют 3–4% и 11–14% соответственно [68,69].

При расчёте спектральных характеристик важно знать, сопровождаются ли оптические переходы переносом заряда, что в свою очередь влияет на выбор вида функционала. Критерием для разделения локальных переходов от переходов с переносом заряда и ридберговских переходов является анализ так называемого  $\Lambda$ -параметра (см. выше). Анализировался  $\Lambda$ -параметр, который является критерием для разделения локальных переходов от переходов с переносом заряда и от ридберговских переходов. Для всех рассчитанных структур «лямбда-параметр» был в пределах  $0,51 < \Lambda < 0,71$ , это означает что перенос заряда не играет существенной роли в данных молекулах при поглощении и излучении.

Дианионная форма D в возбуждённом состоянии, которая преобладает при рН 10,5, излучает при 513 нм. При рН 0,3 видимое плечо в области 470–480 нм относится к форме С\*. В очень кислых условиях (5–10 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  или  $\text{HCl}$ ) это плечо становится доминирующим пиком при 475 нм). Максимумы флуоресценции в диапазоне  $0,3 < \text{pH} < 5,0$  лежат около 514–517 нм, при этом спектры значительно уширены относительно спектра дианиона. Например, при рН 5,0 наблюдается уширение около 480–500 нм и плечо около 550 нм, которое постепенно исчезает при уменьшении рН. Эти тенденции указывают на то, что при промежуточном значении рН спектр флуоресценции флуоресцеина содержит вклады нескольких ионных форм.

Таблица 2.3 – Спектральные теоретические и экспериментальные характеристики эозина и эритрозина в воде

Протоли- ческие формы	Поглощение				Испускание		Стоксов сдвиг
	Расчёт		Эксперимент		Расчёт		Расчёт
	${}^a\lambda_{S_0 \rightarrow S_1}$ , нм	${}^b f_{S_0 \rightarrow S_1}$	${}^c \lambda_{\text{макс}}$ , нм	$d_{\epsilon}^{\text{макс}}$ , $10^3$ лмоль <sup>-1</sup> . см <sup>-1</sup>	${}^e \lambda_{S_1 \rightarrow S_0}$ , нм	${}^f f_{S_1 \rightarrow S_0}$	${}^g \tilde{\nu}$ , см <sup>-1</sup>
Эозин							
D	493	1,20	515	96,7	510	1,17	680
MI	471	0,76	517-519	81,9	518	0,33	1930
MII	507	1,24			576	0,83	2360
L	288	0,11	480-485	8,5	295	0,07	820
Q	478	0,77			584	0,47	3800
Z	–	–			–	–	–
C	442	0,89	453-455	44,5	461	0,80	930
Эритрозин							
D	498	1,21	525	94,6	522	1,13	920
MI	477	0,75	530	91,9	526	0,57	1950
MII	512	1,25			596	0,76	2750
L	279	0,90	500	11,4	290	0,79	1360
Q	491	0,70			556	0,38	2380
Z	–	–			–	–	–
C	469	0,82	462	45,2	487	0,70	790
${}^a \lambda_{S_0 \rightarrow S_1}$ и ${}^b f_{S_0 \rightarrow S_1}$ длина волны поглощения и сила осциллятора перехода $S_0 \rightarrow S_1$ соответственно; ${}^c \lambda_{\text{макс}}$ экспериментальная длина волны поглощения; $d_{\epsilon}^{\text{макс}}$ – экстинкция, ${}^e \lambda_{S_1 \rightarrow S_0}$ , ${}^f f_{S_1 \rightarrow S_0}$ длина волны флуоресценции и сила осциллятора перехода $S_1 \rightarrow S_0$ соответственно							

Для лактонной формы нет экспериментальных данных (поглощает в УФ-диапазоне), и измеренный спектр моноаниона не даёт возможности различить таутомеры MI и MII. Для спектров флуоресценции однозначное соответствие экспериментальных и теоретических результатов может быть установлено только

для дианионной и катионной форм. Наличие нескольких максимумов и плеч в этих спектрах может свидетельствовать: а) о наличии колебаний, б) о сосуществовании нескольких таутомерных форм с различными характеристическими максимумами и в) о суперпозиции переходов с высших электронных состояний.

Сравнение результатов расчёта спектров поглощения с результатами эксперимента представлено на рисунках 2.7 и 2.8. Нейтральные формы соединений, экспериментально представлены в виде равновесной смеси хиноида и бесцветного лактона. Из рисунков 2.7 и 2.8 видно, что все положения измеренных спектров (формы D, M, Q и C) хорошо коррелируют с рассчитанными спектрами поглощения, а также для флуоресценции (формы D\*) для эозина и эритрозина. Как видно из рисунков 2.7 и 2.8, точка MII лежит рядом с линией регрессии – признак того, что форма MII присутствует в растворе, тогда как точка MI выпадает из регрессии, как для эозина, так и для эритрозина. Длина волны поглощения для нейтральной группы судя по расчётам подходит форма хиноида Q.

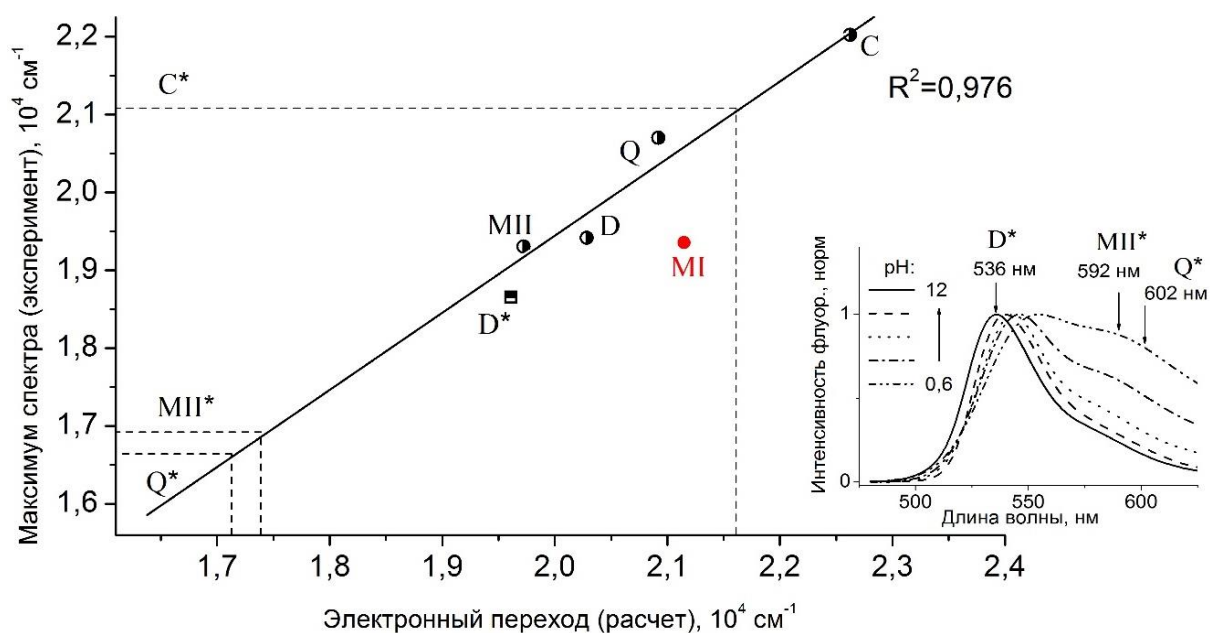


Рисунок 2.7 – Корреляция между расчётной и экспериментальной длинами волн в спектрах поглощения (для D, MII, Q, C-форм) и испускания (D\*) эозина. Теоретические прогнозы для случаев, когда экспериментальные значения не доступны (испускание форм MII \*, Q \* и C\*). На вставке – положение пика дианиона и ряда предсказанных форм в спектрах флуоресценции

Рассчитанные коэффициенты корреляции  $r^2$  для длин волн и частот переходов составляют 0,972 и 0,963 для эозина и эритрозина, соответственно. Таким образом, данный способ можно использовать для идентификации других протолитических форм в спектрах поглощения и флуоресценции. Линейная регрессия может быть использована для уточнения назначения таутомерных форм в экспериментальных спектрах. Полученную линейную регрессию для расчётных и экспериментальных энергий переходов по D, D\*, МП, Q и С-формам можно использовать для прогнозирования спектров флуоресценции ионных и молекулярных форм, экспериментальное определение которых невозможно. Для этого по найденным уравнениям регрессии с учётом рассчитанных энергий испускания были определены значения максимумов в спектрах флуоресценции.

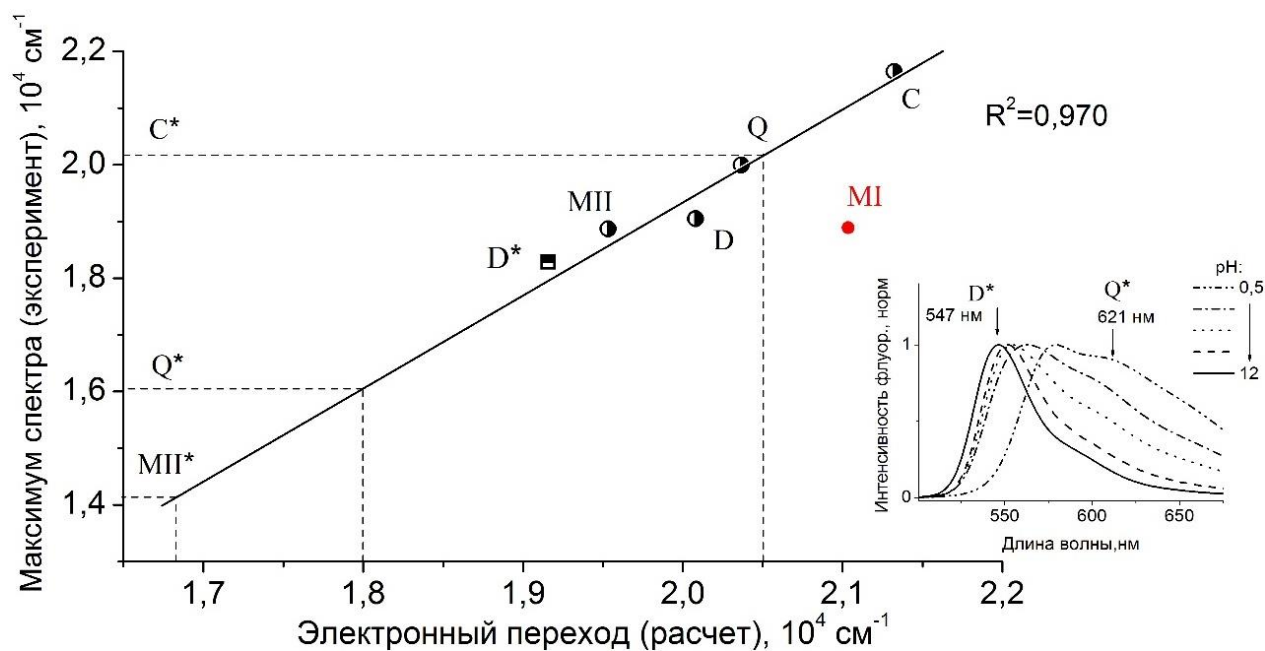


Рисунок 2.8 – Корреляция между расчётной и экспериментальной длинами волн в спектрах поглощения (для D, МП, Q, С-форм) и испускания (D\*) эритрозина. Теоретические прогнозы для случаев, когда экспериментальные значения не доступны (испускание форм МП \*, Q \* и С\*). На вставке – положение пика дианиона и ряда предсказанных форм в спектрах флуоресценции

Для эозина и эритрозина они составили соответственно 614 и 613 нм для Q\*-формы, 473 и 494 нм для С\*-формы, 604 и 690 нм для МП\*-формы. Черты этих пиков прослеживаются в сложных контурах флуоресценции красителей в кислой

среде, которые представляют собой смесь различных ионных и/или молекулярных форм. Самые коротковолновые переходы соответствуют катионной  $S^*$ -форме красителей и не обнаруживаются в спектрах флуоресценции вплоть до pH 0,5-0,6. Как было показано в работе [42], константа катион-нейтрального равновесия составляет около -2 для эозина и -2,4 для эритрозина, что указывает на область существования этой формы за пределами исследованного диапазона кислотности растворителя.

Обращает на себя внимание высокое значение стоксова сдвига для моноанионной и нейтральной хиноидной форм красителя, достигая максимального значения для хиноида эозина  $3820 \text{ см}^{-1}$  (106 нм). Большая разница между энергией поглощения и испускания может быть обсуждена в терминах существенного изменения геометрии молекул вследствие возбуждения и последующей релаксации в равновесное возбуждённое состояние.

Причина изменения энергетической структуры и спектральных характеристик молекул красителей является изменение пространственной структуры и распределение зарядов. Вычисленные силы осцилляторов переходов (таблица 2.4) в поглощении ( $f_{abs}$ ) подтвердили существование интенсивных полос. Значения сил осцилляторов для длинноволновых переходов в спектрах поглощения эритрозина и эозина равны или близки к 1. При излучении наблюдается «красный» сдвиг для таких протолитических форм, как хиноид и моноанион 2. Спектры поглощения этих форм также сдвинуты в красную область, что и для эритрозина и эозина. Наименьший пик спектра поглощения и излучения имеет лактон (279 нм, 290 нм для эритрозина, 288 нм, 295 нм для эозина). Длина волны поглощения для дианиона, моноаниона, нейтральной формы и катиона находится в хорошем согласии с экспериментом. Видно, что у нейтральных (хиноида) и моноанионной молекулы по сравнению с другими ионными состояниями наблюдается самый большой стоксов сдвиг (50-77 нм), что может быть связано с существенными изменениями геометрии красителей при возбуждении (таблица 2.4).

Таблица 2.4 – Изменение геометрии эритрозина и эозина при электронном возбуждении

Эозин							
Угол, град.	D	MI	MP	Q	Z	L	C
$\alpha_1^a$	0,9	0,7	5,7	4,1	-	0,2	2,6
$\alpha_2^a$	1,1	2,3	4,1	2,9	-	0,3	1,8
$\Delta\beta^b$	8,1	14,7	26,2	18,4	-	0,5	12,2
$\Delta\gamma_1^c$	0,2	0,5	2,6	2,8	-	1,5	1,4
$\Delta\gamma_2^c$	0,8	1,6	3,1	3,3	-	1,7	0,8
Эритрозин							
$\alpha_1^a$	1,4	0,67	6,9	5,2	-	0,3	0,5
$\alpha_2^a$	1,8	3,4	4,6	5,7	-	0,8	1,5
$\Delta\beta^b$	10,4	18,1	29,3	28,2	-	0,8	2,8
$\Delta\gamma_1^c$	0,8	0,15	1,9	0,3	-	1,6	0,5
$\Delta\gamma_2^c$	0,5	0,17	2,7	0,6	-	1,7	1,4
<sup>a</sup> $\alpha_1 = \angle(O_{\text{(кольцо 4 основное состояние)}} - O_{\text{(кольцо 3)}} - O_{\text{(кольцо возбуждённое состояние)}})$ и $\alpha_2 = \angle(O_{\text{(кольцо 2 основное состояние)}} - O_{\text{(кольцо 3)}} - O_{\text{(кольцо возбуждённое состояние)}})$ являются двугранными углами, отражающими вращение плоскости трицикла. $\Delta\beta = \beta_{\text{(основное)}} - \beta_{\text{(возбужд.)}}$ , где $\beta$ двугранный угол между плоскостями кольца 1 и кольца тройного хромофора 2-4. $\Delta\gamma = \gamma_{\text{(возбужд.)}} - \gamma_{\text{(основное)}}$ , где $\gamma_1$ и $\gamma_2$ показывают искажение плоскости трицикла.							

Расчёт показывает, что атомы трицикла не лежат в одной плоскости, поэтому для описания изменения геометрии эозина и эритрозина при электронном возбуждении использовали двугранные углы  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ , отражающие вращение плоскости трицикла в основном и возбуждённом состояниях. Угол  $\Delta\gamma$  показывают искажение плоскости трицикла, а  $\Delta\beta$  двугранный угол показывает разность между плоскостями кольца 1 и кольца тройного хромофора 2-4 в основном и возбуждённом состояниях (рисунок 2.9). При этом для хиноидной формы эритрозина наблюдается уменьшение стоксового сдвига почти в два раза, что находит своё отражение в том, что длина волны испускания становится меньше,

чем у эозина ( $\lambda_{fl} = 584$  нм для эозина и 556 нм для эритрозина, таблица 2.4). Искажение плоскости трицикла для хиноидной формы эозина составляет  $\Delta\gamma_1 = 2,8$  и  $\Delta\gamma_2 = 3,3$ , а для хиноидной формы эритрозина составляет  $\Delta\gamma_1 = 0,3$  и  $\Delta\gamma_2 = 0,6$  при этом стоксов сдвиг составляет 106 и 65 нм соответственно. Этот факт можно объяснить особенностями структуры – наличием водорода у одного из кислородов трицикла и тем, что атомы йода достаточно тяжёлые и малоподвижные, что в свою очередь влияет на релаксацию хромофорного трицикла (таблица 2.4).

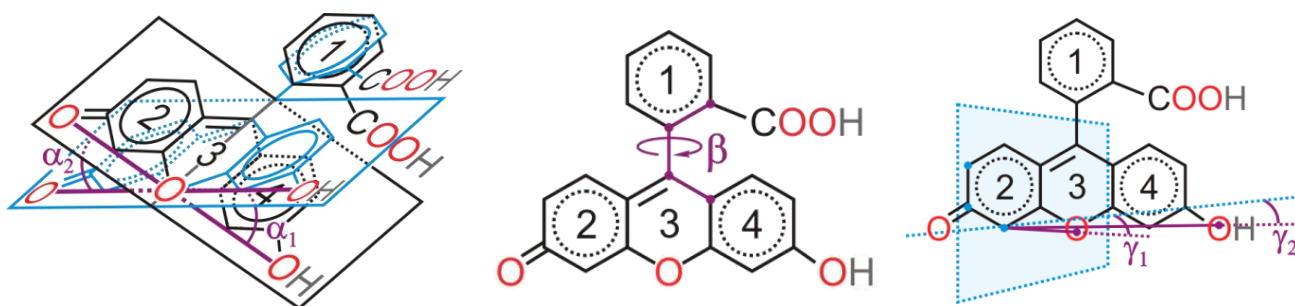


Рисунок 2.9 – Углы, характеризующие изменение пространственной структуры красителей при возбуждении. Пояснение углов дано в таблице 2.4

В ряду форм лактона и катиона для эозина не наблюдается сильное изменение углов. Поэтому искажения геометрии, связанные с переходом в возбуждённое состояние, как для эритрозина, так и для эозина в форме лактона меньше, чем в остальных протолитических формах красителя. Получается, что при незначительном изменении геометрии после возбуждения форма лактона имеет наименьшее смещение пиков спектров поглощения и излучения. Расчёт показал, что для эозина и эритрозина заряженные ионные формы сильнее подвержены структурным изменениям (моноанион II, дианион). Так, для моноаниона II эритрозина  $\Delta\beta = 29,3$ , а для хиноидной формы  $\Delta\beta = 28,2$ , что находит своё отражение наибольшим стоксовым сдвигом относительно других протолитических форм (таблица 2.4).

На рисунке 2.10 представлены НОМО орбитали для дианиона, катиона, хиноида и моноаниона рассчитанных структур эритрозина для основного состояния ( $S_0$ ) с которых происходит поглощения кванта. И LUMO орбитали для

флуоресцентного состояния ( $S_1^*$ ) из которого молекулы излучают. Так как эозин и эритрозин проявляют близкие спектральные свойства, то и расположение НОМО и LUMO орбиталей одинаково. Из рисунка молекулярных орбиталей, видно, что НОМО орбитали имеют  $\pi$  характер связывания для атомов углерода и несвязывающий характер для атомов кислорода и галогенов. LUMO орбитали также расположены на трицикле и имеют такую же природу.

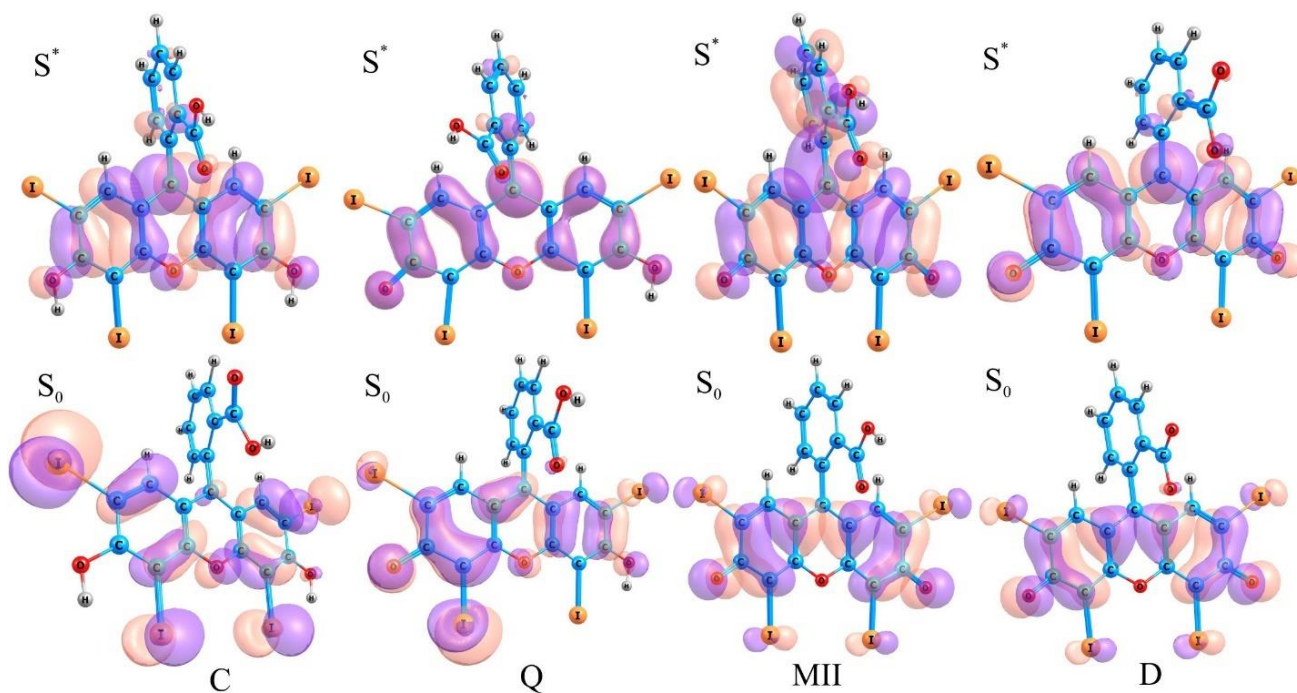


Рисунок 2.10 – Занятые и виртуальные молекулярных орбитали, участвующих в процессах возбуждениях и флуоресценции.  $S_0$  – геометрия в основном состоянии  $S^*$  - геометрия в возбуждённом состоянии.  $S_0$  и  $S_1^*$  соответствуют равновесному основному состоянию и равновесному возбуждённому состоянию, соответственно. C – катион, Q – хиноид, MII – моноанион II, D – дианион

Для дианиона при переходе с НОМО на LUMO орбиталь не происходит перемещение электронной плотности, а значит, не наблюдаются процессы с переносом заряда. Моноанион II и дианион имеют высокую силу осциллятора (больше 1) что также говорит о локальности оптических переходов и о потенциальном высоком квантовом выходе. Все рассчитанные структуры меняют атомную структуру при переходе в равновесное возбуждённое состояние.



Наибольшая разница между геометрией молекулы в основном и возбуждённом состоянии заметна у хиноида и моноаниона II у которых происходит поворот карбоксильной группы относительно моноцикла I, при этом моноцикл I поворачивается относительно трицикла. Это может быть объяснением того, что моноанион II и хиноид красителей имеют самую длинноволновую флуоресценцию.

## **§2.4. ВЛИЯНИЯ СОПРЯЖЕНИЯ В ЦЕПИ МОЛЕКУЛ СОПОЛИФЛУОРЕНА НА ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

Сополифлуорены относятся к классу полимерных материалов. Они сочетают в себе важные полупроводниковые свойства, такие как люминесценция и электропроводность с привлекательными свойствами полимеров – эластичность и простота изготовления. Их оптоэлектронные свойства зависят от хромофорных компонентов, обладающих расширенными возможностями по сопряжению. Структура производных сополифлуорена основывается на характере и свойствах их мономеров. Изделия на их основе перспективны и активно внедряются в микроэлектронике [70], в органических светоизлучающих диодах (OLED) [71], полевых транзисторах [72] и пластиковых солнечных элементах [73]. Для получения высокоэффективного OLED-устройства необходим тщательный подбор материалов каждого из слоёв структуры, его толщины и состава, проведение многократных итераций технологического процесса, исследования электрофизических свойств и математического моделирования [74]. Спектральный состав электролюминесценции, определяющий цвет свечения OLED, зависит от материала или нескольких составляющих активного слоя структуры. Структуры сополифлуоренов, которые должны излучать белый свет, очень сложны, они включают много компонентов (зелёный, синий и красный люминофоры). Чтобы обеспечить высокую интенсивность белой электролюминесценции, содержание в сополимере люминофоров должно быть подобрано и выдерживаться с точностью до десятых долей процента [75]. Это с точки зрения химического синтеза

представляет сложную задачу, но квантовохимические расчёты позволят выявить степень влияния различных факторов на оптические свойства полимера, и способствовать целенаправленному синтезу полимеров.

Флуорен является основной повторяющейся частью в производных полифлуорена. Он был выведен из каменноугольной смолы, его обнаружил Marcellin Berthelot в 1883 году [76]. Название флуорен возникло из-за его интересной флуоресценции, он стал объектом для вариации химической структуры, так как от этого зависит цвет излучения в видимой части спектра. Необходимо было понять какие части молекулы были химически активными, и как заменить эти части, чтобы оказать влияние на цвет. Например, путём добавления донорных и акцепторных функциональных групп в флуорен, исследователи смогли изменить цвет молекулы [77]. Физические свойства молекулы флуорена изучались для создания полимеров. Ещё в 70-е годы учёные начали объединять эти части в полимеры. Было показано, что полимер плоской формы, содержащий жёсткий флуорен, обладает повышенной термомеханической стабильностью. Однако более перспективным решением оказалась интеграция оптоэлектронных свойств флуорена в полимер. Полифлуорены представляют собой важный класс полимеров, которые имеют возможность выступать в качестве электроактивных и фотоактивных материалов. Отчасти это происходит из-за формы флуорена. Молекула флуорена в основном плоская, *p*-орбиталь перекрывает связь между двумя бензольными кольцами и в результате вся молекула становится сопряжённой [78]. Это в свою очередь приводит к уменьшению ширины запрещённой зоны, так как в возбуждённом состоянии молекулярные орбитали, являются делокализованными. Так как степень делокализации и пространственное расположение орбиталей в молекуле зависит от донорных или акцепторных свойств заместителей, и ширина запрещённой зоны может быть различна [79]. Такой химический контроль над шириной запрещённой зоны непосредственно влияет на цвет молекулы, это достигается путём ограничения энергии света, которое молекула поглощает [80]. Молекулы флуорена чаще всего соединяются в положениях 7,2 и 3,6 для образования производных полифлуорена (рисунок 2.11).

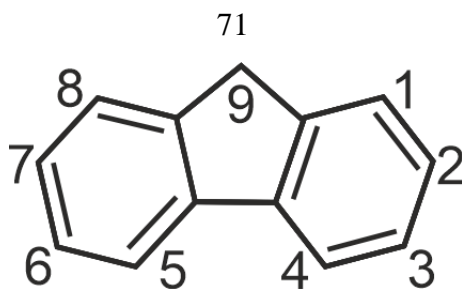


Рисунок 2.11 – Молекула флуорена. Цифры показывают нумерацию атомов

Интерес к производным полифлуорена вырос из-за высокой квантовой эффективности люминесценции, термической стабильности и возможности регулировать цвет, все это достигается путём внедрения сопряжённых мономеров с небольшой шириной запрещённой зоны [81]. Число исследований в этой области значительно возросло, из-за возможного применения сополифлуоренов в органических светоизлучающих диодах. Для органических диодов предпочтительнее всего использовать полифлуорены, потому – что они являются единственным классом сопряжённых полимеров, которые могут излучать цвета, охватывающие всю видимую часть спектра, также они обладают высокой эффективностью и низким рабочим напряжением [81]. Кроме того, сополифлуорены относительно растворимы в большинстве растворителей, что делает их удобными для общего применения [82].

Полифлуорен часто представляют как эксимер, то есть возбуждённый димер, образующийся при термическом отжиге или при пропускании тока через полимер [83]. Образование эксимера включает в себя димеризацию структурных единиц полимера, которые излучают свет при более низких энергиях, чем сам полимер. Это препятствует использованию полифлуоренов во многих устройствах, включая светоизлучающие диоды (LED) [80]. Образование эксимера приводит к уменьшению эффективности светодиода, и к уменьшению рекомбинации носителей заряда, также это вызывает сдвиг в красную зону спектра излучения [84]. Предпринималась попытка устранить образование эксимеров и улучшить эффективность сополифлуоренов, путём сополимеризации полифлуорена с антраценом и большими концевыми группами, что могло стерически препятствовать образованию эксимеров [85]. Также, были совершены попытки улучшить светодиоды, путём синтеза флуорен-триариламин (fluorene-

triarylamine) сополимеров, и других многослойных устройств на основе полифлуоренов. Обнаружено, что такие полифлуорены обладают более яркой флуоресценцией и приемлемой эффективностью [86]. Другая проблема, с которой чаще всего сталкиваются полифлуорены это зелёное паразитное излучение, которое уменьшает чистоту цвета и эффективность необходимую для органических светодиодов [87]. Сначала это приписывали эмиссии эксимера, но затем выяснили, что это зелёное излучение происходит из-за образования кетона, то есть из-за окисления мономера, находящегося в девятой позиции флуорена. Это происходит из-за неполного замещения в девятой позиции флуорена. Способы борьбы с этим заключаются в обеспечение полного замещения активной части мономера, или включением ароматических заместителей [88]. Данные решения представляют собой структуру с недостаточным оптимальным размером или её трудно синтезировать [89].

Таким образом стоит актуальная задача в исследовании оптических свойств эффективно люминесцирующих сопряжённых сополимеров на основе флуорена, а также влияние растворителя и места присоединения мономеров флуорен (F) – карбазол (Kz) (рисунок 2.12, А и Б) на спектры поглощения и люминесценции. Поэтому на первом этапе происходило построение различных конформеров F-2Kz7-F и F-3Kz6-F структур (отличие между структурами состоит в месте присоединения и показано на рисунке 2.12 А и Б).

В дальнейшем полученные структуры оптимизировали с использованием V3LYP в базисе 6-31(p,d). Далее спектр поглощения был рассчитан при помощи метода TD-DFT с использованием базиса 6-31(p,d). Для расчёта длины волны излучения была оптимизирована геометрия молекулы в возбуждённом состоянии, а затем была рассчитана разница между основным и возбуждённым состоянием для данной атомной структуры, что, по сути, является длиной волны люминесценции. Расчёты проводили по схеме, представленной на рисунке 1.2

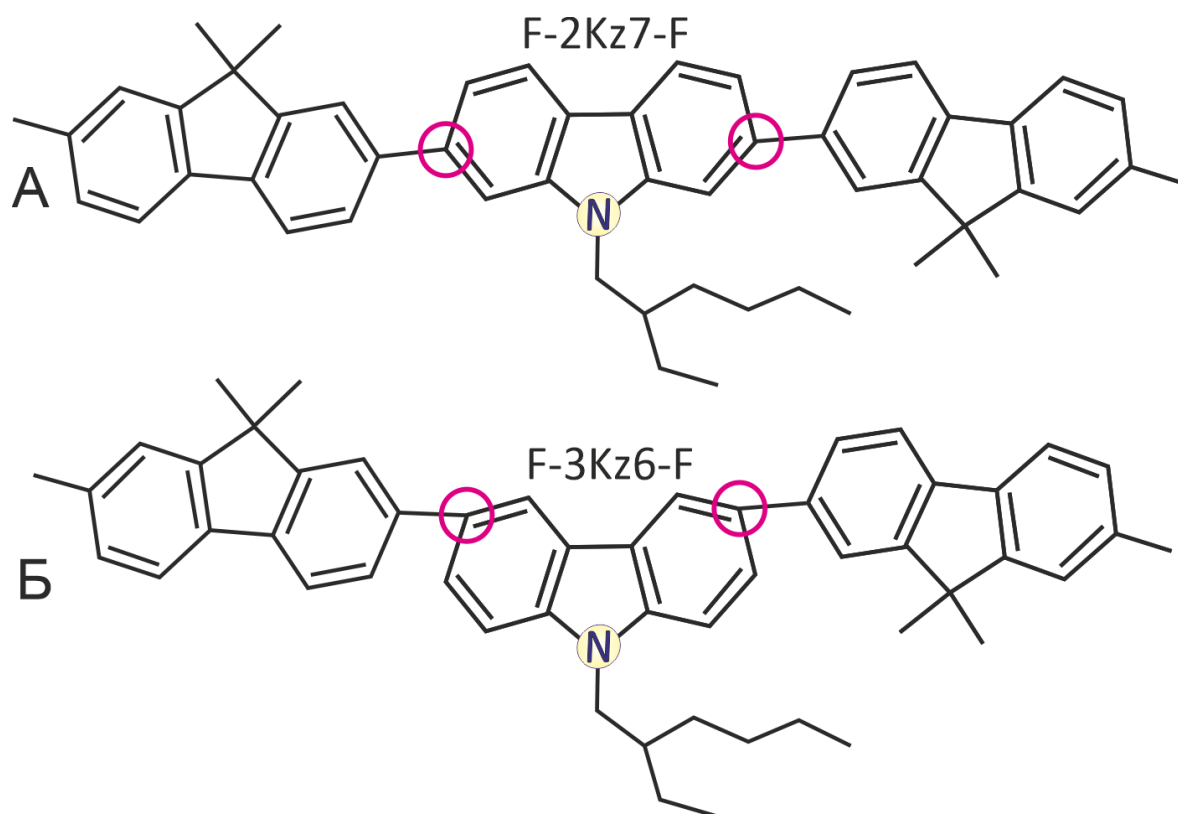


Рисунок 2.12 – Структурные формулы сополифлуоренов. Флуорен – F; карбазол – Kz. А – место присоединения 2,7. Б – место присоединения 3,6

Для того чтобы прогнозировать, как различное положение присоединения карбазола к флуорену влияет на оптические характеристики полимера, в работе строились НОМО и LUMO (рисунок 2.13). В молекуле F-3Kz6-F электронная плотность НОМО локализуется в основном на карбазоле, однако в образовании LUMO основной вклад вносят электроны атомов флуорена, и лишь в незначительной степени хромофора, при этом электроны азота практически не участвуют в образовании LUMO (рисунок 2.13, А). У молекулы F-2Kz7-F в образовании НОМО в равной степени участвуют электроны атомов карбазола и флуорена. При образовании LUMO изменяется лишь характер связывания орбиталей. При таком распределении электронной плотности увеличено число подвижных носителей заряда, по сравнению с молекулой F-3Kz6-F, что приводит к снижению барьера для переброса электронов на низшую вакантную молекулярную орбиталь.

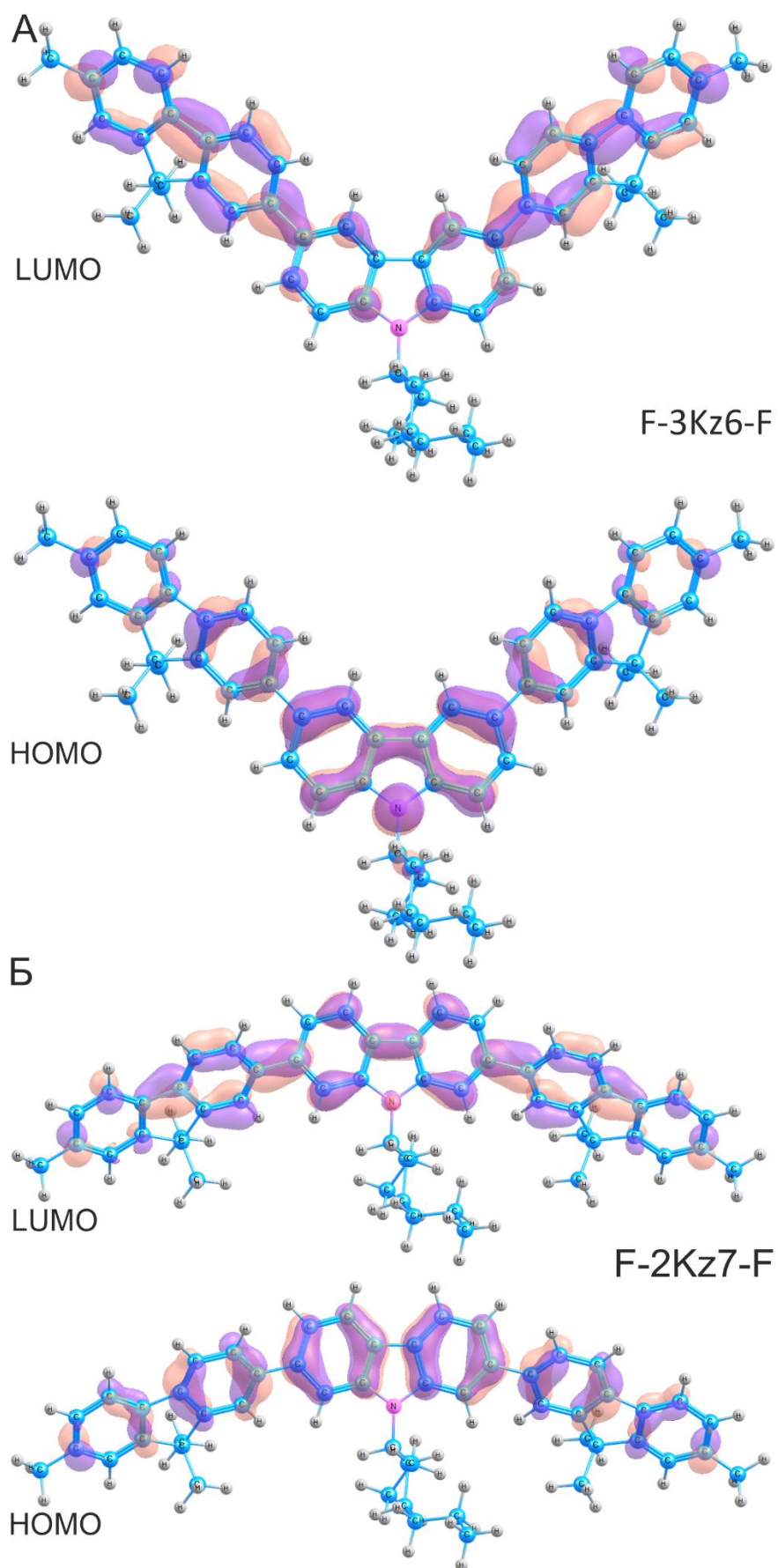


Рисунок 2.13 – Вид граничных (HOMO и LUMO) молекулярных орбиталей молекул F-3Kz6-F (А) и F-2Kz7-F (Б)

Такое распределение приводит к понижению энергии как LUMO с -0,80 до -1,16 эВ, так и энергии НОМО с -4,83 до -4,96 эВ (таблица 2.5). При таком строении молекулы достигается наименьшая ширина энергетической щели 3,80 эВ.

Таблица 2.5 – Значения энергии НОМО и LUMO и ширина энергетической щели для F-3Kz6-F и F-2Kz7-F. Расчёт для Газовой фазы (ГФ) и толуола (Т)

МО	F-3Kz6-F (ГФ)	F-2Kz7-F(ГФ)	F-3Kz6-F (Т)	F-2Kz7-F (Т)
LUMO, эВ	-0,80	-1,16	-0,89	-1,23
НОМО, эВ	-4,83	-4,96	-4,90	-5,04
$\Delta E$ , эВ	4,02	3,80	4,01	3,79

Далее были рассчитаны спектры поглощения и люминесценции сополифлуоренов в вакууме и в присутствии растворителя – толуола (рисунок 2.14).

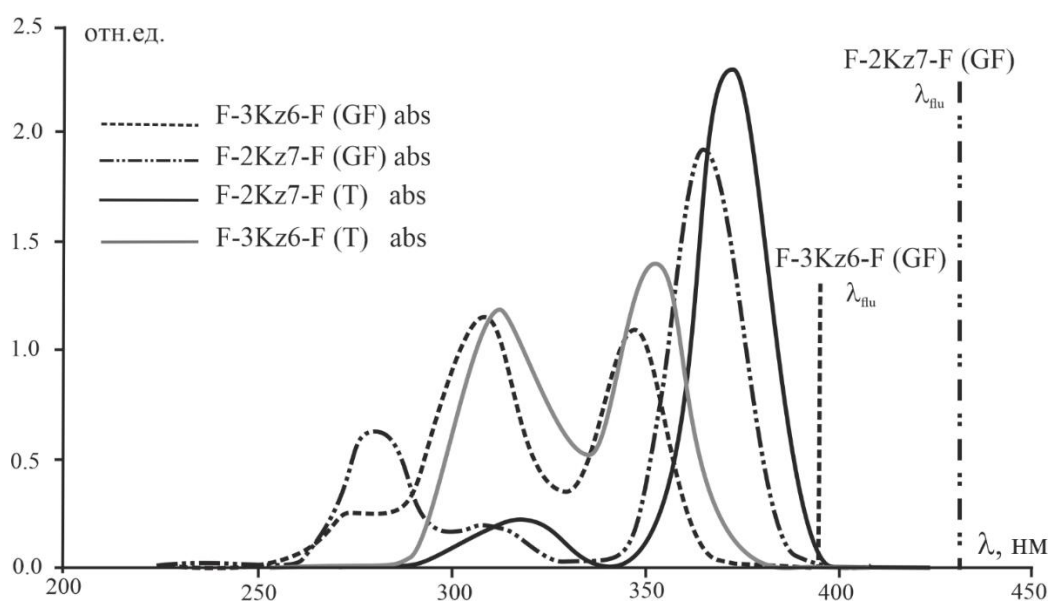


Рисунок 2.14 – Спектры поглощения (abs) и длина волны люминесценции ( $\lambda_{flu}$ ) молекул F-2Kz7-F и F-3Kz6-F в газовой фазе (GF) и в толуоле (Т)

Расчёты показали, что в молекуле с местом присоединения 3 и 6 максимум поглощения приходится 347 нм в вакууме, а в присутствии растворителя пик сдвигается на 6 нм. При этом интенсивность полос поглощения увеличивается в присутствии толуола. Длина волны люминесценции молекулы составила 395 нм. Для сополифлуорена с местом присоединения карбазола в положении 2 и 7

максимум поглощения составил 366 нм в вакууме и 373 нм в толуоле (сдвиг пика на 7 нм), при этом интенсивность пиков так же возросла. Длина волны излучения в вакууме составила 431 нм. Сравнение спектров поглощения сополифлуоренов в вакууме и в растворителе показали, что для обеих молекул наблюдался незначительный батохромный сдвиг пиков поглощения.

Это связано с тем, что взаимодействие растворителя и растворенного вещества, прежде всего, изменяет разность энергий между основным и возбуждённым состоянием. Для полимера F-3Kz6-F энергия LUMO понизилась на 0,09 эВ, а энергия НОМО понизилась на 0,07 эВ. При этом ширина оптической щели практически не изменилась (-4,01 эВ). Такое же изменение энергий НОМО и LUMO наблюдается и для молекулы F-2Kz7-F. Энергия НОМО понизилась на 0,02 эВ, а энергия LUMO на 0,08 эВ. При этом ширина щели составила 3,79 эВ.

## **§2.5 ВЛИЯНИЕ ФЕНАНТРЕНА НА ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОПОЛИФЛУОРЕНОВ**

Среди  $\pi$ -сопряжённых полимеров полифлуорены (PF) и сополимеры на основе флуорена широко изучаются благодаря своим исключительным оптоэлектронным свойствам [90–94]. Важной движущей силой таких исследований является получение новых полимерных материалов для органических светоизлучающих устройств (OLED), которые могут быть использованы в ультратонких и гибких экранах для компьютеров, телевизоров, мобильных телефонов, смарт-часов, носимых систем здравоохранения и технологий дополненной реальности/виртуальной реальности. В светоизлучающей полимерной плёнке, помещённой между двумя электродами, инжектированные дырки и электроны мигрируют по полимерному слою и объединяются, образуя экситоны, которые затем распадаются с испусканием фотонов. В зависимости от химической структуры излучающего полимера можно получить различные цвета. Одной из важнейших характеристик сополифлуоренов является возможность тонкой настройки электрооптических свойств за счёт функционализации



люминофорами, донорно-акцепторными, зарядо-транспортными и метал-связывающими фрагментами. Полимеры на основе флуореновых звеньев отличаются высокой химической и термической стабильностью, растворимостью в основных органических растворителях (хлороформ, толуол, и т.д.), хорошими плёнкообразующими свойствами, высоким квантовым выходом люминесценции в растворе и в покрытиях, а также возможностью образования жидкокристаллической фазы.

В данной главе исследовали спектральные характеристики сополимеров флуорена с дицианофенантеновыми молекулами (PFCN). Интерес к фенантрену вызван тем, что он является люминесцентным соединением с агрегационной-индуцированной эмиссией [95–97], он генерирует высокоэффективное излучение и находит практическое применение. Далее сравнивается и обсуждается влияние различных дицианопроизводных на фотофизические и электролюминесцентные спектральные характеристики сополифлуоренов.

Квантовохимические расчёты молекулы фенантрена выполнены методом теории функционала плотности (DFT) в рамках гибридного функционала B3LYP и CAM-B3LYP в базисе cc-pVDZ. Для учёта растворителя (хлороформ) использовалась модель SMD. Методом TD-DFT рассчитаны максимумы для спектра поглощения молекул, оптимизированы геометрии в возбуждённом состоянии и рассчитан максимум в спектре люминесценции для возбуждённой атомной структуры. Все расчёты выполнены в программе GAMESS.

Ход расчётов выглядел следующим образом – сначала в методе B3LYP проверили влияние сопряжения на молекулу фенантрена. Для этого оптимизировали фенантрен с водородами модель 1 (рисунок 2.15, a1) и с толуольными заместителями в положениях 3,6 – модель 2 (рисунок 2.15, b1). После этого для лучшей модели рассчитывали спектр поглощения с использованием двух функционалов B3LYP и CAM-B3LYP (таблица 2.6). Вторым функционалом использовали для проверки возможных процессов, связанных с переносом заряда (таблица 2.6).

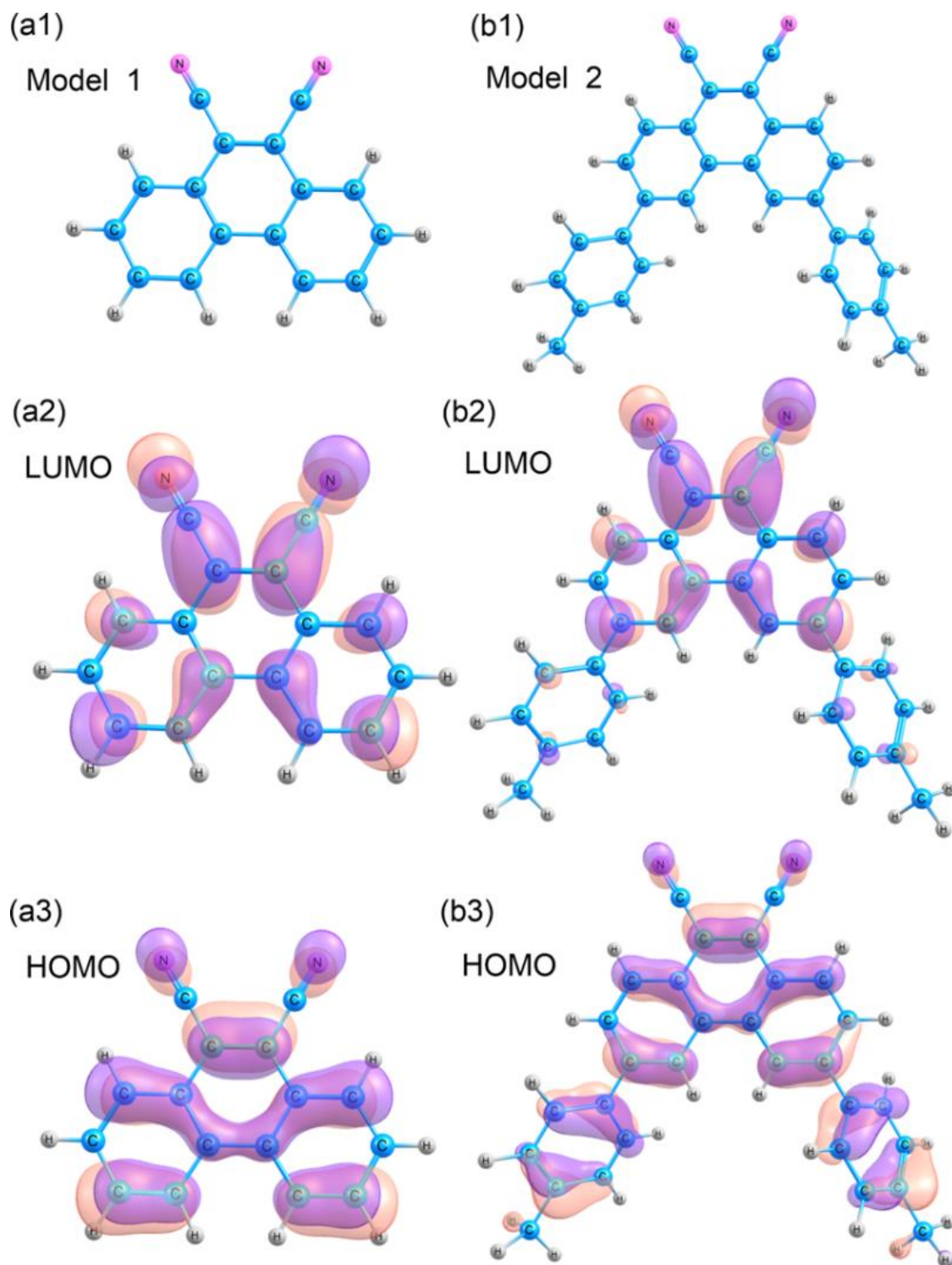


Рисунок 2.15 – Модели для расчёта молекулы фенантрена-9,10-дикарбонитрила. Фенантрен-9,10-дикарбонитрил – модель 1 (a1): изоповерхности LUMO (a2) и HOMO (a3). Фенантрен с толуольными заместителями в положениях 3,6-3,6-ди (4-метилфенил) фенантрен -9,10-дикарбонитрил – модель 2 (b1): изоповерхности LUMO (b2) и HOMO (b3).

Молекулярные орбитали НОМО и LUMO показаны на рисунке 2.15 (a2-3, b2-3). Вид НОМО орбиталей показывает, что в электронная плотность как для модели 1 так и для модели 2 располагается по всей молекуле (рисунок 2.15, a3, b3). Электронная плотность LUMO орбитали для модели 1 также располагается на тех же атомах (рисунок 2.15, a2) для модели 2 LUMO орбиталь располагается в основном на фрагменте дициано-групп (рисунок 2.15, b2). Данная группа атомов определяет оптические свойства и является хромофором.

Полученные результаты максимумов в спектре поглощения и излучения для модели 1 и 2 рассчитанные методом TD/SMD/B3LYP/cc-pVDZ представлены в таблице 2.6 (верхняя часть). При рассмотрении максимумов в спектре поглощения и излучения видно, что при добавлении толуольных заместителей к молекуле фенантрена происходит сдвиг максимума с 352 нм до 423 нм, при этом существенно возрастает сила осциллятора. Такая же картина наблюдается и при рассмотрении максимума излучения, происходит большой сдвиг длины волны излучения (с 371 до 486 нм) с возрастанием силы осциллятора и, как следствие, вероятности данного процесса. Расчёты показывают, что для такой системы важен учёт сопряжение и, как следствие, лучше подходит модель 2 с толуольными заместителями (рисунок 2.15 b1). Поэтому для дальнейших расчётов оптических свойств использовали модель 2 (таблица 2.6, нижняя часть)

Для модели 2 использовали два функционала – CAM-B3LYP и B3LYP. Как правило CAM-B3LYP показывает результаты ближе к эксперименту для систем с переносом заряда. Полученные результаты (таблица 2.6) показывают, что максимумы в спектре поглощения смещаются в коротковолновую область (359 nm для CAM-B3LYP и 423 nm для B3LYP) при этом растёт сила осциллятора (0,722 для CAM-B3LYP и 0,526 для B3LYP). Подобная картина наблюдается и для максимума излучения – длина волны смещается в коротковолновую область для CAM-B3LYP (с 486 до 417 nm) а сила осциллятора возрастает (с 0,631 до 0,809).

Таблица 2.6 – Максимумы поглощения и излучения для модели 1 и 2 рассчитанные функционалом B3LYP и максимумы поглощения и излучения для модели 2 рассчитанные функционалами CAM-B3LYP и B3LYP

Модель 1 и 2 в соответствии с рисунком 2.15.									
Состояние	Поглощение				Излучение				
	Модель 1		Модель 2		Модель 1		Модель 2		
	$\lambda$	$f$	$\lambda$	$f$	$\lambda$	$f$	$\lambda$	$f$	
$S_0 \rightarrow S_1$	369	0,045	423	0.526	371	0.262	486	0.631	
$S_0 \rightarrow S_2$	352		0,292		375	0.171			
Энергия молекулярных орбиталей, эВ									
	НОМО		LUMO		НОМО		LUMO		
$E_{MO}$	-6,54		-2,64		-6.00		-2.66		
$E_{LUMO-НОМО}$	3,91				3,34				
Модель 2									
Состояние	Поглощение				Излучение				
	CAM-B3LYP		B3LYP		CAM-B3LYP		B3LYP		
	$\lambda$	$f$	$\lambda$	$f$	$\lambda$	$f$	$\lambda$	$f$	
$S_0 \rightarrow S_1$	359	0,722	423	0.526	417	0.809	486	0.631	
$S_0 \rightarrow S_2$	332		0,108		375	0.171			
Энергия молекулярных орбиталей, эВ									
	НОМО		LUMO		НОМО		LUMO		
$E_{MO}$	-7,31		-1,71		-6,00		-2.66		
$E_{LUMO-НОМО}$	5,60				3,34				

$\lambda$  and  $f$  – длина волны поглощения (nm) и сила осциллятора перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  соответственно  
 Характеристики расчёта: TD/SMD/CAM-B3LYP/cc-pVDZ и TD/SMD/B3LYP/cc-pVDZ

Теоретические расчёты показывают, что в молекуле фенантрена в полимерной цепи присутствует перенос заряда, поэтому функционал CAM-B3LYP лучше описывает экспериментальные данные (рисунок 2.16) и больше подходит для описания фотофизических свойств данной системы.

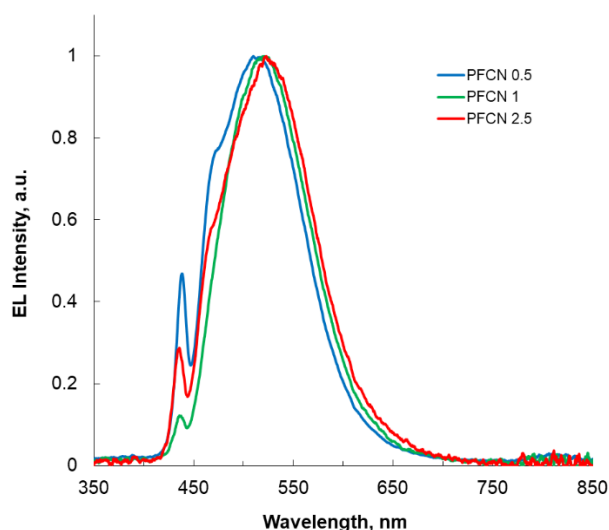


Рисунок 2.16 – Электролюминесценция (EL-спектры) исследованных OLED для серии сополифлуоренов с дицианофенантреновыми молекулами (PFCNx).

Экспериментальные спектры излучения синтезированных полимеров демонстрируют значительный перенос энергии от флуореновых сегментов к дицианофенантреновым единицам. Эти данные хорошо согласуются с нашими теоретическими расчётами. Расчёты показывают, что перенос заряда происходит в полимерной цепи от флуорена к фенантреновым молекулам.

Экспериментально возможно настроить цвет эмиссии в тонких плёнках, добавив в них небольшое количество сомономеров с низкой зоной пропускания. Эти эффективные экситонные ловушки энергии играют важную роль в подавлении проблемного образования эксимеров в тонких плёнках сополимеров полифлуорена. Молекулы дицианофенантрена обладают более жёсткой структурой по сравнению с другими молекулами, и в PLED на их основе наблюдается увеличение максимальной яркости с ростом содержания добавки в полимерной цепи. Полимеры с PFCN2.5 демонстрируют наилучшие характеристики устройств с максимальной световой отдачей 9230 cd/m (3,33 cd/A). Полимеры PFCN демонстрируют голубую эмиссию с превосходной стабильностью EL и высокой яркостью при сравнительно низкой эффективности по току, и, таким образом, имеют большой потенциал для применения в светоизлучающих устройствах.

## §2.6. РОЛЬ ДИМЕТИЛТИОМОЧЕВИНЫ В ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКОГО ЛЮМИНОФОРА *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>]

Люминесценция металлоорганических соединений широко изучается на протяжении нескольких десятилетий. В ней задействовано не менее семи различных механизмов, включая такие основные, как люминесценция, центрированная органическими лигандами и металлоцентрированная (MOF) [98]. В последнее время внимание исследователей привлекают 0D MOFs [99–103]. Квантовый выход фотолюминесценции (PLQY) до 100% был получен на различных 0D гибридных галогенидах металлов [100]. Как поглощение возбуждающего излучения, так и люминесценция в этих материалах в основном сосредоточены на молекулярных орбиталях, обусловленных электронными состояниями ионов металла, а роль органических лигандов, в первом приближении, сводится к формированию контролируемого окружения ионов металла  $ns^2$ . Однако более подробно свойства органических лигандов могут влиять на свойства металлических центров люминесценции в молекуле металл-органика [104]. Использование процессов переноса энергии между органическими лигандами и ионами металла может расширить требования к длинам волн возбуждающего излучения. С другой стороны, формирование MOF может сильно влиять на оптические свойства органических лигандов, например, изменять систему энергетических уровней лиганда и вызывать дополнительное поглощение возбуждающего излучения. Недавно была отмечена ещё одна роль органических лигандов, а именно, было показано, что введение органических лигандов с различной геометрией позволяет контролировать расстояние между ионами марганца в структуре металлоорганического люминофора [105,106], и при достижении достаточно большого расстояния подавляется концентрационное тушение, а PLQY становится близким к 100%. Для других ионов металлов, включая, например, свинец, данные о роли геометрии лиганда на PLQY до сих пор отсутствуют. В работе для построения было выбрано гетерогенное локальное

окружение Pb, состоящее из хлора и серы. В качестве серо содержащего лиганда была взята N,N'-диметилтиомочевина. Производные тиомочевин используются в качестве вспомогательных лигандов, например, в люминесцентных комплексах с Pt(II) [107] и Ru(II) [108]. Координационная химия производных тиомочевин с элементами *p*-блока изучена хуже, чем с переходными металлами, поэтому она может представлять интерес для исследователей. На данный момент исследования люминесценции смешанных тиомочевино-галоидных комплексов Pb(II) отсутствуют.

Все расчёты кристаллической структуры (рисунок 2.24 а) проводились в рамках линейной комбинации атомных орбиталей, реализованной в пакете CRYSTAL 17. Исходные атомные координаты для нахождения равновесной кристаллической структуры были получены из экспериментальных данных XRD. Для всех расчётов использовался функционал B3LYP. В гибридных функциональных расчётах орбитали Кона-Шема расширены в орбитали гауссова типа, как это реализовано в коде CRYSTAL 17 с базисными наборами H: H\_pob\_DZVP\_rev2 [109], C: C\_pob\_DZVP\_rev2 [109], N: N\_pob\_DZVP\_rev2 [109], S: S\_pob\_DZVP\_rev2 [109], Cl: Cl\_pob\_DZVP\_rev2 [109], и Pb: Pb\_ECP60MDF\_doll\_2011 [110,111]. Кристаллическая структура транс-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] с 30 неэквивалентными атомами в элементарной ячейке была оптимизирована в симметрии P21/c (рисунок 2.24 а). Расчёты хорошо согласуются с экспериментом (эксперимент:  $a=11.06120$ ,  $b=10.66150$ ,  $c=15.54920$ ,  $\beta=133.7^\circ$ ; расчёт:  $a=11.28762$ ,  $b=10.86574$ ,  $c=15.72438$ ,  $\beta=134.0^\circ$ ).

Модельная структура для моделирования спектров поглощения представляет собой молекулярный кластер, состоящий из атома свинца, четырёх молекул DMTU, связанных со свинцом, и двух атомов хлора. Начальные атомные координаты были получены из расчётов CRYSTAL 17. В ходе оптимизации была выявлена нестабильность первичного кластера, и для стабилизации атомов хлора были добавлены ещё четыре молекулы DMTU, которые были связаны с атомами хлора водородными связями (рисунок 2.24 б).

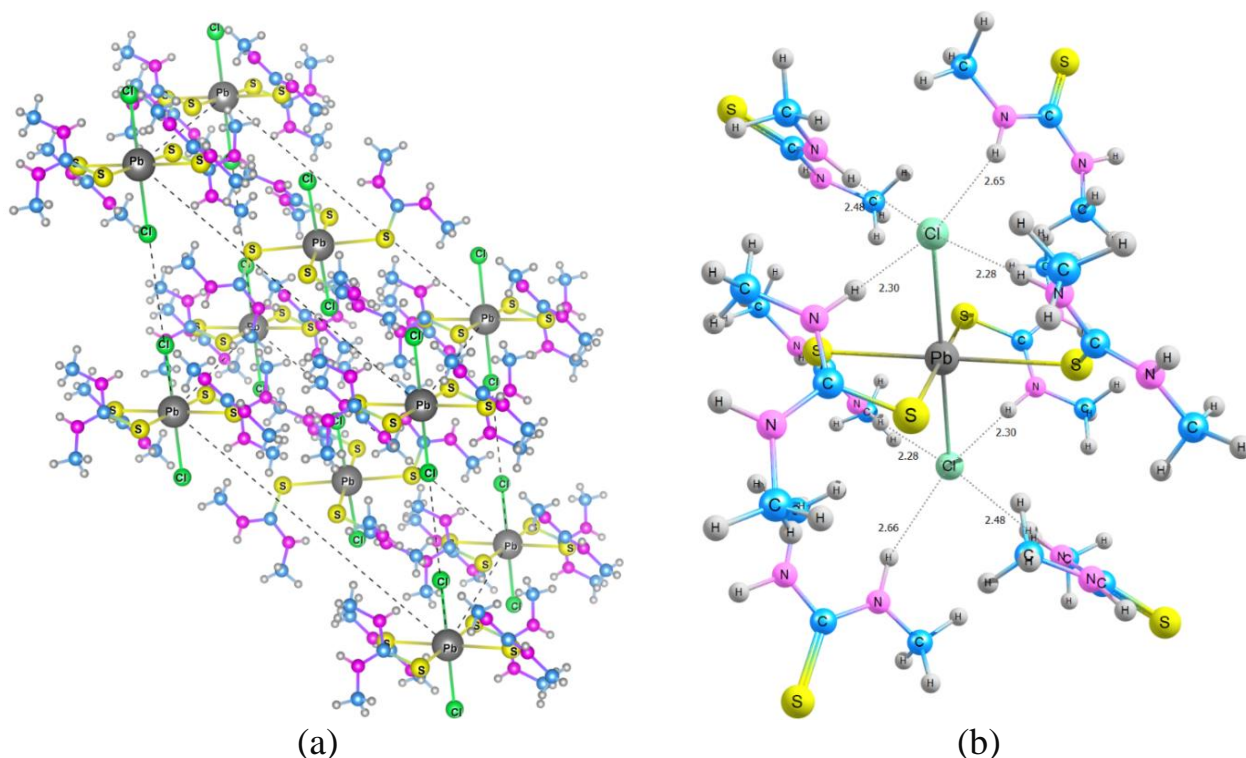


Рисунок 2.24 – Модель для расчёта *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>]. (a) – кристаллическая структура *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] оптимизированная в симметрии P21/c. (b) – модель кластера Pb(DMTU)<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub> для моделирования спектров поглощения. Пунктирная линия – расстояние в ангстремах от хлора до ближайшего водорода.

Равновесная структура была найдена с помощью метода теории функционала плотности (B3LYP), реализованного в пакете GAMESS. При моделировании использовался базисный набор def2-SVP. Моделирование молекулы DMTU и кластера (DMTU)<sub>8</sub>PbCl<sub>2</sub> проводилось в вакууме. Для молекулы DMTU эффект сольватации также оценивался с помощью модели сольватации SMD. Спектры поглощения были рассчитаны с помощью TD/B3LYP/def2-SVP. TD-DFT расчёты молекулы DMTU требуют введения пяти различных переходов, два из которых являются почти вырожденными, для описания спектров поглощения в диапазоне 200-300 нм (рисунок 2.25 а, см. подробнее рисунок 2.26 и таблица 2.9).



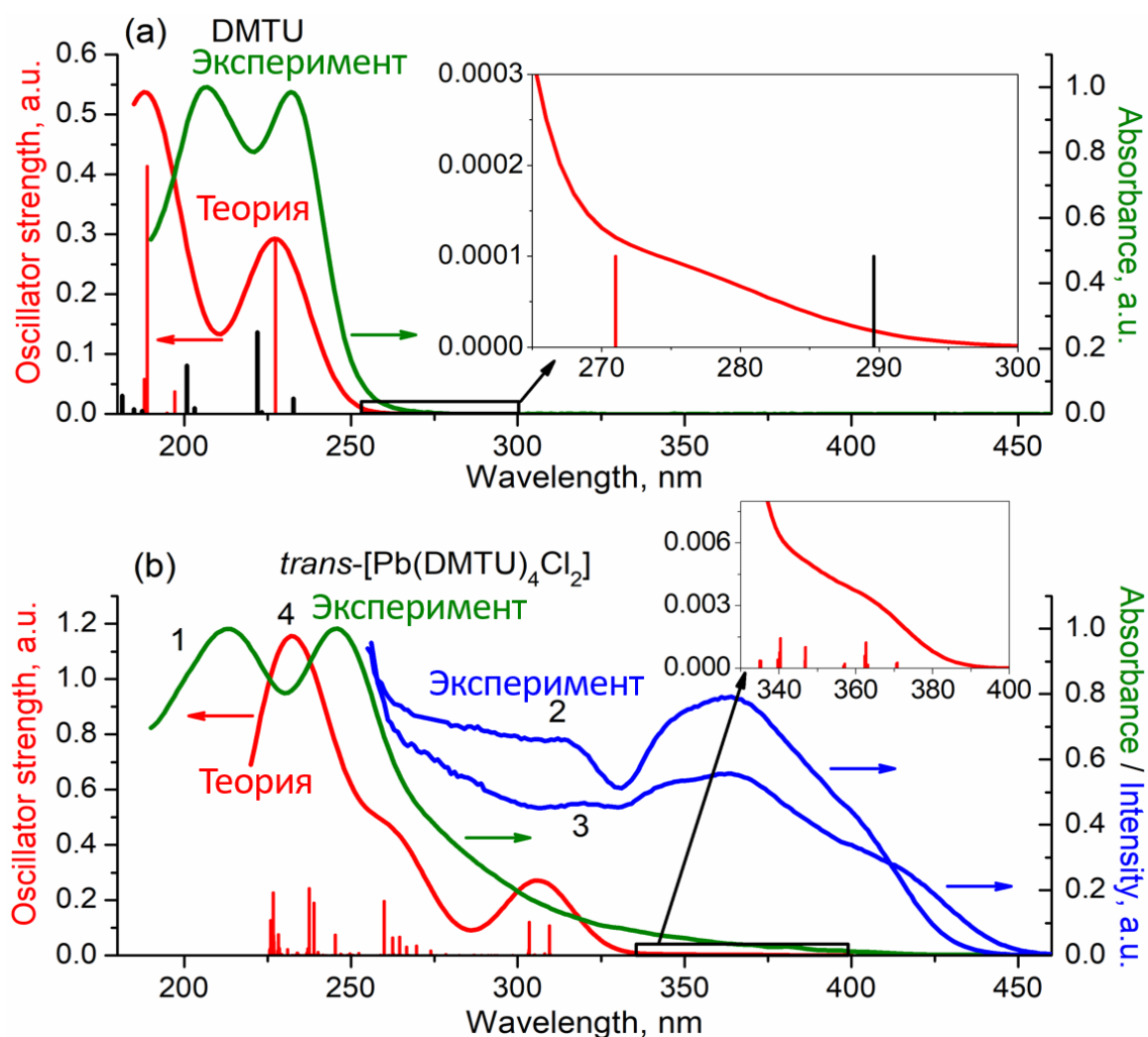


Рисунок 2.25 – Экспериментальные и рассчитанные спектры поглощения для DMTU и *транс*-[Pb(DMTU)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>]. (a) Экспериментальные спектры поглощения (зелёная кривая) и рассчитанные методом TD-DFT спектры поглощения в воде (красная кривая и красные столбики) для DMTU. Черные полосы для DMTU приведены в вакууме, вставка: Рассчитанное поглощение DMTU в окрестности S<sub>0</sub>. (b) Экспериментальные спектры поглощения (1), экспериментального возбуждения (2, 3) и TD-DFT поглощения (4) *транс*-[Pb(DMTU)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>]: 1, 2 – частицы, осаждённые на поверхность кварцевой подложки; 3 – порошок; 4 – вакуум. TD-DFT переходы поглощения показаны на графике (красные линии). Спектры возбуждения измерены при λ<sub>em</sub>=550 нм. Вставка: Рассчитанное поглощение *транс*-[Pb(DMTU)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] вблизи перехода НОМО-LUMO.

Длина волны электронного возбуждения  $S_0$ - $S_1$ , соответствующего электронному переходу НОМО-LUMO, составляет 289 нм в вакууме и сдвинута в синюю сторону примерно до 270 нм в воде. Сила осциллятора возбуждения  $S_0$ - $S_1$  очень мала (рисунок 2.26).

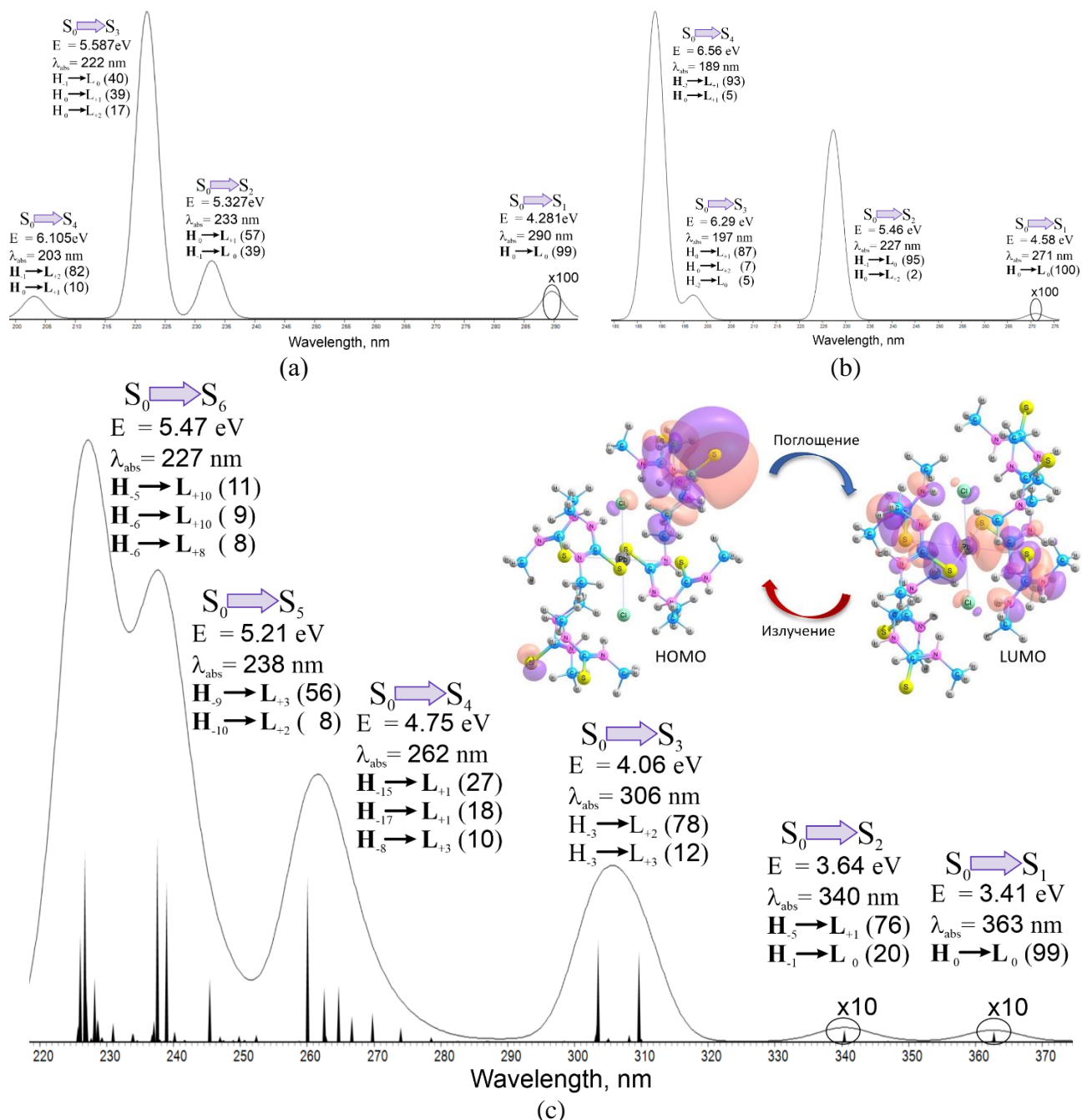


Рисунок 2.26 – Рассчитанные спектры поглощения ДМТУ и *транс*- $[\text{Pb}(\text{DMTU})_4\text{Cl}_2]$  в различных условиях с указанием вкладов (%) от переходов между молекулярными орбиталями, где  $H_0$  – НОМО;  $L_0$  – LUMO.

(a) – ДМТУ в газовой фазе. (b) – ДМТУ в водном растворе. (c) - спектр поглощения *транс*- $[\text{Pb}(\text{DMTU})_4\text{Cl}_2]$  Вставка: вид НОМО – LUMO орбиталей.

Наиболее заметные переходы, согласно расчётам, обозначенные как  $S_0-S_{1,2,3,4}$ , относятся к диапазону 200 - 290 нм. Молекулярные орбитали, которые вносят вклад в эти переходы, находятся в диапазоне от HOMO-1 до LUMO+2. В TD-DFT спектрах не было обнаружено низкоэнергетических электронных состояний, соответствующих длинам волн поглощения выше 290 нм, что прекрасно согласуется с экспериментом (рисунок 2.25a). Моделирование TD-DFT спектров кластера  $(DMTU)_8PbCl_2$  является сложным с вычислительной точки зрения из-за очень большой электронной системы. Для того чтобы охватить тот же спектральный диапазон, в расчётах использовалось 150 электронных состояний. Рассчитанный спектр поглощения  $(DMTU)_8PbCl_2$  представлен на рисунке 2.25b в виде красной линии.

Характерной особенностью рассчитанного спектра является предсказание появления поглощения значительно выше предела, характерного для чистого DMTU, т.е. выше 290 нм, в качественном согласии с экспериментом. Характерная энергия перехода между HOMO и LUMO равна 3,4 эВ, что заметно ниже диапазона поглощения DMTU (4,28 эВ, или, если быть более реалистичным, выше 5,3 эВ) в качественном согласии со спектром возбуждения *транс*- $[Pb(DMTU)_4Cl_2]$  (рисунок 2.25b). В низкоэнергетическом электронном возбуждении при 363 нм доминирует HOMO-LUMO переход комплекса. Вклады для высокоэнергетических возбуждений представлены на рисунке 2.26с и в таблице 2.9.

Согласно расчётам, орбитали HOMO и HOMO-1 состоят из  $3p$ -орбиталей иона хлора, а LUMO и LUMO+1 в основном обусловлены  $6p$ -орбиталями иона свинца (рисунок 2.26 с, вставка). Поэтому переход, приводящий к длинноволновому возбуждению, предположительно является переходом, соответствующим переносу электрона с орбиталей иона хлора в возбуждённое состояние иона  $Pb^{2+}$ . TD-DFT расчёты указывают на довольно уникальную схему формирования последовательности полос поглощения, а именно, за счёт переходов с множества нижних занятых орбиталей на одни и те же незанятые.

Таблица 2.9 – Переходы TD-DFT в спектре поглощения *транс*-[Pb(DMTU)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>](DMTU)<sub>4</sub> и молекулы DMTU. \*H<sub>0</sub> – HOMO; L<sub>0</sub> – LUMO.

Электронные переходы	Энергия, эВ	Длина волны, нм	МО и их вклады в переход*, (%)
DMTU, газовая фаза, B3LYP/def2-SVP			
S <sub>0</sub> →S <sub>1</sub>	4,28	290	H <sub>0</sub> → L <sub>0</sub> (99)
S <sub>0</sub> →S <sub>2</sub>	5,33	233	H <sub>0</sub> → L <sub>+1</sub> (57) H <sub>-1</sub> → L <sub>0</sub> (39)
S <sub>0</sub> →S <sub>3</sub>	5,59	222	H <sub>-1</sub> → L <sub>0</sub> (40) H <sub>0</sub> → L <sub>+1</sub> (39) H <sub>0</sub> → L <sub>+2</sub> (17)
S <sub>0</sub> →S <sub>4</sub>	6,11	203	H <sub>-1</sub> → L <sub>+2</sub> (82) H <sub>0</sub> → L <sub>+1</sub> (10)
DMTU, в воде (модель SMD), B3LYP/def2-SVP			
S <sub>0</sub> →S <sub>1</sub>	4,58	271	H <sub>0</sub> → L <sub>0</sub> (100)
S <sub>0</sub> →S <sub>2</sub>	5,46	227	H <sub>-1</sub> → L <sub>0</sub> (95) H <sub>0</sub> → L <sub>+2</sub> (2)
S <sub>0</sub> →S <sub>3</sub>	6,29	197	H <sub>0</sub> → L <sub>+1</sub> (87) H <sub>0</sub> → L <sub>+2</sub> (7) H <sub>-2</sub> → L <sub>0</sub> (5)
S <sub>0</sub> →S <sub>4</sub>	6,56	189	H <sub>-2</sub> → L <sub>+1</sub> (93) H <sub>0</sub> → L <sub>+1</sub> (5)
<i>транс</i> -[Pb(DMTU) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ](DMTU) <sub>4</sub> , газовая фаза, B3LYP/def2-SVP			
S <sub>0</sub> →S <sub>1</sub>	3,41	363	H <sub>0</sub> → L <sub>0</sub> (99)
S <sub>0</sub> →S <sub>2</sub>	3,64	340	H <sub>-5</sub> → L <sub>+1</sub> (76) H <sub>-1</sub> → L <sub>0</sub> (20)
S <sub>0</sub> →S <sub>3</sub>	4,06	306	H <sub>-3</sub> → L <sub>+2</sub> (78) H <sub>-3</sub> → L <sub>+3</sub> (12)
S <sub>0</sub> →S <sub>4</sub>	4,75	262	H <sub>-15</sub> → L <sub>+1</sub> (27) H <sub>-17</sub> → L <sub>+1</sub> (18) H <sub>-8</sub> → L <sub>+3</sub> (10)
S <sub>0</sub> →S <sub>5</sub>	5,21	238	H <sub>-9</sub> → L <sub>+3</sub> (56) H <sub>-10</sub> → L <sub>+2</sub> (8)
S <sub>0</sub> →S <sub>6</sub>	5,47	227	H <sub>-5</sub> → L <sub>+10</sub> (11) H <sub>-6</sub> → L <sub>+10</sub> (9) H <sub>-6</sub> → L <sub>+8</sub> (8)

Объединяя экспериментальные и теоретические результаты, можно сказать, что механохимическим и гидротермальным способами получено новое металлоорганическое соединение *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>], которое было разрешено с помощью рентгеновской дифракции монокристаллов обладает перспективными фотолюминесцентными свойствами. При возбуждении на 365 нм обнаружен квантовый выход 91 %. Такой высокий квантовый выход указывает на отсутствие заметного концентрационного тушения при среднем расстоянии 9,4 Å между ионами Pb<sup>2+</sup> в структуре *транс*-[Pb(DMTU)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>]. TD-DFT расчёты подтверждают красное смещение полос поглощения в Pb(DMTU)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> по отношению к DMTU и указывают на довольно уникальную схему формирования последовательности полос поглощения, а именно, от множества нижних занятых орбиталей к одним и тем же незанятым. Новый люминофор отличается низким энергопотреблением при производстве по сравнению с неорганическими люминофорами и сравнимой с ними высокой стабильностью характеристик, что перспективно для ряда применений в фотонике.

## §2.7. ВЫВОДЫ

Новые подходы к интерпретации экспериментальных результатов и прогресс вычислительной техники позволили провести анализ ионных состояний флуоресцеина в широком интервале pH. На примере дианиона флуоресцеина найдена наиболее результативная комбинация функционала B3LYP, базиса aug-cc-pVDZ, модели растворителя, что позволило приблизиться к экспериментальным результатам. Построенная линейная регрессия между рассчитанными и экспериментальными электронными переходами поглощения и испускания использована для определения экспериментально реализуемого таутомера моноаниона MI и нахождения значения длин волн испускания MI (494 нм) и Q (550 нм). Формальный анализ зависимости чисто электронного перехода  $\tilde{\nu}_{00}$  в диапазоне pH 0,5-12 позволил определить четыре типа флуоресцирующих

состояний флуоресцеина, которые с помощью рассчитанных спектральных характеристик отнесены к D, MI, Q, C форме таутомеров.

Исследование галогензамещённых форм флуоресцеина показало, что в зависимости от pH в растворе присутствуют различные ионные формы эозина и эритрозина. Дианионная форма присутствует в растворе при pH от 14 до 4,0; моноанионная форма при pH  $8,5 \div 2,0$ ; нейтральная при pH  $6,0 \div 0,5$  и катионная форма при pH  $4,0 \div 0$ . Рассчитаны спектры поглощения и испускания ионных форм эозина и эритрозина с помощью квантовохимических методов. В комбинации с экспериментальными данными, развит подход, который позволяет расшифровать сложный контур в спектрах систем с множеством таутомерных форм. В результате найденной линейной регрессии между расчётными и экспериментальными данными объяснены положения пиков флуоресценции таутомерных форм эозина и эритрозина. Найдено, что для катионной формы это 473 и 494 нм при pH=4,0; для моноанионной – 604 и 690 нм при pH=8,5; для нейтральной хиноидной формы – 614 и 613 нм) при pH=6,0.

Расчёты с использованием теории функционала плотности для исследования оптических свойств сополифлуоренов показали, что наименьшее значение энергетической щели достигается при присоединении флуорена к карбазолу в положении 2,7, поскольку электронная плотность равномерно делокализуется на всей сопряжённой части полимера, и число подвижных  $\pi$ -электронов увеличено, что приводит к снижению барьера для переноса электронов на низшую вакантную молекулярную орбиталь. Также показано, что наличие растворителя приводит к незначительному батохромному сдвигу спектров поглощения.

Расчёты показывают, что в полимерной цепи сополимера флуорена и дицианофенантрена происходит перенос заряда от флуорена к фенантреновым частям в возбуждённом состоянии. Это хорошо согласуется с экспериментальными спектрами излучения синтезированных полимеров, где продемонстрирован значительный перенос энергии от флуореновых сегментов к дицианофенантреновым единицам. Молекулы дицианофенантрена обладают более жёсткой структурой по сравнению с другими молекулами, и в полимерных плёнках

с ними наблюдается увеличение максимальной яркости с ростом содержания добавки в полимерной цепи. Полимеры PFCN демонстрируют голубую эмиссию с высоким квантовым выходом и, таким образом, имеют большой потенциал для применения в светоизлучающих устройствах.

Металлоорганический люминофор  $\text{trans-[Pb(DMTU-S)}_4\text{Cl}_2]$  с высоким квантовым выходом, имеет гетерогенное локальное окружение иона свинца. Люминесценция объясняется ионами  $\text{Pb}^{2+}$  внутри октаэдров DMTU-S. Спектр возбуждения формируется за счёт вкладов прямого возбуждения ионов  $\text{Pb}^{2+}$  и передачи энергии с орбиталей органических лигандов, которые были модифицированы после образования  $\text{trans-[Pb(DMTU-S)}_4\text{Cl}_2]$  комплекса. Новый люминофор перспективен для ряда применений в фотонике.

В работе участвовали – И.А. Щугорева, А.В. Рогова, Д.А. Иванова, Е.Ю. Маляр, С.А. Варганов, Д.Г. Фёдоров, А.А. Кузубов, П.В. Аврамов, С.Г. Овчинников. Эксперимент для флуоресцеина и аналогов проведён сотрудниками Сибирского федерального университета на базовой кафедре фотоники и лазерных технологий под руководством Е.А. Слюсаревой и М.А. Герасимовой. Для органических полимеров эксперимент проведён в Институте высокомолекулярных соединений РАН (г. С.-Петербург) под общим руководством А.В. Якиманского, Т.Г. Чулковой, Г.В. Носовой и Р.Ю. Смыслова. Эксперимент для гибридных металлоорганических соединений проведён – Н.Н. Головнёвым, А.В. Деминой, А.С. Александровским, М.А. Герасимовой и М.С. Молокеевым.

Материалы данной главы представлены в следующих работах из списка публикаций автора: 2, 9, 11, 14, 17, 23.

## ГЛАВА 3. НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДА

### §3.1. ОТКРЫТИЕ ФУЛЛЕРЕНОВ

Долгие годы считалось, что самый изучаемый элемент — элементарный углерод может образовывать только две кристаллические структуры — алмаз и графит. В 60<sup>х</sup> гг. появились сообщения о существовании модификации углерода, которая представляет собой упаковку одномерных (линейных) цепочек углеродных атомов. Такая модификация получила название карбин. Карбин представляет линейную структуру — сшитые или двойными связями, или чередующимися одинарными — тройными связями цепочки из атомов углерода. Алмаз имеет пространственную структуру, в которой атомы углерода, образующие между собой сильные химические связи, ориентированы относительно друг друга не в плоскости, а в пространстве. Длина связи углерод-углерод в алмазе равна 0,142 нм. Структура графита слоистая. Каждый атом образует сильные химические связи с другими атомами, расположенными в одной плоскости, на расстоянии 0,140 нм, т.е. химическая связь в графите сильнее, чем в алмазе, в то время как сами плоскости находятся друг от друга на расстоянии — 0,335 нм и связаны слабыми ван-дер-ваальсовыми связями. Склонность углерода к образованию различных поверхностей в ещё большей степени проявилась в новом классе молекул — фуллеренах и нанотрубках [112,113]. В 1985 г группой Крото была сгенерирована молекула  $C_{60}$  лазерной возгонкой, которая представляет собой замкнутую поверхность [112], образованную многоугольниками. В настоящий момент известно существование ряда молекул фуллеренов —  $C_{36}$  [114],  $C_{60}$ ,  $C_{70}$ ,... [115–122]. Создание в 90<sup>х</sup> гг. эффективной технологии синтеза [122,123] привлекло к изучению фуллеренов специалистами в области физики, химии, материаловедении и биологии [124,125].

Интересно проследить открытие знаменитой молекулы фуллерена  $C_{60}$ . В 1966 г научный обозреватель Джонс предположил, что при высокотемпературном синтезе графита за счёт введения атомов или фрагментов, заставляющих графитовую поверхность отклоняться от плоскости, могут образовываться



углеродные сфериды, полые внутри [126]. В 1970 г И. Осава в Японии теоретически построил молекулу  $C_{60}$  в виде усечённого икосаэдра и предсказал её высокую стабильность [127]. И, наконец, в 1973 г советские химики Бочвар и Гальперн [128] провели квантовохимический расчёт замкнутого полиэдра  $C_{60}$ , который показал, что подобная структура углерода имеет закрытую электронную оболочку и высокую энергию стабилизации. Все эти работы были неизвестны широкому кругу учёных вплоть до второй половины 80<sup>х</sup> гг., пока фуллерены не были получены экспериментально.

В настоящее время, исследование углеродных форм превратилось в отдельную ветвь науки, и уже не ограничивается изучением только фуллеренов и их производных. Сейчас известно множество структур углерода, имеющих характерные размеры от единиц до сотен нанометров. Наиболее полно, на настоящий момент, изучена атомная и электронная структура молекулы  $C_{60}$ . Молекула имеет симметрию  $I_h$ , все атомы углерода находятся в эквивалентных положениях. Связи в молекуле  $C_{60}$  делятся на два типа, в зависимости от того являются ли они общими рёбрами двух шестиугольников или пятиугольника и шестиугольника, длина связей  $0,139 \pm 0,01$  нм, и  $0,144 \pm 0,01$  нм соответственно [129,130]. При такой структуре система  $C_{60}$  является молекулой, а не кластером, что кардинальным образом влияет на её основные физические и химические свойства [124]. Для теоретического исследования электронной структуры фуллеренов и их производных применялись различные расчётные схемы [131,132]. Во всех случаях было получено хорошее соответствие экспериментальных и теоретических данных, что говорит о том, что квантовохимические методы могут на хорошем уровне количественно описывать электронные состояния.

### **§3.2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ ФУЛЛЕРЕНОВ – ФУЛЛЕРЕНОЛЫ**

Существует большой интерес к определению антиоксидантной активности лекарственных форм, биологически активных веществ и пищевых продуктов. Это

связано с тем, что одной из основных причин наиболее опасных заболеваний является накопление свободных радикалов в организме человека, которые приводят к различным клеточным повреждениям. Концентрация таких свободных радикалов, как супероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксил радикал и др., возрастает за счёт снижения активности естественной антиоксидантной системы человека, что связано, в основном, с неблагоприятными условиями. Вредное воздействие на организм свободных радикалов можно уменьшить за счёт систематического употребления некоторых лекарственных растительных препаратов, обладающих хорошей антиоксидантной активностью. Антиоксиданты защищают клеточные структуры от повреждения свободными радикалами, что предохраняет организм человека от болезней.

Изучение свойств фуллеренов и их производных позволило определить области их практического применения, включая различные биомедицинские приложения. Отличительной особенностью фуллеренов и большинства производных на их основе является низкая токсичность и способность выводиться из организма. Следует также отметить, что благодаря своей геометрии и электронной структуре, фуллерены способны образовывать соединения, содержащие в своём составе различные фармакофорные группы, способные легко переходить в возбуждённое состояние под действием различных физических и химических факторов и заключать внутри своей углеродной сферы атомы металлов – эндоэдральные металлофуллерены. Данные структуры обладают такими свойствами, как химическая стабильность, парамагнетизм, большая площадь поверхности, которую легко функционализировать и ненасыщенные двойные связи. К молекуле фуллерена можно присоединять различные функциональные группы, что позволяет получать растворимые в воде производные фуллеренов. Благодаря гидрофильным свойствам и способности связывать свободные радикалы фуллеренолы способны создать альтернативу используемым препаратам в области химиотерапии, лечения нейродегенеративных заболеваний, радиологии.

Полигидроксилированные фуллерены (фуллеренолы) занимают особое место в относительно небольшой группе водорастворимых производных

фуллеренов [133]. Фуллеренолы имеют относительно простую структуру, и их растворимость можно изменить от почти нуля до примерно 60 г/л при комнатной температуре, увеличив число гидроксильных групп. Они характеризуются высокой адгезией к металлам и полупроводникам, образуют тонкие плёнки на их поверхностях и поэтому могут быть использованы в микро- и оптоэлектронике. С другой стороны, фуллеренолы улучшают механические свойства материалов и применяются в качестве модификаторов бетонов и красок. Наиболее важными, вероятно, являются медицинские применения фуллеренолов. Их антиоксидантные свойства и эффекты удаления свободных радикалов известны уже более двадцати лет. Антиоксиданты защищают клеточные структуры от повреждения их свободными радикалами, это предохраняет организм человека от болезней. Также существует предположение, что некоторые фуллерены, растворенные в оливковом масле, способны встраиваться в двухслойные липидные мембраны клеток и митохондрий и действовать как многоуровневый антиоксидант [133].

Различные производные фуллеренов являются эффективными средствами в лечении вируса иммунодефицита человека: белок, ответственный за проникновение вируса в кровяные клетки – ВИЧ-1-протеаза, – обладает сферической полостью диаметром 10 Å, форма которой остаётся постоянной при всех мутациях. Данный размер совпадает с диаметром молекулы фуллерена. Синтезировано производное фуллерена, способное растворяться в воде, блокирующее активный центр ВИЧ-протеазы, без которой невозможно образование новой вирусной частицы [134].

В живых организмах непрерывно протекают реакции одноэлектронного восстановления, приводящего к формированию промежуточных продуктов восстановления молекулы кислорода. Образующиеся таким образом химические соединения относятся к различным группам веществ как нерадикальной, так и радикальной природы, общим характерным свойством которых является высокая реакционная способность, вследствие чего они получили обобщённое название – активные формы кислорода (АФК или ROC) [135]. Они представляют собой серию промежуточных продуктов, которые образуются в процессе восстановления  $O_2^{\cdot-}$ ,

$\cdot\text{OH}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , являясь сильными окислителями. Окисление и антиокисление живых организмов поддерживают динамическое равновесие, тогда как организмы подвергаются воздействию экзогенных материалов, равновесие нарушается и образуется избыточное количество АФК. Они способны атаковать почти все биологические молекулы, включая ДНК, что приводит к серьёзным повреждениям организмов, таким как старение, рак, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания и т.д. Поэтому в биомедицине, особенно для химиотерапии рака, важно развивать химические вещества, которые смогут потенциально уничтожить АФК [136].

Некоторые производные фуллеренов, которые в основном включают трисманонил  $\text{C}_{60}(\text{C}_3)$  и полигидроксифуллерен (фуллеренолы), обладают превосходной антиоксидантной активностью благодаря удалению свободных радикалов. Фуллеренолы, с присоединёнными гидроксильными группами ( $-\text{OH}$ ) на клетках фуллеренов, имеют умеренную растворимость в воде и биосовместимость. Чианг впервые обнаружил, что фуллеренолы обладают потенциальными свойствами, благодаря которым они могут поглощать анионы супероксидных радикалов ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), вырабатываемые ксантиновой и ксантиноксидазной системами [133]. Это особенно верно для  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22}$ , который может поглощать  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  и  $\cdot\text{OH}$ . Исследования показали, что фуллеренолы могут защищать клетки от окислительного стресса, вызванного  $\text{H}_2\text{O}_2$  и супероксиддисмутазой (СОД), предотвращают дегенерацию межпозвоночного диска и окисление глутатиона, уменьшают перекисное окисление липидов в печени и ингибируют апоптоз, вызванный ионизирующим излучением. Таким образом, фуллеренолы можно использовать в качестве лекарственного средства для лечения заболеваний [133,137]. Фуллерены и их производные обладают антиоксидантной активностью, при этом, способны легко выводиться из организма, что позволяет использовать металлофуллеренолы, содержащие гадолиний, в качестве контрастного агента в магнитно-резонансной томографии, например, для выявления рака на ранней стадии. Для применения в качестве медицинских препаратов необходимо, чтобы изучать их химические свойства. В настоящее время на этом этапе часто

применяются теоретические подходы, позволяющие глубже изучить атомную и электронную структуры, предсказать возможные каталитические свойства.

Водорастворимые производные металлофуллеренов, содержащие гадолиний, являются отличными кандидатами для новых контрастных агентов, используемых в магнитно-резонансной томографии для выявления рака на ранней стадии, из-за их высокой релаксирующей способности и характерной инкапсуляции ионов лантаноидов ( $Gd^{3+}$ ), предотвращающей их высвобождение в биоокружение. Из-за сложной методики синтеза фуллеренолов с атомом гадолиния внутри углеродного каркаса применение данных соединений всё ещё ограничено. Тем не менее,  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  потенциально хороший кандидат для применения в качестве медицинских препаратов, так как обладает хорошей растворимостью в биологических средах.

Поиск перспективного антиоксидантного материала для биологических процессов на основе фуллеренолов  $C_{82}O_xH_y$  является актуальной задачей. Для этого в работе находили равновесную геометрию фуллеренолов с атомом гадолиния внутри с высоким спином и разным количеством функциональных групп на поверхности. Исследовали электронную структуру, рассчитывали ИК-спектр и сравнивали его с экспериментом. Далее оценивали данные структуры с позиции реакционной способности, для чего рассчитывали химические индексы, взаимодействие с активными формами кислорода и возможным перспективным применением в магнитно-резонансной томографии.

Модель фуллеренола представлена на рисунке 3.1. Получение фуллеренолов проводят при относительно агрессивных условиях в присутствии разбавленной серной кислоты, гидроксида натрия, перекиси водорода и так далее [138]. На данный момент, максимально подтверждённым количеством присоединённых OH-групп является 40, такой фуллеренол образуется в присутствии перекиси водорода и при нагревании. По данным pH измерений, фуллеренолы проявляют свойства слабых кислот [139]. Важнейшим свойством гидроксильированных фуллеренов является их антиоксидантная активность, так, например, они чаще и эффективнее используются в медицине по сравнению с такими антиоксидантами, как витамины

*C* и *E*. В отличие от фуллеренов, фуллеренолы растворимы в воде, спирте, других полярных растворителях и частично в жирах (оливковом, миндальном масле), что делает их более перспективными для применения в фармацевтических и косметических препаратах, чем фуллерены. Фуллеренолы способны выступать в качестве «радикальных ловушек», то есть способны нейтрализовать одной молекулой более 20 свободных радикалов. В настоящее время все известные антиоксиданты уступают фуллеренолам по эффективности, примерно в 100 раз. Относительно токсичности фуллеренолов, последние выполненные тесты показали отрицательные результаты, таким образом, они не несут отрицательного воздействия на организм.

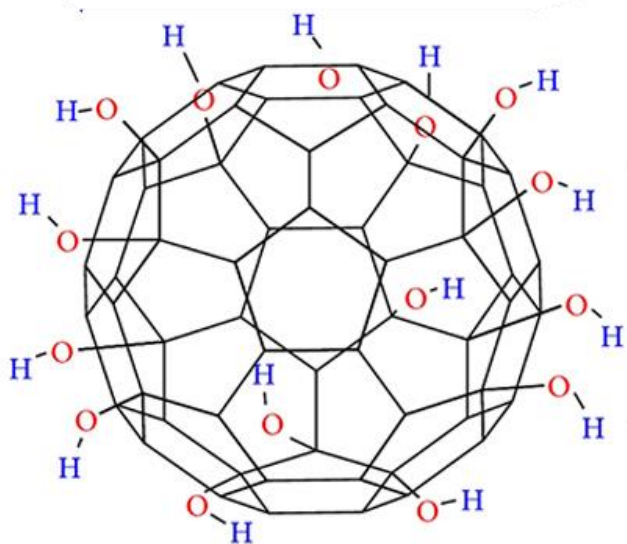


Рисунок 3.1 – Модель молекулы гидроксированного фуллерена  $C_{60}$

Стабильными считаются те фуллеренолы, в которых гидроксильные группы локализованы в «экваториальной области» молекулы  $C_{2v}$ . Поскольку длина связи С-С в экваториальной области молекулы фуллерена больше, чем в других областях молекулы. Следовательно, гидроксильные группы испытывают меньшее взаимное отталкивание, что и обуславливает большую стабильность. Таким образом, относительная стабильность фуллеренолов возрастает при увеличении числа гидроксильных групп в экваториальной области молекулы  $C_{2v}$ , а также, при уменьшении числа гидроксильных групп выше и ниже экваториальной области молекулы  $C_{2v}$  [140].

### §3.3. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ОКСИ-ПОЛИГИДРОКСИ ФУЛЛЕРЕНЫ



В исследованиях биологической активности фуллеренолов с различным числом гидроксильных групп ( $C_{60}(OH)_{12-14}$ ,  $C_{60}(OH)_{18-24}$ ,  $C_{60}(OH)_{30-38}$ ) показано, что растворимость фуллеренолов коррелирует с числом гидроксильных групп, фуллеренолы  $C_{60}(OH)_{18-24}$  и  $C_{60}(OH)_{30-38}$  не оказывает токсического эффекта на клеточные культуры, а фуллеренол  $C_{60}(OH)_{18-24}$  проявляет максимальную биологическую активность [125,126]. Обнаружено, что фуллеренол  $C_{60}$  проявляет антиоксидантную активность и способен утилизировать почти все активные формы кислорода и азота [127,128], а также, при значительных концентрациях,  $C_{60}$  фуллеренол проявляет прооксидантную активность и сам является источником активных частиц. При синтезе фуллеренола получено большое количество изомеров и молекул с разным количеством гидроксильных и карбонильных групп, и соответственно, с разной растворимостью и биофункциональностью.

В этой части работы рассматривалась стабильность самых широко используемых фуллеренолов вида  $C_{60}OH_nO_2$  ( $n=24, 36, 48$ ) и электронные свойства фуллеренола с наибольшей биологической активностью –  $C_{60}(OH)_{24}O_2$  – в реакции с адреналином. Также приводятся результаты экспериментального исследования оксидантной активности фуллеренола  $C_{60}$  в реакции автоокисления адреналина. Квантовохимические расчёты характеристик фуллеренолов проводились с помощью метода функционала плотности B3LYP [129,130] в базисе 6-31(p,d) программы GAMESS [146]. Предварительно, для ускорения расчётов, геометрию молекул оптимизировали с помощью полуэмпирического метода PM7 программы MORAC2012 [147].

Проведено исследование влияния фуллеренолов на реакцию автоокисления адреналина. На рисунке 3.2 представлены результаты экспериментального исследования оксидантной активности фуллеренола  $C_{60}(OH)_{24}$ .

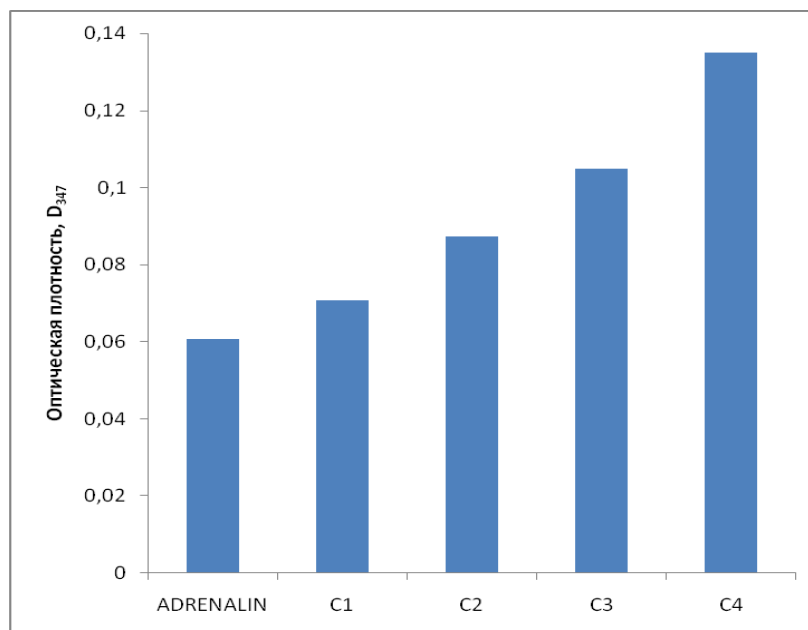


Рисунок 3.2 – Гистограмма зависимости оптической плотности раствора адреналина в зависимости от концентрации фуллеренола C<sub>60</sub>.

Как видно из диаграммы, увеличение концентрации фуллеренола вызывает увеличение оптической плотности раствора, что вызвано увеличением накопления продуктов окисления адреналина. Таким образом, фуллеренол в указанных концентрациях проявляет прооксидантную активность и ускоряет реакцию автоокисления адреналина.

Для проверки эксперимента проведены квантовохимические расчёты всех предполагаемых участников реакции автоокисления. В качестве объектов выбраны фуллеренолы с двумя атомами кислорода и 24, 36, 48 группами -ОН. В настоящее время не установлено, какой конкретно изомер или группа изомеров получаются в ходе синтеза. В работе [148] рассчитаны различные изомеры и показано что экспериментально трудно отдать предпочтение какому-либо изомеру, так как они мало отличаются по своим свойствам. Поэтому в работе рассмотрены три крайних случая (рисунок 3.3). Построены изомеры фуллеренола таким образом, чтобы -ОН группы располагались либо на одной полусфере фуллерена, либо на двух противоположных сторонах, либо равномерно по сфере. Атомы кислорода старались располагать максимально далеко друг от друга и от -ОН групп. На рисунок 3.3 представлены три изомера фуллеренола с 24 -ОН группами и по одному



наиболее энергетически выгодному изомеру с 36 и 48 -ОН группами. Наличие гидроксидных групп сильно меняет симметричную форму фуллерена.

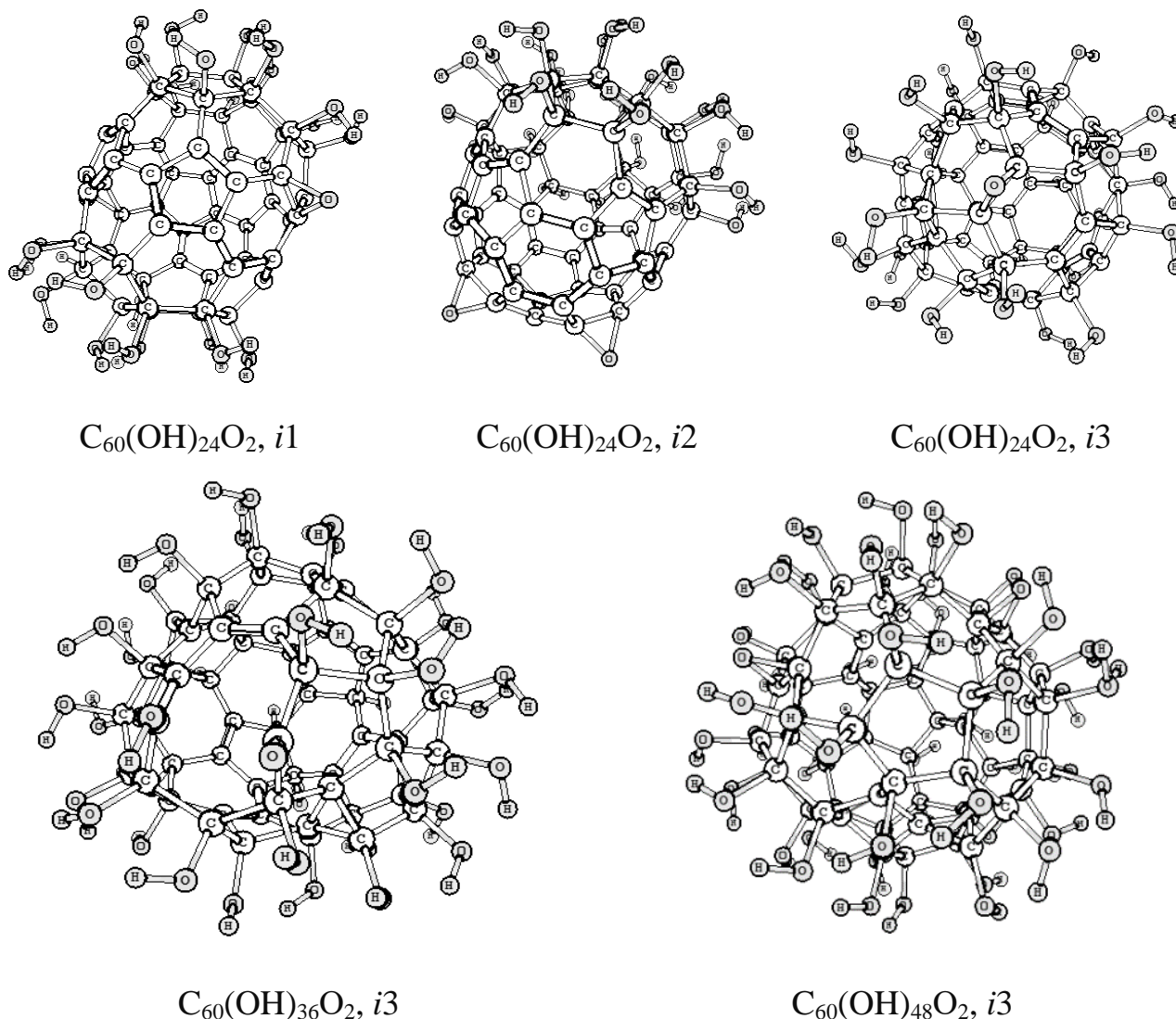
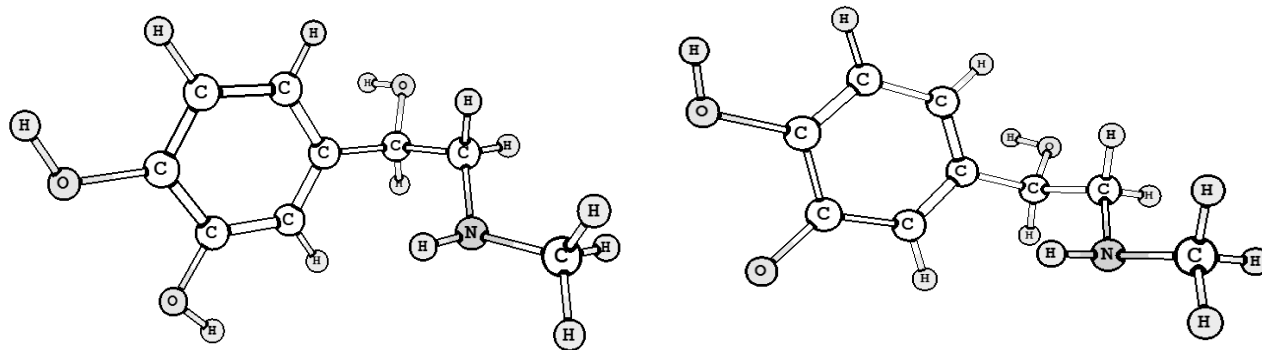


Рисунок 3.3 – Фуллеренолы общей формулы  $C_{60}(OH)_{24}O_2$  с различным расположением -ОН и О групп по сфере фуллерена  $C_{60}$  и фуллеренолы с разным количеством -ОН групп

Молекула адреналина рассчитана в двух формах – нейтральной и с зарядом  $-1e^-$  (рисунок 3.4). Рассчитывались различные конформеры адреналина, отличающиеся расположением водорода в ОН группах. Энергетическая разница между конформерами составила не более 10 кДж/моль. В дальнейшем приведены данные для энергетически эффективного конформера. Также для анализа реакции рассчитана молекула кислорода в триплетном состоянии.



Адреналин

Адреналинполухинон

Рисунок 3.4 – Геометрия нейтральной и анионной полухинонной формы молекулы адреналина

На рисунке 3.5 представлены энергии верхних занятых молекулярных орбиталей (НОМО) и нижних вакантных (LUMO) орбиталей. Видно, что изомер *i3*, имеет самую маленькую энергетическую щель между НОМО и LUMO, что говорит о большей, по сравнению с изомерами *i1* и *i2*, химической активности. Согласно химической структуре и, соответственно своим свойствам, адреналин является донором электронов, и эта его функция реализуется именно в процессе хиноидного окисления [149]. В итоге все расчётные данные для анализа реакции каталитического окисления адреналина и получение анион радикала молекулы кислорода в присутствии молекул фуллеренолов представлены на рисунке 3.5. На рисунке приведены энергии НОМО и LUMO орбиталей трёх изомеров фуллеренола с двадцатью четырьмя группами -ОН в синглетном состоянии, фуллеренол с зарядом  $-1 e^-$  в дублетном состоянии, адреналин, адреналинполухинон с зарядом  $-1 e^-$  и молекула кислорода в триплетном состоянии соответственно.

Показано, что в присутствии фуллеренолов реакция идёт по пути А. Разница между уровнями НОМО адреналина и LUMO фуллеренола составляет 1,35 эВ в отличие от НОМО и LUMO адреналина, где энергетическая щель составляет 5,70 эВ. Очевидно, что требуются заметно более мягкие условия для реализации данного пути. Фуллеренол, с зарядом  $-1$  становится энергетически невыгодным по сравнению с нейтральным и будет возвращаться в исходное состояние. Всё это

создаёт предпосылки для передачи электрона по двум каналам: или обратно на адреналин, или на кислород, который всегда присутствует в растворе.

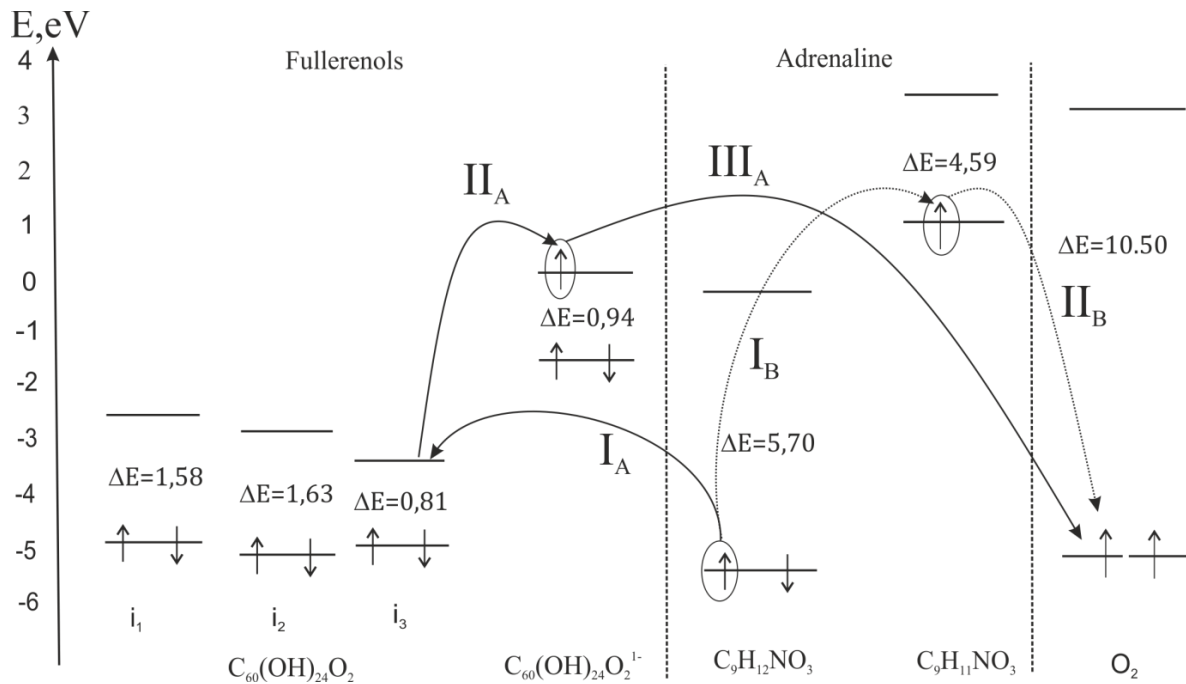


Рисунок 3.5 – Схема уровней молекулярных орбиталей и возможная схема реакции окисления адреналина. А – реакция с участием фуллеренола, В – без фуллеренола

По схеме видно, что заряженному фуллеренолу выгоднее отдавать электрон на молекулу кислорода и тем самым получить активную форму кислорода. Видно, что путь В требует больших энергетических затрат по сравнению с путём А. По данному пути система может идти, например, в присутствии основания, когда водород отнимается от адреналина и он переходит в адреналинополухинон. Расчёты показывают, что фуллеренол может проявлять каталитическую прооксидантную активность и ускорять реакцию автоокисления адреналина. Это объясняется энергетической выгодой при переносе электрона с молекулы адреналина на молекулу фуллеренола. Фуллеренол, при этом, служит «контейнером» электронов и, тем самым, ускоряет реакцию автоокисления.

### §3.4. РАСЧЁТ ЭНДОЭДРАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОФУЛЛЕРЕНОЛОВ $Gd@C_{82}O_xH_y$

Функционалом в расчётах для кластеров  $Gd@C_{82}O_xH_y$  служил мета-гибридный обменно-корреляционный функционал MN15 [150]. Функционал основан на приближении мета-GGA, то есть включает члены, которые зависят от плотности кинетической энергии, и основан на сложных функциональных формах, параметризованных в высококачественных базах данных эталонных тестов. Функционал можно использовать для традиционных расчётов квантовой химии и физики твёрдого тела. Функционал MN15 имеет более широкую точность, чем другие потенциалы DFT, для воспроизведения энергий связи, энергий атомизации, потенциалов ионизации, сродства к электрону, сродства к протону, высоты реакционного барьера, нековалентных взаимодействий, термодинамики углеводородов, энергий изомеризации, энергии электронного возбуждения, абсолютных энергий атомов, и молекулярные структуры. В частности, он обеспечивает очень точные результаты для много-, одноконфигурационных и нековалентных систем со средней ошибкой (MUE) 4,75, 1,85 и 0,25 ккал/моль<sup>-1</sup> соответственно, что в несколько раз меньше, чем MUE обычных потенциалы DFT [150]. Базовый набор def(2)-SVP представляет собой сбалансированный базовый набор для обеспечения качества расчётов [151].

Положение молекулярных орбиталей рассматривается на основании квантово-механических расчётов. Наиболее важными для рассмотрения являются нижняя вакантная молекулярная орбиталь (LUMO) и высшая занятая молекулярная орбиталь (HOMO). На HOMO размещены электроны самых высоких энергий, которые легко взаимодействуют с электронами других молекул, а молекула будет переходить в ионизированное состояние или видоизменяться вследствие разрушения одних или образования других связей. LUMO является следующей после HOMO по шкале энергий и является вакантной молекулярной орбиталью. В результате рассмотрения HOMO-LUMO можно судить о реакционной способности исследуемых структур [152]. Главным инструментом исследования различных

систем при квантово-механическом моделировании является вычислительный комплекс, с программами для расчётов с использованием методов квантовой химии. На данный момент доступно несколько программных пакетов, наиболее популярными являются GAMESS и Gaussian [153], позволяющие производить геометрическую оптимизацию молекул, рассчитывать энергии и другие различные характеристики. Полученные результаты для обеих программ аналогичны. Расчёты проводились согласно схеме, представленной на рисунке 3.6.

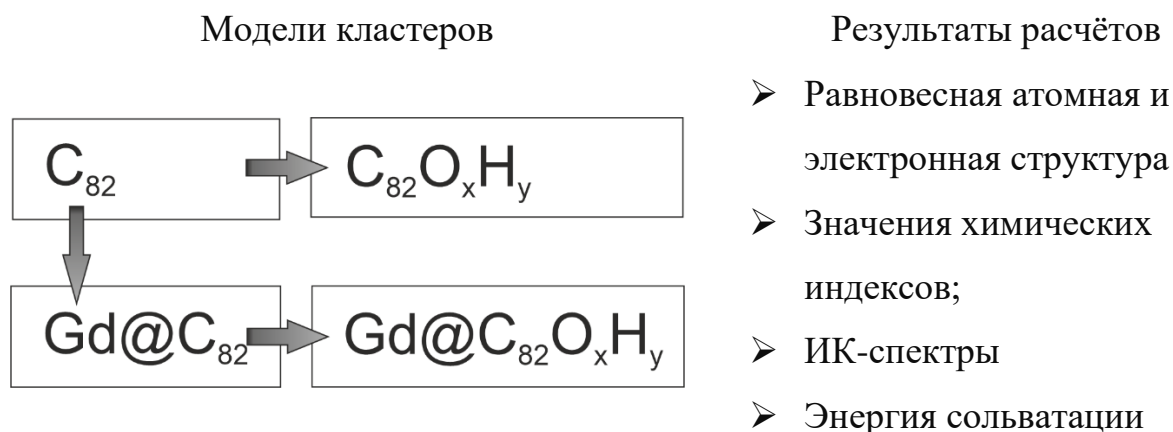


Рисунок 3.6 – Схема расчёта исследуемых структур

В работе рассчитаны молекулярные структуры фуллерена  $C_{82}$ , эндоэдрального комплекса  $Gd@C_{82}$  и молекул фуллеренолов  $Gd@C_{82}O_xH_y$ . Так же для оценки антиоксидантных свойств фуллеренолов рассчитаны электронные характеристики молекулы кислорода с разными мультиплетностями  $-m$  и зарядами  $-z$  ( $O_2^-$   $m=2$ ,  $z=-1$ ;  $O_2^0$   $m=1$ ,  $z=0$ ;  $O_2^0$   $m=3$ ,  $z=0$ ); молекулы пероксида водорода ( $H_2O_2$   $m=1$ ,  $z=0$ ;  $HO_2^-$   $m=2$ ,  $z=-1$ ). Модели молекул фуллеренов и их производных сконструированы в симметрии  $C_1$  и  $C_{2v}$  (рисунки 3.7 и 3.8) и оптимизированы в рамках MN15 и базисных наборов def(2)-SVP для атомов углерода (C), кислорода (O), водорода (H) и def(2)-SVP\_ECP для атома гадолиния (Gd) [154] в программе GAUSSIAN. Расчёты проводили в рамках ограниченного метода Хартри-Фока с открытой оболочкой (ROHF) в газовой среде и с учётом растворителя, где в качестве модели воды использовали подход SMD [11].

Структуры металлофуллеренолов представлены двух видов: одни структуры ( $C_{2v}$ ) обладают целым, закрытым углеродным каркасом, на который прикреплены

гидрокси- и эпокси-группы (рисунок 3.7, а); другие структуры ( $C_1$ ) представлены с различными функциональными группами (карбоксо-, гидрокси-группы и кислородный мостик), которые разрушают целостность углеродного каркаса (рисунок 3.7, б).

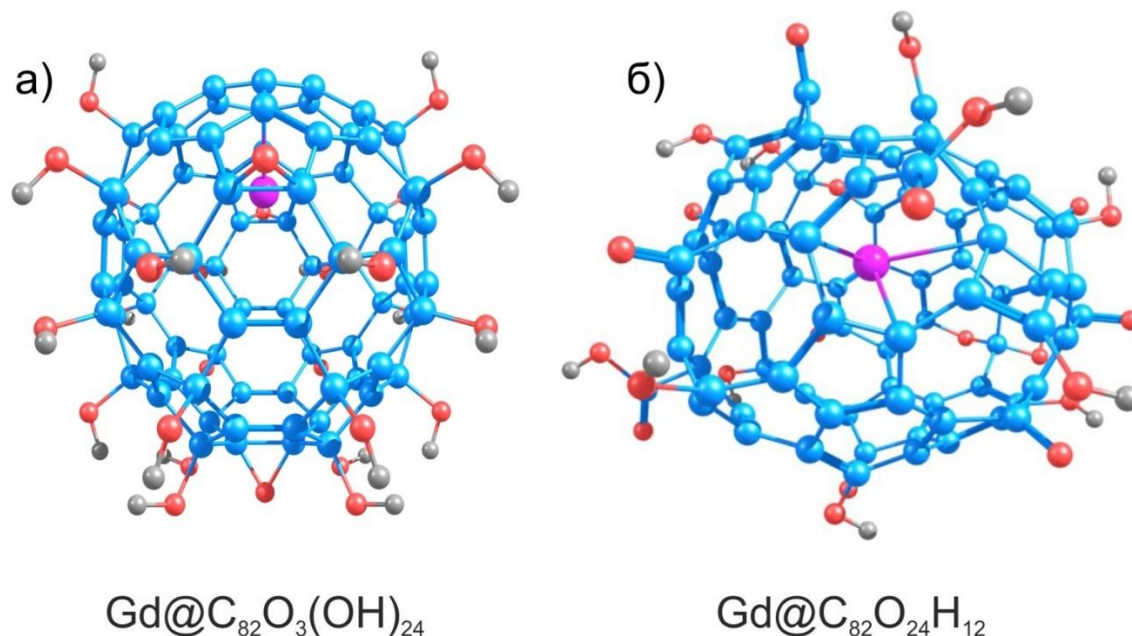


Рисунок 3.7 – Структуры эндоэдральных комплексов металлофуллеренов  $Gd@C_{82}O_xH_y$ . а)  $Gd@C_{82}O_3(OH)_{24}$  и б)  $Gd@C_{82}O_{24}H_{12}$ . Атомы углерода, гадолиния, кислорода и водорода обозначены голубым, фиолетовым, красным и серым, соответственно

Внутри молекулы  $C_{82}$  поместили атом гадолиния и рассчитали структуру  $Gd@C_{82}$  в симметрии  $C_{2v}$ , в которой атом Gd расположен на оси  $C_2$  (рисунки 3.8, а-б). Оптимизация для этого эндоэдрального металлофуллерена  $Gd@C_{82}$  проводилась со спином  $S=7/2$ , что соответствует конфигурации  $4f^7$  иона  $Gd^{+3}$ . Далее симметрично распределяли 8, 16, 24, 36 и 44 гидроксильные группы на молекуле  $Gd@C_{82}$  и рассчитывали структуры (рисунки 3.8, в). Также оптимизацию геометрии проводили для структур фуллеренолов с тремя эпоксидными группами с максимально возможной симметрией  $Gd@C_{82}O_3(OH)_y$  ( $y=8, 16, 24, 36, 44$ , рисунки 3.8, г). При построении молекулярных структур гидроксильные группы и эпоксидные группы располагали равномерно по углеродному каркасу фуллерена

для того, чтобы уменьшить число возможных внутримолекулярных взаимодействий.

Для оценки реакционной способности фуллеренолов и эндодральных комплексов были рассчитаны химические индексы. Индекс электрофильности –  $\omega = \chi^2/2\eta$  (где  $\eta = -(I+A)/2$ , где  $I$  – энергия НОМО орбитали,  $A$  – энергия LUMO орбитали) – служит показателем склонности молекулы к атаке нуклеофила, а абсолютная электроотрицательность –  $\chi = (I+A)/2$  характеризует реакционную способность [152]. При изучении структур проводился анализ электронной структуры, рассчитывали ИК-спектр и сравнивали его с экспериментом. Далее оценивали взаимодействие структур с активными формами кислорода и возможным перспективным применением в магнитно-резонансной томографии [155].

Молекула  $Gd@C_{82}$  имеет атомную структуру, в которой атом Gd расположен над центром шестиугольника на оси  $C_2$  в молекуле  $C_{82}$  ( $C_{2v}$ ) [134]. Электронная конфигурация изолированного атома Gd равна  $4f^7 5d^1 6s^2$  и это указывает на то, что электроны Gd  $5d$ - и  $6s$ - в основном перенесены на углеродную сферу, что говорит о важности ионного взаимодействия между Gd и  $C_{82}$ . Этот вывод хорошо согласуется с ионной моделью  $Gd^{3+}@C_{82}^{3-}$  [156]. Основное спиновое состояние  $Gd@C_{82}$  является результатом антиферромагнитного внутримолекулярного обмена связи между атомом гадолиния со спином  $S_{Gd}=7/2$  и  $S_{C_{82}}=1/2$  и с общим спином комплекса  $S_{Gd@C_{82}}=6/2$ .

Молекула фуллерена  $C_{82}$  с симметрией  $C_{2v}$  состоит из 12 пентагонов и 32 гексагонов (рисунок 3.8, а), в вершинах которых расположены атомы углерода, таким образом, в молекуле  $C_{82}$  симметрии  $C_{2v}$  имеется система сопряжённых связей ( $\pi$ -система).



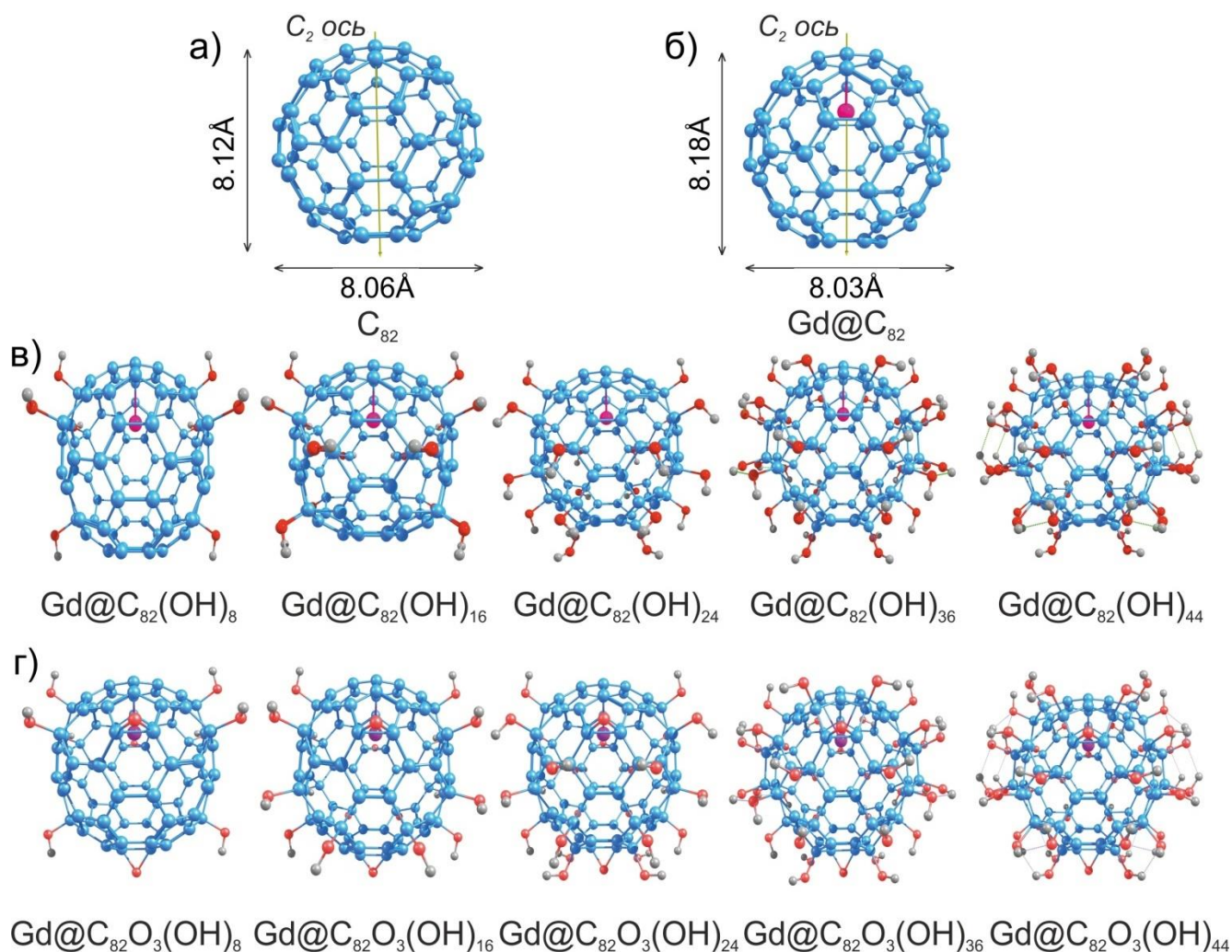


Рисунок 3.8 – Структуры рассчитанных молекул. а)  $C_{82}$ , б)  $Gd@C_{82}$ , в)  $C_{82}O_x(OH)_y$  и г)  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  (где  $x = 0, 3$ ;  $y = 8, 16, 24, 36, 44$ ) в симметрии  $C_{2v}$ . Цвета атомов как на рисунке 3.7. Длина молекулы указана в Å.

Когда в молекулу фуллерена  $C_{82}$  поместили атом гадолиния, длина связи между атомами увеличилась с 1,42-1,43 на 1,44-1,45 Å ( $\Delta l = 0,02$  Å). При этом на длину связи практически не влияет нахождение гидроксильных групп (8, 16 и 24) на молекуле фуллерена ( $l = 1,38-1,42$  Å), по сравнению с фуллереном (рисунок 3.8, а). Однако, увеличение гидроксильных групп до 36-и и 44-х значительно изменяет длину связи, за счёт чего происходит разрушение  $\pi$ -системы, и длина одинарной связи увеличивается от 1,41-1,42 до 1,51-1,53 Å ( $\Delta l = 0,10-0,12$  Å), а длина двойной связи уменьшается от 1,38-1,41 до 1,33-1,35 Å ( $\Delta l = 0,06-0,08$  Å) (рисунок 3.8, б). Помимо длины связи также изменяются и углы между атомами в углеродном шестиугольнике, в котором расположен атом гадолиния (рисунок 3.9).



Присутствие иона гадолиния, также как и атомов кислорода и гидроксильных групп (8, 16 и 24), в структуре фуллерена  $C_{82}$  практически не изменяет углы связи между атомами (рисунок 3.9, а). При этом большее количество гидроксильных групп увеличивает угол  $\angle C_{1-2-3}$  на 2-4 градуса ( $\angle C_{1-2-3}$  изменяется от 120 до 124 градусов),  $\angle C_{1-2-4}$  увеличивается на 3-4 градуса (от 109 до 112-113 градусов),  $\angle C_{3-2-4}$  уменьшается на 3-4 градуса для структур с 36-ю гидроксильными группами (от 122-125 до 118-119 градусов). Однако для структур с 44-я гидроксильными группами углы увеличиваются на 3-4 градуса, относительно структуры с 36-ю гидроксильными группами (от 118-119 до 121-122 градусов) (рисунок 3.9, б). В целом можно заключить, что для структур  $C_{82}O_x(OH)_y$  и  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  (где  $x = 0, 3$ ;  $y = 8, 16, 24, 36, 44$ ) наблюдается разделение на две условные группы: в первую группу входят структуры  $C_{82}O_x(OH)_y$  и  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  (где  $x = 0, 3$ ;  $y = 8, 16, 24$ ), во вторую  $C_{82}O_x(OH)_y$  и  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  (где  $x = 0, 3$ ;  $y = 36, 44$ ). Так для первой группы  $\pi$ -система сохраняется даже в присутствии иона гадолиния в углеродном каркасе, что можно наблюдать по изменению угла шестиугольника, в центр которого расположен атом гадолиния, для структур фуллеренолов. Однако при увеличении количества гидроксильных групп можно наблюдать, как резко изменяется угол связи и природа химической связи, т.е. происходит разрушение  $\pi$ -системы, и полуторная связь сменяется на одинарную и двойную, что приводит к резкому изменению геометрии углеродного каркаса. Присутствие 8, 16 и 24 гидроксильных групп на углеродном каркасе  $C_{82}$  не приводит к их существенному взаимодействию (рисунок 3.9, а). Увеличение гидроксильных групп (до 36 и 44 групп) приводит к тому, что они располагаются близко друг к другу, из-за этого они начинают взаимодействовать и образуют систему водородных связей (рисунок 3.9, б). Расстояние между атомами кислорода одной гидроксильной группы и водорода другой гидроксильной группы находится в интервале от 1,89 до 1,97 Å (рисунок 3.9, б).

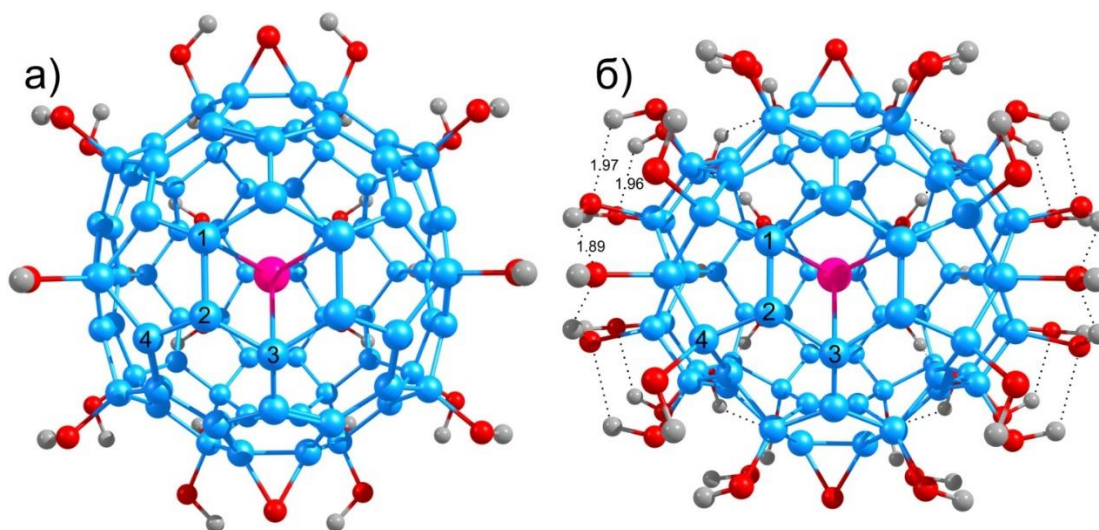


Рисунок 3.9 – Атомные структуры молекул (а)  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_3(\text{OH})_{24}$  и (б)  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_3(\text{OH})_{44}$ . Атомы углерода, обозначенные 1 и 2, 2 и 3, указывают на одинарную связь (1-2) и двойную (2=3), соответственно. Пунктирная линия показывает водородную связь между гидроксильными группами, её длина варьируется от 1,89 до 1,97 Å.

В ряду  $\text{C}_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  с количеством OH-групп 8, 16, 24 растёт энергия взаимодействия с растворителем от 213 до 402 кДж/моль, однако, для  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  наиболее выгодной структурой по энергии растворения (сольватации) является структура с 16-ю гидроксильными группами (793 кДж/моль). Для структур  $\text{C}_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  и  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  ( $x = 0, 3$ ;  $y = 24$ ) сохраняется  $\pi$ -система, следовательно наблюдается высокое сродство к электрону, что будет способствовать хорошим антиоксидантным свойствам. Увеличение количества гидроксильных групп-заместителей, в  $\text{C}_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  и  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  (где  $x = 0, 3$ ;  $y = 36, 44$ ), приводит к взаимодействию между атомами кислорода и водорода соседних гидроксильных групп, образуя внутримолекулярные водородные связи (рисунок 3.9, б), поэтому такие фуллеренолы хуже растворяются. Энергия сольватации была рассчитана для структур с большим количеством эпокси-групп  $\text{C}_{82}\text{O}_8(\text{OH})_y$  (где  $y = 8, 16, 24, 36, 44$ ). Для структур с количеством OH-групп 8, 16, 24 растёт энергия взаимодействия с растворителем от 165 до 298 кДж/моль, для структуры с 36-ю гидроксильными группами уменьшилась до 258 кДж/моль, и возросла для структуры с 44-я гидроксильными группами до 288 кДж/моль. При

этом присутствие гадолиния не повлияло на значения энергии сольватации. Как следствие, для структур с большим количеством гидроксильных групп, будет хуже взаимодействие с растворителем. Так же углеродный каркас сильно искажается в случае с 36-ю и 44-я гидроксильными группами, что приводит к тому, что единая  $\pi$ -система для всей молекулы разрушается и происходит уменьшение сродства к электрону. Таким образом, происходит уменьшение растворимости фуллеренолов, что также может приводить к снижению антиоксидантной активности.

### §3.5. АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОННЫХ СТРУКТУР ФУЛЛЕРЕНОЛОВ

Данные по энергии высшей занятой и низшей вакантной молекулярных орбиталей исследуемых структур в растворителе, а также величина энергетической щели ( $\Delta E_{\text{НОМО-LUMO}}$ ) представлены на рисунке 3.10. Для сопоставления, были рассчитаны атом гадолиния с мультиплетностью 8 (рисунок 3.10, а) и молекула фуллерена  $C_{82}$  симметрии  $C_{2v}$  (рисунок 3.10, б). Распределение атомов кислорода на молекуле  $C_{82}(\text{OH})_{24}$  незначительно повлияло как на энергетическое состояние НОМО и LUMO орбиталей ( $\Delta E_{\text{НОМО-LUMO}}$  увеличилась на 0,032 эВ для  $C_{82}\text{O}_3(\text{OH})_{24}$  относительно  $C_{82}(\text{OH})_{24}$ ), так и на локализацию орбиталей в пространстве. При расчёте  $\text{Gd}@C_{82}\text{O}_x(\text{OH})_y$  применяли метод ROHF со спином 7, что приводит к появлению альфа и бета электронов на энергетической диаграмме. Электроны гадолиния 4*f*-состояния лежат ниже по энергии на 1,88 эВ относительно НОМО орбитали (*f*-оболочка от -6,24 до -6,69 эВ). НОМО орбиталь преимущественно находится на атомах углерода фуллеренола (рисунок 3.10, б, в, г), тем самым сохраняется общий высокий магнитный момент молекулы. Орбитали НОМО и LUMO фуллерена  $C_{82}$  симметрии  $C_{2v}$  располагаются в верхней части молекулы (рисунок 3.10, б). В присутствии гадолиния на молекуле фуллерена, НОМО орбитали ( $\alpha$  и  $\beta$ ) локализовались в верхней части молекулы там, где находится атом гадолиния. При этом LUMO орбитали стали располагаться преимущественно на противоположной стороне молекулы (рисунок 3.10, в). При появлении

гидроксильных групп и кислорода на поверхности фуллеренола, НОМО и LUMO орбитали стали ещё более локализованы, т.е. электронная плотность НОМО сконцентрировалась на атомах углерода вблизи гадолия, и наоборот, электронная плотность LUMO орбитали стала располагаться на другом полюсе молекулы (рисунок 3.10, г).

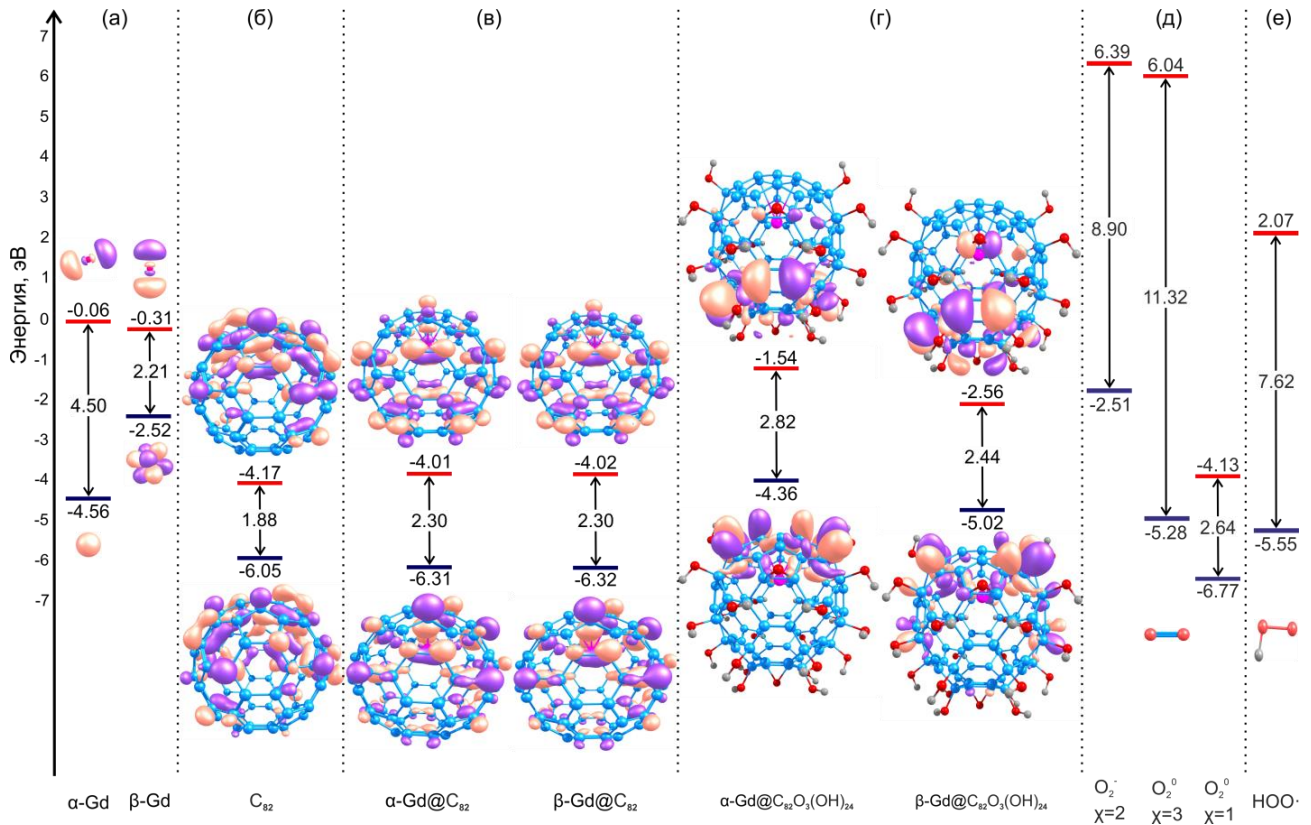


Рисунок 3.10 – Диаграмма граничных молекулярных орбиталей для (а) Gd, (б)  $C_{82}$ , (в) Gd@ $C_{82}$ , (г) Gd@ $C_{82}O_3(OH)_{24}$ , (д)  $O_2^0$  ( $\chi=1$ ,  $\chi=3$ ),  $O_2^-$  ( $\chi=2$ ) и (е)  $HOO\cdot$  с учётом растворителя. Уровни НОМО и LUMO обозначены синими и красными линиями, соответственно. Число между НОМО и LUMO – энергетическая щель.

Присутствие атома гадолия практически не повлияло на смещение по энергии занятых и вакантных орбиталей. НОМО орбиталь сместилась вниз по энергии на 0,26 эВ (с 6,05 на -6,31 (-6,32) эВ), LUMO орбиталь сместилась вверх по энергии на 0,10 эВ (с -4,17 на -4,01 (-4,02) эВ), энергетическая щель увеличилась на 0,42 эВ (с 1,88 до 2,30 эВ) относительно чистого фуллерена  $C_{82}$  (рисунок 3.10, в). Распределение атомов кислорода и гидроксильных групп привело к тому, что  $\alpha$ -НОМО орбиталь сместилась вверх по энергии на 1,95 эВ (с -6,31 на -4,36 эВ),  $\alpha$ -

LUMO орбиталь также сместилась вверх по энергии на 2,47 эВ (с -4,01 на -1,54 эВ, рисунок 3.10, г).  $\beta$ -НОМО орбиталь сместилась вверх по энергии на 1,3 эВ (с -6,32 на -5,02 эВ),  $\beta$ -LUMO орбиталь также сместилась вверх по энергии на 1,46 эВ (с -4,02 на -2,56 эВ) (рисунок 3.10, г). Энергетическая щель для фуллеренола  $\beta$ -Gd@C<sub>82</sub>O<sub>3</sub>(OH)<sub>24</sub> увеличилась на 0,14 эВ (с 2,30 до 2,44 эВ) относительно чистого металлофуллерена  $\beta$ -Gd@C<sub>82</sub>. В случае активации молекула Gd@C<sub>82</sub>O<sub>3</sub>(OH)<sub>24</sub> будет сильнее перетягивать электроны молекул растворителя и активных форм кислорода, чем сама взаимодействовать (реагировать) с ними.

Также сопоставляли электронную структуру молекул O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub><sup>-</sup> x=2; O<sub>2</sub><sup>0</sup> x=1; O<sub>2</sub><sup>0</sup> x=3) и НОО<sup>-</sup> (рисунок 3.10, д, е) с фуллеренолами C<sub>82</sub>O<sub>x</sub>(OH)<sub>y</sub>, Gd@C<sub>82</sub>O<sub>x</sub>(OH)<sub>y</sub> (x=0, 3; y=8, 16, 24, 36, 44) подобно тому, как сделано в работе Xing Dai [134]. НОМО орбитали аниона и молекулы кислорода (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, m=2; O<sub>2</sub><sup>0</sup>, m=3) находятся по энергии на -2,51 и -5,28 эВ, а LUMO на 6,39 и 6,04 эВ, соответственно, при возбуждении молекул переход электрона на свою вакантную орбиталь будет затруднён из-за того, что надо будет затратить много энергии (около 8,90 и 11,32 эВ, соответственно, рисунок 3.10, д). Следовательно, электрону легче перейти на LUMO орбиталь молекулы фуллеренола, энергия которой составляет -1,54 ( $\alpha$ ) и -2,56 эВ ( $\beta$ ). В синглетном состоянии НОМО - LUMO энергетическая щель, молекулы кислорода (O<sub>2</sub><sup>0</sup>, m=1), составляет 2,64 эВ, следовательно, электроны при возбуждении будут переходить на свою вакантную орбиталь (рисунок 3.10, д). НОМО орбиталь гидроксипероксидного радикала (НОО<sup>•</sup>) находится по энергии на -5,55 эВ, а LUMO на 2,07 эВ, при возбуждении молекулы переход электрона на свою вакантную орбиталь будет затруднён из-за того, что надо будет затратить много энергии (около 7,62 эВ, рисунок 3.10, е). В таком случае, у электрона появляется хорошее сродство к LUMO орбитали молекулы фуллеренола, энергия которой составляет -1,54 ( $\alpha$ ) и -2,56 эВ ( $\beta$ ). Молекулы активных форм кислорода имеют большие значения энергетической щели, и их вакантная молекулярная орбиталь находится высоко по энергии, что затрудняет переход электрона с высшей занятой МО на низшую вакантную МО. Граничные молекулярные орбитали фуллеренолов находятся между НОМО и LUMO орбиталями активных

форм кислорода, поэтому данные молекулы могут с лёгкостью взаимодействовать между собой.

Для структур  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  и  $C_{82}O_x(OH)_y$ , рассчитаны  $\omega$  (электрофильность) и  $\chi$  (абсолютная электроотрицательность), полученные значения представлены в таблице 3.1. Для структур  $C_{82}O_x(OH)_y$  ( $x = 0, 3$ ;  $y = 16, 24$ ) не наблюдается изменений в реакционной способности между структурами, абсолютная электроотрицательность находится в интервале от -4,5 до -4,9. Присутствие атома гадолиния приводит к резким изменениям реакционной способности, кроме того, реакционная способность  $\alpha$ - и  $\beta$ -электронов также отличается. Так, например, изменение свойств можно наблюдать для структур  $Gd@C_{82}(OH)_y$  ( $y = 16, 24$ ), у которых абсолютная электроотрицательность  $\alpha$ -электронов равна -3,8 и -3,1, а для  $\beta$ -электронов -5,1 и -3,5, соответственно.

Таблица 3.1 – Рассчитанные химические индексы металлофуллеренолов

Индексы	Комплексы					
	$C_{82}O_x(OH)_y$					
	$C_{82}O_3(OH)_8$		$C_{82}O_3(OH)_{16}$		$C_{82}O_3(OH)_{24}$	
$\omega$	7,3		5,2		11,6	
$\chi$	-4,8		-4,5		-4,8	
	$Gd@C_{82}O_x(OH)_y$					
	$Gd@C_{82}O_3(OH)_8$		$Gd@C_{82}O_3(OH)_{16}$		$Gd@C_{82}O_3(OH)_{24}$	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
$\omega$	13,0	6,5	5,7	5,8	3,1	5,8
$\chi$	-4,3	-4,6	-3,2	-3,2	-2,9	-3,8
Электрофильность – $\omega$ , в отн.ед. и абсолютная электроотрицательность $\chi$ , в эВ. $C_{82}$ : $\chi=-5,1$ эВ, $\omega=13,9$ отн.ед.; $Gd@C_{82}$ : ( $\alpha$ ) $\chi=-5,6$ эВ, $\omega=11,6$ отн.ед.; ( $\beta$ ) $\chi=-5,2$ эВ, $\omega=11,7$ отн.ед.						

Распределение атомов кислорода к таким структурам не приводит к сильному различию реакционной способности между  $\alpha$ - и  $\beta$ -электронами, так для структуры с 16-ю гидроксильными группами абсолютная электроотрицательность  $\alpha$ - и  $\beta$ -электронов равна -3,2, а для структуры с 24-я гидроксильными группами равна -2,9 и -3,8, соответственно. Наибольшая склонность к атаке нуклеофила наблюдается для структуры  $C_{82}O_3(OH)_{24}$ , для которой индекс электрофильности

$\omega = 11,6$ , в то время как для  $C_{82}O_3(OH)_{16}$  равен 5,2. Когда атом гадолиния находится внутри углеродного каркаса, способность принимать электроны у структуры с 16-ю гидроксильными группами ( $\alpha$  и  $\beta$ ) равна 5,7, а для структуры с 24-я гидроксильными группами равна 3,1 и 5,8, по  $\alpha$ - и  $\beta$ -электронам соответственно.

Таким образом, можно сделать вывод, что присутствие иона гадолиния повышает реакционную способность и электрофильные свойства молекул фуллеренолов. При этом эндоэдральный комплекс фуллеренола с 24-я гидроксильными группами обладает наибольшей электрофильностью.

### **§3.6. СТРУКТУРА И КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ВАЛЕНТНЫХ ИЗОМЕРОВ ФУЛЛЕРЕНОЛА $C_{82}$**

Несмотря на спрос, вызванный широким спектром возможных применений фуллеренолов в медицине, определение точной атомной структуры производных фуллерена до сих пор остаётся сложной задачей. Расчёты по теории функционала плотности являются мощным инструментом для описания атомной и электронной структуры и стабильности различных производных [136,157–159], включая эндоэдральные металлофуллерены [134,160–164].

Перспективным методом определения функциональных групп замещения и их положения на фуллереновых клетках оказался совместный экспериментально-теоретический подход, основанный на сравнении экспериментальных ИК-спектров производных фуллерена с теоретическими. Зависимость ИК-спектров от распределения функциональных групп была успешно изучена с помощью DFT-расчётов электронной структуры гидроксильированных [159,165] и окисленных [166] производных  $C_{60}$ . Поскольку частоты колебаний углеродной клетки и кислородсодержащих групп лежат в диапазоне  $1000-4000\text{ см}^{-1}$ , эта область спектральных энергий производных фуллерена представляет особый интерес при определении атомной структуры фуллеренолов путём сравнения экспериментальных и теоретических ИК-спектров [157,167]. Для эндоэдральных

фуллеренов полосы поглощения металлических ионов гостей не попадают в эту область и не требуют рассмотрения [167,168].

Среди всех типов фуллеренов и их производных, с числом атомов углерода в родительских углеродных оболочках от 16 до сотен, производные и комплексы  $C_{60}$  являются наиболее изученными на сегодняшний день. Однако из всех известных к настоящему времени эндоэдральных фуллеренов фуллерен  $C_{82}$  стал одним из наиболее интенсивно изучаемых [169–171]. Гидроксирование углеродного каркаса – одна из распространённых стратегий, используемых для растворения комплекса  $Gd@C_{82}$  [172]. Хотя медицинскому применению  $Gd@C_{82}$  и его производных посвящено немало исследований [173–175], определению атомной структуры функционализированного фуллерена  $Gd@C_{82}$  уделено гораздо меньше внимания [176–178]. В настоящее время описание атомной структуры фуллерена основано на предсказании устойчивости различных моделей методом теории функционала плотности без сопоставления с имеющимися экспериментальными структурными и спектроскопическими данными [176–178].

Комплексы  $Gd@C_{82}O_xH_y$  были успешно синтезированы ранее [179], однако их атомная структура до сих пор не была должным образом охарактеризована. В работе [176] был предложен и исследован ряд атомистических моделей эндоэдральных фуллеренолов  $Gd@C_{82}O_xH_y$  ( $x = 0$  и  $3$ ;  $y = 8, 16, 24, 36$  и  $44$ ) с использованием комбинации методов экспериментальной масс-спектропии и расчётов по теории функционала плотности. В результате совместного экспериментального и теоретического исследования эндоэдральный комплекс  $Gd@C_{82}O_xH_y$  с 24 гидроксильными группами был признан наиболее перспективным кандидатом для биомедицинских применений [176].

Данный раздел посвящён высокотемпературному синтезу и совместному экспериментальному исследованию спектроскопии поглощения в ИК-диапазоне с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье) и теоретическому исследованию методом Density Functional Tight Binding (DFTB3) [180] различных комплексов  $Gd@C_{82}O_xH_y$ . ИК-Фурье спектроскопия выявила неожиданную полосу поглощения в диапазоне энергий от 1600 до 1800  $cm^{-1}$ , которая может быть отнесена к двойным



химическим связям углерод-кислород. Для правильной интерпретации экспериментальных ИК-Фурье данных было проведено теоретическое DFTB3 исследование атомной и электронной структур и оптических спектров эндодральных комплексов  $Gd@C_{82}O_xN_y$  с использованием подхода DFTB3. Установлено, что структура предложенной теоретической модели  $Gd@C_{82}O_xN_y$  находится в хорошем согласии с экспериментальными спектроскопическими данными. В результате методом DFTB3 выявлено влияние ключевых геометрических параметров, типов замещающих функциональных групп и их количества в фуллереновой клетке.

Высокотемпературный синтез водорастворимых фуллеренов [179] проводится в довольно жёстких условиях. Это приводит к широкому спектру молекул фуллеренола с различным количеством и сочетанием кислородсодержащих функциональных групп. Что, в свою очередь, приводит к трудностям в определении атомной структуры с помощью рентгеновской дифракции электронов. Поэтому для верификации структур должны применяться и применяются различные косвенные методы, которые не могут дать прямого и точного ответа об атомном строении фуллеренов.

Для аттестации водорастворимых фуллеренов целесообразно использовать ИК-спектроскопию и рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию (XPS). Метод ИК-Фурье спектроскопии позволяет определить функциональные группы, а XPS даёт возможность рассчитать количество видов связей между атомами углерода и кислорода. В XPS-спектре фуллеренола энергия связи  $C_{1s}$  находится до 5,3 эВ и явно отклоняется от пика  $C_{1s}$  фуллерена [181]. Значительное смещение указывает на относительно высокий процент углерода с более высокой степенью окисления в фуллереноле по сравнению с фуллереном. Широкий диапазон и ширина спектра также прямо указывают на то, что в экспериментальной смеси продуктов может присутствовать значительное число изомеров. Анализ полученных данных даёт уникальную возможность рассчитать приблизительные атомные концентрации различных видов углерода и кислорода с различными типами связей и окислительными состояниями.

Для определения природы и координированности функциональных групп в исследовании использовалась ИК-Фурье спектроскопия, поскольку XPS не даёт детальной информации о разнообразии функциональных групп. Определенные полосы в экспериментальном ИК-Фурье спектре позволяют предположить, что на поверхности углеродной клетки фуллеренола  $C_{82}$  могут быть образованы и координированы карбонильные, эпоксидные, гидроксильные -ОН и карбоксильные -ООН группы [181–183]. Атомистические теоретические модели возможных изомеров фуллеренола  $C_{82}$  должны учитывать, что целостность родительской фуллереновой клетки может быть нарушена появлением карбонильных групп  $C=O$  и карбоксильных групп -ООН, координированных к поверхности молекулы. Поэтому важно контролировать, чтобы молекула фуллерена не разрушалась, т.е. не распадалась на различные виды и фрагменты при оптимизации геометрии в расчётах.

Приблизительное количество функциональных групп было определено с помощью XPS по доле атомов углерода, химически связанных с кислородом. Поскольку число гидроксильных групп -ОН, присоединённых к фуллерену, должно быть чётным, состав данного фуллерена можно выразить как  $Gd@C_{82}O_xH_y$ , где  $x:y \sim 1.5$ , поэтому молекулы  $C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$  и  $C_{82}O_8(OH)_{20}$  были построены с соотношением  $O:H = 28:20$ . Поскольку основное сравнение теоретических моделей и экспериментальных структур проводилось с помощью ИК-спектроскопии, основной задачей в данной работе было достижение правильного соотношения функциональных групп, проявляющегося в интенсивности соответствующих спектральных пиков ИК-Фурье. В то же время при расчёте ИК-спектров гадолинием можно пренебречь, так как концентрация одного атома очень мала по сравнению с остальными, и, что может быть ещё более важно, из-за огромной атомной массы гадолиния; колебания иона гадолиния находятся в длинноволновой области спектра, и его характерные линии слабо или совсем не видны на экспериментальном спектре. Поэтому использование более простых методов, таких как эффективный DFTB3, является более разумным и быстрым.

Гидроксированный фуллерен эндоэдрального комплекса  $Gd@C_{82}$  синтезирован и исследован с помощью ИК-Фурье спектроскопии. Согласно работе [183], идентифицированы полосы поглощения от связей C-C ( $1554\text{ см}^{-1}$ ), C=C ( $1621\text{ см}^{-1}$ ), C=O ( $1703\text{ см}^{-1}$ ) и C-O ( $1050\text{-}1150\text{ см}^{-1}$ ). Полученный экспериментальный ИК-спектр представлен на рисунке 3.11 (черная кривая).

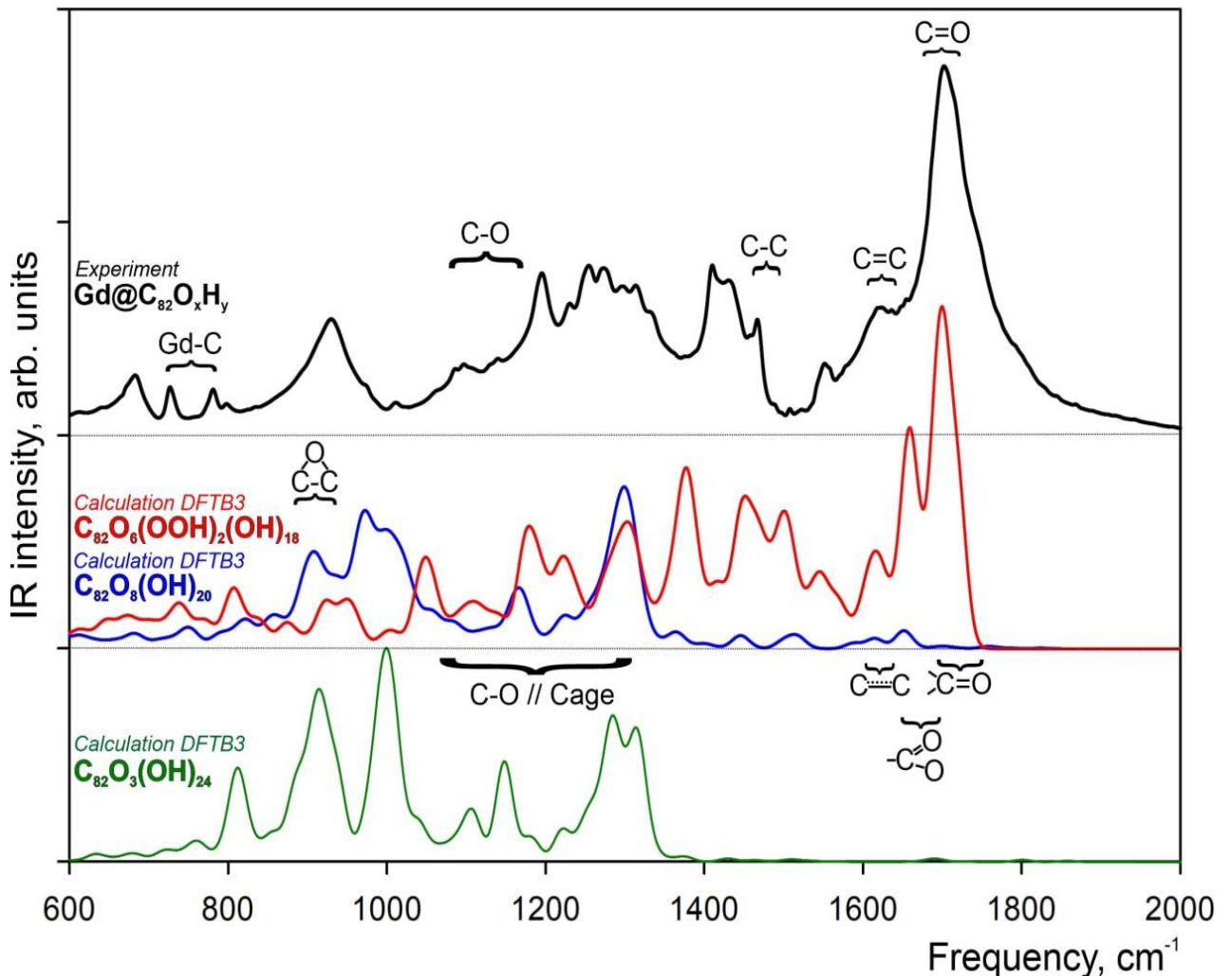


Рисунок 3.11 – Экспериментальный ИК-Фурье спектр  $Gd@C_{82}O_xH_y$  и теоретические спектры возможных изомеров  $C_{82}O_xH_y$ . Вверху: экспериментальный ИК-Фурье спектр  $Gd@C_{82}O_xH_y$  в матрице KBr (чёрная кривая). Середина: Теоретический ИК-спектр I1-изомера ( $C_{82}O_8(OH)_{20}$ , синяя кривая) и теоретический ИК-спектр I2-изомера ( $C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$ , красная кривая). Внизу: Теоретический ИК-спектр  $C_{82}O_3(OH)_{24}$  (зелёная кривая).

Для моделирования спектров использована следующая вычислительная процедура:

- (1) спроектированы и построены молекулы фуллеренов,
- (2) молекулы оптимизировались до равновесной геометрии и
- (3) рассчитан ИК-спектр.

Атомная структура и ИК-спектры свободного гидроксированного фуллерена  $C_{82}O_3(OH)_{24}$  и двух валентных изомеров  $C_{82}O_{28}H_{20}$ , а именно I1 ( $C_{82}O_8(OH)_{20}$ ) и I2 ( $C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$ ), изучены с помощью метода DFTB3 [184]. Для достижения высокого качества моделирования колебательных спектров и выполнения жёстких требований к структурной оптимизации низкоразмерных кластеров, атомные структуры комплексов  $Gd@C_{82}O_8(OH)_{20}$  и  $Gd@C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$  (рисунок 3.12) оптимизированы в газовой фазе с порогом  $10^{-4}$  Хартри/Бора методом DFTB3 с использованием параметров *3ob-3-1* [184] программе GAMESS. Все расчёты электронной структуры проводились без учёта каких-либо групп точечной симметрии, а для всех атомистических моделей производных фуллерена  $C_{82}$  применялась группа симметрии  $C_1$ . Метод DFTB3 – быстрый и точный параметризованный квантово-механический метод, подходящий для оптимизации протяжённых молекул и кластеров из десятков атомов, содержащих атомы углерода, кислорода и водорода [184] с высокой точностью. DFTB3 — очень эффективное приближение, основанное на параметризации DFT, которое обеспечивает резонансно точную атомную структуру и силовые константы в сравнении с DFT и экспериментально измеренными колебательными спектрами [185] для различных молекул [186].

На основании экспериментальных спектроскопических данных синтезированных эндоэдральных комплексов и предыдущих совместных экспериментальных и теоретических результатов [187], фуллерен  $Gd@C_{82}$  (рисунок 3.12 А) взят за основу для построения набора исходных атомистических структурных моделей. Согласно экспериментальным данным, соотношение гидроксильных групп и кислорода составляет 1:3, а общее число атомов кислорода приблизительно равно 28 [188]. Поскольку исходный фуллерен  $Gd@C_{82}$  относится

к группе  $C_{2v}$ , 28 атомов кислорода симметрично распределялись по углеродной клетке. Атомы кислорода присоединены к соседним атомам углерода шестичленных колец (рисунок 3.12 E) и затем преобразованы в гидроксильные, карбонильные и карбоксильные функциональные группы.

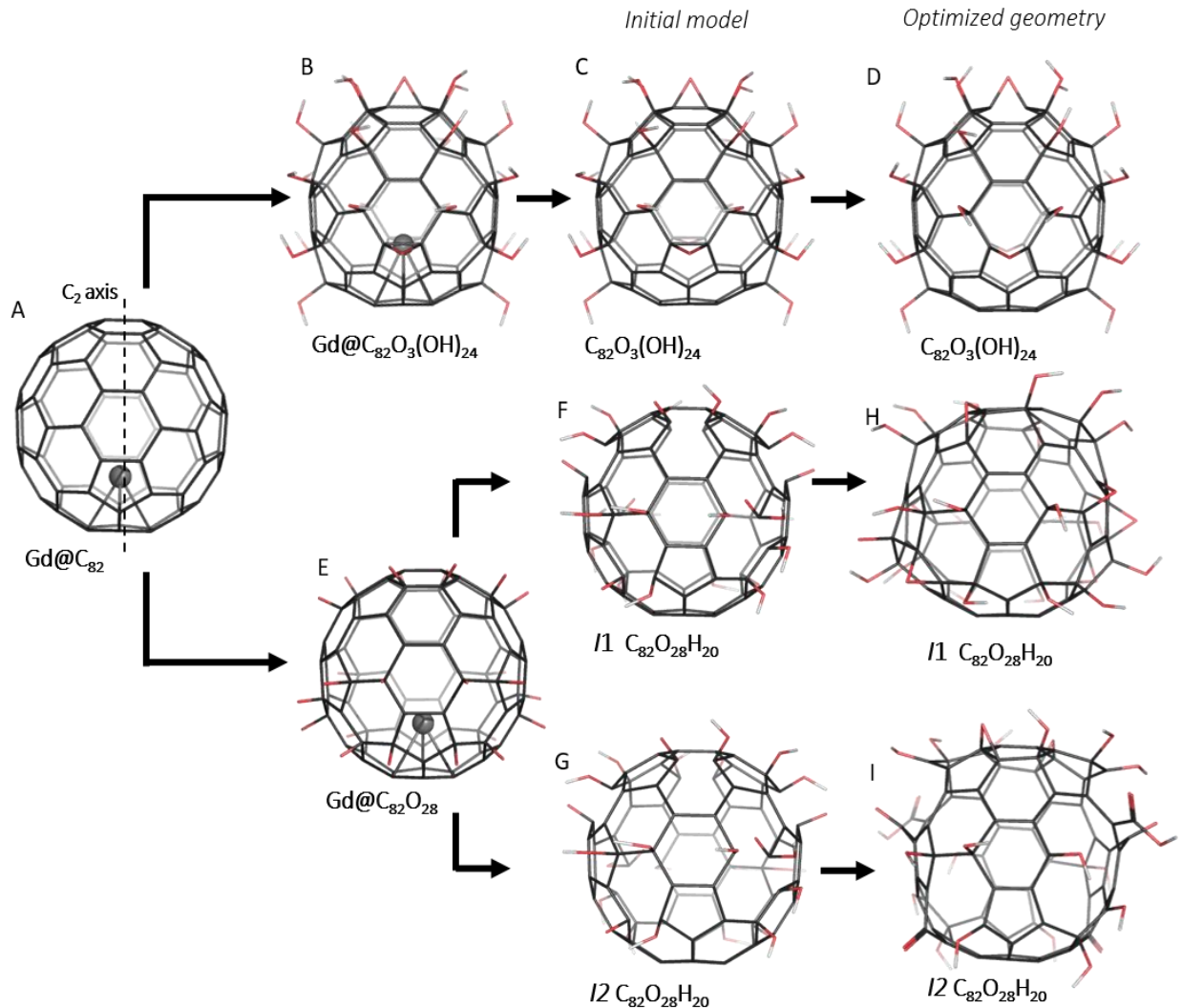


Рисунок 3.12 – Некоторые структурные модели возможных комплексов  $C_{82}O_xH_y$ . А –  $Gd@C_{82}$ . В –  $Gd@C_{82}O_3(OH)_{24}$ . С, F, G – исходные структурные модели  $C_{82}O_3(OH)_{24}$ , где I1 –  $C_{82}O_8(OH)_{20}$ , а I2 –  $C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$ , валентные изомеры комплекса  $C_{82}O_{28}H_{20}$ , соответственно. D, H, I – равновесные геометрии  $C_{82}O_3(OH)_{24}$ , I1 и I2 изомеров комплекса  $C_{82}O_{28}H_{20}$ , соответственно. Атомы углерода, гадолиния, кислорода и водорода изображены черным, серым, красным и белым цветами, соответственно.

В результате моделирования предложены два изомера  $C_{82}O_{28}H_{20}$ , содержащие связи  $C=O$ , для объяснения пиков экспериментального ИК-спектра. Основное различие между изомерами заключается в том, как связь  $C=O$  координирована к клетке  $C_{82}$ . Основная цель исследования – изучение основных структурных особенностей эндоэдральных комплексов  $Gd@C_{82}O_xH_y$  и их спектральных характеристик.

Первый валентный изомер  $C_{82}O_8(OH)_{20}$  (I1) имеет 20 гидроксильных ( $-OH$ ) и 8 карбонильных ( $C=O$ ) групп (рисунок 3.12 F), распределённых в виде восьми пар карбониллов и гидроксиллов и шести пар гидроксиллов, присоединённых к соседним атомам углерода. Учитывая предельную валентность атома углерода, равную четырём связям  $sp^3$  C-C, можно ожидать, что окисление атома углерода до карбонила должно происходить с разрывом химической связи с одним из его ближайших соседей, с последующим окислением партнёра как минимум до гидроксила и раскрытием фуллереновой сферы между группами.

Второй валентный изомер  $C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$  (I2) имеет 18 гидроксильных ( $-OH$ ), 6 карбонильных ( $C=O$ ) и 2 карбоксильных ( $-OOH$ ) функциональных групп (рисунок 3.12 G). Две карбоксильные группы расположены на противоположных сторонах клетки  $C_{82}$ . Карбоксильные группы образованы атомом углерода, лежащим в вершине двух соседних шестиугольников и пятиугольника. Таким образом, для образования карбоксильной группы  $-COOH$  разрывались две начальные связи C-C, а к другим концам каждой разорванной связи C-C присоединялись две гидроксильные группы. Другие функциональные группы распределены так же, как и в I1. Как и в модели  $C_{82}O_3(OH)_{24}$ , гадолиний был удалён из новых атомистических моделей.

Атомные структуры обоих изомеров I1 и I2, оптимизированные на теоретическом уровне DFTB3, представлены на рисунке 3.12 H, I. В ходе оптимизации на уровне DFTB3 все карбонильные группы первого изомера (рисунок 3.12 F) преобразованы в эпоксидные группы, сохранив замкнутую родительскую клетку  $C_{82}$ . Таким образом, оптимизированная структура I1

содержит 20 гидроксильных (-ОН) и 8 эпоксидных групп, в которых атомы О являются мостиками для связей С-С.

Равновесная атомная структура изомера I2, рассчитанная методом DFTB3, представлена на рисунке 3.12 I. В результате оптимизации I2 имеет шесть пор в клетке, причём две из них образованы комбинацией двух шестиугольников и одного пятиугольника за счёт образования -СООН карбоксильных групп. Взаимная координация карбоксильной и двух гидроксильных групп I2 предотвращает образование новых связей С-О-С между ними с образованием двух эпоксидных групп. Каждая «карбоксильная пора» имеет соседнюю пору, возникающую в результате удлинения расстояния между С=О и С-ОН и объединяющую два шестиугольника. Две другие поры также образуются при удлинении расстояния между С=О и -ОН и объединении двух шестиугольников на оси  $C_{2v}$  клетки. Наконец, изомер I2 имеет открытую клетку  $C_{82}$  с 2 карбоксильными, 2 эпоксидными, 4 карбонильными и 18 гидроксильными группами.

Для того чтобы выявить, насколько корректно ранее изученная структурная модель  $Gd@C_{82}O_3(OH)_{24}$  [187] (рисунок 3.12 Б) отражает атомную структуру экспериментально синтезированных фуллеренов, (рисунок 3.11) приведено сравнение соответствующих теоретических DFTB3 (зелёная кривая) и экспериментальных ИК-спектров (чёрная кривая). Экспериментальный спектр комплекса  $Gd@C_{82}O_xH_y$  показал, что полосы поглощения, обеспечиваемые углеродной клеткой  $C_{82}$ , лежат за полосами иона гадолиния ( $700-800\text{ см}^{-1}$ ). Ранее показано, что присутствие иона гадолиния незначительно влияет на параметры углеродной оболочки [176]. Таким образом, предполагалось, что исключение иона гадолиния из теоретической модели не влияет на часть спектра, обеспечиваемую функциональными группами клетки, но может существенно упростить расчёты. Поэтому гадолиний повторно удалён из модели  $Gd@C_{82}O_3(OH)_{24}$  (рисунок 3.12 С). Сравнение экспериментальных ИК-спектров FTIR и теоретических ИК-спектров DFTB3 наглядно демонстрирует хорошее совпадение спектральных линий в области  $900-1400\text{ см}^{-1}$ , отражающей колебательные моды эпоксидных и С-О групп, и полное отсутствие интенсивности в энергетической области ( $1400-1800\text{ см}^{-1}$ ),

приписываемой карбоксильным и карбонильным группам, а также двойным и ароматическим углерод-углеродным связям углеродной оболочки  $C_{82}$ .

Сравнение экспериментального ИК-Фурье спектра с теоретическим DFTB3 показывает, что структурная модель  $C_{82}O_3(OH)_{24}$  не удовлетворяет спектральным особенностям гидроксированных фуллеренов. Для  $C_{82}O_3(OH)_{24}$  спектральная область для С-ОН групп и карбоновых атомов клетки составляет  $1100-1350\text{ см}^{-1}$ , а для эпоксидных групп – около  $850\text{ см}^{-1}$  (рисунок 3.11). В отличие от теоретического спектра, экспериментальный ИК-Фурье-спектр обнаруживает узкую очень интенсивную полосу сложной формы в спектральном диапазоне от  $1600$  до  $1800\text{ см}^{-1}$ . Спектральное плечо с энергией  $1650\text{ см}^{-1}$  может быть приписано двойным колебаниям связи  $C=C$ , в то время как основной пик с энергией  $1750\text{ см}^{-1}$  может быть отнесён к полосе поглощения  $C=O$ .

Фуллерены и их производные имеют полиэдрические углеродные ячейки, в которых  $sp^2$ -углероды непосредственно связаны с тремя соседями. Структурно любая фуллереновая клетка не может содержать поверхностные  $C=O$  группы без разрушения углеродной клетки, так как это нарушает максимальную валентность углерода, равную четырём, и можно предположить, что комплекс  $Gd@C_{82}O_xH_y$  содержит функциональные группы, отличные от эпокси- и гидроксидов. Наличие связи  $C=O$  в  $Gd@C_{82}O_xH_y$  подтверждено также методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии [179]. Исходя из экспериментального ИК-Фурье спектра, можно предположить новые структурные модели комплексов  $Gd@C_{82}O_xH_y$  с открытой оболочкой углеродной клетки, обусловленные избыточным окислением кислородом при высокотемпературном синтезе.

В итоге можно сказать, что на основе предложенных теоретических структурных моделей фуллеренолов  $C_{82}O_xH_y$  рассчитаны теоретические ИК-спектры в рамках метода DFTB3 и проведено их сравнение с экспериментальными ИК-Фурье. Поскольку и II, и предложенный ранее фуллерен  $C_{82}O_3(OH)_{24}$  функционализирован гидроксильными и эпоксидными группами, можно видеть сходство в их теоретических ИК-спектрах, с некоторыми различиями в интенсивностях пиков, обусловленными разным количеством и разной



координацией гидроксильных и эпоксидных групп на клетке  $C_{82}$ . Сравнение экспериментального ИК-Фурье спектра (рисунок 3.11 чёрная кривая) с теоретическим I1 в DFTB3 напрямую демонстрирует хорошее согласие между спектрами в спектральной области  $850-1350\text{ см}^{-1}$ . Напротив, теоретический спектр не демонстрирует заметной интенсивности в спектральной области карбонильных групп ( $1750-1780\text{ см}^{-1}$ , рисунок 3.11, синяя кривая), которая является наиболее интенсивной для экспериментального спектра. Можно сделать вывод, что ИК-спектр изомера I1, который характеризуется наличием восьми эпоксидных групп, не описывает основные спектральные особенности комплекса  $Gd@C_{82}O_xH_y$ . Теоретический ИК-спектр DFTB3 изомера I2 с открытой углеродной клеткой (рисунок 3.11, красная кривая) демонстрирует гораздо лучшее согласие с экспериментальным ИК-Фурье. Присутствие карбонильной C=O и карбоксильной -COOH групп оказывает большое влияние на ИК-спектр I2 в спектральной области  $1400 - 1800\text{ см}^{-1}$ . Рассчитанный по методу DFTB3 ИК-спектр имеет характерные полосы в спектральных областях  $1600-1630\text{ см}^{-1}$  (углеродная клетка),  $1650-1670\text{ см}^{-1}$  (колебания -COOH групп) и  $1690-1720\text{ см}^{-1}$  (C=O группы) (рисунок 3.11, красная кривая). Хорошее согласие теоретического ИК-спектра I2, рассчитанного методом DFTB3, с экспериментальным ИК-Фурье спектром прямо указывает на открытую оболочку углеродной клетки комплекса  $Gd@C_{82}O_xH_y$ .

### **§3.7. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ВАЛЕНТНЫХ ИЗОМЕРОВ ФУЛЛЕРЕНОЛОВ $C_{82}$ С РАЗЛИЧНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ**

Фуллеренолы характеризуются антирадикальными свойствами [189–192]. Эти особенности, в том числе, определяют фуллерены как высокоперспективные препараты для противоопухолевой терапии [193–196]. В связи с таким потенциалом применения особый интерес в настоящее время представляют

соотношения между структурными характеристиками и параметрами биологической активности фуллеренов. Биологическая активность фуллеренов с различным числом гидроксильных групп изучалась в течение последних десятилетий [197–201]. Рассматривались токсические и антиоксидантные эффекты фуллеренов. Однако различные биологические тест-объекты не обеспечивали сопоставимости биологической активности фуллеренолов. Биологические эффекты фуллеренов представляют собой обширное поле для изучения с использованием различных подходов [175,196,202,203]. Терапевтические эффекты фуллеренов [191,196,204] обычно объясняются их свойствами поглощать радикалы. В последнее время Gd-эндопроизводные фуллеренов привлекли к себе внимание в связи с их перспективами в МРТ [173]. Большинство применяемых в настоящее время контрастных МРТ-агентов на основе Gd-содержащих соединений, таких как гадодамиид, гадопентетат димеглумин и т.д., имеют ограниченное применение в медицине из-за своей токсичности [205–207]. Потенциальное решение этой проблемы связано с фиксацией гадолия внутри каркаса фуллеренола, что предотвращает высвобождение ионов  $Gd^{3+}$  в биологическую среду [155].

Поскольку производные фуллерена действуют как антирадикальные агенты, их влияние на активные виды кислорода (ROS) в биологических системах имеет особое значение. Известно, что ROS участвуют в ряде физиологических реакций, происходящих в организме, и, таким образом, обычно присутствуют в организмах в физиологических концентрациях для осуществления метаболических реакций [208,209]. С экспериментальной точки зрения применение биolumинесцентных анализов – удобный способ проверки биологической активности различных соединений. Люминесцентная характеристика проб обеспечивает правильную регистрацию биологических реакций. Интенсивность люминесценции является физиологическим параметром анализа, отслеживаемым в ходе процедуры пробы. Светящиеся морские бактерии применяются в течение нескольких десятилетий [210–214] в качестве традиционной системы биопробы. Высокая скорость анализа (1-3 мин), простота использования, высокая чувствительность, доступность

приборов и реагентов являются преимуществами анализа на основе люминесцентных бактерий. Поскольку регистрация люминесценции не занимает много времени, она позволяет получить необходимое количество экспериментальных результатов в сопоставимых условиях и, следовательно, провести корректную статистическую обработку.

Цель данного раздела – сравнить влияние двух гадолиний содержащих фуллеренов с различным количеством кислородсодержащих заместителей – 20 и 42 ( $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  и  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ , соответственно) на биолюминесцентный анализ бактерий. Для проверки связи между биоэффектами и структурными особенностями фуллеренов применены квантовохимические расчёты. При этом особое внимание уделялось количеству карбоксильных групп на поверхности углеродной клетки фуллерена. Сравнивалось влияние  $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  и  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$  на бактериальную и ферментативную биолюминесцентные системы. Рассматривались количественные характеристики токсичности и роль ROS в токсических эффектах. Экспериментально выявлены различия в биологическом действии двух Gd-содержащих фуллеренолов, сходных по размеру углеродного каркаса ( $C_{82}$ ), но имеющих разное количество кислородсодержащих групп на поверхности: 20 и 42 ( $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  и  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ , соответственно). Разница в биоэффектах фуллеренов была экспериментально проанализирована с использованием бактериальной биолюминесценции в качестве тестового физиологического параметра. Обнаружена меньшая токсичность  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ . Наблюдалась активация биолюминесценции под действием  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ , в то время как при воздействии  $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  такой активации не наблюдалось. Эффекты фуллеренов на светящиеся бактерии сравнивались с эффектами на ферментативную систему, и разница объяснялась способностью фуллеренов проникать через клеточную мембрану. Изменение содержания ROS в бактериальных суспензиях, ферментных растворах и дистиллированной воде при различных концентрациях фуллеренов отслеживалось и обсуждалось с точки зрения антирадикальной способности фуллеренов.

Карбоксильные группы на поверхности углеродной оболочки  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$  определены с помощью ИК-Фурье спектров и подтверждены квантовохимическими расчётами. Эти группы способны в большей степени влиять на полярность среды, чем другие избыточные кислородные заместители. Предполагается, что это приведёт к активационной способности и меньшей токсичности  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ , его большей проникающей способности через клеточную мембрану, сбалансированию содержания ROS в бактериальных суспензиях и меньшей агрегации в водной среде.

Квантовохимические расчёты. Модели фуллеренолов были построены для двух комплексов с различным содержанием атомов кислорода и водорода –  $C_{82}O_{20}H_{14}$  ( $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$ , рисунок 3.3 а, б) и  $C_{82}O_{42}H_{32}$  ( $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ , рисунок 3.13 с). Для фуллеренола  $C_{82}O_{20}H_{14}$  были построены два валентных изомера, а для фуллеренола  $C_{82}O_{42}H_{32}$  – один изомер. Атомные структуры полученных моделей были оптимизированы с помощью DFTB с параметрами 3ob-3-1. Для равновесных геометрий ИК-спектры (рисунок 3.14 б, с, д) были рассчитаны с помощью программы GAMESS.

Чтобы понять и предсказать биологические эффекты фуллеренов, необходимо знать их структуру, включающую ключевые функциональные группы на поверхности их оболочек. Фуллеренолы  $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  и  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$  были синтезированы при разном времени воздействия азотной кислоты, и, следовательно, в ходе синтеза получают фуллеренолы неоднородного состава с разным количеством атомов кислорода и водорода на поверхности углеродных оболочек. Это затрудняет определение атомной структуры методом рентгеновской дифракции электронов, поэтому широко используются косвенные методы, такие как ИК-Фурье и рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS). Эти методы позволяют оценить наличие функциональных групп и примерное содержание кислорода и водорода на фуллереновой оболочке. Характерные полосы в экспериментальном ИК-Фурье спектре свидетельствуют о том, что на поверхности фуллеренов образуются группы C=O, эпоксидные, -ОН и -COOH. В этом случае группы разрушают углеродную клетку. Различные комбинации типов и количества

функциональных групп могут приводить к различным механизмам в биологических системах. Поэтому для объяснения различного поведения необходимо построить модели фуллеренолов  $C_{82}O_xH_y$ , где  $x=20$ ;  $y=14$  и  $x=42$ ;  $y=32$ . Эти модели соответствуют фуллеренам ( $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  и  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$ , соответственно), которые были экспериментально получены.

Теоретические расчёты  $C_{82}O_{20}H_{14}$ . Также как и в предыдущем разделе, фуллерен  $Gd@C_{82}$  в симметрии  $C_{2v}$  был взят в качестве отправной точки для построения различных структурных моделей ( $Gd@C_{82}O_xH_y$ ), поскольку экспериментальное значение ИК-Фурье спектров для этой молекулярной геометрии известно. Для построения модели  $Gd@C_{82}O_{20}H_{14}$  соотношение гидроксильных (-ОН) групп и кислорода было выбрано  $\sim 1:3$ , в согласии с экспериментальными данными, общее число атомов кислорода составило 20. Структура металлофуллерена  $Gd@C_{82}$  имеет пространственную группу  $C_{2v}$ , поэтому для расчётов 20 атомов кислорода были распределены симметрично по углеродной обложке, а затем к атомам кислорода были добавлены 14 атомов водорода. Гадолиний был удалён из полученных моделей, поскольку, согласно экспериментальным данным, спектры ионов гадолиния ( $700-800\text{ см}^{-1}$ ) не лежат в области функциональных групп фуллеренов. Далее рассчитаны два валентных изомера  $C_{82}O_{20}H_{14}$ , которые отличались составом и количеством функциональных групп. Первый изомер  $C_{82}O_{20}H_{14}$  (I1) содержал 14 гидроксильных (-ОН) и 6 карбонильных (C=O) групп (рисунок 3.13 а), распределённых в виде восьми пар карбониллов и гидроксиллов, а также двух пар гидроксиллов, присоединённых к соседним атомам углерода. В ходе оптимизации геометрии первого изомера все карбонильные группы были преобразованы в эпоксидные, сохранив атомную структуру углеродной клетки. В результате равновесная структура изомера I1 включала 14 гидроксильных (-ОН) и 6 эпоксидных (C-O-C) групп (рисунок 3.13 а).

Теоретические расчёты  $C_{82}O_{42}H_{32}$ . Атомная структура  $Gd@C_{82}O_{42}H_{32}$  моделировалась так же, как и в случае  $C_{82}O_{20}H_{14}$ . Сорок два атома кислорода были распределены симметрично по всей поверхности углеродной клетки. Далее к атомам кислорода присоединён водород, в результате чего образовались различные

функциональные группы (гидроксильная, карбонильная и карбоксильная). Для данного соединения полоса в ИК-Фурье спектре при  $1700\text{ см}^{-1}$  указывает на карбоксильную группу [215], поэтому построены две карбоксильные группы симметрично на противоположных сторонах углеродной клетки. В результате в модели фуллеренола  $\text{C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$  оказалось 30 гидроксильных (-OH), 8 эпоксидных (C-O-C) и 2 карбоксильных (-COOH) функциональных групп (рисунок 3.13 б).

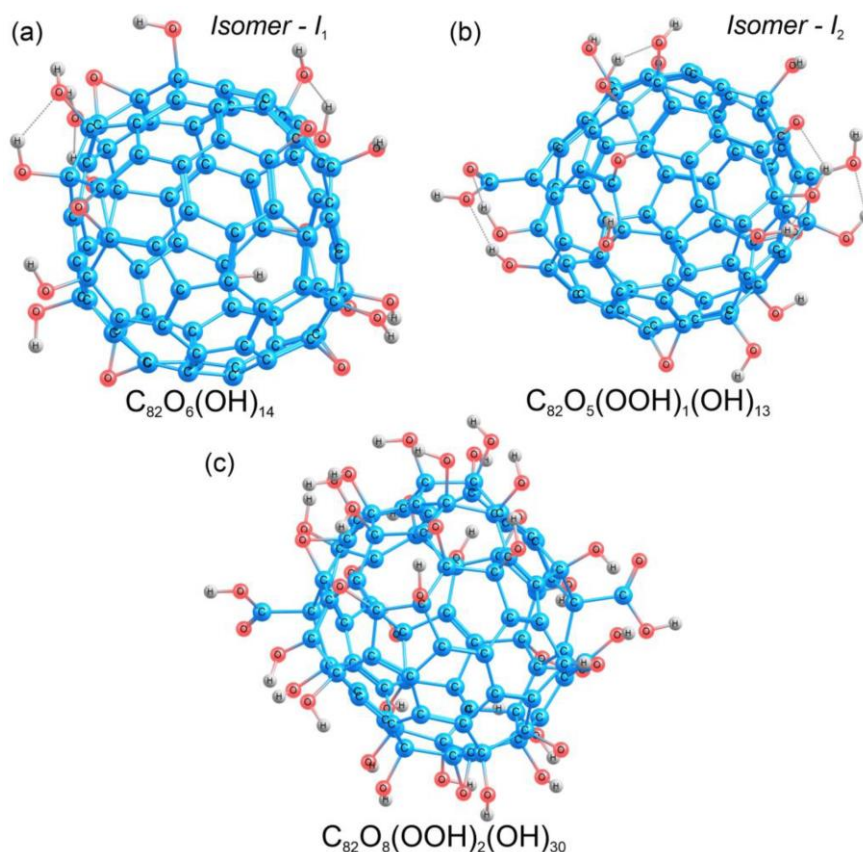


Рисунок 3.13 – Атомные структуры валентных изомеров. (а, б) – валентные изомеры  $\text{C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$ . (с) – структура  $\text{C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$ .

Теоретические ИК-спектры колебаний для атомной структуры  $\text{C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$ , рассчитанные на уровне теории функционала плотности (DFTB3), представлены на рисунке 3.14 б. Сравнение экспериментального ИК-Фурье спектра (рисунок 3.14 а) с теоретическими данными показывает хорошее согласие между спектрами в области  $850\text{-}1350\text{ см}^{-1}$ . ИК-спектр имеет характерные полосы в областях  $1600\text{-}1670\text{ см}^{-1}$  (углеродная клетка) и  $1690\text{-}1720\text{ см}^{-1}$  (группы -COOH) (рисунок 3.14 б). Таким образом, в соединении ( $\text{C}_{82}\text{O}_x\text{H}_y$ ,  $x = 42$   $y = 32$ ) должны присутствовать карбоксильные группы.

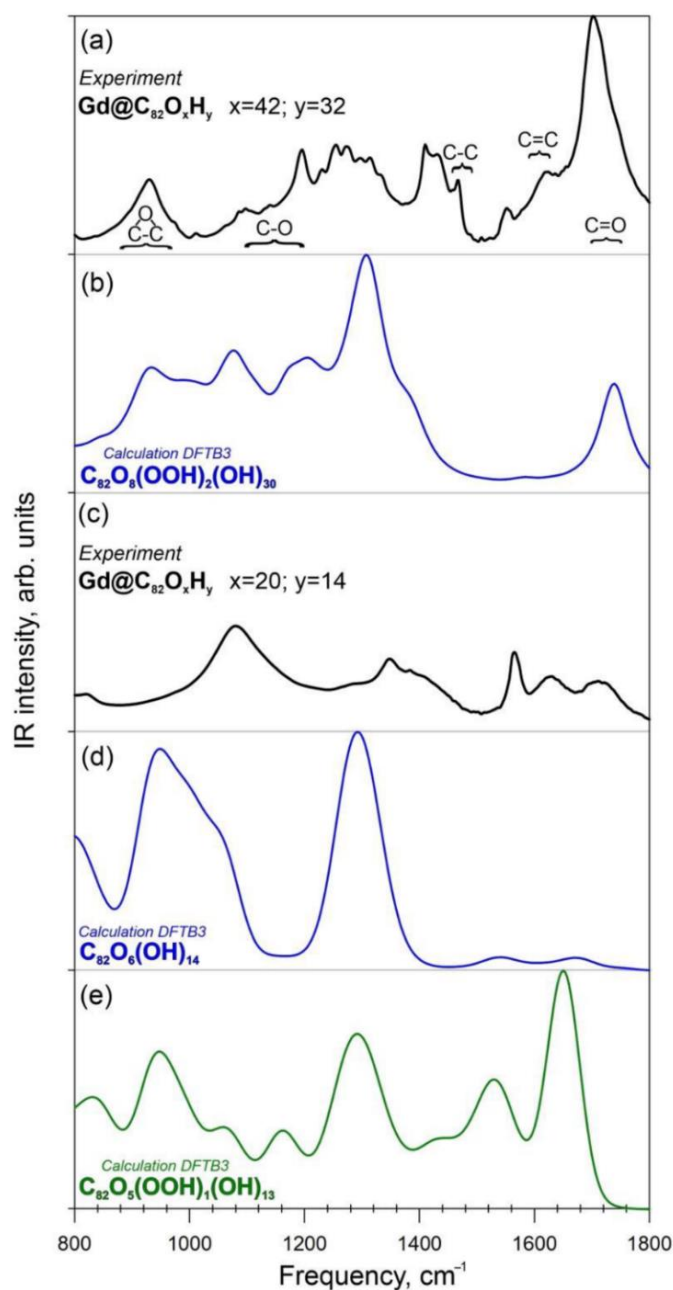


Рисунок 3.14. – Экспериментальные и теоретические ИК-спектры  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_x\text{H}_y$ . (a) – экспериментальный ИК-спектр  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$ ; (b) – теоретический ИК-спектр соединения  $\text{C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$ ; (c) – экспериментальный ИК-спектр  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$ ; (d) – теоретический ИК-спектр I1-изомера  $\text{C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$ ; (e) – теоретический ИК-спектр I2-изомера  $\text{C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$ .

Сравнение экспериментальных ИК-Фурье спектров (рисунок 3.14 c) и теоретических ИК-спектров (рисунок 3.14 d), рассчитанных с помощью DFTB3, показывает хорошее согласие между спектральными линиями в области  $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ , показывающими колебательные линии эпоксидных, C-O, C-C и C=C

групп (рисунок 3.14 d, e). Изомер I1, содержащий только гидроксильные и эпоксидные функциональные группы, демонстрирует наилучшее согласие между расчётными и экспериментальными ИК-Фурье спектрами (в области  $850\text{-}1350\text{ см}^{-1}$ ) (рисунок 3.14 e). Для изомера I2 (с карбоксильной группой) наблюдается сходство между теоретическими и экспериментальными ИК-спектрами. Однако в теоретическом спектре, в отличие от экспериментального, присутствует интенсивная полоса при  $1700\text{ см}^{-1}$  (рисунок 3.14 d). Можно предположить, что в соединении  $\text{C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$  отсутствует карбоксильная группа.

По результатам квантовохимических расчётов различных моделей фуллеренов можно сделать вывод, что в процессе их синтеза может образовываться несколько типов фуллеренов. Основное различие между двумя фуллеренами ( $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$  и  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$ ) заключается в наличии карбоксильных групп (рисунок 3.13 и рисунок 3.14). Это приводит к различным физико-химическим свойствам двух фуллеренов. Возможно, дополнительные карбоксильные группы увеличивают электронное сродство ядра  $\text{Gd@C}_{82}$ . Gd-содержащие фуллерены имеют ионную структуру; внутренний парамагнитный ион  $\text{Gd}^{3+}$  заключён в отрицательно заряженную углеродную оболочку, образуя дипольный комплекс с переносом заряда  $\text{Gd}^{3+}@C_{82}^{3-}$  [155]. В настоящее время ионная гипотеза для  $\text{Gd@C}_{82}$  принята научным сообществом [137]. Дополнительные карбоксильные группы способны в большей степени влиять на полярность биосреды. Расчёты структур фуллеренолов с карбоксильными группами в структуре находятся в хорошем согласии с экспериментом (ИК-спектроскопия, рисунок 3.14).

Таким образом, дополнительное количество кислородсодержащих групп на поверхности  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$  с участием карбоксильных групп наделяет фуллеренол особой химической, биохимической и микробиологической активностью по сравнению с  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{20}\text{H}_{14}$ . Структурные особенности служат основанием для предположений о меньшей токсичности и активационной способности фуллеренола  $\text{Gd@C}_{82}\text{O}_{42}\text{H}_{32}$ , его большей проникающей способности через клеточную мембрану и агрегации в водной среде.



### §3.8. ВЫВОДЫ

Эндоэдральные комплексы  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  с 24-я кислородами, 12-ю водородами, которые представляют из себя такие функциональные группы, как карбокси-, гидроксид- и кислородные мостики на углеродном каркасе фуллеренола, обладают наиболее благоприятными антиоксидантными свойствами для применения в биологических процессах. Химической реакционной способности и электрофильным свойствам фуллеренольных и фуллеренольных металлокомплексов способствует внедрённый атом гадолиния. Для относительно небольшого числа гидроксильных групп на углеродном каркасе  $C_{82}$  комплексов  $C_{82}O_x(OH)_y$  и  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  ( $x = 0; 3; y = 24$ ) по-прежнему имеется  $\pi$ -электронная система. Комплексы обладают высоким сродством к электрону, что обеспечивает антиоксидантные свойства. Увеличение количества гидроксильных групп ( $y > 24$ ) в комплексах  $Gd@C_{82}O_x(OH)_y$  приводит к образованию внутримолекулярных водородных связей между различными группами как следствие уменьшает растворение и, в свою очередь, приводит к уменьшению реакционной способности.

Химически модифицированные эндоэдральные комплексы фуллеренов на основе  $C_{82}$  с гадолинием в качестве гостевого иона представляются перспективными агентами для магнитно-резонансной томографии и лечения рака благодаря высокой контрастности гадолиния в магнитно-резонансной томографии, инертным и защитным углеродным оболочкам вокруг ионов гадолиния и химической растворимости в биомедицинской среде. Комплексы  $Gd@C_{82}O_xH_y$  исследованы совместными экспериментальными и теоретическими методами, сочетающими ИК-Фурье спектроскопию и теоретические расчёты электронной структуры в рамках DFTB3. Это даёт фундаментальное представление об атомной структуре и спектроскопических свойствах комплексов  $Gd@C_{82}O_xH_y$ . Показано, что окисление углеродной клетки  $C_{82}$  с образованием  $C_{82}O_{28}H_{20}$  должно приводить к разрыву некоторых связей C-C с разрушением целостности родительской клетки  $C_{82}$  с образованием пор между соседними карбонильными и карбоксильными

группами. Эндоедральный комплекс  $Gd@C_{82}O_6(OOH)_2(OH)_{18}$  с эпоксидной, карбонильной и карбоксильной группами признан наиболее надёжной структурной моделью фуллеренола.

В работе участвовали – А.А. Шакирова, П.В. Артюшенко, А.В. Рогова, В.А. Помогаев, П.В. Аврамов, С.Г. Овчинников. Эксперимент проведён сотрудниками Лаборатории аналитических методов исследования вещества, Института физики ФИЦ КНЦ СО РАН, под руководством Г.Н. Чурилова и Н.Г. Внуковой, антиоксидантная активность проверялась в Лаборатории фотобиологии Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН под руководством Н.С. Кудряшовой.

Материалы данной главы представлены в следующих работах из списка публикаций автора: 1, 4, 10, 22.

## **ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ ФЕРОМОНОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОВЕДЕНИЯ ЛЕСНЫХ НАСЕКОМЫХ**

### **§4.1. ФЕРОМОНЫ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ И ЖЁСТКОКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ**

Информация у насекомых передаётся с помощью специально выделяемых особями пахучих веществ – феромонов. По своему назначению феромоны могут быть разделены на несколько видов, например, феромоны тревоги, феромоны агрегации, феромоны – метки пути и другие. Наибольший интерес представляет исследование половых феромонов, используемых насекомыми при поиске партнёра для спаривания. Практическое применение половые феромоны находят в основном в области контроля численности популяций насекомых и для борьбы с насекомыми-вредителями в сельском хозяйстве и в лесозащитных мероприятиях. Преимуществами использования феромонов в защите растений от насекомых-вредителей является то, что в отличие от инсектицидов феромоны не вызывают «привыкания» у насекомых, не накапливаются на обрабатываемых площадях разлагаются под действием факторов среды, являются специфичными для определенного вида. Для повышения эффективности мероприятий защиты леса и сельскохозяйственных насаждений с применением феромонов необходимо полное понимание всех стадий механизма феромонной коммуникации, в частности воздействие факторов среды на феромонные молекулы, распространяющиеся в воздушной среде.

Эффективность феромонной коммуникации во многом определяется такими характеристиками как специфичность, чувствительность, мощность и продолжительность сигнала, затуханием и шумом в информационном канале. Для того чтобы молекулы феромонов могли улавливаться на довольно большом расстоянии от особи-источника, время жизни этих молекул должно быть достаточно длительным. С другой стороны, если молекулы окажутся устойчивыми к воздействию внешних факторов, то при перемещении в турбулентных потоках воздуха, они могут неоднократно сменить направление своего движения. Тогда при

восприятию такой молекулы особь-приёмник не получит корректной информации о местонахождении особи-источника. Тем самым чрезмерно устойчивая молекула будет генерировать шум в рецепторах особи-приёмника. Для обеспечения оптимальной эффективности химической коммуникации, молекулы феромонов должны обладать специфическими физико-химическими свойствами, позволяющими минимизировать как затухание феромонного сигнала, связанного с разложением молекул феромонов, так и информационный шум, определяющийся, в конечном счёте, устойчивостью молекул к факторам внешней среды, таким как свет, температура, влажность. В свою очередь поисковое поведение насекомых будет во многом определяться временем, в течение которого феромоны находятся в воздушной среде не разрушаясь.

Феромоны – специально выделяемые насекомыми пахучие вещества, вызывающие специфические поведенческие реакции у особей того же вида, воспринимающих феромон [216]. По своему воздействию феромоны делятся на два основных типа: релизеры и праймеры. Релизеры побуждают особь к каким-либо немедленным действиям; используются для привлечения брачных партнёров, сигналов об опасности. Праймеры используются для формирования определённого поведения и влияния на развитие других особей: например, специальный феромон, выделяемый пчелой-маткой, и подавляющий половое развитие других пчёл-самок, превращая их таким образом в рабочих пчёл [217]. Релизеры обычно представлены высоколетучими веществами, распространяющимися по воздуху, в то время как праймеры часто передаются контактным путём. Среди релизеров, различают несколько подтипов: аттрактанты – привлекающие особей вещества (половые феромоны и феромоны агрегации); репелленты – отпугивающие; аррестанты – останавливающие; стимулянты – вызывающие активность (например, феромоны тревоги). Обычно феромоны представляют собой не одно вещество, а смесь основного, преобладающего по массе компонента с малыми добавками (минорными компонентами), в состав феромона может входить более десяти веществ [218,219]. Химическая структура феромонов весьма разнообразна. Для поддержания видовой специфичности феромонных смесей насекомые используют

явление химической изомерии: структурной и оптической. Помимо изомерии для опознавания верного сигнала среди многих природных запахов используются пропорции отдельных изомеров и соотношения основного и минорных составляющих в феромонной смеси [220,221].

Важным критерием эффективности химической коммуникации является наличие шума в информационном канале. Одной из основных причин возникновения шума является турбулентность воздушных потоков. При движении в ламинарном потоке молекула феромона не теряет информацию о нахождении источника сигнала. Чем выше турбулентность, тем быстрее молекула теряет информацию о местоположении источника [222]. В природных условиях воздушный поток не может быть ламинарным, что неизбежно будет приводить к возникновению шума в информационном канале при долгой жизни феромонных молекул. Один из способов защиты сообщений от влияния шума канала – многократное повторение одного и того же сообщения. В случае чешуекрылых насекомых этот способ реализуется путём выделения самкой феромонов в течение некоторого промежутка времени – времени лёта самца. Помимо этого, для минимизации шума в информационном канале необходимы механизмы дезактивации феромонных молекул через определенное время их нахождения в воздухе. Причиной разрушения феромонных молекул во внешней среде может быть воздействие таких факторов как солнечное излучение, температура, химическое взаимодействие с компонентами воздуха [223].

Чешуекрылые (бабочки) *Lepidoptera* это отряд насекомых, включающий около 150 000 видов [224,225]. Они делятся на две группы – те которые проявляют ночную или дневную активность [226,227]. В работе, в качестве объектов исследования, выбраны: совки-ленточницы *Erebidae*, пяденицы *Geometroidea*, коконопряды *Lasiocampoidea*. Выбор определялся актуальностью борьбы с данными видами насекомых в регионах России.

Коконопряды *Lasiocampoidea* используют в качестве феромонов спирты, альдегиды и формиатов [228]. Сосновый *Dendrolimus pini* и сибирский шелкопряды *Dendrolimus sibiricus* – представители данного семейства – очень опасные

вредители хвойных лесов [229–231]. Структурные формулы феромонов [231–236] приведены на рисунке 4.1. Как правило у этих феромонов длина цепи лежит в диапазоне 10-18 атомов углерода. Для них характерно содержание двойных связей в структуре молекулы. Диеновые и триеновые [228] как правило содержат 17-23 атомов углерода (рисунок 4.1). Часто двойные связи имеют *Z*-конфигурацию, а эпоксидные группы представлены *cis*-изомерами при этом функциональные группы находятся в положении 3,6 и 9.

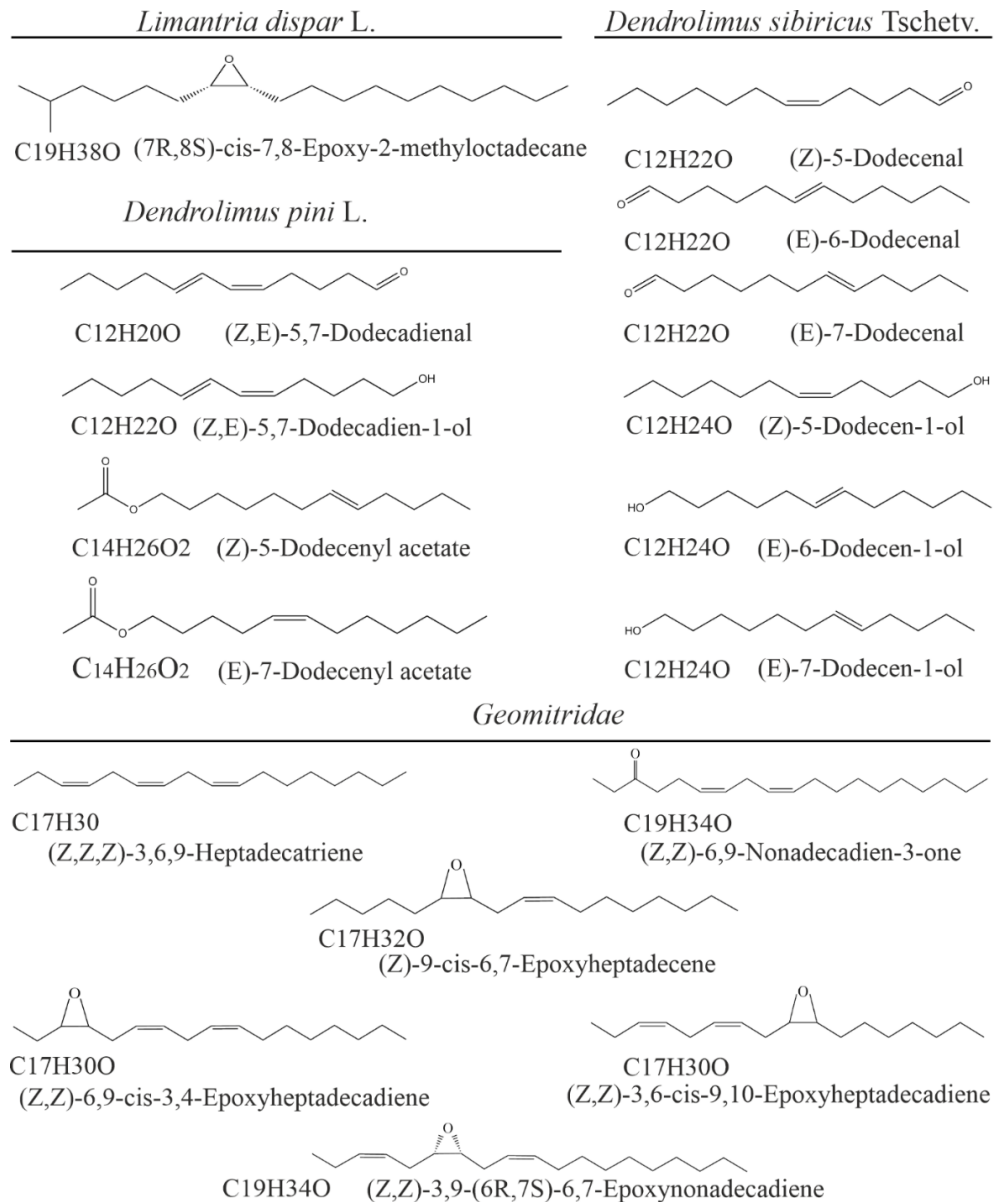


Рисунок 4.1 – Изученные феромоны чешуекрылых. *Limantria dispar* – феромон непарного шелкопряда; *Dendrolimus sibiricus* – феромоны сибирского шелкопряда; *Dendrolimus pini* – феромоны соснового шелкопряда; *Geometridae* – феромоны пядениц

*Lymantria dispar* – непарный шелкопряд – бабочка которая имеет высокую опасность для хвойных растений [237]. Вспышки популяции шелкопряда наносят большой урон экологии и экономике страны. Известен интересный факт – в девятнадцатом веке непарный шелкопряд был завезён в Северную Америку и нашёл там подходящие условия для существования, став там очень опасным вредителем [238]. Для непарного шелкопряда известен один феромон – диспарлюр (рисунок 4.1) – (7R,8S)-cis-7,8-Ероху-2-methyloctadecane [239,240], с эпоксидной группой.

Для бабочек семейства *Geometridae* [241–246] в качестве феромонов характерны неопределённые углеродные соединения и их производные – эпокиси, с 17-21 атомами углерода в цепи (рисунок 4.1). Как видно из рисунка 4.1 все соединения можно разделить на четыре типа: бескислородные линейной структуры с тремя двойными связями в положении 3,6,9 с длиной цепи 17,19,21 атом углерода (рисунок 4.1, А); эпокиси, с одной двойной связью, (рисунок 4.1, В); эпокиси, содержащие, помимо этого, две двойные связи (рисунок 4.1, С); кетон, содержащий две двойные связи (рисунок 4.1, D).

*Coleoptera* – это жуки (жесткокрылые), которые являются большой группой насекомых (более 390 000 видов [247]). В работе, в качестве объектов исследования, выбраны: короед-типограф *Ips typographus* L., чёрный пихтовый усач *Monochamus urusovi* Fish и чёрный сосновый усач *Monochamus galloprovincialis* Oliv. Данные виды [248–250] относят к наиболее серьёзным вредителям лесных массивов и древесных стройматериалов.

Феромоны короеда-типографа (рисунок 4.2) состоят из спиртов 2methyl3buten-2ol, cis-verbenol, trans-verbenol, 2-phenylethanol, myrtenol и trans-myrtenol [251,252]. Феромон чёрного пихтового усача (рисунок 4.2) содержит пять компонентов: 1S-alpha-pinene, 1R-alpha-pinene, S-3carene, R-limonene, alpha-terpinolene [252,253]. Феромон чёрного соснового усача (рисунок 4.2) содержит – ipsenol, alpha-pinene и 2methyl-3buten-1ol (рисунок 4.2) [252].

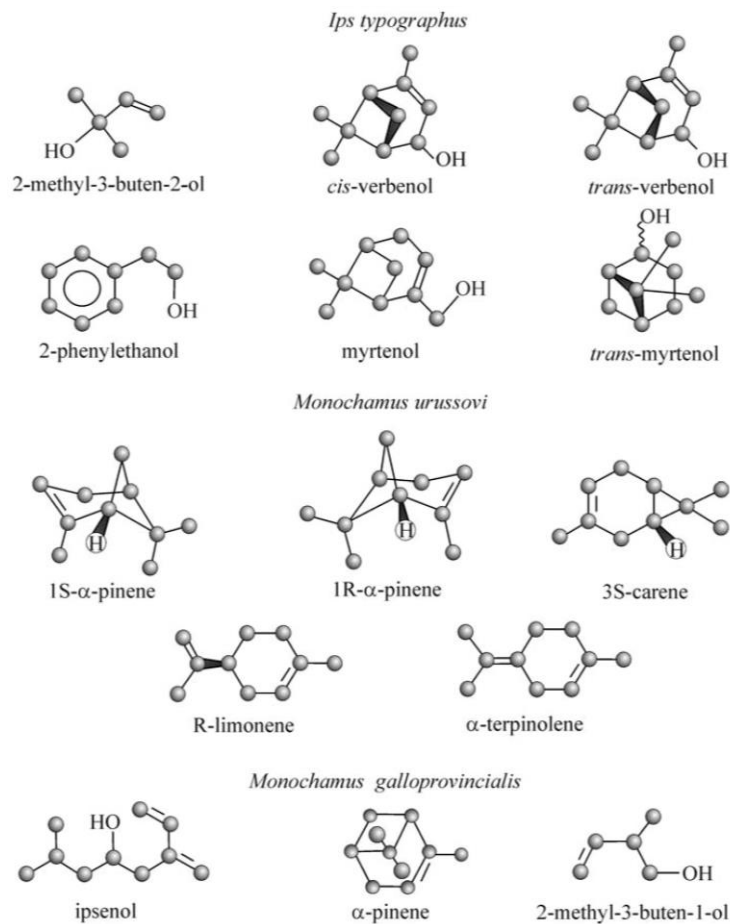


Рисунок 4.2 – Структурные формулы молекул феромонов жёсткокрылых. *Ips typographus* L. – короед-типограф; *Monochamus urussovi* Fish. – чёрный пихтовый усач; *Monochamus galloprovincialis* Oliv. – чёрный сосновый усач

В целом можно сказать, что эффективность феромонной коммуникации зависит от устойчивости химических соединений в реальной среде. Известно [254], что взаимодействие феромонов и белка рецептора происходит по принципу «ключ-замок» [254]. В этой связи, изменение конформации молекул может привести к невосприимчивости феромонов. Также на это может влиять возможные химические превращения – изомеризация, разрушения молекул и т.д. Для феромонов важно иметь оптимальные характеристики по отношению к внешнему воздействию. С одной стороны, феромоны должны быть устойчивы чтобы донести информацию. С другой стороны, нельзя чтобы феромоны не разрушались, т.к. это приведёт к накоплению на определённой территории и, как следствие, внесёт информационный шум. Поддержка численности и вспышки популяций насекомых показывает, что механизм феромонной коммуникации выработанный в процессе



эволюции – эффективен. При этом состав и структура молекул являются оптимальными для каждого из видов.

Для выявления механизмов феромонной коммуникации и для выработки рекомендаций по борьбе с вредителями хотелось бы знать как структурные характеристики молекул влияют на их физические свойства. В этой связи применение теоретических расчётов на основе функционала плотности выглядит целесообразным. Очевидно, что огромное видовое разнообразие насекомых, многокомпонентный состав феромонов, сложные и дорогие методики получения феромонов из насекомых в лабораторных условиях приводят к необходимости разработки теоретического подхода для анализа феромонной коммуникации. Для этого, в данном разделе, рассчитывались и анализировались структурные и спектральные характеристики молекул феромонов для оценки устойчивости к факторам среды.

#### **§4.2. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ФЕРОМОНОВ ЧЕШУЕКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ К РАЗЛИЧНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ**

Феромоны чешуекрылых насекомых, представляют собой углеводороды нормального строения и их производные, относящиеся к непредельным спиртам, альдегидам, эпоксидам, сложным эфирам. За основу при построении молекул брали базу данных [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com), для соответствующих насекомых. Строение данных молекул позволяет вращение вокруг сигма связей разных частей молекулы что может приводить к большому числу конформеров. Для конформеров проводили поиск равновесной геометрии и для дальнейших расчётов фотофизических процессов были отобраны структуры с минимальной энергией. Далее рассчитывался спектры поглощения, и анализировались атомные и электронные структуры возбуждённых молекул. Полученные данные сопоставлялись с особенностями поведения насекомых.

Непарный шелкопряд. Феромон непарного шелкопряда состоит из одного компонента – (7R,8S)-cis-7,8-Ероху-2-methyloctadecane. Для него построены конформеры. Для дальнейших расчётов и анализа отобраны три конформера – линейный, скрученный и зигзагообразный (рисунок 4.3, таблица 4.1).

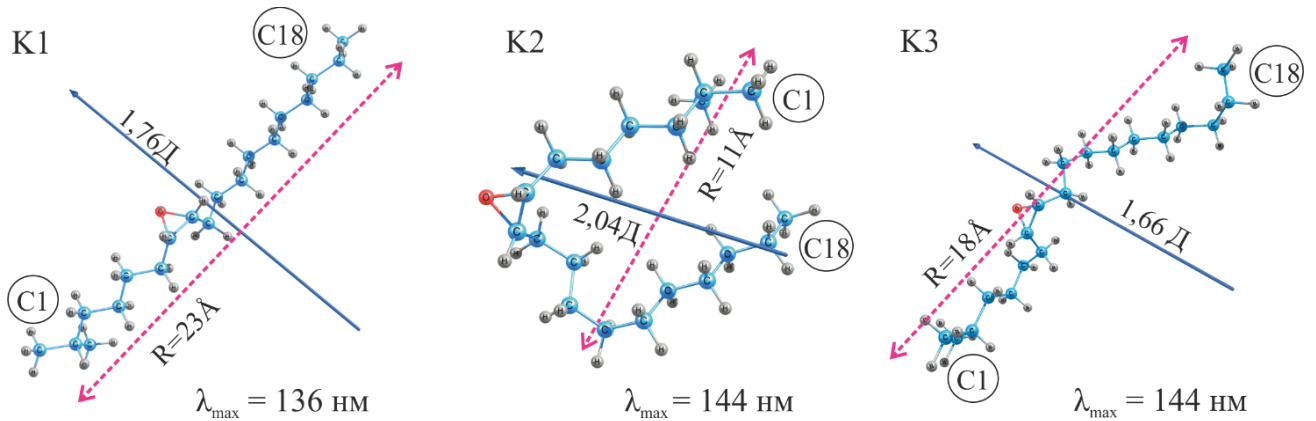


Рисунок 4.3 – Конформеры диспарлюра. К1 – линейный, К2 – скрученный и К3 – зигзагообразный. Синяя стрелка – дипольный момент в Дебаях; красная пунктирная линия – расстояние между крайними атомами феромона.

Разница по энергии между конформациями не превысила  $24 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ , что говорит о том, что для данного феромона не характерно образование конформеров какого-то определённого типа. Дипольный момент молекул (рисунок 4.3.) остаётся достаточно высоким – больше 1,5 Д (разница  $< 0,4 \text{ Д}$ ), что говорит о том, что на устойчивость молекулы может влиять влажность воздуха. Максимумы длин волн поглощения конформеров (таблица 4.1) находятся в дальней области спектра, что говорит о хорошей устойчивости по отношению к солнечной радиации.

Сосновый и сибирский шелкопряд. Молекулы содержат в углеродной цепи от двенадцати до четырнадцати атомов. Особенностью в строении молекул с двойными связями состоит в том, что она затрудняет вращение молекулы и, тем самым, «обедняет» состав конформеров. Моделировали, по возможности, крайние случаи, т.е. рассчитывали максимально скрученную и раскрученную конформацию (рисунок 4.4).

Таблица 4.1 – Энергетические и спектральные характеристики конформеров диспарлюра, рассчитанные на уровне B3LYP/6-31G(p,d)

Феромон	Конформер	$\mu$	$\Delta E$	$\lambda_{\max}$	$f$
	K1	1,76	22	136	0,17
	K2	2,04	0	144	0,03
	K3	1,66	24	144	0,05

$\mu$  – электрический дипольный момент в Дебаях, Д.  $\Delta E$  – разность между полной энергией конформеров в кДж\*моль<sup>-1</sup>, рассчитанная относительно конформера с минимальным значением полной энергии в кДж\*моль<sup>-1</sup>.  $\lambda_{\max}$  – длина волны, соответствующая максимуму поглощения в нм.  $f$  – сила осциллятора, в относительных единицах

Далее проводили анализ по аналогии с непарным шелкопрядом (см. выше). Расчёты что энергетическая разница между конформерами не превышает 11 кДж\*моль<sup>-1</sup>, дипольный момент находится в диапазоне 1,23–2,71 Д. (изменение <0,4 Д, рисунок 4.4).

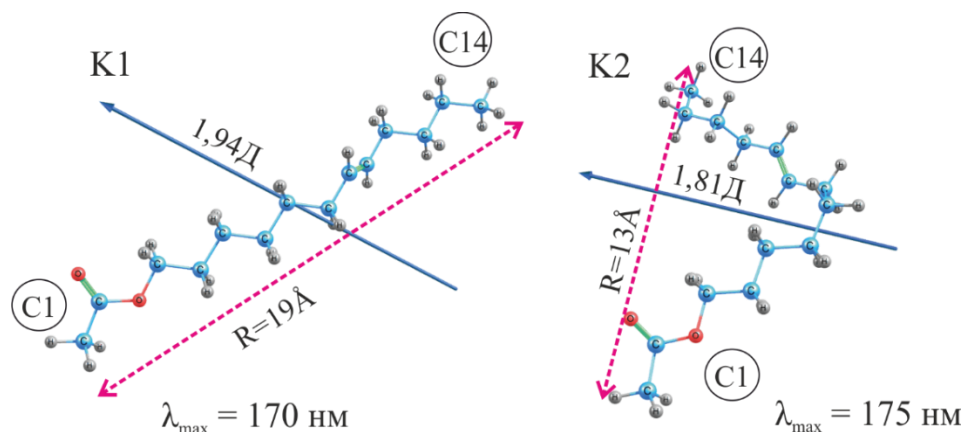


Рисунок 4.4 – Конформеры (E)-7-Dodecenyl acetate. K1 – линейный, K2 – скрученный. Обозначения как на рисунке 4.3.

Достаточно высокий дипольный момент сопоставим с дипольным моментом воды 1,85 Д [255], что говорит о том, что на устойчивость также может влиять высокая влажность воздуха лесных массивов. Максимумы длин волн поглощения

для молекул, содержащих сопряжённые связи, соответствуют диапазону 224-227 нм, а для молекул с одной двойной связью – от 168 нм до 177 нм.

Насекомые-пяденицы. Восемь видов насекомых-пядениц взято для исследования. Феромоны представляют собой непредельные углеводороды с содержанием кислорода (эпоксидные и кетонные группы) с 17-21 атомами углерода в цепи нормального строения. По аналогии с предыдущими молекулами феромонов смоделированы и рассчитаны конформации для каждой молекулы (в качестве примера – на рисунке 4.5 два конформера (Z,Z,Z)-3,6,9-Heptadecatriene), энергетическая разность, при этом, между ними не превышала  $11 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ . Дипольный момент для углеводородов составил от 0,29 до 0,49 Д, для эпокисей – от 1,73 до 2,20 Д, для кетона – 2,63 Д. Видно, что наличие кислорода ведёт к меньшей устойчивости к полярным компонентам содержащихся в лесном воздухе в сравнении с феромонами – «чистыми» углеводородами, (дипольный момент значительно меньше 1 Д).

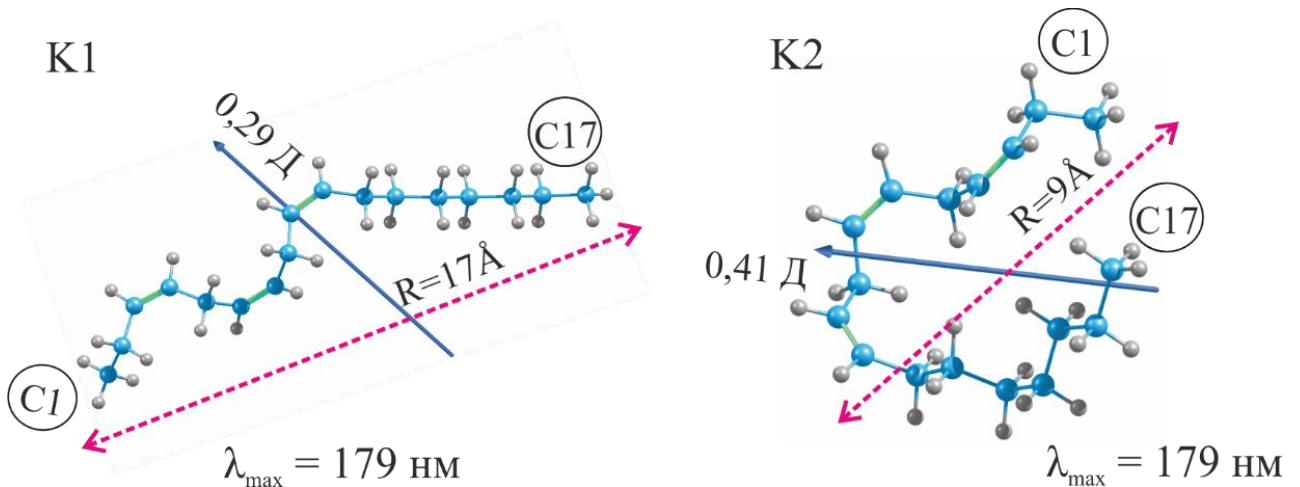


Рисунок 4.5 – Конформеры молекулы (Z,Z,Z)-3,6,9-Heptadecatriene.

Обозначения как на рисунке 4.3.

Для оценки влияния солнечной радиации проводили расчёт максимумов длин волн поглощения с помощью TD-DFT. Расчёт показал, что у всех молекул максимумы лежат в ультрафиолетовой части спектра. Для непредельных углеводородов максимум составляет 179 нм, для эпокисей максимум находится от 164 нм до 174 нм, для кетона – 204 нм.

Анализ атомной и электронной структуры для основного и возбуждённого состояния показал, взаимосвязь между строением молекул и происходящими изменениями в фотофизическом состоянии молекул.

Расчёты показывают, что для непредельных углеводородов длина углеродной цепи не влияет на максимум поглощения, а релаксация атомной структуры приводит к увеличению длин двойных связей в среднем на 0,1 Å. При этом наибольшее увеличение длины связи при возбуждении происходит для одинарной связи C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>, (увеличение на 0,26 Å для (Z,Z,Z)-3,6,9-Heptadecatriene; увеличение на 0,27 Å (Z,Z,Z)-3,6,9-Nonadecatriene; увеличение на 0,35 Å для (Z,Z,Z)-3,6,9-Heneicosatriene).

Для непредельных эпокисей с двумя π-связями расчёт показал, что изменение атомной структуры зависит от взаимного расположения эпоксидного мостика и двойных связей. Увеличение σ-связи C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> для молекулы (Z,Z)-3,6-cis-9,10-Ерохуheptadecadiene составило 0,27 Å, для (Z,Z)-6,9-cis-3,4-Ерохуheptadecadiene длина σ-связи C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> – 0,24 Å. В молекуле (Z,Z)-3,9-(6R,7S)-6,7-Ерохунonadecadiene двойные связи находятся по разные стороны от эпоксидной группы и увеличение длин связей соответствует переходу от π-связей к полуторным. Длины σ-связей – не меняются.

Для непредельных эпокисей с одной π-связью возбуждённая геометрия приводит к увеличению длины двойной связи до полуторной.

Для непредельного кетона (Z,Z)-6,9-Nonadecadien-3-one в возбуждённом состоянии не происходит существенного увеличения длин σ-связей. Увеличение длин π-связей также незначительно. Больше всего изменений произошло у функциональной группы C=O, где связь увеличилась на 0,09 Å.

В целом можно сказать, что под воздействием радиации на молекулы феромонов происходит изменение геометрии молекулы. Результаты расчётов показали, что изменяются длины связи, которые расположены вблизи функциональных групп. На этих участках происходит перераспределение электронной плотности. Значения длин двойной связи изменяются в среднем на Δ=0,08 Å. Происходит перераспределение электронной плотности в молекуле,

приводящее к изменению значений длин связи и углов: длина связи C5-C6 и C7-C8 увеличиваются с 1,34 Å до 1,42 Å ( $\Delta=0,08$  Å), длина связи C6-C7 уменьшается с 1,45 Å до 1,36 Å ( $\Delta=0,09$  Å) (рисунок 4.6). Таким образом, изменяется порядок связи между атомами, вместо двойной связи образуется полуторная.

При возбуждении молекулы диспарлюра связь C7-C8 увеличивается с 1,50 до 2,30 Å ( $\Delta = 0,80$  Å), а угол C7-O-C8 изменился с  $62,8^\circ$  до  $116^\circ$  ( $\Delta = 53,2^\circ$ ) (рисунок 4.6). Разрушение эпоксидного кольца и, как следствие, дезактивация феромона может привести к тому, что не будет происходить связывание молекулы с рецептором насекомого [254].

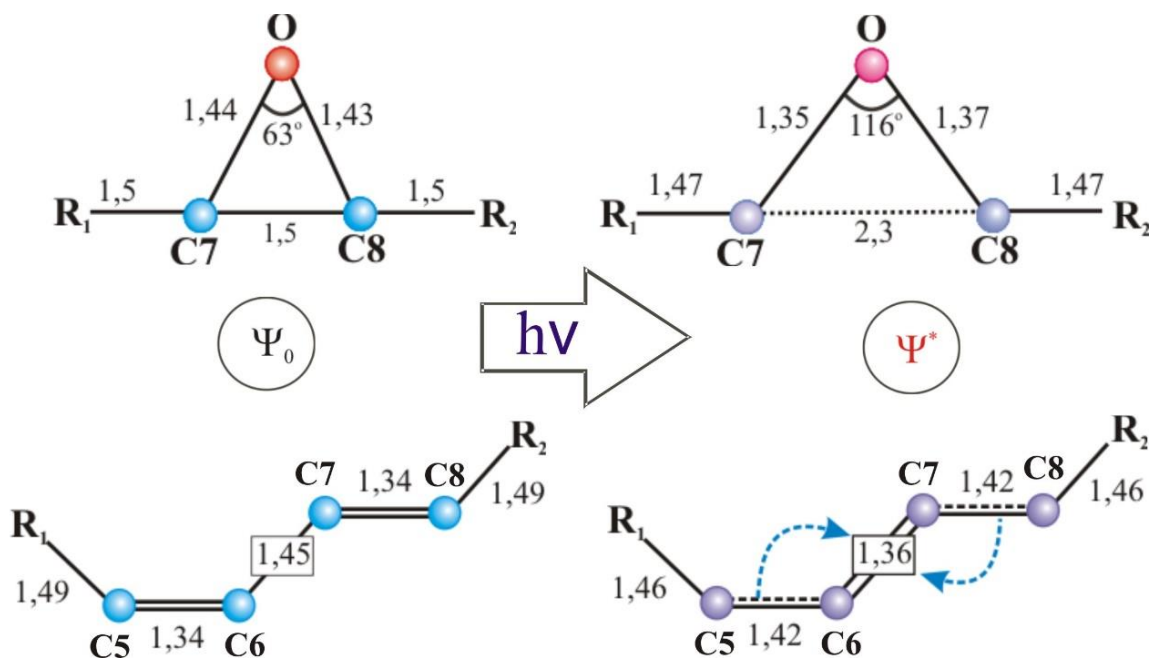


Рисунок 4.6 – Изменение атомной структуры вблизи функциональных групп альдегидов, спиртов и эпокисей в результате фотофизических процессов.  $\Psi_0$  и  $\Psi^*$  – основное и возбуждённое состояние соответственно;  $R_1$  и  $R_2$  – углеводородные радикалы; длины указаны в ангстремах, Å

Данные, полученные с помощью теоретических расчётов, позволяют связать с поведением данного вида насекомых. В отличие от большинства бабочек, самцы непарного шелкопряда летают в течение всего дня до позднего вечера [256–258]. Для распространения информации на определённом расстоянии самки должны феромон вырабатывать днём, а распространение сигнала будет происходить, когда солнечная радиация высока. Поэтому молекула диспарлюра должна иметь

устойчивость к солнцу. Это согласуется с расчётом максимумов поглощения диспарлюра. Возбуждение молекулы диспарлюра происходит в дальней части ультрафиолетового спектра. При этом дезактивации не нужных феромонных молекул [222] может происходить через химические реакции с веществами находящимися в воздухе.

Феромоны чешуекрылых насекомых относятся к непредельным соединениям с  $\pi$ -связями. Для молекул феромонов, без кратных связей, максимумы поглощения приходятся на 136-144 нм, для непредельных углеводородов и кислородсодержащих феромонов – 157-204 нм, для кислородсодержащих феромонов с  $\pi$ -связями – 226-230 нм. Малые изменения атомной структуры феромонов в возбуждённом состоянии могут приводить к повышенной реакционной способности.

Рассчитанные характеристики феромонов чешуекрылых были сопоставлены с данными о поисковой активности насекомых [223]. Феромон непарного шелкопряда состоит из одного компонента – диспарлюра, феромон соснового шелкопряда включает четыре компонента, спектры поглощения феромонов, и структура молекул показана на рисунке 4.7.

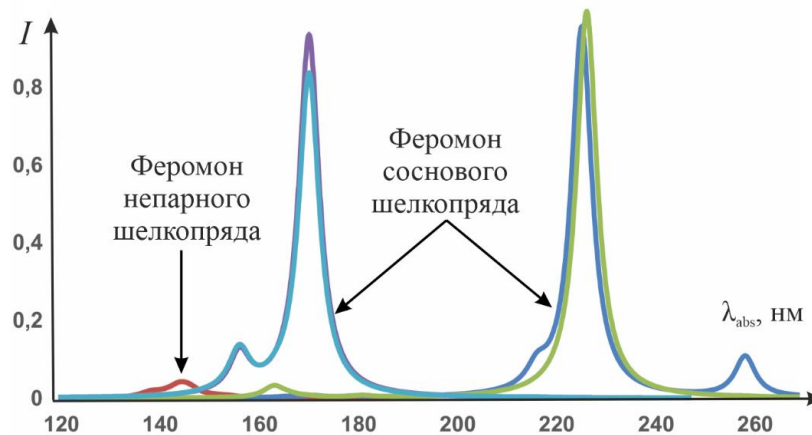


Рисунок 4.7 – Рассчитанные спектры поглощения для феромонов непарного и соснового шелкопрядов.  $\lambda_{\text{abs}}$  – длина волны поглощения;  $I$  – интенсивность в относительных единицах

При сопоставлении расчётных характеристик с данными о поисковой активности насекомых можно видеть различия в интенсивности и максимумах

длин волн поглощения феромонов этих видов (рисунок 4.7). Для непарного шелкопряда поиск партнёра происходит в течение всего дня [256–258], для соснового шелкопряда активность наблюдается в вечерние и ночные часы. Можно видеть корреляцию между поведением насекомого и спектром поглощения. Для молекул феромонов сибирского шелкопряда и пядениц – ночных бабочек [259], спектры поглощения похожи на спектры для соснового шелкопряда. Конечно солнечное излучение с длиной волны менее 300 нм практически отсутствует у поверхности земли [260], тем не менее, между спектральными характеристиками и поведенческими данными наблюдается согласованность. Можно с уверенностью предположить, что фотофизические свойства феромонов связаны с поисковой активностью насекомых.

#### **§4.3. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ФЕРОМОНОВ ЖЁСТКОКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ К ФАКТОРАМ СРЕДЫ**

Жуки-короеды используют в качестве феромонов молекулы, которые сильно (рисунок 4.2) отличаются от структуры феромонов бабочек. Так же, как и для молекул феромонов бабочек, проведена работа для феромонов жуков. Смоделированы структуры молекул и рассчитаны структурные и энергетические характеристики в основном состоянии. Структура молекул феромонов (рисунок 4.2) короедов ограничивает внутримолекулярное вращение и ограничивает набор конформаций. Феромонов короедов как правило относятся к группе терпенов и терпеноидов [261]. Для оценки устойчивости молекул к воздействию радиации, рассчитаны максимумы в спектрах поглощения и проанализированы изменения в атомной и электронной структуре молекул в возбуждённом состоянии.

Согласно расчётам, для феромонов, содержащих кислород, дипольный момент имеет значения от 1,28 до 1,71 Д, что говорит о предрасположенности к химическому взаимодействию с полярными молекулами воздушной среды. Молекулы феромонов без кислорода, имеют дипольный момент от 0,16 до 0,70 Д.



что говорит о том, что влажность воздуха не будет оказывать влияние на дезактивацию молекул. Максимумы длин волн поглощения лежат в диапазоне 156-223 нм. При этом для наблюдается существенные изменения геометрии в возбуждённом состоянии для данных молекул.

Для удобства провели группировку данных по типам молекул: нециклические, моноциклические и бициклические.

Нециклические: 2-methyl-3buten-2-ol, 2-methyl-3-buten-1-ol и ipsenol (рисунок 4.2 и 4.8). Для молекул 2-methyl-3buten-2-ol и 2-methyl-3-buten-1-ol, максимум поглощения составляет 157 и 160 нм соответственно. На рисунке 4.8 в качестве примера представлена атомная и электронная структура молекулы 2-methyl-3buten-2-ol в основном и возбуждённом состоянии. На примере молекулы 2-methyl-3buten-2-ol (рисунок 4.8) видно, что наибольшие изменения происходят в области двойной связи. Для молекул 2-methyl-3buten-2-ol и 2-methyl-3-buten-1-ol имеется увеличение длины  $\pi$ -связи на 0,11 Å и 0,07 Å соответственно. Таким образом, радиация может приводить к активации молекул и повышению их реакционной способности. При этом изменения длин связей для возбуждённого состояния не вызывает значительных структурных изменений, которые могли бы привести к дезактивации феромоннов.

Моноциклические: 2-phenylethanol, alpha-terpinolene и R-lemonen (рисунок 4.2). В отличие от alpha-terpinolene и R-lemonen, содержащих в шестичленном цикле одну  $\pi$ -связь, 2-phenylethanol имеет в цикле систему сопряжённых  $\pi$ -связей. Изменение электронной структуры приводит к увеличению длины  $\pi$ -связей в молекулах alpha-terpinolene и R-lemonen с 0,07 Å до 0,10 Å, что соответствует переходу от двойных в полуторные связи (рисунок 4.8).

Для молекулы 2-phenyl-ethanol при возбуждении изменение электронной структуры происходит в области шестичленного цикла. Изменение атомной не более 0,03 Å. Наибольшие изменения происходят в области кратных связей увеличение длин связей не превышает 0,11 Å. Воздействие радиации может приводить к активации молекул.

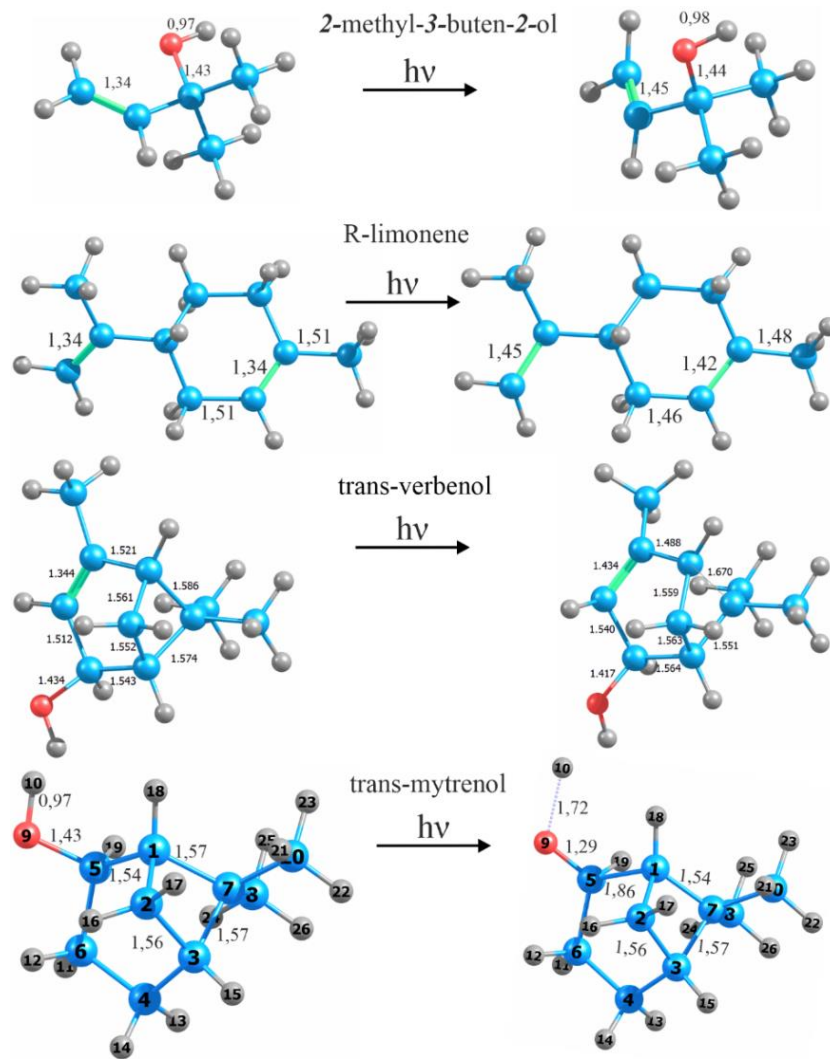


Рисунок 4.8 – Атомная и электронная структура молекулы феромонов в основном и возбуждённом состоянии. Длины связей в ангстремах.

Бициклические: trans-myrtrenol, alpha-pinene, cis-verbenol, myrtrenol, trans-verbenol, 1R-alpha-pinene, 1S-alpha-pinene, содержат по одному шести- и четырёхчленному циклу, и 3S-careen, содержит трёх- и шестичленный циклы (рисунок 4.2). Все бициклические феромоны содержат в структуре двойную связь, входящую в шестичленный цикл (исключая молекулу trans-myrtrenol). Отсутствие двойных связей в молекуле trans-myrtrenol даёт максимум поглощения 144 нм. Для бициклических молекул с кратными связями максимум поглощения – 174 - 204 нм. На рисунке 4.8 показаны изменения в структуре молекулы trans-myrtrenol. В основном состоянии trans-myrtrenol имеет напряжённый цикл, включающий связь C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> (1,57 Å), и угол C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>3</sub> - 85°, вместо характерного для sp<sup>3</sup>-орбиталей угла

109°. В возбуждённом состоянии происходит увеличение связи C<sub>5</sub>-C<sub>1</sub> на 0,32 Å (шестичленный цикл), что в свою очередь вызывает существенное изменение атомной структуры. Видно раскрытие шестичленного цикла с сохранением четырёхчленного цикла C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>.

Молекулы alpha-pinene, cis-verbenol, mytrenol, trans-verbenol, 1R-alpha-pinene и 1S-alpha-pinene в возбуждённом состоянии претерпевают аналогичные изменения поэтому на рисунке 4.8 показана только молекула trans-verbenol. В основном состоянии у trans-verbenol два цикла: шестичленный – C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> и четырёхчленный – C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>. Шестичленный цикл имеет двойную связь (между C<sub>2</sub> и C<sub>3</sub> – 1,34 Å). Угол C<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> – 110°, такая конфигурация атомов даёт эффективное перекрывание *p*-орбиталей с образованием одинарной связи. Релаксация структуры приводит к тому, что длина связи C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> увеличивается до 1,43 Å; расстояние C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> увеличивается до 1,67 Å, что может привести к раскрытию циклов. Угол C<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> меняется от 110° до 99°. Видно, что образуется новый шестичленный цикл, представленный атомами C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> (рисунок 4.8). Расположение атомов C<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> для молекулы trans-verbenol (рисунок 4.8) под углом 99° не обеспечивает эффективное перекрывание *p*-орбиталей атомов углерода C<sub>1</sub> и C<sub>6</sub>, в отличии от первоначальной структуры, поэтому связь C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> – слабее. В основном состоянии (рисунок 4.8) длина связи C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> составляет 1,59 Å, можно ожидать, что молекула будет переходить в устойчивую структуру, без напряжённых связей. Аналогичные изменения наблюдаются во всех молекулах феромонов, содержащих два напряжённых цикла.

3S-careen содержит в структуре шестичленный и трёхчленный цикл (рисунок 4.9). Наибольшие изменения в возбуждённой структуре происходят в области двойной связи (рисунок 4.9). Двойная связь C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> переходит в полуторную (увеличение с 1,36 Å до 1,45 Å). Наибольшие изменения видны (увеличение на 0,31 Å) между атомами C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, которые входят в шести- и трёхчленный цикл. Видно что увеличение расстояния между C<sub>3</sub> и C<sub>6</sub> может привести к образованию семичленного цикла (рисунок 4.9), хотя это не характерно для терпенов [261],

поэтому, в отличие от остальных бициклических структур, разрушение геометрии молекулы, под воздействием солнечной радиации, менее вероятно.

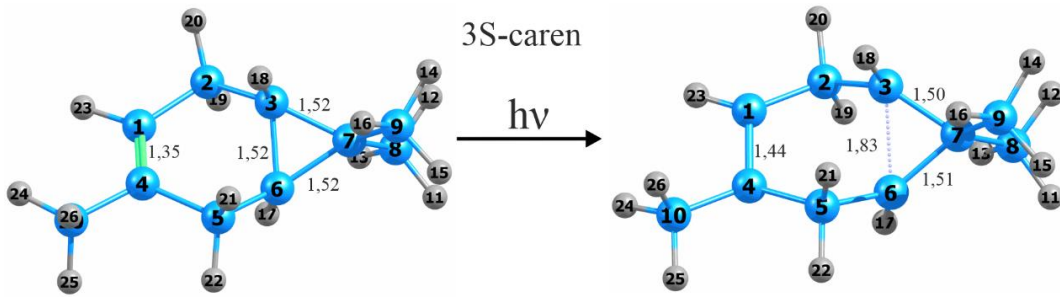


Рисунок 4.9 – Атомная и электронная структура молекулы 3S-carene в основном (слева) и возбуждённом (справа) состоянии. Длины связей в ангстремах.

Далее сопоставлены рассчитанные свойства феромонов с данными о поведении насекомых (рисунок 4.10).

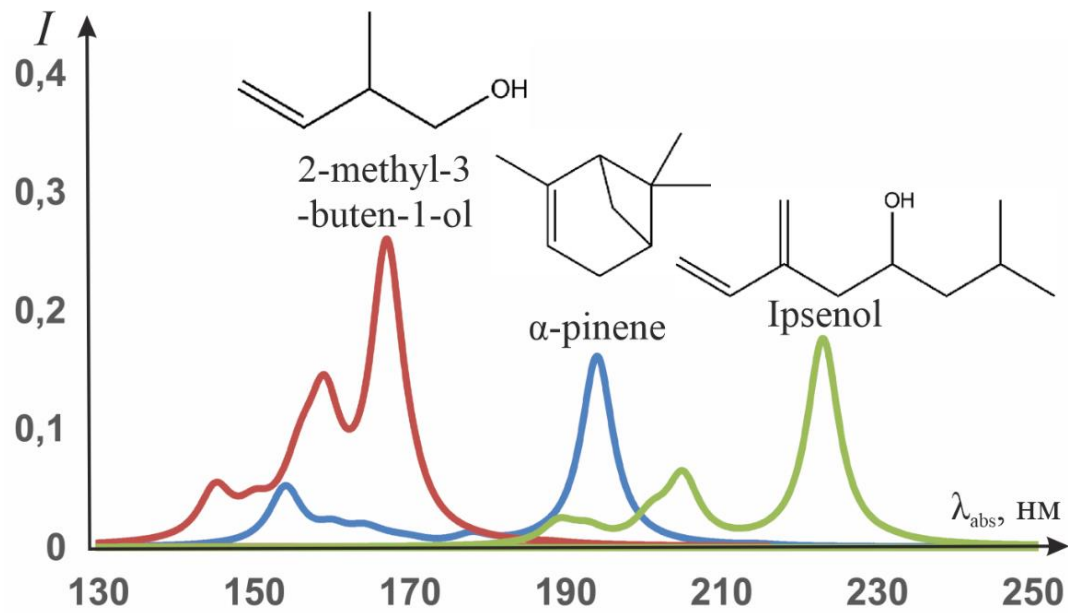


Рисунок 4.10 – Рассчитанные спектры поглощения феромонов соснового усача.

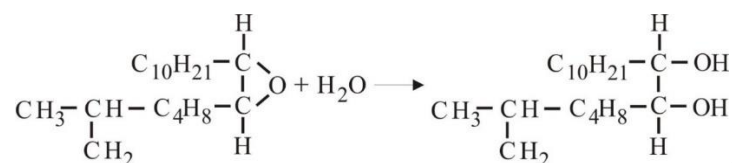
$\lambda_{\text{abs}}$  – длина волны поглощения;  $I$  – интенсивность в относительных единицах

Феромоны усача имеют максимум поглощения в том же диапазоне, что и феромоны соснового шелкопряда (рисунок 4.10), но с меньшей интенсивностью [223]. Получается, что молекулы феромонов усача будут с меньшей вероятностью возбуждаться, что делает их более устойчивыми к солнечной радиации. Это коррелирует с тем, что для чёрного соснового усача характерна активность в течение всего светового дня [262], в отличие от соснового шелкопряда.

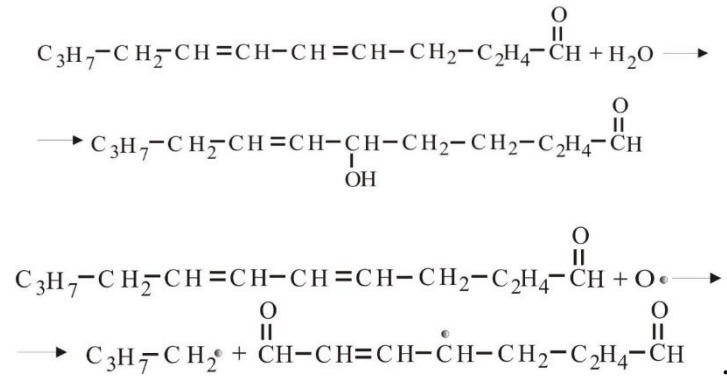
#### §4.4. РАСЧЁТ ПУТЕЙ РЕАКЦИЙ МОЛЕКУЛ ФЕРОМОНОВ В ОСНОВНОМ И ВОЗБУЖДЁННОМ СОСТОЯНИЯХ

Расчёт путей реакций между молекулами феромонов в основном и возбуждённом состояниях и с водой, кислородом, лимоненом. Методика заключается в нахождении максимальной энергии вдоль координаты реакции на поверхности потенциальной энергии. При расчёте переходного состояния строится карта реакции. Это необходимо для того, чтобы провести соответствие между реагентами и продуктами реакции, соединить атомы реагентов и продуктов и построить предполагаемую структуру переходного состояния так называемого активированного комплекса. Метод квадратичного синхронного перехода (КСП) [263] позволяет найти энергетический максимум вдоль параболы, связывающей реагенты и продукты, и минимум для всех перпендикулярных направлений к параболе. В соответствие с реакциями изучаемых молекул с реагентами, находящимися в воздухе, с помощью метода КСП были построены энергетические диаграммы пути реакции. При этом учитывалось как основное состояние молекул, так и возбуждённое, когда вещество поглощает определенное количество электромагнитного излучения.

Схематично (рисунок 4.11) механизмы реакций рассматриваемых феромонов с некоторыми веществами воздуха можно представить на примере взаимодействия молекулы диспарлюра с водой:



Или, по аналогии, например взаимодействие молекулы феромона Сибирского шелкопряда и Соснового шелкопряда (Z,E)-5,7-додекадиеналь с водой и кислородом



Для получения карты реакции брали оптимизированную геометрия молекул реагентов и продуктов реакции. При этом для молекул феромонов брали геометрию от основного и возбуждённого состояния. Затем строилась карта реакции, где указывались переходы атомов реагентов в атомы продуктов реакции, т.е. определялось соответствие между молекулами продуктов и реактантов. С помощью метода КСП оптимизировалась предполагаемая структура активированного комплекса.

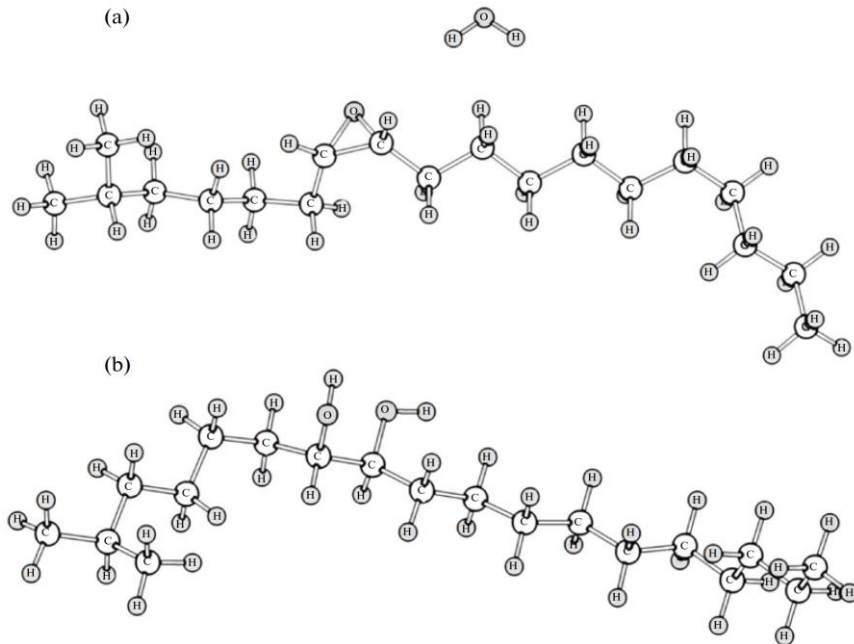


Рисунок 4.11 – Схема реакции молекулы диспарлюра с водой. (а) начальные позиции феромона и молекула воды для моделирования химической реакции; (б) продукт реакции

На рисунке 4.12 представлена энергетическая диаграмма пути реакции молекулы феромона Непарного шелкопряда (7R,8S)-дис-7,8-эпокси-2-метилоктадекана с водой. Видно, что взаимодействие возбуждённой молекулы с

водой происходит без энергетического барьера. Это объясняется тем, что при поглощении молекулой энергии в функциональной группе увеличиваются связи между атомами (рисунок 4.6) и система переходит в другое положение на поверхности потенциальной энергии, где барьер реакции может быть меньше или совсем отсутствует. Аналогичным образом наблюдается и для других молекул (таблица 4.2).

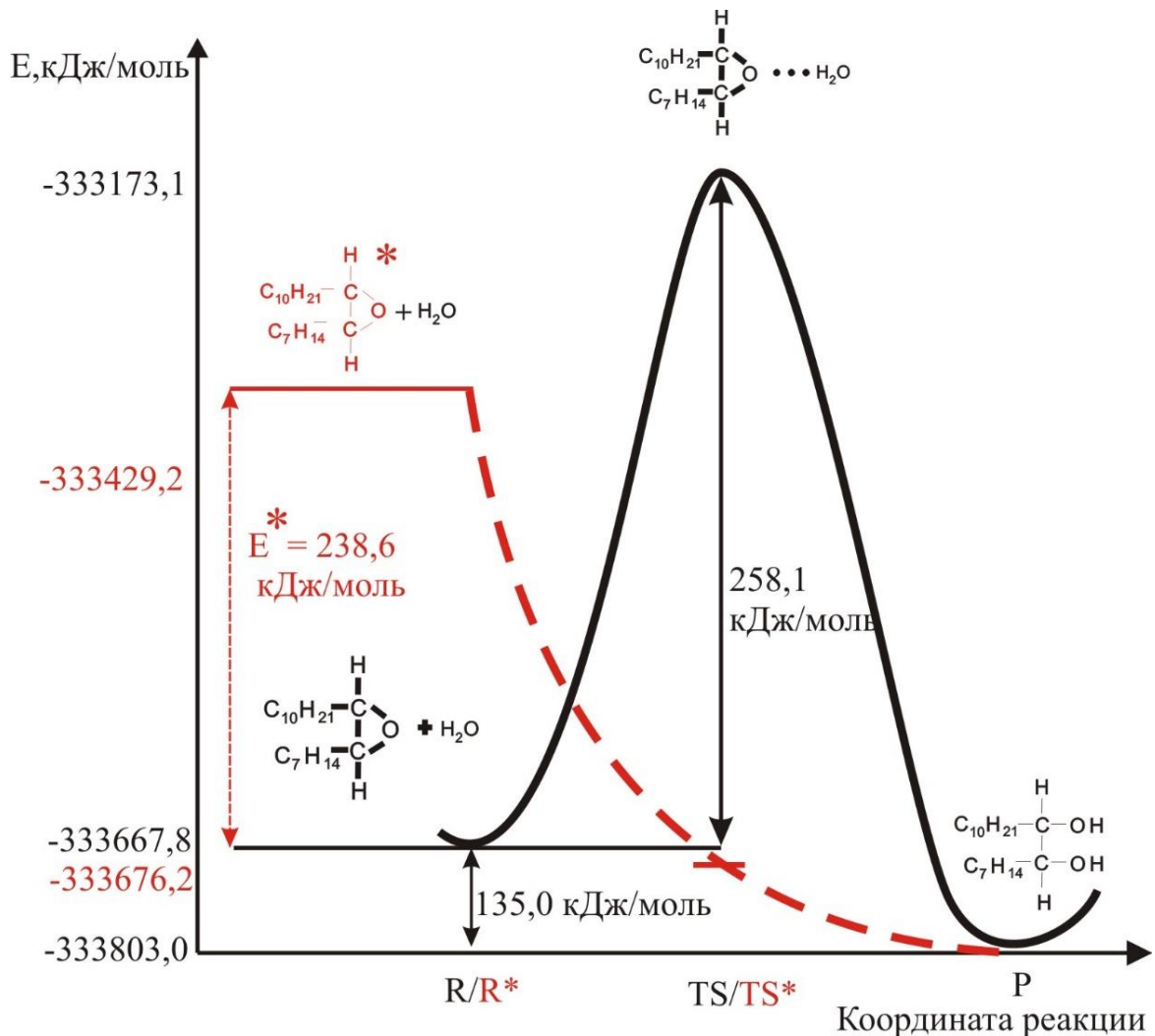


Рисунок 4.12 – Зависимость энергии от координаты реакции молекулы диспарлюра с водой.  $R/R^*$  – реагенты, в основном состоянии (сплошная линия) и в возбуждённом состоянии (пунктир);  $TS/TS^*$  – активированный комплекс, для основного/возбуждённого состояния;  $P$  – продукт реакции;  $E^*$  – разница между энергиями молекул в основном и возбуждённом состояниях

При взаимодействии исследуемых веществ с кислородом наблюдается несколько другая картина. На рисунке 4.13 изображена зависимость энергии от

координаты реакции молекулы (Z,E)-5,7-додекадиенала с кислородом. Видно, что для возбуждённой структуры реакция с кислородом протекает с преодолением энергетического барьера  $E=100,8$  кДж/моль, но данная энергия активации значительно меньше, чем энергия активации взаимодействия невозбуждённого феромона с кислородом на  $252,6$  кДж/моль. При взаимодействии возбуждённой молекулы феромона и молекулы кислорода реакция протекает с более низким энергетическим барьером, в отличие от реакции с молекулой феромона в основном состоянии.

Таблица 4.2 – Значения энтальпий реакций ( $\Delta H$ ), энергий активаций взаимодействия молекул феромонов в основном ( $E_{\text{акт}}$ ) и возбуждённом ( $E^*_{\text{акт}}$ ) состояниях с водой. Энергия в кДж/моль

Молекула феромона	$\Delta H$	$E_{\text{акт}}$	$E^*_{\text{акт}}$
(7R,8S)-цис-7,8-эпокси-2-метилоктадекан	135,0	258,1	-
(Z,E)-5,7-додекадиеналь	48,3	43,1	-
(Z,E)-5,7-додекадиен-1-ол	42,1	294,2	-
(Z)-5-додекеналь	59,0	214,7	-
(Z)-7-додекеналь	57,2	375,1	-
(Z)-5-додекен-1-ол	57,7	300,3	-
(E)-6- додекен-1-ол	53,6	374,5	-
(E)-7- додекен-1-ол	58,6	278,1	-
(E)-5-додекенилацетат	62,5	127,7	-
(E)-7-додекенилацетат	51,6	210,6	-

Это связано с тем, что в случае с кислородом мы имеем другой тип реакций, при котором образование новой молекулы идёт через разрыв старых связей и образовании новых. При этом энергетических затрат на разрыв связи, как правило, требуется больше, далее следует образование новых устойчивых химических связей. Подобная химическая реакции наблюдается и для остальных структур (таблица 4.3).



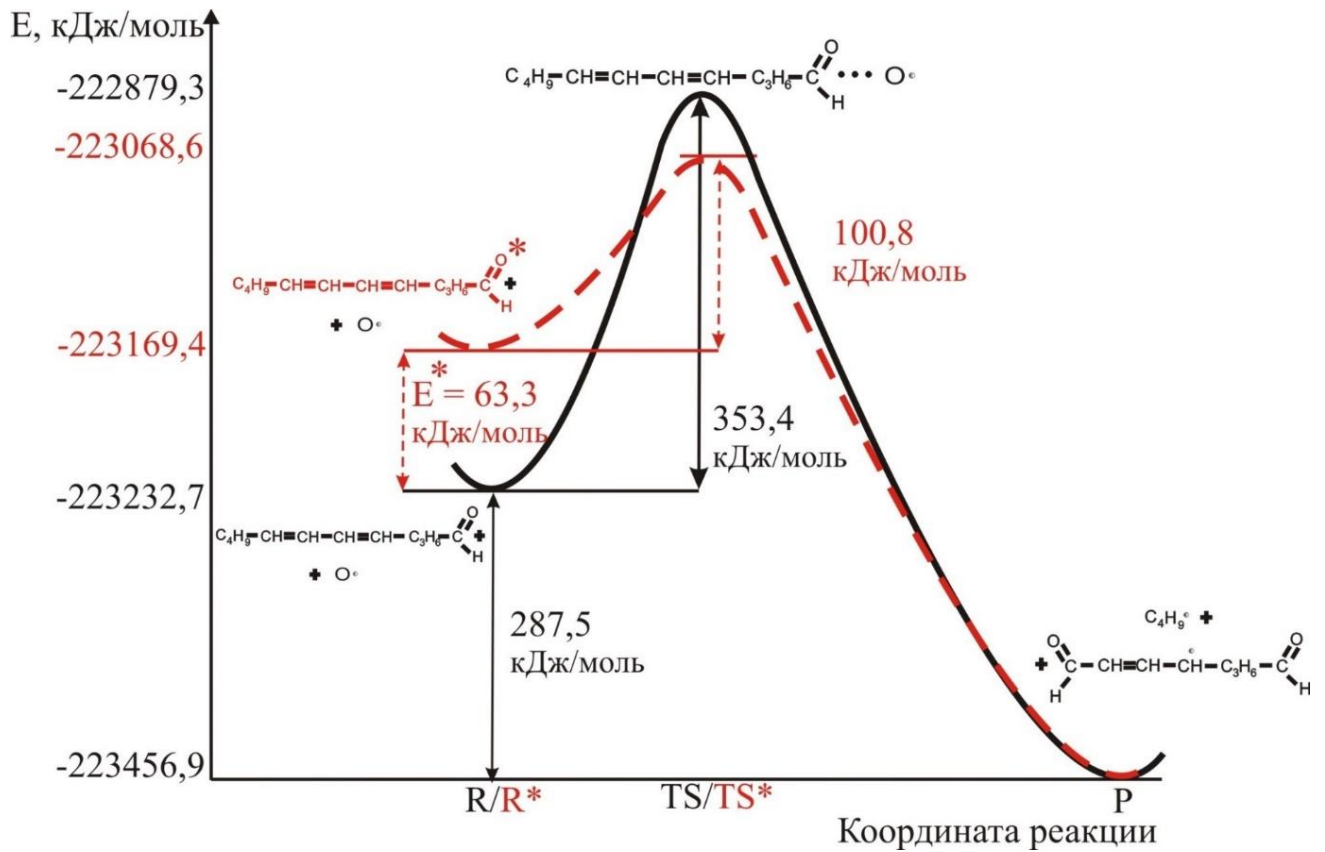


Рисунок 4.13 – Зависимость энергии от координаты реакции молекулы феромона Сибирского шелкопряда (Z,E)-5,7-додекадиенала с кислородом.

Обозначения аналогичны рисунку 4.12.

В итоге можно сказать, что, когда во взаимодействиях с компонентами воздуха участвуют возбуждённые молекулы, наблюдаются два процесса: протекание реакции с энергетическим барьером и без энергетического барьера. Это ведёт к тому, что, энергия активации может уменьшаться. На возбуждение молекулы диспарлюра требуется значительное количество энергии 238,6 кДж/моль. Это объясняет повышенную устойчивость к химическим реакциям. Данный факт хорошо согласуется с экспериментальными данными, известно, что данная молекула феромона устойчива в течение нескольких дней.

Таблица 4.3 – Значения энтальпий реакций ( $\Delta H$ ), энергий активаций взаимодействия молекул феромонов в основном ( $E_{\text{акт}}$ ) и возбуждённом ( $E^*_{\text{акт}}$ ) состояниях с кислородом. Энергия в кДж/моль

Молекула феромона	$\Delta H$	$E_{\text{акт}}$	$E^*_{\text{акт}}$
(Z,E)-5,7-додекадиеналь	287,5	353,4	100,8
(Z,E)-5,7-додекадиен-1-ол	224,2	322,9	135,3
(Z)-7-додекеналь	483,6	464,3	236,8
(Z)-5-додекен-1-ол	460,1	358,5	198,8
(E)-6- додекен-1-ол	483,6	464,3	236,8
(E)-7- додекен-1-ол	485,2	405,0	298,6

В большинстве случаев воздействие света на молекулы феромона Сибирского и Соснового шелкопряда должно приводить к увеличению реакционной способности молекулы, т.к. происходит либо уменьшение энергии активации реакции, либо исчезновение энергетического барьера, что повышает способность исследуемых соединений взаимодействовать с веществами, содержащимися в воздухе. Молекулы данных феромонов к середине светового дня полностью исчезают. Таким образом, наблюдается хорошая корреляция между расчётными данными и данными о характерном времени жизни феромонов.

#### §4.5. ВЫВОДЫ

Результаты моделирования изменений структурных и электронных свойств феромонов в возбуждённом состоянии показывают наличие взаимосвязи между структурными характеристиками молекул и механизмами коммуникации насекомых. Многие молекулы феромонов, родственных насекомых, имеют разницу в небольших функциональных группах относительно углеродного скелета. Наблюдается эффект замещения, когда лиганд меняет свойства основного носителя информации в соответствии с эволюцией видов.

Исследования показывают, что можно получать информацию о поведении насекомых на основе теории функционала плотности используя достаточно простые инструменты. Можно достаточно быстро оценить основные характеристики молекул. Полученные данные в дальнейшем можно использовать для построения математических моделей поведения вредителей, что, в свою очередь, позволяет разрабатывать экологически чистые методы борьбы.

Теоретические расчёты показывают, что изменение конформации молекул приводит к изменению дипольного момента. Данная характеристика важна для понимания гидрофильных свойств феромонов. Моделирование процессов поглощения показывает, как будет влиять солнечная радиация на коммуникацию насекомых, ведь известно, что они ведут сложный образ жизни. Рассмотрение фотофизических процессов позволяет понять, что может происходить с молекулами в возбуждённом состоянии, ведь молекулы с напряжёнными функциональными группами могут менять свою изомерную структуру, что приводит к дезактивации функции феромонов. Изучение процессов кинетики реакций, для молекул в основном и возбуждённом состоянии, также подсказывает, как данные молекулы будут вести себя при взаимодействии с компонентами, находящимися в атмосфере леса. Результаты расчётов изменений структурных и электронных свойств феромонов в возбуждённом состоянии показывают наличие взаимосвязи между структурными характеристиками молекул и механизмом коммуникации насекомых.

В работе участвовали – О.В. Осина, В.Ю. Клемичева, П.В. Артюшенко [223], П.В. Аврамов, С.Г. Овчинников. Поддержка экспериментальными данными и дальнейшая статистическая обработка были проведены сотрудниками Института леса ФИЦ КНЦ СО РАН – В.Г. Суховольским, Т.М. Овчинниковой, П.Е. Цикаловой и А.В. Ковалёвым.

Материалы данной главы представлены в следующих работах из списка публикаций автора: 18, 19, 21, 26 и в монографиях 1 и 2.

## ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ С ПОМОЩЬЮ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ

### §5.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ $\text{Ca}^{2+}$ -РЕГУЛИРУЕМОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

Несмотря на то, что биолюминесценция была открыта более 100 лет назад, интерес исследователей к изучению этого явления не ослабевает. Прежде всего, это связано с тем, что в настоящее время биолюминесцентные белки являются основой многих широко используемых методов анализа. Методы с применением биолюминесцентных белков позволяют измерять вещества ниже  $10^{-18}$  моля. Биолюминесцентные методы широко используются в клеточной биологии и экологии для мониторинга внутриклеточных процессов и загрязнения окружающей среды, а также в медицинской диагностике и исследованиях онкологических заболеваний. Спектр применения биолюминесцентных методов с каждым годом растёт, так как постоянно возникают все новые и новые области их приложения. Значительный прогресс в понимании механизма биолюминесценции и роли отдельных аминокислот белка в этом процессе был достигнут после определения пространственных структур  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов. Однако пространственная структура белка обеспечивает информацию только о статическом состоянии белковой молекулы и аминокислот активного центра. Какие изменения происходят непосредственно в ходе реакции, остаётся неизвестным. Восполнить этот пробел позволяют современные квантово-химические методы расчётов, которые в настоящее время широко применяются для решения вопросов кинетики реакций, формирования переходных и промежуточных комплексов и продуктов реакции, и что особенно важно, возбуждённых состояний.

Квантовохимические расчёты в настоящее время используются в качестве одного из физико-химических методов исследования для получения данных, необходимых для установления механизмов сложных реакций. В настоящее время разработаны достаточно эффективные полуэмпирические и неэмпирические

варианты метода молекулярных орбиталей, которые можно использовать для изучения реакционной способности больших молекул. С их помощью удаётся установить, какие факторы определяют направление и относительный выход продуктов реакции, а также получить недоступную для эксперимента информацию о геометрии и электронной структуре переходных состояний. При расчёте систем, содержащих атомы с неподелёнными электронными парами, отдельный вклад может вносить корреляция электронов. Учёт даже слабых корреляционных эффектов приводит к изменению геометрии структуры, а, следовательно, и изменению её спектральных характеристик и реакционной способности. Квантовохимические расчёты электронной структуры и геометрии электронно-возбуждённых молекул широко используются для интерпретации экспериментальных данных: отнесения полос поглощения, установления связи спектров поглощения и излучения со структурой молекулы и её конформацией, а также для изучения реакционной способности молекул в фотохимических реакциях. Целью квантовохимических расчётов является адекватное описание реальных систем: точный расчёт строения молекул, их физико-химических свойств, количественное предсказание реакционной способности.

Открытие биоломинесцентных белков началось в 1761 г. когда зоолог Форскол, плывущий на датском корабле по Северному морю, заметил странное свечение в воде. Причиной оказались небольшие медузы, «способные светиться изнутри». Позже выяснили, что медуза содержит «светящееся вещество». В 1961–1962 гг. учёные Джонсон и Шимомура выделили из медузы *Aequorea Victoria* белок акворин, который светится в присутствии ионов кальция [264]. Позднее нашли такие же белки в колониальных гидрополипах *Obelia longissima* и *Obelia geniculata*, гребневиках, радиоляриях. Акворин, выделенный из медузы *Aequorea Victoria*, и обелин, выделенный из гидрополипа *Obelia Longissima* (OL) относятся к одной из наиболее изучаемых биоломинесцентных систем –  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемым фотопротеинам.

Фотопротеины представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида (люциферазы) и

«преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина (2HP-CLZ), прочно, но нековалентно связанного с белком [265–267]. Схематично процесс биолюминесценции представлен на рисунке 5.1.

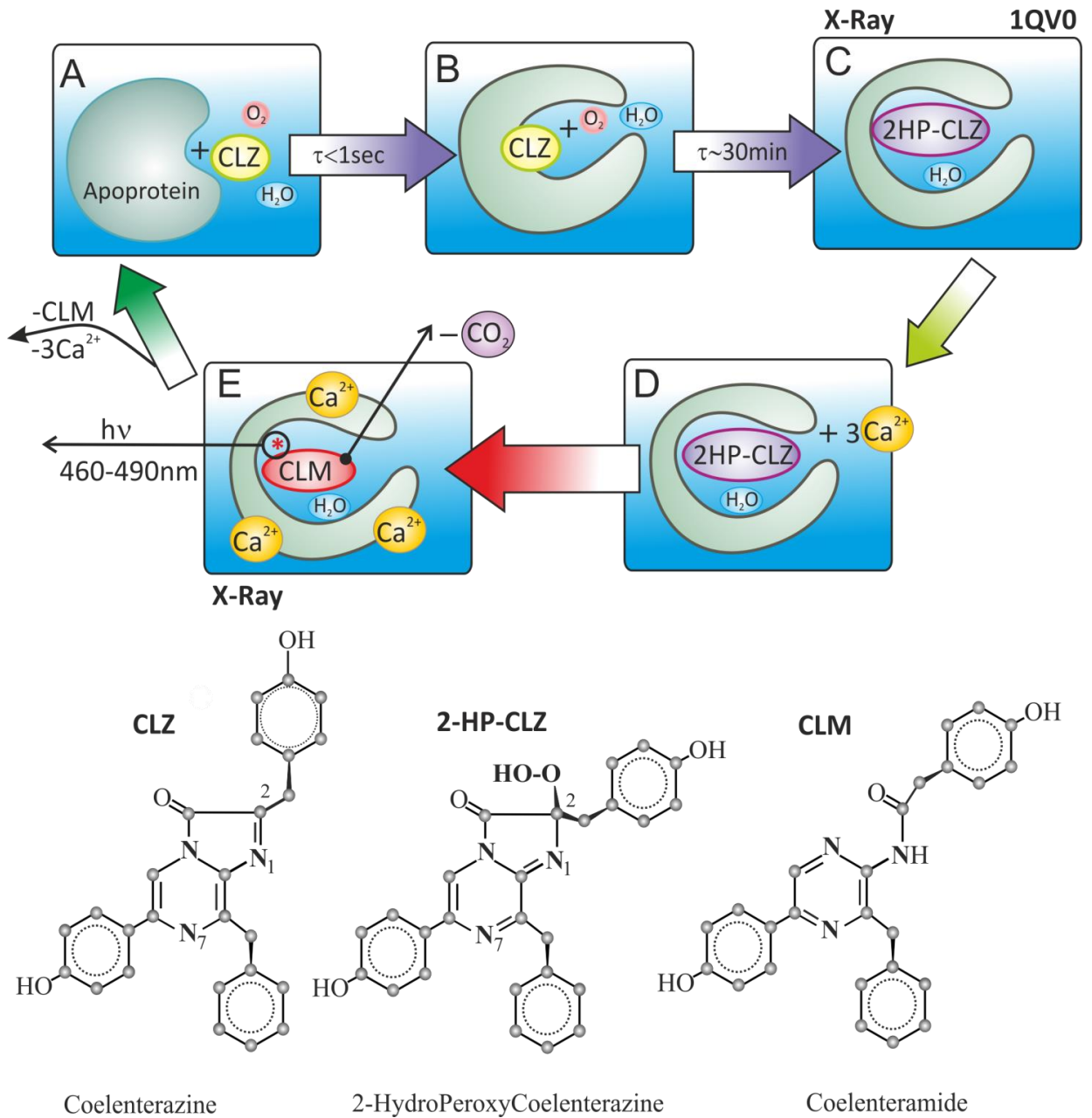


Рисунок 5.1 – Активация и биолюминесценция фотопroteина обелина, а также флуоресценция Ca<sup>2+</sup>-разряженного белка. А – связывание апобелка с целентеразином; В и С – образование 2-гидропероксицелентеразина в полости белка; D и E – биолюминесцентная реакция обелина, запускаемая ионами кальция, и образование Ca<sup>2+</sup>-разряженного белка; E – флуоресценция Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина.

При добавлении к апобелку целентеразина (CLZ) происходит образование активированного фотопротейна (рисунок 5.1). При этом CLZ вступает в реакцию с молекулой кислорода, образуя внутри белка молекулу 2-гидропероксицелентеразина (HP-CLZ). Присоединение ионов кальция (рисунок 5.1) запускает реакцию окислительного декарбоксилирования, в результате которой образуется  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный фотопротейн, содержащий субстрат в возбуждённом состоянии – целентерамид (CLM). Переход CLM из возбуждённого состояния в основное сопровождается биолюминесценцией, которая наблюдается в диапазоне 465–495 нм и зависит от организма, из которого фотопротейн выделен. После реакции образующийся разряженный фотопротейн, содержащий CLM в основном состоянии, при облучении светом проявляет яркую флуоресценцию (рисунок 5.1) [268].

Яркость свечения фотопротейнов достаточно велика, поэтому вскоре после выделения акворина родилась идея использовать этот белок и другие ему подобные как индикаторы свободных ионов кальция во всевозможных клетках [269]. В настоящее время биолюминесцентные методы широко используются в клеточной биологии и экологии для мониторинга внутриклеточных процессов, загрязнения окружающей среды, в медицинской диагностике. Одной из наиболее перспективных областей применения клеточных сенсоров на основе цветных флуоресцирующих белков является экспериментальная онкология. Использование FP-маркированных (FP – фотопротейн) опухолей позволяет исследовать развитие опухоли в режиме реального времени [270–275].

Целентеразин (CLZ) был выделен впервые в начале 60-х годов. Структура была идентифицирована только в 1977 г [276]. Не модифицированная форма CLZ отвечает формуле  $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}_3$ . Целентеразин может быть выкристаллизован из метанола как жёлто-оранжевые кристаллы. В метаноле CLZ флуоресцирует в жёлтой области, и его ультрафиолетовый спектр поглощения имеет максимум на 435 нм [276,277]. Так как выделить целентеразин или синтезировать его – достаточно сложный процесс, то экспериментально исследуют аналоги целентеразина, сохраняющие основную пиразиновую систему, ответственную за

люминесцентные свойства. Было синтезировано и изучено большое количество аналогов CLZ. Например, в работе [278] было изучено несколько аналогов CLZ. В работе было предположено, что различия в окраске растворов аналогов CLZ происходят из-за образования протонированных форм в кислой среде. При переходе от полярного растворителя к менее полярному спектр поглощения сдвигается в красную область. В работе [279] проведено исследование не модифицированного CLZ и его аналогов в различных растворителях. По результатам исследования, Кормиер и сотрудники сделали предположение, что CLZ существует в метаноле со спектром поглощения 427-435 нм в зависимости от аналога. А в апротонных растворителях, таких как диглим или диметилсульфоксид (DMSO) существует форма CLZ(2H) со спектром поглощения 440-455 нм.

Белок обелин – это  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый биолуминесцентный фотопротеин из организма *Obelia Longissima*. *Obelia* известны яркой биолуминесценцией [270]. Обелин представляет собой одноцепочный полипептид с молекулярной массой 22,2 кДа, составленный из 195 аминокислот, с тремя связывающими  $\text{Ca}^{2+}$  участками [270]. Окислительное декарбоксилирование CLZ в обелине происходит через несколько стадий. Депротонирование 2-гидропероксицелентеразина (HP-CLZ) приводит к диоксиэтану, напряженному четырёхчленному  $\alpha$ -пероксилактоновому кольцу, который в свою очередь превращается в продукт CLM, выделяя  $\text{CO}_2$ . HP-CLZ сейчас подтверждён многими исследованиями [268]. В работах [267,280] предложен механизм образования 2-гидропероксицелентеразина с образованием аниона целентеразина.

Механизм, предложенный в работах [281,282] в настоящее время считается наиболее правдоподобным. Шимомура и Тераниши [283] провели исследование флуоресценции CLM в растворителях с различной полярностью. Они предположили, что CLM может формировать четыре вида возбуждённых состояний (рисунок 5.2). В нейтральном сильно поляризованном растворителе максимум флуоресцентного спектра – 387-409 нм, соответствует возбуждённому состоянию неионизированного CLM. В бензоле с добавлением сильного основания максимум смещается на 480 нм и соответствует возбуждённой форме CLM-



фенолята. В более полярных растворителях ацетонитриле или DMSO, получается жёлтая флуоресценция с максимумом в 535-550 нм, и Шимомура и Тераниши приписали его пиразин-N(4)-аниону – резонансная форма фенолят-аниона. В основном растворителе продуктом являлся амид-анион, который даёт флуоресценцию 435-458 нм.

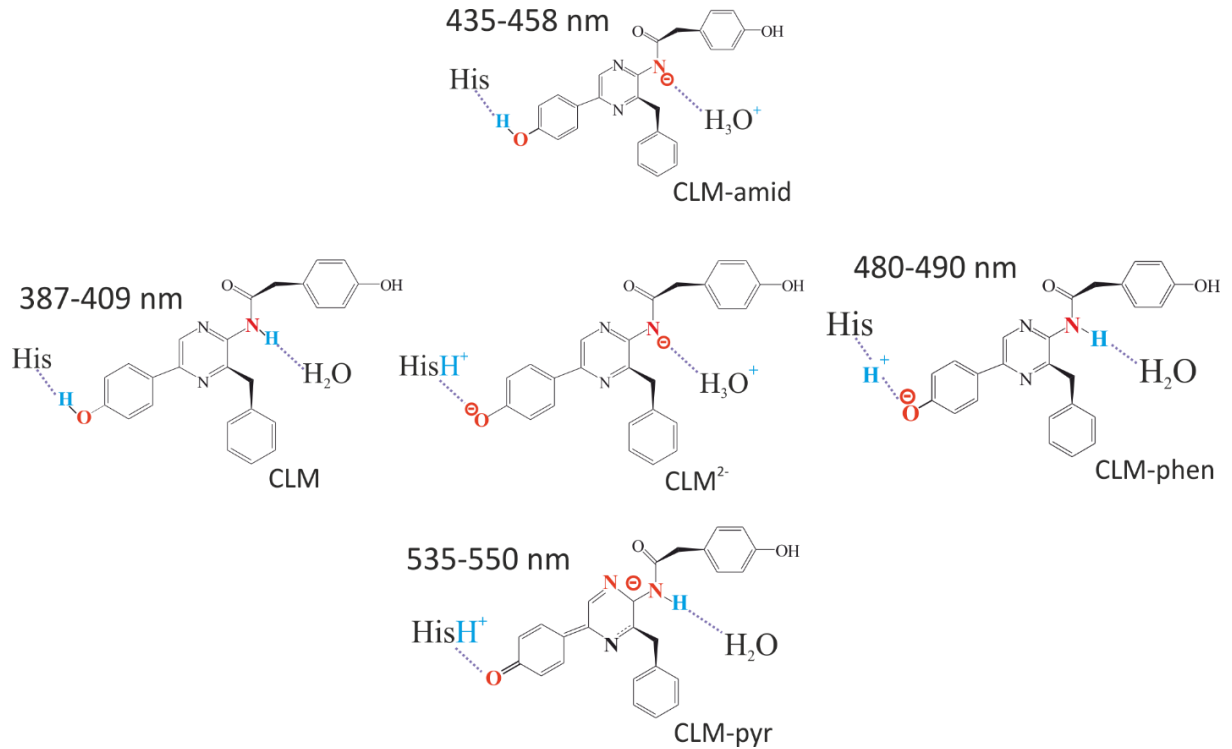


Рисунок 5.2 – Возможные формы целентерамида. Эксперимент из [280,283]

Экспериментально установить, какая же форма является излучающей в процессе биолюминесценции или флуоресценции, не удаётся. Поэтому было проведено множество исследований для определения возможной формы субстрата и процесса его образования [267,280,284–286].

## §5.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ МОЛЕКУЛЫ ЦЕЛЕНТЕРАМИДА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

Ca<sup>2+</sup>-разряженный обелин представляет собой молекулу белка с полостью внутри, в которой находится целентерамид (CLM), химически не связанный с аминокислотами субстрат-связывающей полости (рисунок 5.3).

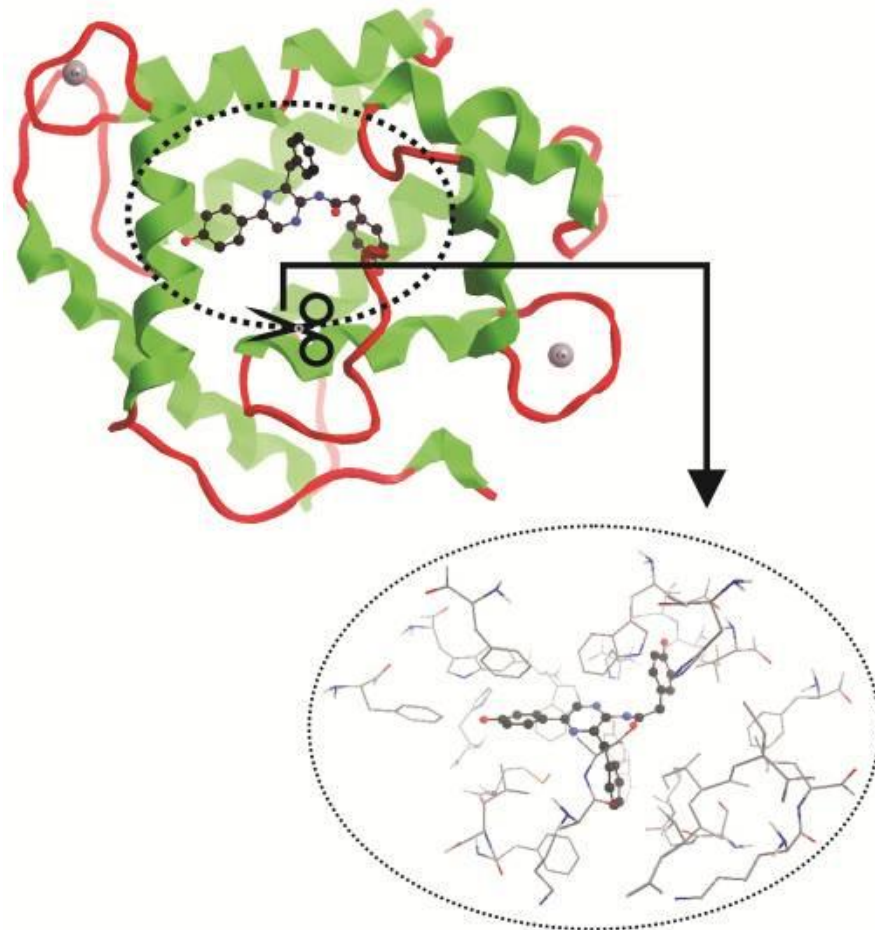


Рисунок 5.3 – Кристаллическая структура  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного фотопротеина обелина (PDB код 2F8P). Молекула целентерамида показана в центре. Пунктиром отмечен аминокислотный кластер, используемый в расчётах

Экспериментально очень трудно, если вообще возможно, установить какая именно ионная форма является эмиттером в биолюминесцентной реакции и при флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного фотопротеина. Поэтому было проведено множество исследований для определения возможной формы эмиттера и процесса его образования [277]. В работе при моделировании процесса флуоресценции были проверены все возможные ионные формы целентерамида, для которых были рассчитаны спектры поглощения и флуоресценции.

Так как напротив амидного протона находится молекула  $\text{H}_2\text{O}$  (рисунок 5.4), то существует вероятность, что азот может отдать протон молекуле воды с образованием CLM-амида и иона гидроксония. Также возможен переход протона от фенольного кислорода к азоту His22 (рисунок 5.4). Если эти два процесса происходят одновременно, то возможно образование молекулы дианиона.

Необходимо, однако, отметить, что поскольку связь N–H достаточно сильная, а образующийся ион гидроксония  $\text{H}_3\text{O}^+$ , как сильная кислота, должен мгновенно отдавать протон обратно на азот, время существования дианиона может быть очень коротким, например, сравнимым с временем жизни возбуждённого состояния.

Депротонирование фенольной группы, особенно в возбуждённом состоянии, явление достаточно распространённое [287]. Поэтому образование фенолята по сравнению с образованием амид аниона и дианиона является более вероятным. Пиразин, как резонансная форма фенолят-аниона, может образоваться, когда фенольная группа долгое время находится в депротонированном состоянии за счёт перестройки химических связей в целентерамиде.

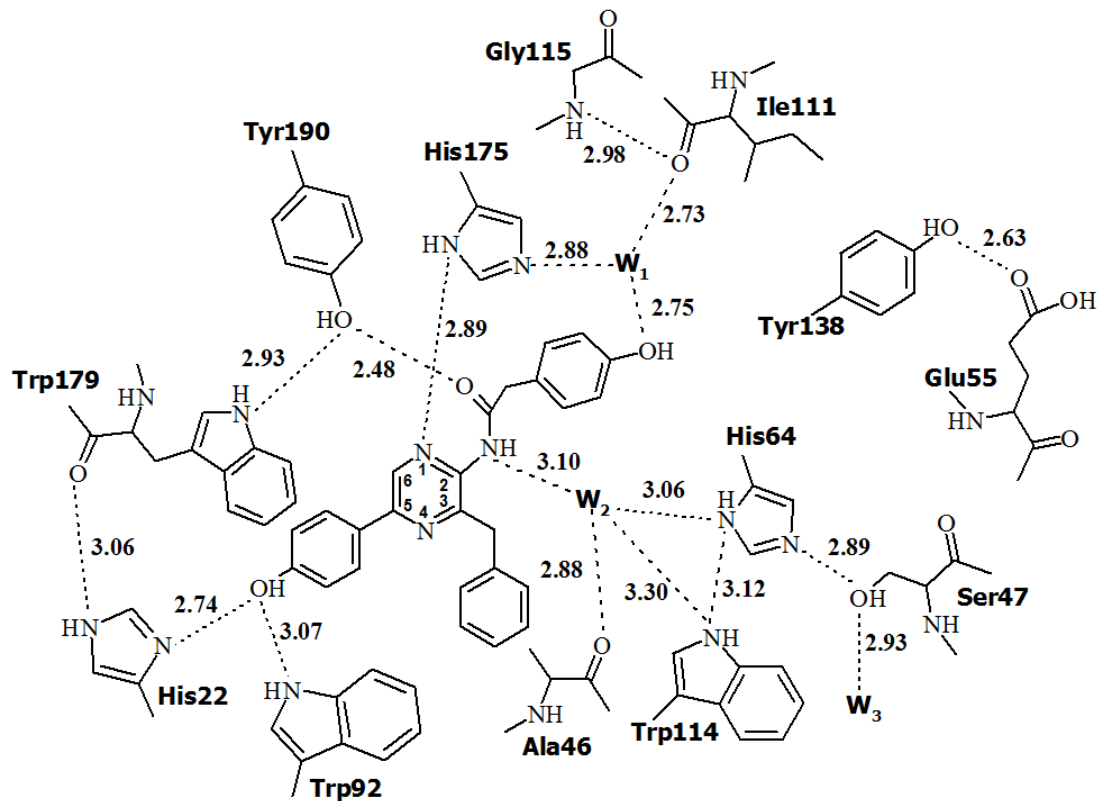


Рисунок 5.4 – Двухмерное изображение субстрат-связывающей полости  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина [283]. Водородные связи показаны пунктиром, расстояние указано в ангстремах.  $W_1$  и  $W_2$  – молекулы воды

Расчётные длины волн флуоресценции в вакууме значительно расходятся с экспериментальными значениями для нейтральной формы целентерамида (CLM), амид-аниона (CLM-Amid) и пиразин-N4-аниона (CLM-pyr) (таблица 5.1). Поэтому в кластерную модель были включены аминокислоты субстрат-связывающей

полости, исходя из предположения, что аминокислотное окружение оказывает существенное влияние на возбуждённое состояние целентерамида.

При моделировании системы аминокислотное окружение было зафиксировано и играло роль электростатического поля. Для расчёта было взято аминокислотное окружение целентерамида из кристаллической структуры  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного фотопротейна обелина (PDB код 2F8P). Рассчитывали молекулу целентерамида (~50 атомов) и её ближайшее аминокислотное окружение на расстоянии 4-5 Å от каждого атома целентерамида: — His22, Met25, Phe28, Leu29, Lis45, Ala46, Asp49, Ile50, Cys51, Lis53, Leu54, His64, Phe72, Phe88, Trp92, Trp114, Gly115, Val118, Phe122, Ser142, Gly143, Ile144, Met171, Thr172, His175, Trp179, Tyr190, 5 молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , всего около 500 атомов (рисунок 5.3).

Таблица 5.1 – Рассчитанные и экспериментальные [283] длины волн флуоресценции различных ионных форм целентерамида в условиях газовой фазы (ГФ) и аминокислотного окружения (АО) с помощью TD/B3LYP/6-31(p,d)

Ионная форма целентерамида	Расчёт (ГФ), $\lambda$ , нм	Расчёт (АО), $E_{пер}$ , эВ	Расчёт (АО) $\lambda$ , нм	Эксперимент, $\lambda$ , нм
CLM	329	3,30	375	390 – 410
CLM <sup>2-</sup>	483	3,25	382	?
CLM-Amid	479	2,86	434	435 – 458
CLM-Pirazine	379	2,31	538	530 – 565
CLM-Phenol*	-	2,48	499	480 – 490

\* модель, обсуждается ниже

При расчёте структур в вакууме и в аминокислотном окружении явно видны различия в их геометрии. Длины связи при расчёте в вакууме и в аминокислотном окружении практически одинаковы, но заметно изменяются углы (рисунок 5.5).

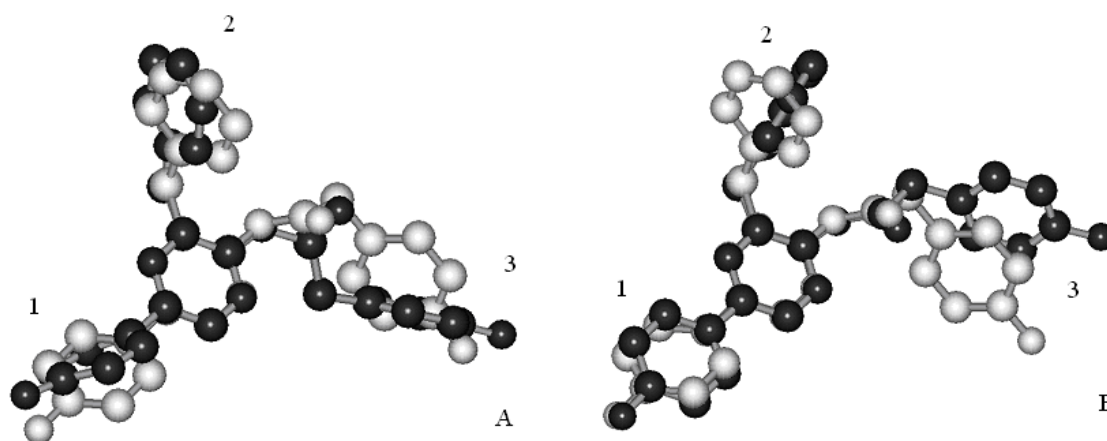


Рисунок 5.5 – Геометрии рассчитанных структур целентерамида (черный цвет) в аминокислотном окружении (А) и в вакууме (Б) в сравнении с целентерамидом в кристаллической структуре (серый цвет). 1,2,3 – функциональные группы.

Относительно кристаллической структуры целентерамида кольцо (1) структуры А повернуто на  $33^\circ$ , в то время как для структуры Б – только на  $20^\circ$ , при этом, в отличие от структуры А кольцо (1) лежит в одной плоскости с пиразиновым кольцом. Кольца (2) в структурах расходятся на  $14^\circ$  для структуры А и на  $26^\circ$  для структуры Б относительно кристаллической структуры, и повернуты по связи С-С на  $30^\circ$  и  $76^\circ$  соответственно. Группа атомов в положении (3) в случае структуры, оптимизированной в аминокислотном окружении, полностью меняет свою геометрию, в то время как для структуры Б всего лишь происходит поворот по связи N-С на  $20^\circ$  и фенольное кольцо расходиться с кристаллической структурой на  $35^\circ$ . Эти отклонения приводят к тому, что длины волн флуоресценции для структур, оптимизированных в вакууме и в аминокислотном окружении, сильно отличаются (таблица 5.1).

В связи с этим, можно сказать, что выработанный подход для расчёта больших систем с детальным исследованием активного центра молекул позволяет на хорошем теоретическом уровне проанализировать атомную и электронную структуры системы, а также, в будущем, моделировать возможные химические превращения которые происходят в активном центре.

Далее с помощью квантовохимических методов исследован молекулярный механизм образования эмиттера при флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного

фотопротеина обелина. Расчёты проводили с помощью метода V3LYP. Для того чтобы смоделировать в расчётах процесс флуоресценции, были рассчитаны спектры поглощения и флуоресценции для всех ионных форм целентерамида (CLM). Для расчёта ионизированных форм целентерамида было взято аминокислотное окружение из кристаллической структуры  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина (PDB код 2F8P) так же, как и в предыдущем параграфе. Расчёты показали, что изменение длин связей во всех формах не превышает 0,1 Å. Наиболее сильные изменения происходят около атомов, которые могут отдавать протон, и на атомах гетероцикла. Это позволяет сделать вывод, что атомы гетероцикла достаточно сильно подвергаются влиянию аминокислотного окружения и в большей степени участвуют в перераспределении заряда. Сравнение длин связей различных структур целентерамида, рассчитанных в возбуждённом и основном состояниях, показывает, что наибольшее изменение значений происходит на фенольном и пиразиновом кольцах. Этими изменениями в геометрии можно объяснить большой сдвиг Стокса в спектре флуоресценции (~150 нм). В результате расчётов получены частичные электронные заряды на атомах. В случае пиразин-аниона и фенолят-аниона разница в зарядах наблюдается только на фенольном кольце, а на остальных атомах заряды практически одинаковы. Это указывает на возможную роль аминокислотного окружения, которое через электростатическое взаимодействие может влиять на целентерамид, сдвигая при этом длину волны излучения.

Из данных таблицы 5.1 видно, что длины волн CLM и CLM–amid близки к экспериментальным значениям, полученным для этих форм в различных растворителях, но не соответствуют экспериментальным значениям для флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина ( $\lambda_{\text{max}} = 510$  нм). Таким образом, эти формы не подходят на роль эмиттера, т.к. их энергии излучения значительно больше, чем энергия максимума флуоресценции (2,40–2,50 эВ). Расчёт пиразин-аниона показывает энергию излучения 2,30 эВ (538 нм), следовательно, пиразин также не годится на роль эмиттера флуоресценции обелина.

Так как при оптимизации фенолят структурно переходит в пиразин-анион, его атомную структуру невозможно рассчитать. Поэтому была построена модель,

основанная на следующих приближениях: энергия, полученная от внешнего источника, идёт на перемещение протона; на возбуждение продукта тратится энергия около 3.5 эВ, часть которой идёт на внутримолекулярные изменения. Моделирование проводили следующим образом. Протон помещали в различные положения между двумя крайними позициями, расстояние между которыми составляло 2,42 Å. В каждом положении отдельно проводили расчёт основного и возбуждённого состояний (рисунок 5.6, таблица 5.2).

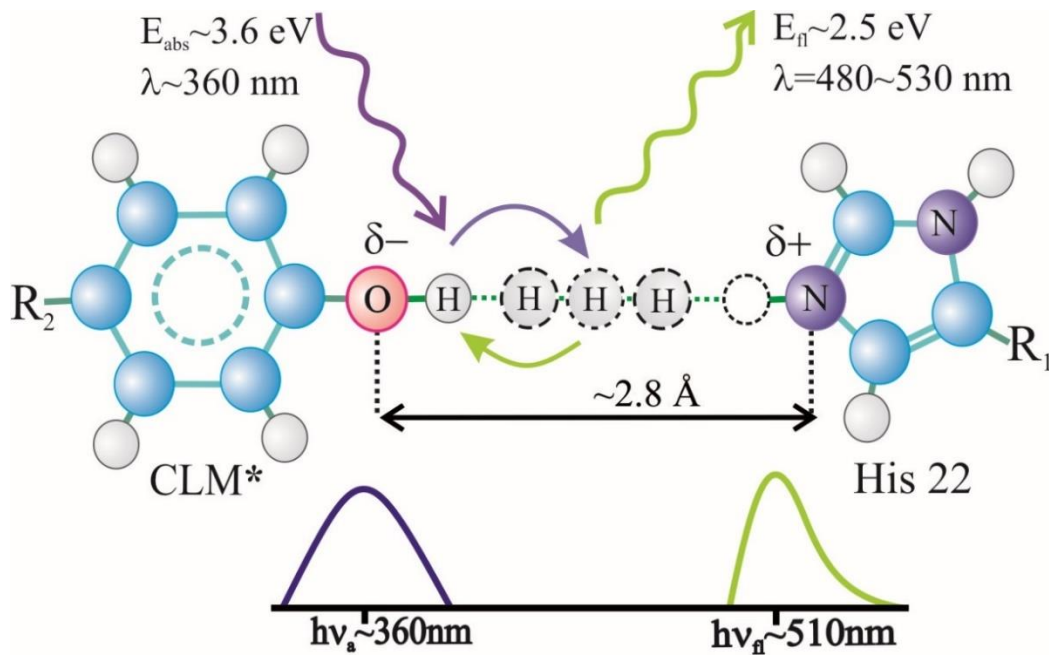


Рисунок 5.6 – Моделирование процесса переноса водорода между эмиттером реакции и аминокислотой His22

Данная схема позволяет смоделировать процесс образования комплекса с переносом протона, который получил название «*Ion-pair proton transfer*» [280,283] который, как было предположено [284,288,289], образуется при биолюминесценции  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов. Из расчётов видно, что положение протона сильно влияет на длину волны излучения. Сложность при моделировании процессов переноса протона состоит в том, что в расчётах мы не можем получить точно геометрию возбуждённого состояния и электронную структуру, т.к. в данном случае геометрия является неравновесной, и система стремится перейти в основное состояние. При этом происходят мгновенные изменения зарядов на кислороде целентерамида и азоте гистидина.

Таблица 5.2 – Длина волны флуоресценции целентерамида в зависимости от положения протона между целентерамидом (CLM) и Гистидином (H)

№	Расстояние CLM — H, Å*	$E_{\text{пер}}$ , эВ	$\lambda$ , нм	№	Расстояние CLM — H, Å	$E_{\text{пер}}$ , эВ	$\lambda$ , нм
1	0,92	3,30	375	9	1,63	2,65	469
2	1,31	3,30	375	10	1,64	2,53	492
3	1,36	3,30	375	11	1,78	1,63	763
4	1,40	3,26	380	12	1,85	1,96	633
5	1,47	3,22	385	13	1,90	2,00	620
6	1,50	3,17	390	14	1,96	2,02	615
7	1,56	2,97	417	15	2,02	2,04	610
8	1,60	2,79	445				

\* расстояние для протона отсчитывается от молекулы целентерамида

Расстояние 0,92 Å между кислородом и протоном соответствует равновесной геометрии основного состояния нейтральной формы целентерамида. Энергия перехода в данном состоянии 3,3 эВ (375 нм). Полученная энергия тратится на перемещение протона и возбуждение системы. Экспериментально излучение системы происходит в районе 2,5 эВ (~500 нм), что в наших расчётах соответствует положению протона посередине между целентерамидом и гистидином (~1,65 Å). Нахождение протона на расстоянии большем, чем 1,8 Å, показывает энергию перехода в районе 1,5-2,0 эВ (~600-700 нм). В спектре флуоресценции данные длины волн не наблюдаются, это связано с тем, что перемещение на расстояние более 1,8 Å требует дополнительных затрат энергии. Данная модель показывает, что описание процесса флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина должно учитывать перемещение протона между целентерамидом и гистидином. Таким образом, эмиттером, как и в случае биолюминесцентной реакции, может являться комплекс с переносом протона.

Расчитанные энергии излучения амид-аниона, дианиона и нейтральной формы целентерамида не совпадают с экспериментально измеренными длинами



волн флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина, поэтому данные возможные эмиттеры можно исключить. Флуоресценция пиразин-аниона в различных растворителях показывает максимумы в области 535–550 нм. Экспериментальный спектр флуоресценции белка обелина имеет только один максимум в районе 500 нм. Т.к. пиразин является наиболее устойчивой формой, то если бы происходило его образование, то в спектре биолюминесценции и флуоресценции наблюдался бы чёткий пик в районе 535–550 нм. Поэтому можно сделать вывод, что пиразин-анион не образуется.

На данный момент не существует экспериментального доказательства, какая форма целентерамида является эмиттером реакции. Пиразин-анион не подходит под спектр флуоресценции, а фенолят-анион трудно смоделировать, потому что при оптимизации геометрии он структурно переходит в форму пиразина. В связи с этим была построена модель, в которой энергетическая разница между возбуждённым и основным уровнем зависит от положения протона между кислородом целентерамида и азотом аминокислотного окружения.

Моделирование переноса протона в системе His22-CLM показало, что для удаления протона от фенольной группы целентерамида на расстояние до 1,5 Å необходимо затратить энергию около 3,3 эВ, что соответствует энергии возбуждения флуоресценции. На расстоянии примерно 1,65 Å происходит излучение кванта света с энергией 2,5 эВ, что соответствует экспериментальным данным. Поскольку процесс излучения спонтанный, протон может возвращаться к целентерамиду с разных позиций, и это приводит к уширению пика флуоресценции. Таким образом, процесс флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина (возможно и других  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных фотопротеинов) хорошо моделируется перемещением протона от кислорода фенольной группы CLM до азота аминокислоты His22. Вероятнее всего, что аналогичный процесс имеет место и при биолюминесцентной реакции фотопротеинов. По-видимому, спектр биолюминесценции также определяется положением протона между атомом кислорода фенольной группы CLM в возбуждённом состоянии и атомом азота His22.

### §5.3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПУТЕЙ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНОЙ ФОРМЫ $\text{Ca}^{2+}$ -РЕГУЛИРУЕМОГО ФОТОПРОТЕИНА

В настоящее время детальный механизм реакции образования 2-гидроперокси-целентеразина при активации фотопротеинов не известен. Для установления интермедиатов реакции нами была проведена оптимизации геометрии целентеразина в форме CLZ(7H) в активном центре обелина (Рисунок 5.7). Согласно расчётам, CLZ(7H) пересекается в пространстве с аминокислотными остатками His175 и Trp135, что приводит к разрушению его структуры. Такой же результат получен для аниона CLZ(C2-). Показано, что только целентеразин в форме CLZ(2H) стабилен в целентеразин-связывающей полости, так как C(2) атом находится в  $sp^3$ -гибридизации, что приводит к изменению угла связи с боковым заместителем. Исходя из этих расчётов было предположено, что активный фотопротеин образуется из формы CLZ(2H).

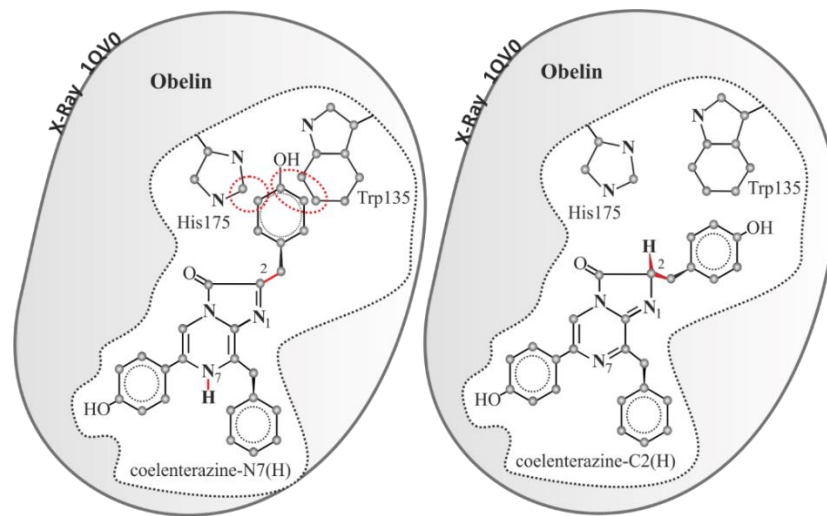


Рисунок 5.7 – Таутомерные формы целентеразина CLZ(7H) и CLZ(2H) в активном центре обелина

Поскольку целентеразин-связывающая полость фотопротеинов сформирована в основном гидрофобными аминокислотами, было предположено, что при быстром связывании целентеразина происходит изомеризация и образуется таутомерная форма CLZ(2H), которая затем реагирует с кислородом,

образуя гидроперекись. Этот процесс можно представить как одностадийный с образованием промежуточного состояния, когда протон от C(2) атома переходит на кислород с дальнейшим образованием 2НР-СТЗ (рисунок 5.8).

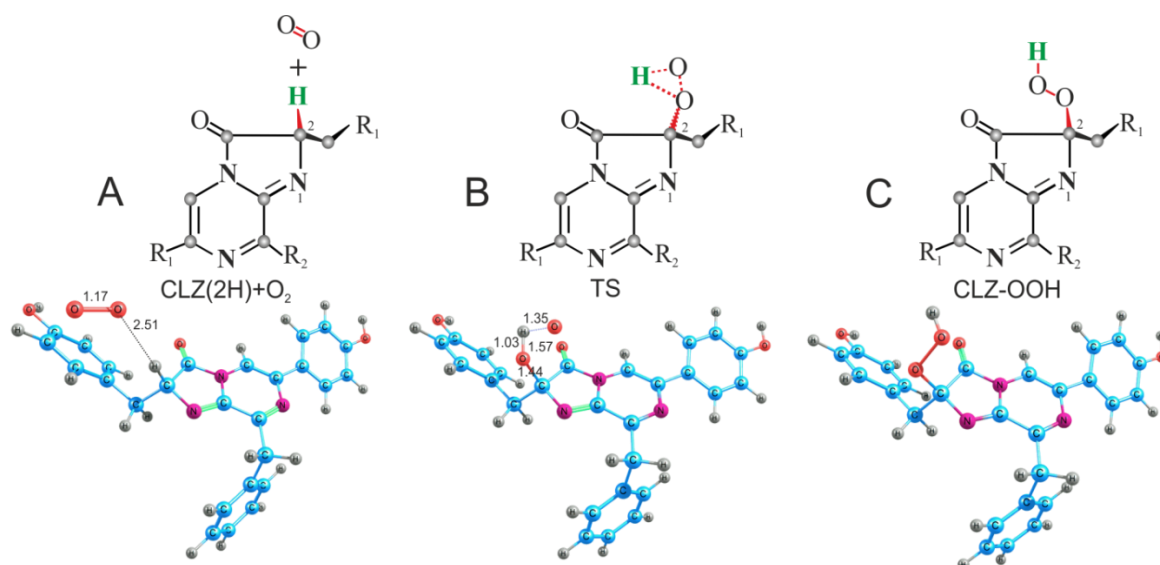


Рисунок 5.8 – Предположенный механизм образования 2-гидропероксицелентеразина (2НР-СТЗ)

Были проведены расчёты по моделированию пути данной реакции с построением адиабатических поверхностей потенциальных энергий (ППЭ) состояний, начиная с реактантов реакции CLZ(2H) и O<sub>2</sub> и заканчивая продуктом реакции CLZ-OOH (рисунок 5.8). Барьер реакции (MEХ) относительно триплетного состояния составил 135 кДж/моль, что является большим значением и превышает экспериментальное значение (45 кДж/моль) в три раза. Таким образом, можно сделать вывод, что реакция образования 2НР-СТЗ идёт по иному механизму, кроме того, по всей вероятности полость белка, связанного с продуктом реакции, отличается от полости для реактантов.

Для моделирования альтернативного пути реакции было обращено внимание к схеме, Хирано с соавторами [280] (рисунок 5.9), согласно которой реакция идёт с образованием анион-радикала кислорода.

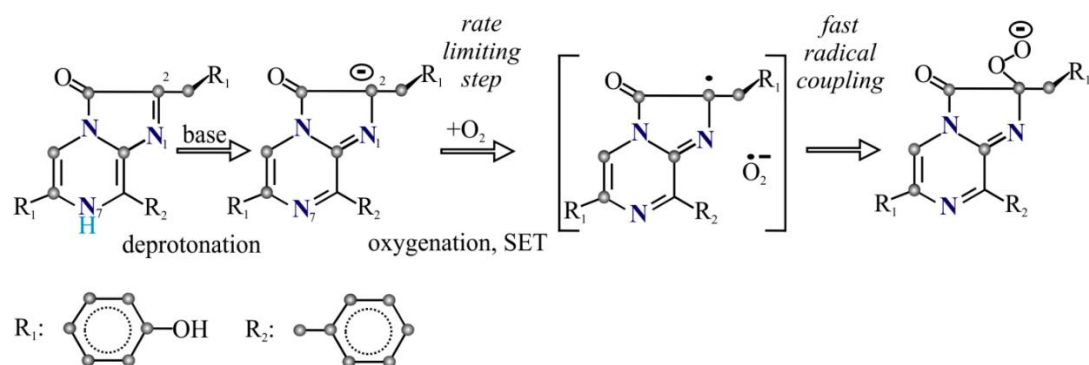


Рисунок 5.9 – Возможный механизм образования 2-гидропероксицелентеразина (2HP-CTZ) предложенный Хирано с соавторами [280]

В процессе моделирования присоединения молекулы кислорода к аниону целентеразина в газовой фазе к оптимизированной структуре  $\text{CLZ}(\text{C}2^-)$  добавили молекулу кислорода около C(2) атома (рисунок 5.10, А). В процессе оптимизации данного кластера происходила циклизация с последующим образованием структуры, соответствующей конечным продуктам реакции биолюминесценции — целентерамиду и  $\text{CO}_2$  (рисунок 5.10, С), минуя стадию образования  $\text{CLZ-OOH}$ .

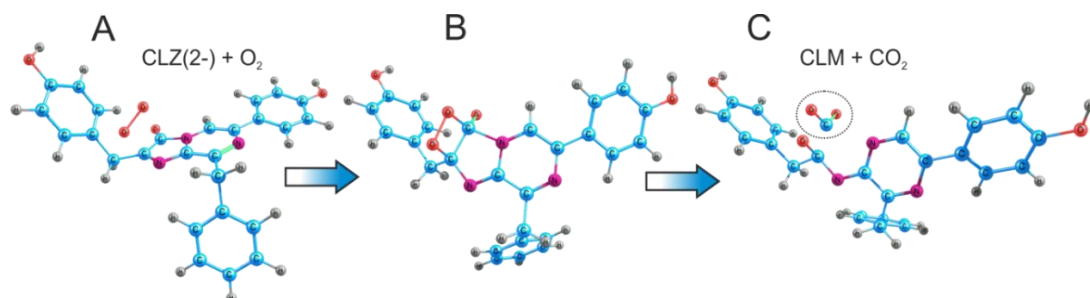


Рисунок 5.10 – Оптимизация аниона целентеразина и молекулы кислорода в газовой фазе

Таким образом, было предположено, что в белке 2-гидропероксицелентеразин стабилизируется аминокислотным окружением. Для проверки этого предположения для дальнейших расчётов были взяты два аминокислотных остатка активного центра – His175 и Tyr190, а также молекула воды в соответствии с данными кристаллической структуры белка (PDB код 1QV0) [290]. При этом His175 для расчётов брался в протонированном виде His175H(+). Исходя из предположения, что на момент начала реакции субстрат находится в полости белка в виде аниона целентеразина, моделирование реакции начинали с

нахождения точной геометрии структур системы CLZ(C2-)-His175H(+)-Tyr190-H<sub>2</sub>O методом  $\omega$ B97X-D/6-31G(p,d). Равновесная конфигурация, соответствующая началу реакции, представлена на рисунке 5.11, А.

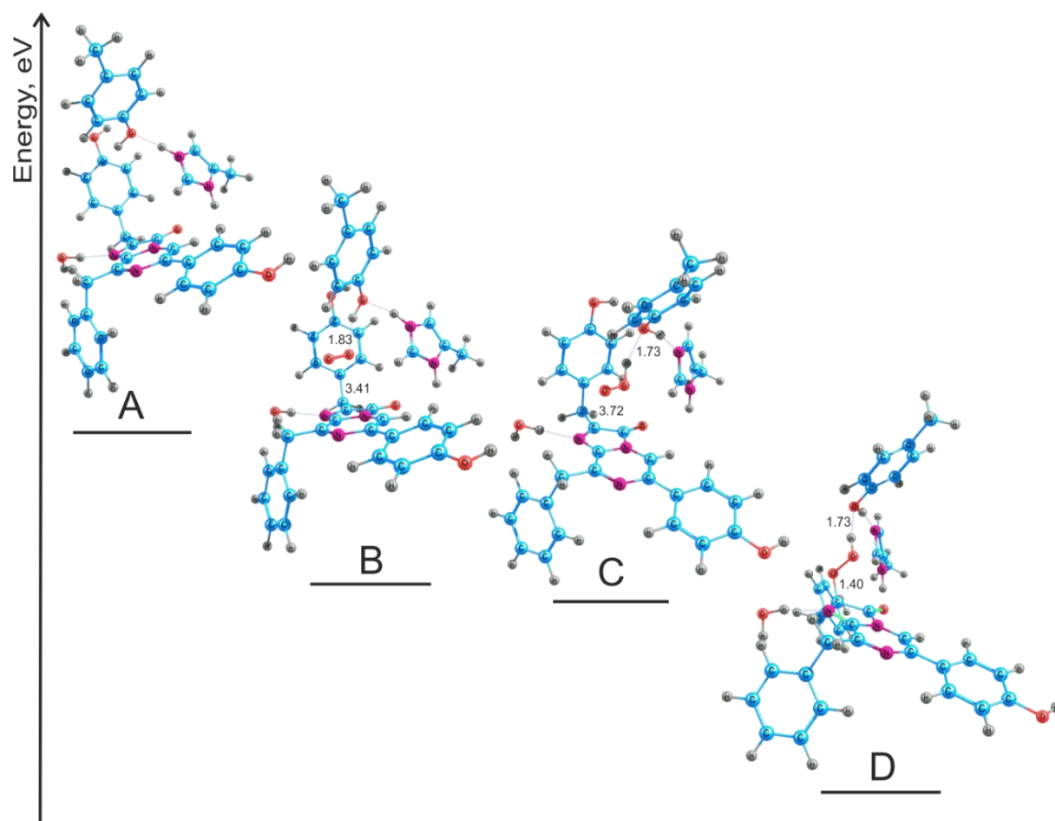


Рисунок 5.11 – Предложенный Механизм образования 2-гидропероксицелентеразина. А, В, С – возможные интермедиаты реакции D – продукт реакции

Далее в данную систему напротив C(2) атома добавляли молекулу кислорода, которая в процессе оптимизации занимала место вблизи Tyr190 на расстоянии 1,83 Å (рисунок 5.11, В), что сопровождалось перераспределением отрицательного заряда между субстратом и молекулой кислорода. Значение заряда, появившегося на кислороде, было равно  $-0,32 e^-$ , при этом на субстрате оставалась большая часть отрицательного заряда, равная  $-0,51 e^-$ . Энергия межмолекулярного взаимодействия кислорода с остальными молекулами системы составила - 64 кДж/моль, что говорит о сильном взаимодействии и о том, что образование кластера CLZ(C2-)-O<sub>2</sub>-His175H(+)-Tyr190-H<sub>2</sub>O энергетически выгодно. Данная энергия была рассчитана вычитанием из полной энергии системы CLZ(-)-O<sub>2</sub>-

His175H(+)-Tyr190-H<sub>2</sub>O энергии системы CLZ(-)-His175H(+)-Tyr190-H<sub>2</sub>O и энергии кислорода, оптимизированного в вакууме.

Далее была проверена возможность переноса протона с His175 на Tyr190 с образованием структуры Tyr190H(+), а затем переноса протона с Tyr190 на кислород. В ходе оптимизации кластера получить такое состояние не удалось; система переходила в состояние, соответствующее рисунку 5.11, В. Также не удалось получить структуру, соответствующую переносу протона с Tyr190 на кислород с сохранением протона на His175, поэтому далее мы рассматривали одновременный перенос протонов с His175 на Tyr190, а с Tyr190 на кислород. В результате было получено стабильное состояние, изображённое на рисунке 5.11, С. Согласно расчётам, на данном этапе реакции, субстрат находится в CLZ(C2-) форме. Присоединение -ООН группы к CLZ(C2-) с образованием 2-гидропероксицелентеразина проходит безбарьерно за счёт сильного кулоновского взаимодействия, т.е. разности зарядов двух структур (рисунок 5.11, D).

Таким образом, лимитирующей стадией реакции является стадия переноса протонов (рисунок 5.11, В-С). Для нахождения барьера реакции была построена адиабатическая ППЭ, при этом рассматривали все возможные пути переноса протонов и следили за спиновым состоянием, добиваясь того, чтобы электроны находились на разных участниках реакции, что достигалось установкой триплетного состояния (рисунок 5.12). При этом один электрон всегда находился на молекуле кислорода, а второй – на молекуле целентеразина. Расстояния  $\vec{r}_1$  и  $\vec{r}_2$  (рисунок 5.12, А), которые в ходе реакции должны пройти протоны, разбивали на пять промежуточных точек (шагов), рассчитывали энергии структур, соответствующих всем возможным комбинациям данных шагов, и по полученным данным построили ППЭ и карту ППЭ (рисунок 5.12, В, С). Энергию структуры, соответствующей перешедшим протонам, приняли за ноль и проводили построение в относительных энергиях. Наиболее выгодный энергетический путь указан стрелками (рисунок 5.12, В, С). Исходя из расчётов, оба протона начинают движение одновременно, затем идёт перемещение только одного протона от Tyr190 к кислороду. Не доходя до молекулы кислорода на расстояние, необходимого для

образования связи, этот протон останавливается. Второй протон начинает движение от His175 к Tyr190 и также останавливается на небольшом расстоянии от Tyr190. Только после этого оба протона продолжают движение вплоть до образования химических связей. Можно сказать, что механизм данной реакции близок к последовательному.

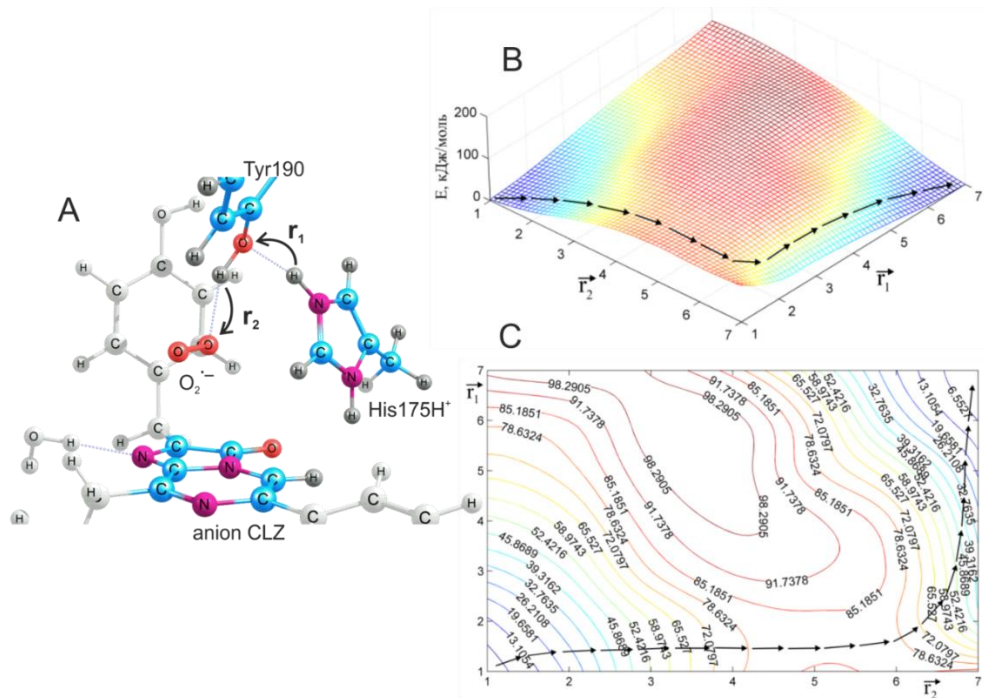


Рисунок 5.12 – Моделирование движение протонов в системе целентеразин-анион, молекула кислорода, His175H(+) и Tyr190. А – вид кластера для расчётов; В – трёхмерная поверхность потенциальной энергии (ППЭ) перехода протонов; С – контурная карта ППЭ

Для нахождения точного значения барьера реакции проводили оптимизацию структуры, используя геометрию пятой точки как начальную, при этом положения атомов водорода фиксировались (рисунок 5.12). Барьер реакции составил 61 кДж/моль, что хорошо согласуется с экспериментальными данными (45 кДж/моль). Таким образом, можно предположить, что в ходе реакции субстрат находится в формах CLZ(C2-) и CLZ-OОН и 2-гидропероксицелентеразин образуется по предложенному ниже механизму (рисунок 5.13).



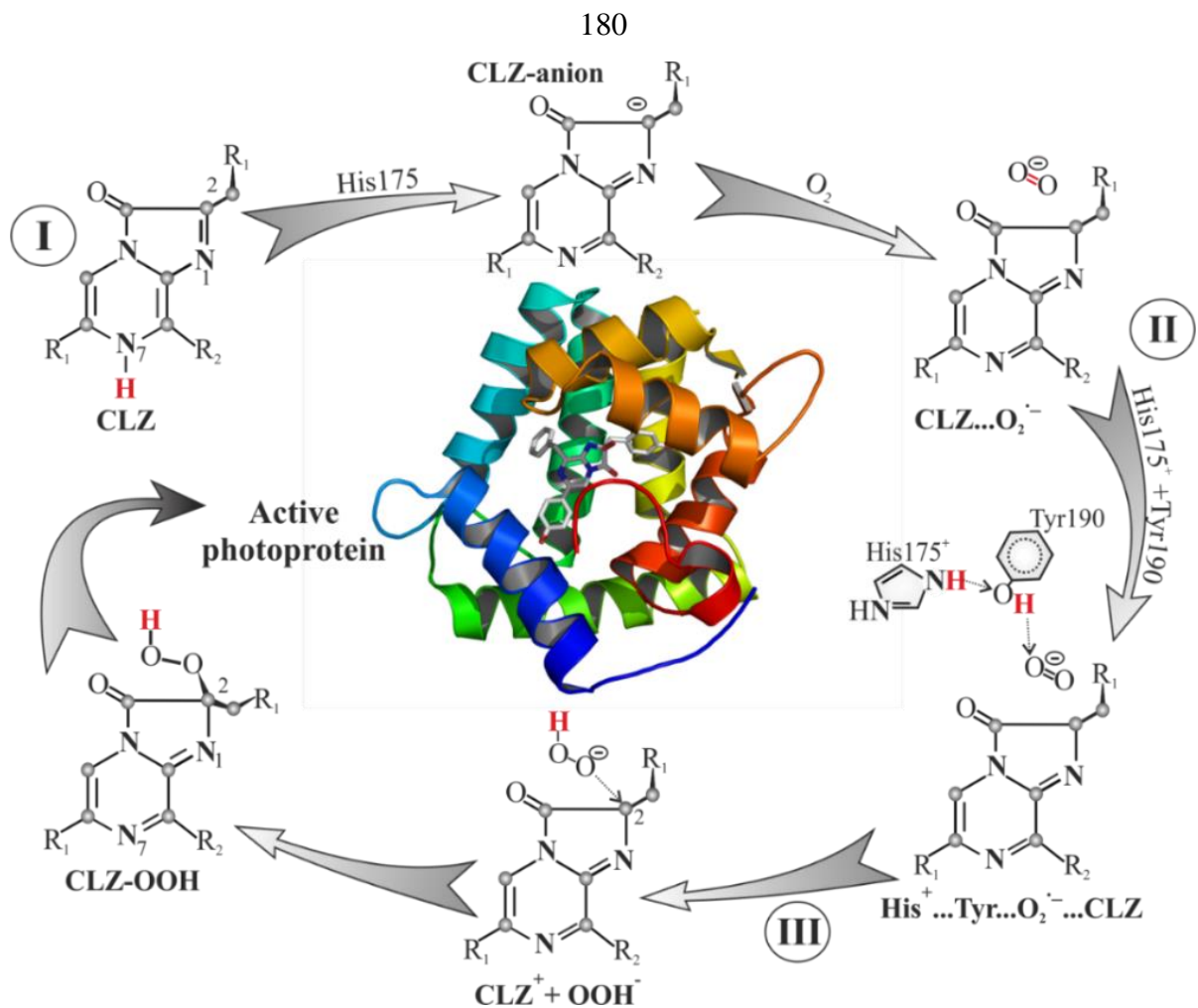


Рисунок 5.13 – Схема образования 2-гидропероксицеллентеразина в активном центре фотопротеина

Начальное формирование комплекса апобелка с целлентеразином происходит в течение миллисекунд. После связывания субстрата образуется анион целлентеразина при участии His175, действующего как основание. Следующим шагом является образование анион-радикала кислорода. Этот процесс может занимать десятки минут (рисунок 5.13, I). Затем при участии Tyr190 происходит передача протона на анион-радикал кислорода с образованием активной частицы OOH<sup>-</sup> (рисунок 5.13, II), которая в свою очередь взаимодействует с субстратом с образованием 2-гидропероксицеллентеразина (рисунок 5.13, III), завершая реакцию образования активного фотопротеина.



#### §5.4. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦЕЛЕНТЕРАМИДА

Целентерамид представляет собой фотохимически активную молекулу; он может быть донором протонов в своих электронно-возбуждённых состояниях, генерируя несколько форм с разной энергией флуоресцентного состояния [283] и, следовательно, с разным цветом флуоресценции. Химическая структура CLM (нейтральная и ионизированная формы) представлена на рисунке 5.14. Ароматические фрагменты, которые могут участвовать в электронном возбуждении, отмечены здесь буквами F, P и B, соответствующими фенольному, пиразиновому и бензольному кольцам соответственно. На рисунке 5.14 схематически показаны различные энергии флуоресцентных состояний нейтральной и ионизированной (или частично ионизированной) форм CLM. Вклад форм в видимые спектры флуоресценции зависит от эффективности фотохимического процесса (рисунок 5.14) и определяется микроокружением CLM в белках или растворах [291–296].

Первый флуоресцентный белок, содержащий целентерамид, был выделен и изучен профессором Шимомура одновременно с GFP. Он получил название «Голубой флуоресцентный белок» [297]. В отличие от GFP, флуоресцентные белки, содержащие CLM, не нашли широкого применения в биомедицинских исследованиях, и их потенциал в качестве цветных биомаркеров в настоящее время недооценивается. Поскольку биолюминесценция фотобелков зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ , она инициируется в биологических жидкостях при физиологических концентрациях кальция. Это основа медико-биологического применения биолюминесценции фотобелка в различных видах диагностики: для контроля содержания  $\text{Ca}^{2+}$ , локализации белков в клетках и тканях и др. Кроме того, биолюминесценция фотопротеинов используется в качестве внутриклеточного маркера [298,299]. Это причины для интенсивных исследований механизма биолюминесценции, в том числе формирования эмиттера биолюминесценции. Обелин гидроида *Obelia longissima* в настоящее время интенсивно изучается [300–304]. Созданы генетически модифицированные формы обелина с разной окраской

биоломинесценции [305]. Экспериментально продемонстрирована активность верхних электронно-возбуждённых состояний связанного с ферментом CLM в реакции биоломинесценции обелина [306]; обсуждается сходство с процессами возбуждения других светящихся организмов (бактерий и светлячков) [306,307].

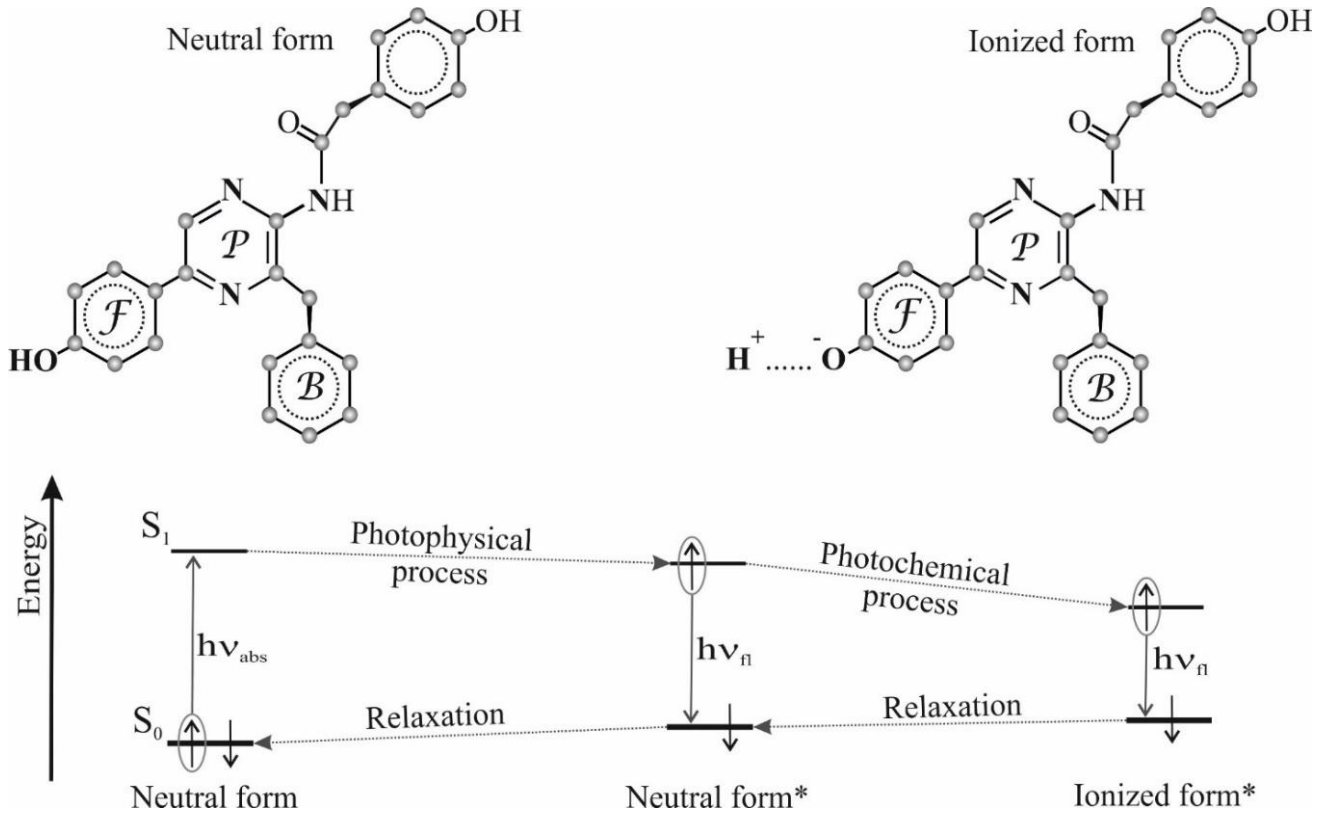


Рисунок 5.14 – Схема фотофизических и фотохимических процессов во флуоресцентных белках, содержащих целентерамид. Буквами F, P и B обозначены фенольные, пиразиновые и бензольные кольца соответственно

Продукт биоломинесцентной реакции обелина, «выделенный обелин», белок, содержащий CLM, в настоящее время находится под теоретическим [291–296] и экспериментальным [302,303] вниманием. Эксперименты по флуоресценции с временным разрешением были проведены в [308] для определения характеристик флуоресценции нейтральной и ионизированной форм выделяемого обелина. Компоненты сложных фотолуминесцентных спектров выделенного обелина и акворина были изучены и отнесены к различным формам CLM [309]; изменения спектрального состава анализировали при изменении концентрации кальция [310], при воздействии более высоких температур [176,311] и экзогенных соединений

[312,313]. В [311,313] спектры разряженного обелина анализировали при различных энергиях возбуждения. Было обнаружено, что спектры зависят от длин волн возбуждения: возбуждение с более высокой энергией (260-300 нм) инициирует флуоресценцию не только в видимой области спектра, но и в ближней УФ области. Возникновение этого типа флуоресценции представляет особый интерес. Известно, что слабосопряжённые ароматические структуры ответственны за ближнюю УФ-флуоресценцию. В выделенных фотобелках (белках, содержащих CLM) это могут быть ароматические фрагменты аминокислотных остатков, а также ароматические фрагменты CLM.

В этой части, работа была направлена на характеризацию УФ-флуоресценции разряженных фотобелков и определение фрагментов, ответственных за испускание УФ-излучения. Спектры индуцированной светом флуоресценции трёх разряженных фотобелков (обелина, акворина и клитина) при разных длинах волн возбуждения регистрировались и сравнивались. Спектры флуоресценции CLM в метаноле были измерены и проанализированы, взяв их в качестве флуорофорной модели для CLM-содержащих белков. Квантовохимические расчёты позволили выяснить особенности спектров поглощения и излучения CLM в метаноле и выявить фрагменты молекул, ответственные за УФ-флуоресценцию.

Расчёты проводились с использованием теории функционала плотности в рамках функционала B3LYP с базисом cc-pVDZ в пакете GAMESS как в газовой фазе, так и в растворе метанола. Для моделирования среды метанола использовались две модели: «простая» модель поляризованного континуума (PCM) и альтернативная корректирующая сольватационная модель, основанная на плотности (SMD). Поскольку применение обеих моделей привело только к разнице в спектрах поглощения и флуоресценции в несколько нанометров, можно было сделать вывод об эквивалентности моделей в выбранных условиях. Результаты для SMD представлены ниже. Спектры поглощения и излучения молекулы целентерамида, по-видимому, существенно зависят от типа возбуждения. Расчёт проводился как для вертикального SMD, так и для адиабатического SMD\*

возбуждения. Различия до 7 нм и 15 нм способствуют предпочтению SMD\* для поглощения и излучения соответственно. Структура CLM из фотобелка обелина (PDB код 1S36) была выбрана в качестве начальной геометрии для расчётов, чтобы обеспечить сравнение с целентерамидом, связанным с белком. Геометрия основного состояния целентерамида была полностью оптимизирована в газовой фазе и SMD с использованием B3LYP/сс-pVDZ. Исходя из геометрии наземного равновесия, расчёты спектра поглощения были выполнены с помощью, TD/Газовая фаза или SMD или SMD\*/B3LYP/сс-pVDZ. Геометрия возбуждённого состояния целентерамида была оптимизирована с использованием B3LYP/сс-pVDZ в газовой фазе, SMD и SMD\*. Энергии излучения для этих геометрий были получены методом TD-DFT, также проводили  $\Lambda$ -диагностику. «Лямбда-диагностика» является критерием отделения валентных состояний от состояний с переносом заряда и ридберговских состояний. Малое значение  $\Lambda$  означает дальное действие; большое значение означает короткодействующее возбуждение. Локальные возбуждения имеют относительно большое перекрытие,  $0,45 < \Lambda < 0,89$ , что указывает на то, что занятые и виртуальные орбитали, участвующие в возбуждении, занимают аналогичные области пространства. Этого следовало ожидать для локальных возбуждений, где степень перераспределения заряда мала. Лямбда-диагностика даёт  $0,65 < \Lambda < 0,75$  для всех расчётов. Это указывает на то, что перенос заряда не играет существенной роли в молекуле целентерамида в процессах поглощения и излучения. Общая схема квантовохимических расчётов молекулы целентерамида методом B3LYP/сс-pVDZ представлена на рисунке 1.2.

Рисунок 5.15 демонстрирует, что спектры излучения CLM зависят от возбуждения: возбуждение в нижние электронно-возбуждённые состояния (310-400 нм) инициирует флуоресценцию в видимой области с максимумом 420 нм, а возбуждение в верхние электронно-возбуждённые состояния (260-300 нм) инициирует дополнительную эмиссию в УФ-А области с максимумом 330 нм.

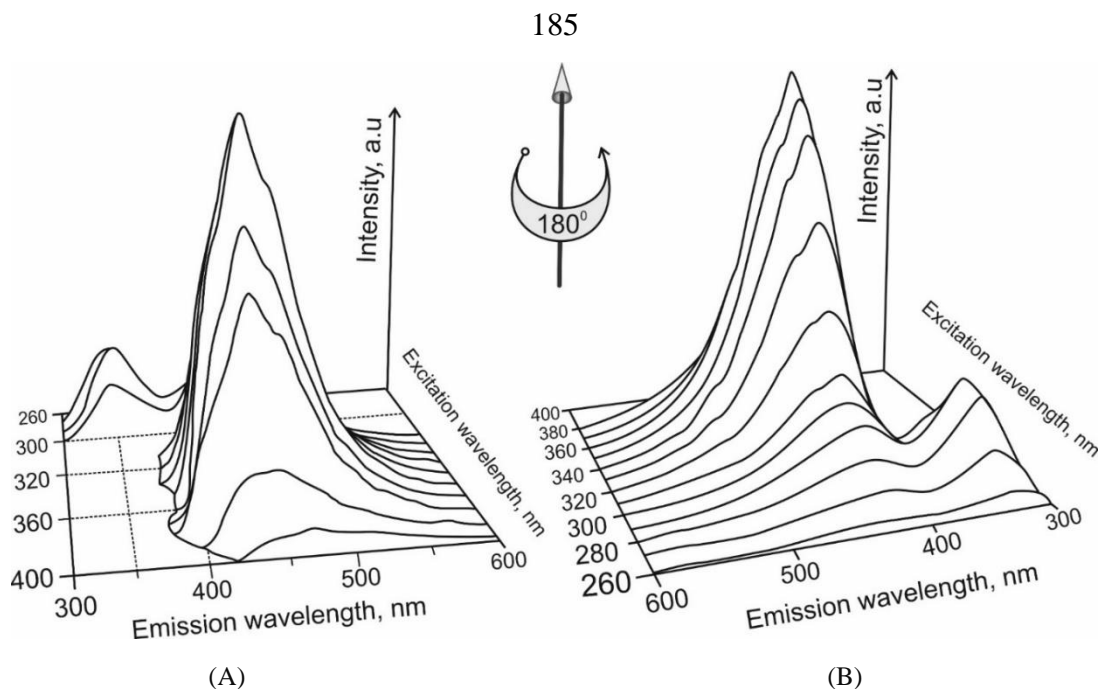


Рисунок 5.15 – Флуоресценция целентерамида в метаноле,  $C = 2,2 \cdot 10^{-6}$  М. Вид (А) - 3D-спектры флуоресценции; вид (В) – поворот А на  $180^\circ$

Рисунок 5.16, А показывает, что экспериментальные и теоретические спектры поглощения СЛМ в метаноле близки: их максимумы составляют 277, 295 и 332 нм против 264, 293 и 332 нм для экспериментов и расчётов. Максимумы совпадают с определенными ранее в [314]. Напротив, экспериментальный и теоретический спектры флуоресценции СЛМ разошлись: их максимумы составляют 330 и 420 нм против 318 и 397 нм соответственно (рисунок 5.16, В). Это расхождение между предсказанными и экспериментальными значениями следует из неполноценности теоретической модели, которая не учитывает растворитель явно. Максимум флуоресценции СЛМ в видимой области (420 нм, рисунок 5.16, В) можно сравнить с максимумом флуоресценции нейтральной формы СЛМ, связанной с белком. При возбуждении с более высокой энергией (280 нм, рисунок 5.16, В) наблюдается пик ближнего УФ-А (330 нм), аналогичный флуоресценции фотобелка.

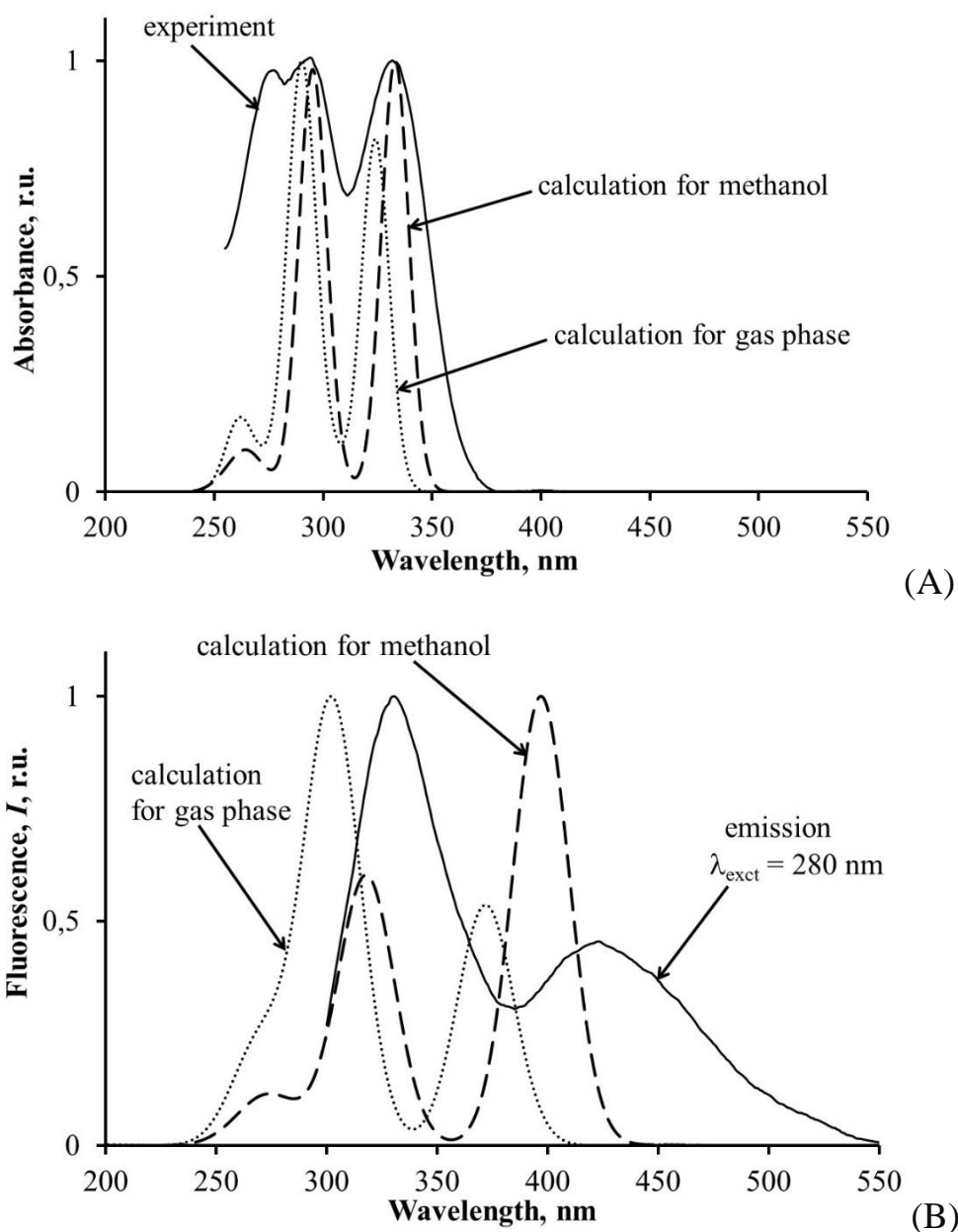


Рисунок 5.16 – Экспериментальные и теоретические спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) целентерамида.  $C_{\text{CLM}} = 2,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , метанол

Описание электронных переходов в молекуле CLM и молекулярных орбиталей CLM, участвующих в процессе возбуждения, дано на рисунке 5.17. На этом рисунке показано, что длинноволновый (397 нм) пик образован избирательным переходом между LUMO и HOMO. Коротковолновый пик с максимумом 318 сложен; он включает три перехода от LUMO + 1 к: HOMO, HOMO-2 и HOMO-3 (рисунок 5.17). Коротковолновый флуоресцентный пик

свободной CLM (318 нм в предсказанной модели и 330 нм в эксперименте (рисунок 5.16, В), а также его электронные переходы (рисунок 5.17) были описаны впервые.

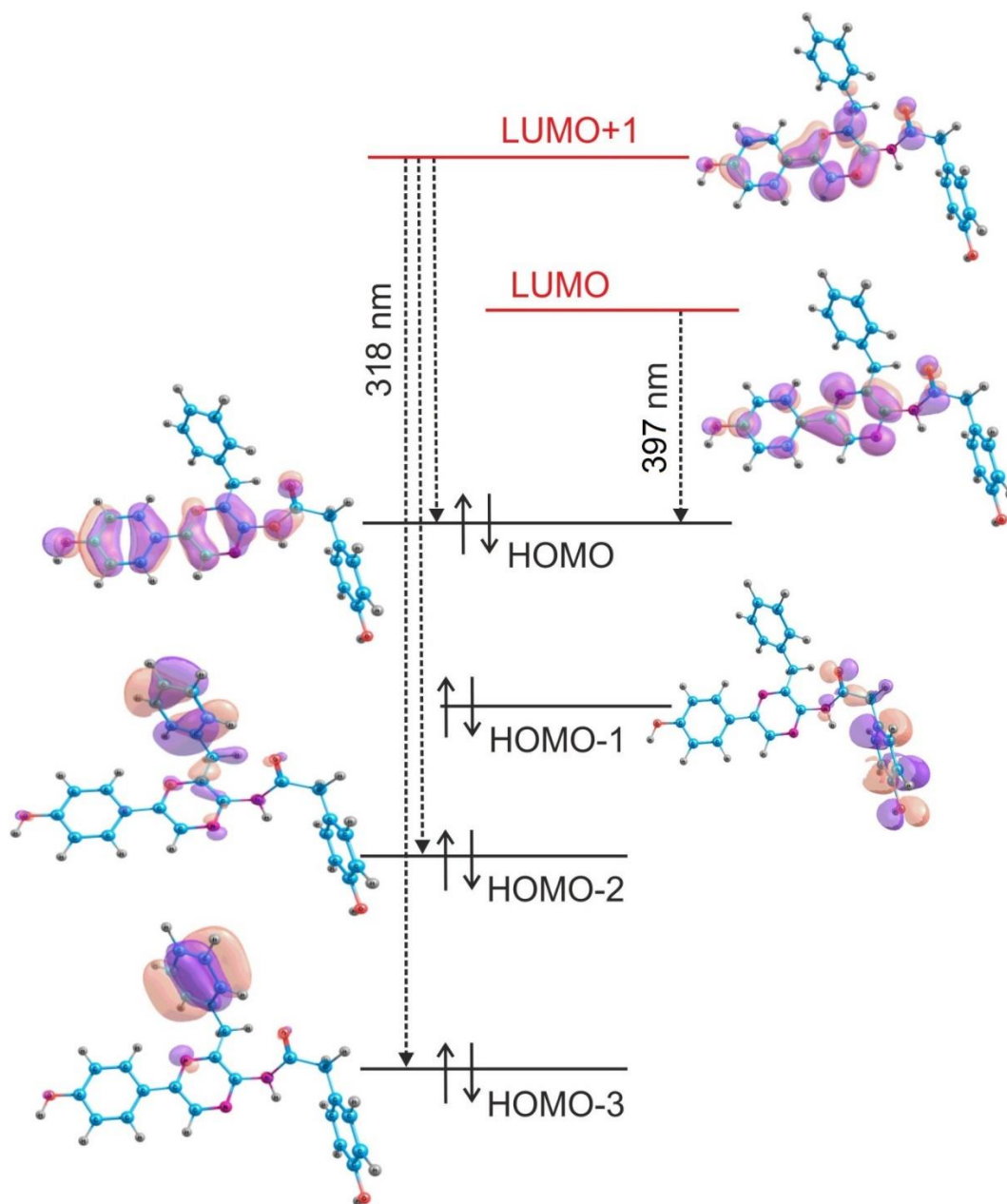


Рисунок 5.17 – Схема электронных переходов целентерамида и молекулярных орбиталей, участвующих в флуоресценции.

Расчёт – SMD\*/TD/B3LYP/cc-pVDZ

В предыдущих исследованиях [291,295] рассматривалась только видимая флуоресценция CLM. Они обнаружили, что видимая флуоресценция представляет собой комбинацию излучений нейтральной и ионизированной форм CLM, причём первая включает электронные переходы LUMO → HOMO и LUMO → HOMO-1, а вторая - электронные переходы LUMO → HOMO и LUMO + 1 → HOMO. Все

молекулярные орбитали, участвующие в электронных переходах, локализованы на пиразиновом, фенольном и бензольном фрагментах молекулы CLM (рисунок 5.17). Эти фрагменты обозначены буквами Р, F и В на рисунок 5.14. Вероятно, аналогичные электронные переходы вносят вклад в УФ-флуоресценцию разряженных фотобелков.

Можно констатировать что фотовозбуждение в верхние электронно-возбуждённые состояния CLM-содержащих флуоресцентных белков (разряженных фотопротеинов обелина, акворина и клитина) инициирует эмиссию в ближней УФ-области в дополнение к видимой сине-зелёной флуоресценции. Обнаружено, что нейтральная форма CLM, флуорофор белков, может способствовать этой УФ-флуоресценции. Были проведены экспериментальные и теоретические исследования для характеристики УФ-флуоресценции CLM. Вероятно, что не только нейтральная форма CLM, но и ионизированная форма CLM, наряду с низкосопряжёнными ароматическими структурами аминокислотных остатков белка, могут вносить вклад в УФ-флуоресценцию разряженных фотопротеинов. Эта может служить основой для дальнейших исследований белок-целентерамидных взаимодействий во флуоресцентных белках. В целом, это способствует получению знаний о переносе внутренней энергии в биологических структурах – комплексах белков с легковесными ароматическими молекулами. Особый интерес представляет миграция энергии с участием верхних электронно-возбуждённых состояний в биологических процессах.

## **§5.5. ВЛИЯНИЕ ГЕОМЕТРИИ, РАСТВОРИТЕЛЯ И ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ НА ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦЕЛЕНТЕРАЗИНА И ЕГО АДДУКТА 2-ГИДРОПЕРОКСИЦЕЛЕНТЕРАЗИНА**

Электронные возбуждения, относящиеся к спектрам целентеразина и его аддукта 2-гидропероксицелентеразина, были смоделированы с помощью теории функционала плотности и TD-DFT. Биолюминесценция широко распространена



среди морских обитателей. Многие из этих организмов генерируют свет, используя целентеразин (CTZ) в качестве субстрата в реакциях, катализируемых различными биолюминесцентными белками. Среди них  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины представляют собой уникальный класс белков, использующих целентеразин. Фотопротеин образует фермент-субстратный комплекс, состоящий из одноцепочечного глобулярного белка, во внутренней полости которого нековалентно связан пероксизамещенный целентеразин, 2-гидропероксицелентеразин (2HP-CTZ, рисунок 5.18).

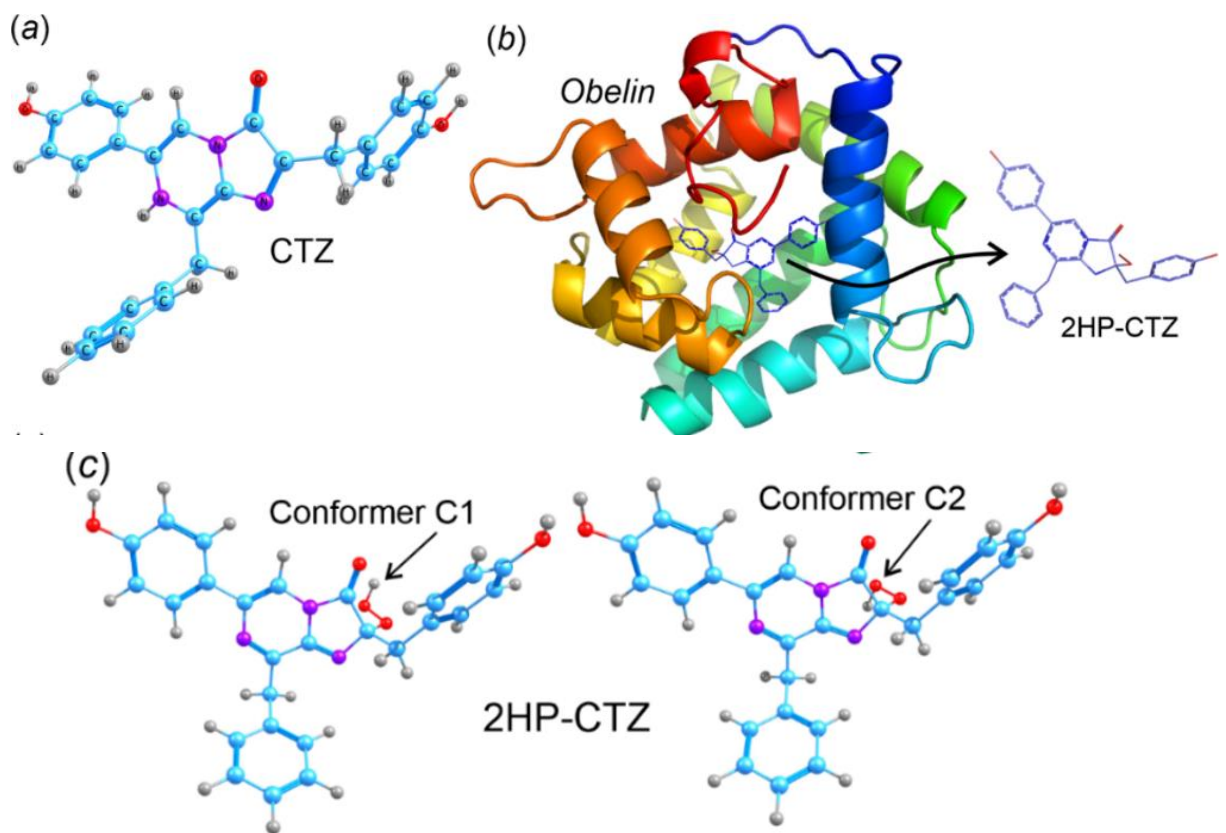


Рисунок 5.18 – Молекулярные структуры, использованные для расчета спектров оптического поглощения: (a) целентеразин (CTZ); (b), 2-hydroperoxycelenterazine (2HP-CTZ) в конформации, соответствующей конформации в кристаллической структуре обелина; (c) C1 и C2 конформеры 2HP-CLZ. Атомы С, О, Н и N окрашены в синий, красный, серый и фиолетовый цвета, соответственно.

Связывание ионов кальция с фотопротеином необходимо для запуска реакции декарбоксилирования 2-гидроперокси аддукта целентеразина с образованием связанного с белком продукта, целентерамида (CLM), в возбуждённом состоянии [315,316]. Релаксация возбуждённого CLM в основное состояние сопровождается эмиссией света со спектральным максимумом в диапазоне 465-495 нм [284]. Структуры нескольких  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов в различных конформационных состояниях были определены для акворина, обелина, цитина и митрокомина, связанных с 2HP-CTZ [266,317–320], обелина, связанного с CLM [265,321], а также апо-акворина и апо-обелина, связанных с ионами кальция [322].

Спектры поглощения фотопротеинов ктенофор отличаются от спектров фотопротеинов гидромедуз. Если последние поглощают свет с максимумом при 460-470 нм [276,323], то максимум поглощения фотопротеинов ктенофора находится при 437 нм [324], что очень близко к максимуму поглощения целентеразина в метаноле ( $\lambda_{\text{max}} = 435$  нм) [276] (рисунок 5.19). Учитывая, что поглощение фотопротеинов в видимой области определяется связанным 2-гидроперокси аддуктом целентеразина, это различие можно объяснить различием в структуре связанного субстрата и его аминокислотного окружения в полости субстрата. Но для начала необходимо разобраться со структурой субстрата в обелине что бы в будущем возможно было определиться с изменением структуры целентеразина в других фотопротеинах. В данном разделе с помощью теории функционала плотности (DFT) изучено влияние геометрии, растворителей и заместителей на спектральные свойства поглощения целентеразина и его аддукта 2-гидроперокси.

Согласно данным, представленным на рисунок 5.19 и в таблице 5.3, модель SMD, независимо от используемого функционала, хорошо описывает экспериментальный максимум поглощения с точностью 2-5 нм. Во всех расчётах сила осциллятора лежит в одном и том же диапазоне (0,17-0,32). Для поиска наилучшего DFT-функционала спектральные характеристики CTZ были рассчитаны с использованием функционалов CAM-B3LYP, PBE0, M06-2X и M08-

SO (таблица 5.3). Для моделей PCM и SMD длина волны максимума поглощения, определенная методом B3LYP, ближе к экспериментальному значению ( $\lambda_{\text{abs}} = 430$  и 435 нм). Для расчётов всех электронных структур молекулы CTZ, связанной в активном сайте молекулы беровина, был выбран подход SMD/B3LYP.

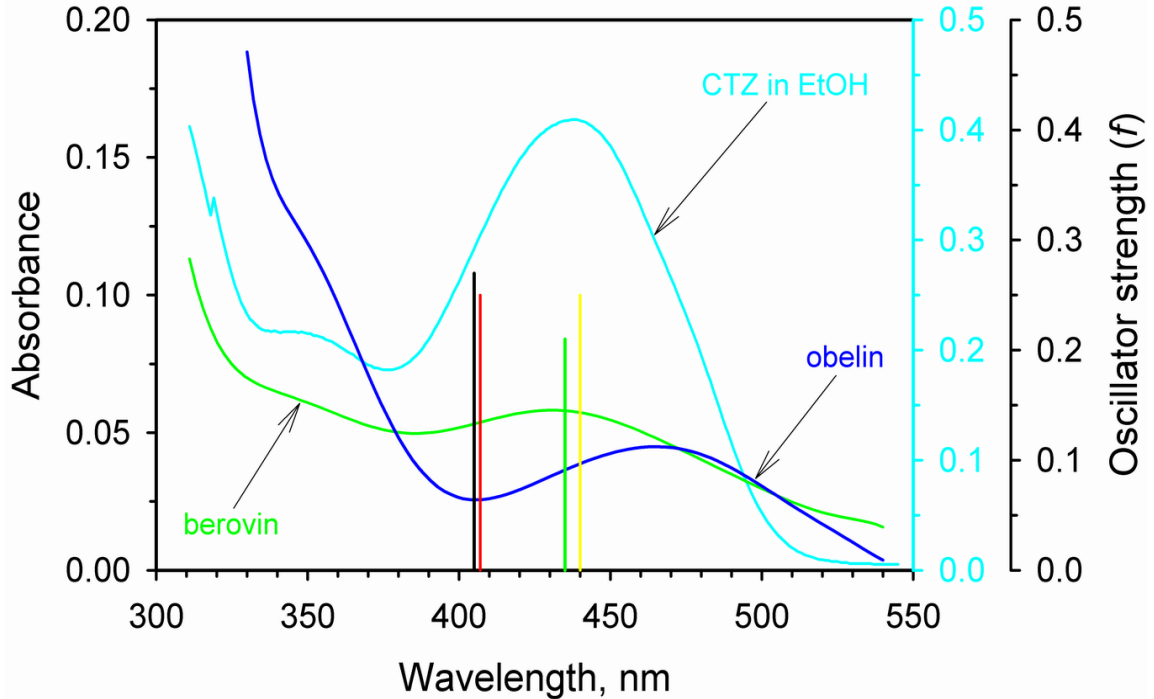


Рисунок 5.19. – Спектры поглощения обелина (синяя линия), беровина (зелёная линия) и целентеразина в этаноле (голубая линия). Черные, красные, жёлтые и зелёные линии – рассчитанные спектры поглощения CTZ в метаноле, с помощью TD/PCM/B3LYP/cc-pVDZ, TD/SMD/B3LYP/cc-pVDZ, TD/SMD/CAM-B3LYP/cc-pVDZ и TD/PCM/CAM-B3LYP/cc-pVDZ, соответственно.

Расчётная схема для исследования оптических свойств активного фотопротеинового субстрата представлена на рисунке 5.18. Для выбора подходящего метода электронное возбуждение для основного пика в спектре поглощения молекулы CTZ было рассчитано с использованием набора функционалов DFT и двух моделей сольватации (рисунок 5.18 а, таблица 5.3). CTZ был выбран, так как его спектр поглощения в метаноле известен ( $\lambda_{\text{max}}$  в видимой области находится при 435 нм) [276]. Затем выбранный метод расчета был применён для исследования оптических свойств молекулы 2HP-CTZ.

Таблица 5.3 – Возбуждения  $S_0 \rightarrow S_1$  в CTZ (рисунок 5.18 а) в метаноле, рассчитанные с помощью нескольких DFT-функционалов<sup>a</sup>

	B3LYP		CAM-B3LYP		PBE0		M06-2X		M08-SO	
	PCM	SMD	PCM	SMD	PCM	SMD	PCM	SMD	PCM	SMD
$\lambda_{\text{abs}}$	430 (447)	435 (439)	405 (407)	407 (403)	442	434	415	409	415	410
$E$	2,76 (2,77)	2,77 (2,82)	3,06 (3,05)	2,84 (2,84)	2,81	2,85	2,99	3,03	2,99	3,03
$f$	0,171 (0,191)	0,179 (0,218)	0,262 (0,291)	0,179 (0,323)	0,168	0,179	0,223	0,255	0,238	0,271
$\Lambda$	0,751(0,748)	0,750 (0,752)	0,744(0,738)	0,745(0,743)	0,748	0,751	0,742	0,747	0,739	0,742

<sup>a</sup> $\lambda_{\text{abs}}$  (нм) – длина волны поглощения,  $f$  (отн. ед.) – сила осциллятора,  $E$  - энергия поглощения (эВ),  $\Lambda$  - параметр, описывающий физические характеристики возбуждения. Расчёты проводились с набором базисов cc-pVDZ (в скобках указано aug-cc-pVDZ). В качестве моделей растворителя были выбраны PCM и SMD для учёта эффекта сольватации в метаноле. Экспериментальный максимум поглощения CTZ в метаноле составляет **435** нм.

Поскольку органические молекулы с  $\sigma$ -связями могут иметь множество конформеров, в качестве отправной точки для оптимизации геометрии была взята конформация 2HP-CTZ в кристаллической структуре обелина (PDB-код 1QV0) (рисунок 5.18 b). Водород пероксидной группы в 2HP-CTZ способен принимать транс- (C1) и цис- (C2) конформации (рисунок 5.18 c), которые могут иметь различные спектральные свойства, поскольку пероксид находится близко к хромофорной группе (таблица 5.4) и может образовывать водородную связь. Поэтому было исследовано влияние пероксидных конформаций пероксидной группы на оптические свойства молекулы 2HP-CTZ. Была выбрана пероксидная конформация, дающая наилучшее совпадение расчётных и экспериментальных спектров поглощения 2HP-CTZ в видимом диапазоне ( $\lambda_{\text{max}} = 460\text{-}470$  нм, [276,323] таблица 5.4).

Для моделирования спектров поглощения CTZ в метаноле были проведены вертикальные TD-DFT-расчёты с использованием SMD для описания эффектов растворителя с одинаковой диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$  как в основном, так и в возбуждённом состояниях. Для поиска наилучшего DFT-функционала спектральные характеристики CTZ были рассчитаны с использованием функционалов CAM-B3LYP, PBE0, M06-2X и M08-SO (таблица 5.3). Некоторые

расчёты были повторены с более широким набором базисов aug-cc-pVDZ, включающим диффузные функции. B3LYP/SMD/cc-pVDZ даёт наилучшее согласие с экспериментально определенным максимумом поглощения ( $\lambda_{\max} = 435$  нм) [276]. Учитывая, что результаты для большего базисного набора практически совпадают с результатами для cc-pVDZ, был выбран последний (таблица 5.3), поскольку он меньше.

Таблица 5.4 – Длины волн поглощения  $\lambda_{\text{abs}}$  (нм) и силы осцилляторов  $f_{\text{abs}}$  (отн. ед.) для возбуждений  $S_0 \rightarrow S_1$  в конформерах 2HP-CTZ, рассчитанные на уровне теории B3LYP/SMD/cc-pVDZ.

Конформер <sup>a</sup>	Газовая фаза	Метанол	Вода
	$\lambda_{\text{abs}}$ ( $f_{\text{abs}}$ )	$\lambda_{\text{abs}}$ ( $f_{\text{abs}}$ )	$\lambda_{\text{abs}}$ ( $f_{\text{abs}}$ )
C1	<b>473</b> (0,021) <sup>b</sup>	485 (0,032)	486 (0,032)
C2	480 (0,022)	493 (0,027)	494 (0,028)

<sup>a</sup>См. рисунок 5.18 с.

<sup>b</sup>Экспериментальный максимум поглощения 2HP-CTZ, связанного в обелине, находится при 460-470 нм [276,323].

Молекулярная структура 2HP-CTZ была оптимизирована с помощью DFT на уровне B3LYP/cc-pVDZ, реализованном в GAMESS. Электронные возбуждения для спектров поглощения были рассчитаны с помощью TD-DFT в оптимизированном основном синглетном состоянии. Для 2HP-CTZ расчёты проводились в газовой фазе ( $\epsilon = 1$ ), метаноле ( $\epsilon = 33$ ) и воде ( $\epsilon = 78$ ). Исходная структура 2HP-CTZ была взята из кристаллической структуры обелина (PDB-код 1QV0, рисунок 5.18 b). Результаты расчётов сведены в таблице 5.3 и 5.4. В результате этих проверочных тестов были выбраны B3LYP/cc-pVDZ и конформер C1.

Экспериментальные данные показывают, что максимумы в спектрах поглощения лежат в интервале 460-470 нм (рисунок 5.19). Из таблицы 5.4 видно, что конформация C2 всегда смещена в длинноволновую область по сравнению с конформацией C1 на 7 нм и более. Разница между полными энергиями

конформаций C1 и C2 в газовой фазе составляет 17,3 кДж/моль. Использование модели растворителя добавляет к условиям газовой фазы 13-14 нм, т.е. происходит батохромный сдвиг. При этом разница между рассчитанными структурами в длине волны поглощения составляет всего 1 нм для условий метанола и воды, в то время как проницаемости отличаются более чем в два раза ( $\epsilon = 33$  и  $78$ ).

Разница между полными энергиями конформаций C1 и C2 составляет 21,3 кДж/моль в метаноле и 21,4 кДж/моль в воде, т.е. разница между рассчитанными структурами составляет 0,1 кДж/моль для условий метанола и воды. Наилучшее согласие с экспериментом (460-470 нм) было получено для конформации C1 в условиях газовой фазы (TD/B3LYP/cc-pVDZ,  $\lambda_{\text{abs}} = 473$  нм).

С помощью теории функционала плотности выявлены ключевые причины влияющие на различия в спектрах поглощения фотопротеинов в видимой области что в дальнейшем можно использовать для моделирования субстратов в аминокислотном окружении.

## §5.6. ВЫВОДЫ

Построена физическая модель флуоресценции фотопротеина обелина, в которой рассчитаны электронные структуры молекул целентерамида в основном и возбуждённом состояниях с учётом электронных корреляций методом конфигурационного взаимодействия. Рассмотрено пять возможных вариантов возбуждённых состояний целентерамида в процессе флуоресценции. Показано, что экспериментально наблюдаемая длина волны излучения 500 нм соответствует «комплексу с переносом протона» между кислородом целентерамида и гистидином.

В главе исследуются недавно обнаруженные спектральные характеристики целентерамидсодержащих белков – выделенных фотобелков обелина, акворина и клитина. Обнаружено, что фотовозбуждение в верхние электронно-возбуждённые состояния (260–300 нм) вызывает дополнительную (к сине-зелёной)

флуоресценцию в ближней УФ-области. Было продемонстрировано, что нейтральная форма целентерамида, флуорофор белков, может способствовать этой УФ-флуоресценции. Были предоставлены теоретические исследования в сравнении с экспериментальными для характеристики УФ-флуоресценции целентерамида в метаноле.

Рассчитаны спектры поглощения двух конформеров 2-гидропероксицелентеразина, отличающихся разным положением протона. Наилучшее согласие с экспериментальным спектром поглощения с максимумом длины волны в диапазоне 460-470 нм было получено для конформации, когда пероксидная группа находится над хромофорной группой 2-гидропероксицелентеразина, а водород направлен во внешнюю сторону. Выявлены основные причины, влияющие на различия в спектрах поглощения конформеров субстратов фотопротеинов в видимой области. Это открывает возможность использования данных структур для моделирования субстратов в аминокислотном окружении.

С помощью теории функционала плотности выявлены ключевые причины влияющие на различия в спектрах поглощения фотопротеинов в видимой области. В дальнейшем данные результаты можно использовать при построении атомной структуры субстратов в конкретном аминокислотном окружении.

В работе участвовали – Л.Ю. Антипина, А.А. Кузубов, А.В. Рогова, П.В. Аврамов, С.Г. Овчинников. Эксперименты были проведены в Лаборатории фотобиологии Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН по общим руководством заведующего лабораторией Е.С. Высоцкого. Спектральные характеристики целентерамида были определены в лаборатории фотобиологии Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН под общим руководством Н.С. Кудряшовой.

Материалы данной главы представлены в следующих работах из списка публикаций автора: 8, 20, 24, 25, 26, 27, 28 и в монографии 3

## ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

### §6.1. АПТАМЕРЫ И ОСОБЕННОСТИ ИХ СТРОЕНИЯ

В настоящее время в медицине существует задача разработки новых технологий диагностики и терапии различных заболеваний. Исследование нуклеиновых кислот РНК и ДНК в качестве аптамеров, направленно на решение этих задач. По большинству своих характеристик аптамеры являются хорошей альтернативой антителам, так как они способны специфично связываться с важными участками молекул – мишеней. В силу своей природы аптамеры, в первую очередь, нашли своё применение в исследованиях взаимодействий с белками.

Нуклеиновые кислоты – биологические полимерные молекулы, хранящие всю информацию и передаваемые следующему поколению. Существует два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК), состоящие соответственно из мономеров дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов [325]. Полимер ДНК обладает довольно сложной структурой. Нуклеотиды соединены между собой в длинные полинуклеотидные цепи. Эти цепи попарно объединяются во вторичную структуру, спиралевидной формы, по принципу комплементарности. Такая форма обусловлена стягивающими водородными связями между горизонтально взаимодействующих азотсодержащих гетероциклов. Также взаимодействия происходит между уложенными одно над другим основаниями – стэкинг-взаимодействие, которое обусловлено в основном дисперсионными лондонскими силами и гидрофобными эффектами. Пары, связанные водородными связями, жёстко определены: фрагмент (А) всегда взаимодействует с (Т), а фрагмент (G) – всегда с (С). Цепи ДНК имеют определенную направленность. Эти две цепи закручены одна вокруг другой определенным образом. В природе эта спираль, чаще всего, правозакрученная. Направления от 3'-конца к 5'-концу в двух цепях, из которых состоит молекула ДНК, противоположны (цепи «антипараллельны» друг другу). Существует три



основных конформационных состояний двухцепочечной ДНК (А, В- и Z-ДНК) [326,327].

У всех живых организмов двуспиральные молекулы ДНК плотно упакованы с образованием сложных трёхмерных структур. Третичная структура ДНК формируется в результате её взаимодействия с различными веществами в растворе под влиянием большого количества факторов. Структурные формы ДНК зависят от насыщения водой молекулы нуклеиновой кислоты. Молекула ДНК высокой влажности получила название В-формы. При физиологических условиях (низкая концентрация соли, высокая степень гидратации) доминирующим структурным типом ДНК является В-форма. Молекула ДНК более низкой влажности получила название А-формы. А-форма образуется в условиях менее высокой гидратации и при более высоком содержании ионов  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ , имеет 11 пар на виток. Плоскости азотистых оснований имеют более сильный наклон к оси спирали, они отклонены от нормали к оси спирали на  $20^\circ$ . А-ДНК отличается по своей структуре от уотсон-криковской В-ДНК. Пары оснований в А-форме очень сильно отодвинуты от оси спирали к периферии молекулы – почти на половину радиуса; сдвиг достигает 4-5 Å. В В-ДНК он близок к нулю, поэтому А-ДНК при взгляде сверху (вдоль оси спирали) выглядит как труба. Столь яркое различие В- и А-форм не позволяет считать А-форму некоторым искажением В-формы. Тепловое движение при физиологических температурах приводит к флуктуациям угла закрутки двойной спирали на  $5^\circ$ , что приводит к большому семейству А и В форм. Это меняет представление о двойной спирали ДНК как о жёсткой структуре, содержащей 10 пар на виток в В-форме и 11 пар в А-форме [326,327].

К неканоническим структурным элементам ДНК можно отнести необычные структуры, ограниченные какими-то специальными последовательностями:

1. Z-форма ДНК – образуется в местах В-формы ДНК, где пурины чередуются с пиримидинами или в повторах, содержащих метилированный цитозин;
2. палиндромы – последовательности-перевёртыши, инвертированные повторы последовательностей оснований, имеющие симметрию второго порядка относительно двух цепей ДНК и образующие «шпильки», и «кресты»;

3. H-форма ДНК и тройные спирали ДНК - образуются при наличии в одной цепи нормального Уотсон-Криковского дуплекса участка, содержащего только пурины, и во второй цепи, соответственно, комплементарные им пиримидины;
4. G-квадруплекс (G-4) – четырёх цепочечная спираль ДНК, где 4 гуаниновых основания из разных цепей образуют G-квартеты (G-тетрады), скреплённые водородными связями с образованием G-квадруплексов.

Одно из перспективных прикладных направлений исследований нуклеиновых кислот направлено на применение молекул РНК и ДНК в качестве аптамеров – молекул, способных специфично связываться с молекулой-мишенью, выполняя таким образом функции лигандов или рецепторов [328–330]. Олигонуклеотидные аптамеры с требуемыми свойствами выделяют из библиотек случайных последовательностей методами селекции *in vitro* с помощью методики SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [331–333]. Эта методика основана на экспоненциальном обогащении потенциальных лигандов из библиотеки случайных последовательностей синтетической РНК или ДНК. Для отбора оптимальной последовательности аптамера синтетическую смесь олигонуклеотидов (библиотеку) инкубируют совместно с интересующей молекулярной мишенью. При этом олигонуклеотиды, не способные взаимодействовать с мишенью, отмываются, в то время как олигонуклеотиды, способные к специфичному взаимодействию – амплифицируются. Процедуру повторяют несколько раз и в результате становится возможным получить смесь, содержащую небольшое количество олигонуклеотидов обладающих высоким сродством к интересующей мишени. После завершения обогащения библиотеки остаётся лишь определить нуклеотидные последовательности отобранных олигонуклеотидов и синтезировать их в количествах необходимых для проведения функциональных тестов [334,335].

Аптамеры являются одним из наиболее перспективных современных инструментов высокочувствительной экспресс-диагностики. К преимуществам аптамеров по сравнению с антителами можно отнести дешевизну химического синтеза, простоту введения широкого спектра меток и функциональных групп

непосредственно при синтезе, отсутствие падения аффинности за счёт необратимой денатурации активных структур, возможность использования внутренних особенностей структуры самого аптамера для создания, например, флюоресцентного репортёра, изменяющего интенсивность флюоресценции при взаимодействии с мишенью [336,337], высокую по сравнению с антителами плотность иммобилизации в ориентированном положении на твёрдой фазе и целый ряд других свойств [338]. В отличие от антител аптамеры можно получить к полностью неиммуногенным мишеням и даже к малым, повсеместно встречающимся молекулам, например к АТФ [339]. Для получения и производства аптамеров не нужны живые системы. Небольшая молекулярная масса и отсутствие протяжённых участков, не входящих в связывающий центр аптамеров, снижают вероятность их неспецифического взаимодействия с различными молекулами по сравнению с таковой для антител. Стоимость синтеза аптамеров и сайт-направленного введения в эти молекулы различных меток намного ниже стоимости производства и модификации антител. Чувствительность аптамеров к нуклеазам блокируется химическими модификациями в процессе синтеза [340].

У аптамеров выявлены типичные виды их структур. Вторичные структуры: k-turn (к-поворот), stem-loop (стебель-петля), pseudoknot motifs (псевдоузловые петли), также формируются и третичные структуры: coaxial stacking (коаксальная укладка) и G-quadruplexes (квадруплексы) (рисунок 6.1). Структура к-поворота содержит трёхнуклеотидную выпуклость, окружённый комплементарными частями [341]. Петли являются наиболее распространёнными структурами аптамеров, которые стабилизируются при взаимодействии с белком петлевой частью [342]. Структура псевдоузловых петель более сложна, поскольку они содержат два вложенных элемента штока. Поскольку половина одного стебля интеркалируется между двумя половинами другого стебля, создаётся чёткая третичная структура. Кроме того, богатые гуанином аптамерные последовательности способны образовывать высшие упорядоченные структуры, называемые G-квадруплексами. В центре квадруплексной структуры могут быть включены одновалентные или двухвалентные катионы, которые стабилизируют

трёхмерную (3D)-структуру посредством электростатических взаимодействий. Из-за различных стерических требований эффективная квадруплексная геометрия зависит от ионной идентичности [343,344].

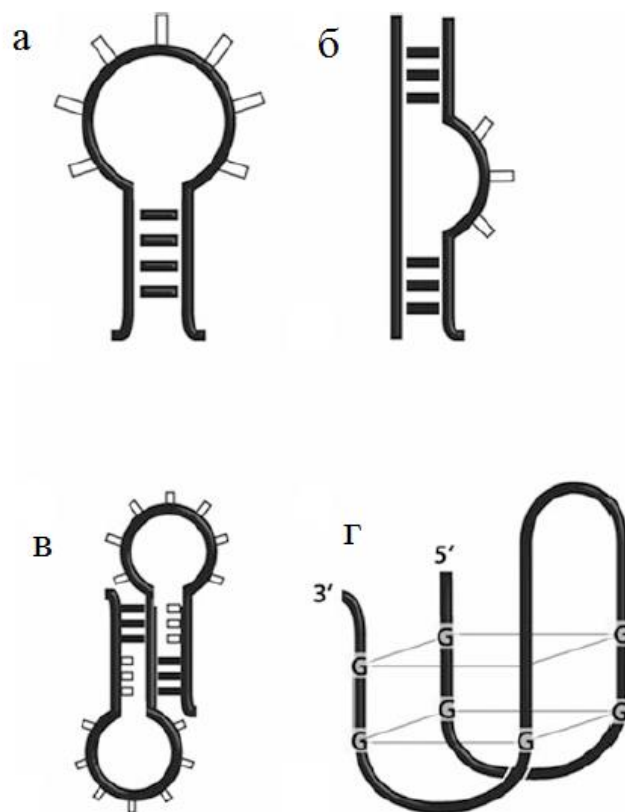


Рисунок 6.1 – Типичные структуры аптамеров. а) stem-loop (стебель-петля, шпилька); б) k-turn (к-поворот); в) pseudoknot motifs (псевдоузловые петли); г) G-quadruplexes (квадруплексы) [341]

Малоугловое рассеяние (МУРР) рентгеновских лучей, электронов и тепловых нейтронов являются дифракционными методами исследования структуры вещества при субмолекулярном разрешении. Основная задача МУРР – определение структуры или отдельных структурных параметров рассеивающего объекта по картине интенсивности. Он используется для исследования надатомной структуры вещества, при анализе структуры дисперсных систем, в молекулярной биологии, биофизике и других областях науки и техники. Принципиальная схема установки малоуглового рассеяния представлена на рисунке 6.2 [345–347].

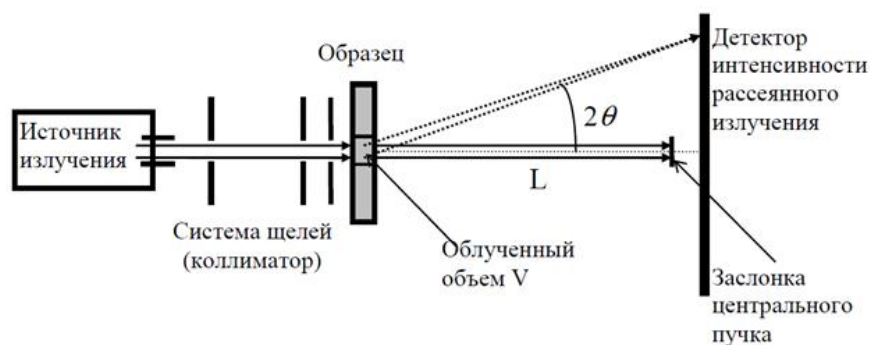


Рисунок 6.2 – Схема установки малоуглового рассеяния.  $2\theta$  – угол рассеяния,  $L$  – расстояние от образца до детектора

Для биологических макромолекул, разбавленных в растворе, экспериментальная интенсивность МУРР пропорциональна усреднённой по всем ориентациям интенсивности рассеяния одной частицы и, следовательно, несёт в себе информацию о её надатомной структуре. Хаотическая ориентация частиц в растворе, однако, приводит к существенной потере структурной информации по сравнению с изучением макромолекулярных кристаллов: вместо двумерной дифракционной картины рефлексов в МУРР измеряют одномерную кривую интенсивности рассеяния. В общем случае однозначное восстановление структуры трехмерного объекта (частицы) по одномерной кривой МУРР невозможно. Неоднозначность интерпретации может быть существенно уменьшена наложением ограничений на искомую структуру (например, условия симметричности частицы или её однородности, поиск структуры только низкого разрешения), а также выбором математического аппарата, позволяющего адекватно описывать строение объекта как можно меньшим числом параметров. Это даёт возможность разработки прямых методов анализа, один из которых метод виртуальных атомов, используемый для обработки результатов МУРР основан на моделировании структуры шариками нужной плотности и определении их пространственных отклонений между экспериментальной и теоретической кривыми рассеяния [345–347].

## §6.2. ВОССТАНОВЛЕНИЕ АТОМНОЙ СТРУКТУРЫ АПТАМЕРА RE-31 ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

Аптамеры представляют собой синтетические РНК или ДНК-олигонуклеотидные лиганды, способные узнавать другие молекулы и даже проявлять каталитическую активность. Взаимодействия аптамер-мишень зависят от трёхмерной (3D) структуры аптамера, распределения их зарядов и количества его связывающего партнёра. Различные структурные элементы, такие как шпильки, выпуклости, псевдоузлы и G-квадруплексы [348], обеспечивают взаимодействие аптамеров со своими мишенями посредством водородных связей, гидрофобных взаимодействий, ван-дер-ваальсовых взаимодействий и ароматического стэкинга [349]. Аптамеры используются в большом количестве биосенсоров [350–356] и терапевтических средствах [353,357–359]. Связывание аптамера зависит от его трёхмерной структуры. Проблема в том, что трёхмерная структура аптамера не может быть напрямую экстраполирована из его нуклеотидной последовательности или его вторичной структуры. Чтобы понять молекулярную основу образования комплекса, знание о пространственной конформации основного аптамера очень желательно, но часто недоступно из-за ограничений аналитических методов структурного анализа. В настоящее время наиболее распространённые методы определения структур нуклеиновых кислот включают спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [360–363], малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) [364] [345], круговой дихроизм (КД) [365], флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) [366] и криогенная электронная микроскопия [367,368].

Наиболее точным методом является рентгеноструктурный кристаллографический анализ [369]. Однако этот метод обеспечивает только статическую картину конформации одного олигонуклеотида в твёрдом состоянии, тогда как ЯМР, МУРР, FRET и КД могут исследовать динамические изменения конфигурации в растворе в более физиологически релевантных условиях. ЯМР обнаруживает конформации аптамера в растворе с атомным разрешением, но этот метод обычно ограничивается небольшими биомолекулами (<30-40 кДа). В

качестве альтернативы FRET может измерять только относительное расстояние между флуоресцентно меченными нуклеотидами и не показывает структуру всей молекулы [370]. Кроме того, флуоресцентное мечение нуклеиновой кислоты влияет на её трёхмерную структуру. Спектроскопия КД идеально подходит для отслеживания конформационных переходов между дискретными мотивами нуклеиновых кислот (G – квадруплексы, A, B, Z - формы и др.) [371]. КД используется как дополнительный метод к ЯМР-спектроскопии и МУРР, поскольку он не требует какого-либо мечения [365]. Крио-ЕМ по-прежнему имеет самый низкий предел определения молекулярной массы (>60 кДа) [347].

МУРР представляет собой мощный метод определения структуры биомолекул в растворе, а также их структур более высокого порядка, если известны исходные составляющие [345–347]. МУРР имеет ряд преимуществ перед другими структурными методами, включая минимальное время подготовки образца, анализ отдельных макромолекул или их комплексов в растворах в физиологических условиях или при любой требуемой температуре, pH и буфере, а также быстрый сбор и обработку данных [372].

Для восстановления структуры аптамера применили четыре шага для поиска и корректировки трёхмерной структуры тромбин связывающего аптамера (RE-31) в растворе на основе молекулярного моделирования в соответствии с его нуклеотидной последовательностью и экспериментов с МУРР (рисунок 6.3).

Восстановление молекулярной структуры проводили в четыре этапа. Молекулярное моделирование аптамера RE-31 проводили в соответствии с последовательностью на основе экспериментальных данных МУРР с использованием программы Avogadro [23]. Полученная атомная структура во всех трёх проекциях сравнивалась с экспериментальной моделью, полученной из малоуглового рассеяния [373]. Геометрия структуры аптамера оптимизирована полуэмпирическим квантово-химическим методом на основе MOPAC2016. Атомная структура белка с аптамером взята с базы данных белков (PDB код 3QLP).

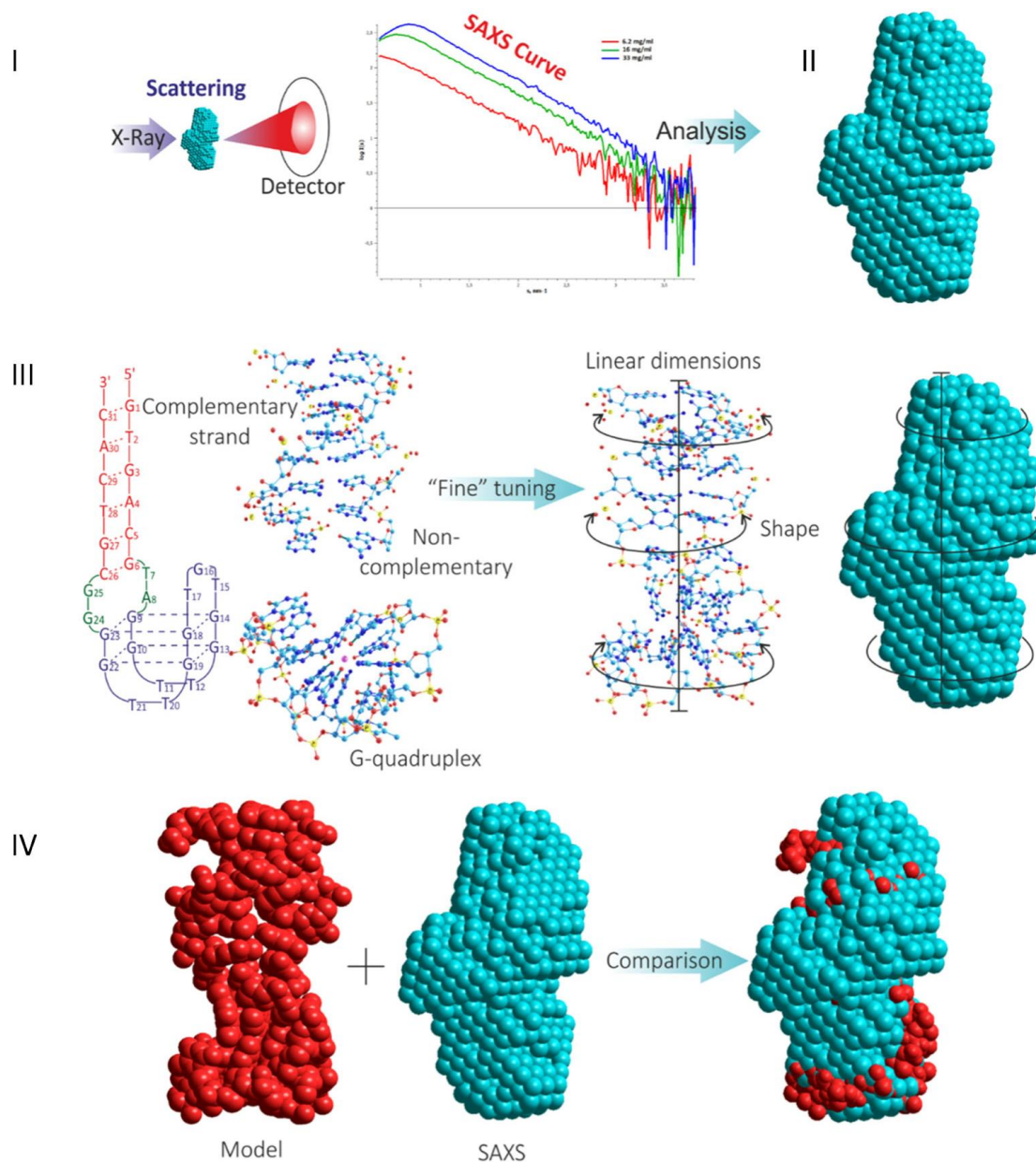


Рисунок 6.3 – Общая схема нахождения трёхмерной атомной структуры аптамера на основе МУПП путём восстановления молекулярной структуры (MSR). (I) – получение экспериментальных данных МУПП для аптамера в растворе, (II) – построение пространственного распределения электронной плотности молекулы с использованием результатов МУПП, (III) – построение трёхмерной атомной структуры аптамера на основе его первичной нуклеотидной последовательности и вторичной структуры, и (IV) – сравнение и уточнение смоделированных трёхмерных структур со стандартной моделью МУПП (красный цвет, из молекулярного моделирования; бирюзовый цвет, из данных МУПП)



На первом шаге были получены результаты экспериментов МУРР (рисунок 6.3, I).

Следом на втором шаге производилось моделирование МУРР с целью получения объёмной шариковой структуры молекулы RE-31 (рисунок 6.3, II).

На третьем шаге совершалось восстановление молекулярной структуры RE31 в соответствии с его первичной последовательностью и экспериментальными данными по малоугловому рассеянию (рисунок 6.3, III). Первичная последовательность RE-31 использовалась для предсказания вторичной структуры с помощью веб-сервера Mfold [374] на основе методов минимизации свободной энергии. Аптамер был разделён на три структурные части, и их расположение в пространстве варьировалось относительно друг друга в соответствии с экспериментальными данными. Первая структурная часть – это G-квадруплекс со следующей последовательностью GGTTGGTGTGGTTGG. Это хорошо известный 15-нуклеотидный тромбин-связывающий аптамер (15ТВА), образованный двумя тетрадами четырёх гуанинов в классической конформации *anti-syn-anti-syn* и расположенным в центре ионом калия [375]. Рентгеноструктурные данные комплекса тромбина с аптамером 15ТВА были описаны ранее группой Тулинского [376]. G-квадруплекс состоит из двух уложенных друг на друга плоских G-квартетов (G-стебель), которые связаны с тремя боковыми петлями. Каждый G-квартет связан восемью водородными связями. Согласно данным РСА, 15ТВА связывается с тромбином, охватывая выступающую область экзосайта I через их ТТ-петли [377,378]. Вторая структурная часть RE-31 – двуцепочечная. Это правая спираль типа В. Третья структурная часть состоит из четырёх комплементарных нуклеотидов Т-G и А-G (рисунок 6.3, III).

На четвёртом этапе было проведено молекулярное моделирование для построения исходной геометрии молекул аптамера. Полученная атомная структура сравнивалась с экспериментальной формой, полученной методом малоуглового рассеяния. На этом этапе основной целью было определение линейных размеров молекул во всех трёх проекциях, в то время как добиться идеального совпадения в мельчайших деталях было сложно. Поскольку ДНК является хиральной молекулой,

возможны различные варианты локального скручивания аптамера. Наибольшие трудности возникают в отношении некоплементарных нуклеотидов, так как они имеют большое количество возможных положений. Сначала была построена модель, в которой основные атомы азота ориентированы в разные стороны. Однако такая структура не соответствует объёму фигуры, полученной из эксперимента. Чтобы модель соответствовала экспериментальной фигуре, нуклеотиды, составляющие двойную цепь, были скручены, как двойная спираль. Таким образом, мы добились максимального совпадения с экспериментальной формой. Поэтому на этом этапе выполнялось локальное скручивание нуклеотидов для получения наилучшего возможного совпадения с особенностями экспериментальной фигуры (рисунок 6.3, IV).

Смоделированная молекула аптамера должна соответствовать линейным размерам, полученным в результате анализа кривой МУРР. Линейные размеры из МУРР хорошо соответствуют линейным размерам построенной 3D-модели (рисунок 6.3, III). Более того, даже при существующих линейных размерах можно моделировать большое количество конформаций. На втором этапе теоретического моделирования необходимо обеспечить, чтобы построенная теоретическая модель учитывала особенности «рельефа» экспериментально полученной формы (эти формы имеют сложную топологию). Таким образом, на этапе «точной настройки» достигалось (за счёт незначительных поворотов вокруг сигма-связей) наиболее полное соответствие теоретической модели экспериментальному объёму. После изменения теоретической геометрии молекулы в соответствии с формой электронной плотности строилась кривая МУРР по теоретической молекуле в сравнении с экспериментальной кривой, таким образом, проверялось соответствие модели эксперименту.

На рисунке 6.4 показана структура RE-31, полученная тремя разными способами. На верхнем изображении (рисунок 6.4, а) показано связывание аптамера с тромбином, выявленное методом XRD [379]. На рисунке 6.4, б показан аптамер, полученный с помощью XRD, МУРР и MSR.

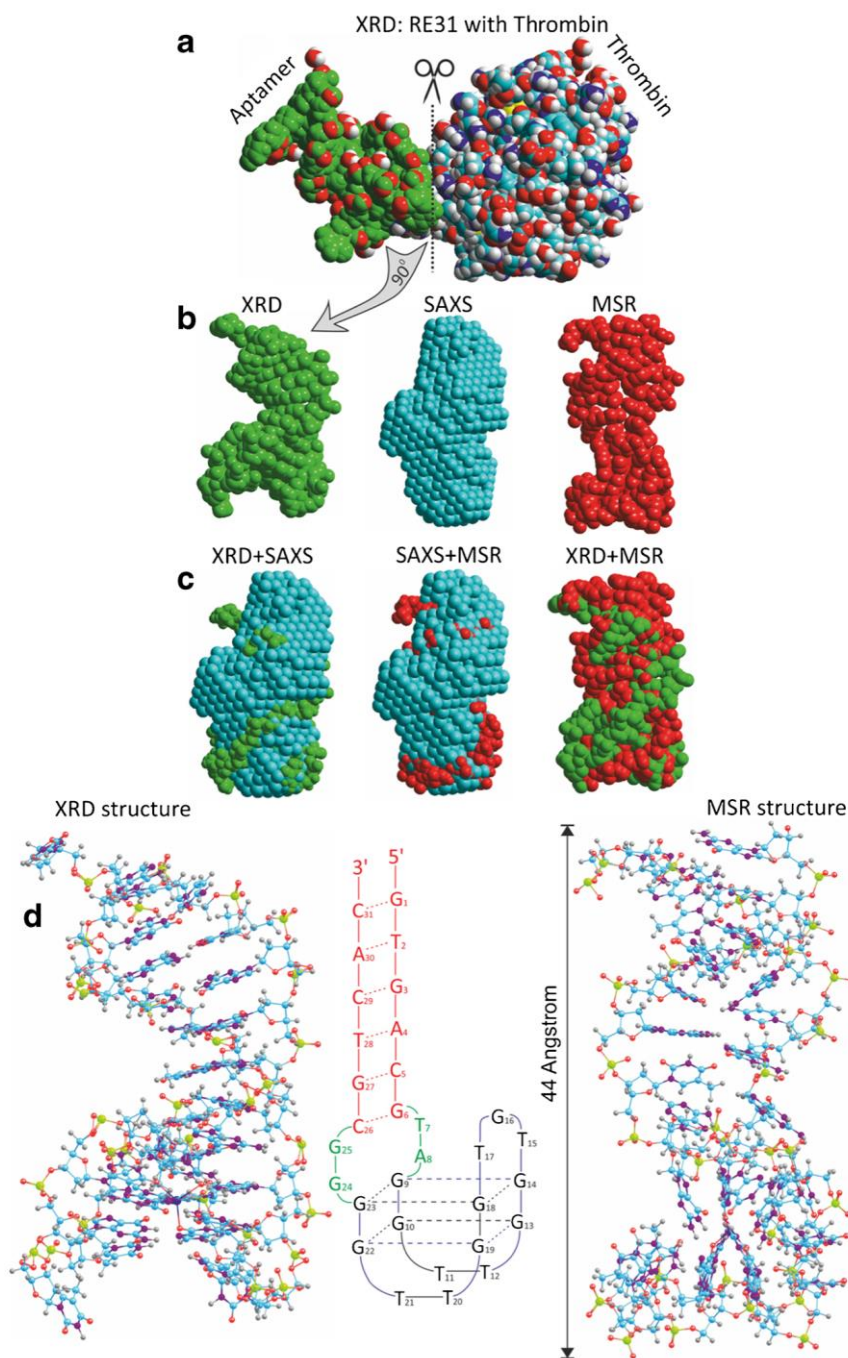


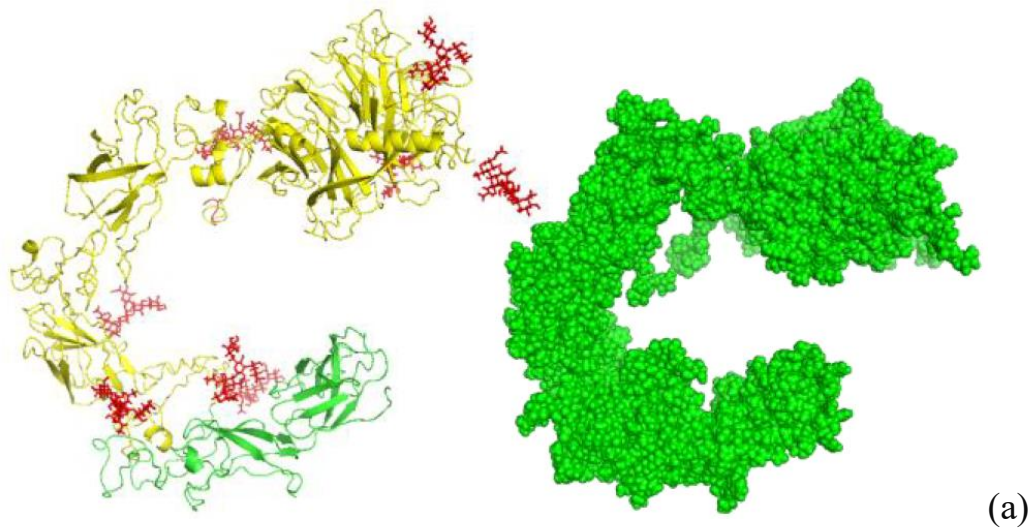
Рисунок 6.4 – Сравнение структур аптамера RE-31, полученного разными методами. а) RE-31 – тромбиновый комплекс по данным XRD. б) Структуры аптамеров, полученные методом XRD, в зелёном цвете, МУПП (SAXS) – в бирюзовом цвете, MSR – в красном. в) Сравнение структур, полученных разными методами. д) Структуры RE31 для анализа XRD и MSR. Между ними расположена вторичная структура RE31, разделённая на три цветные части; красный – дуплекс В-формы; зелёный – некоплементарная часть; синий – G-квадруплекс

Сопоставимые конформации аптамера, полученные методом МУРР в растворе с XRD из кристаллической формы с тромбином и MSR, показали хорошее совпадение (рисунок 6.4, с). В обоих случаях основное различие состоит в квадруплексе аптамера, который действует как сайт связывания тромбина. Ранее было показано, что RE-31 образует специфический комплекс с тромбином [379]. Различия между структурой аптамера до и после добавления белка можно интерпретировать как индуцированную модель соответствия, когда аптамер меняет свою форму при связывании. Рисунок 6.4, d показывает строение RE-31 на основе XRD анализа и MSR. Связь между концевыми нуклеотидами (G1 и C31) гибкая. Дуплексная часть и некомплементарная область между квадруплексом и дуплексом не статичны, а достаточно гибки.

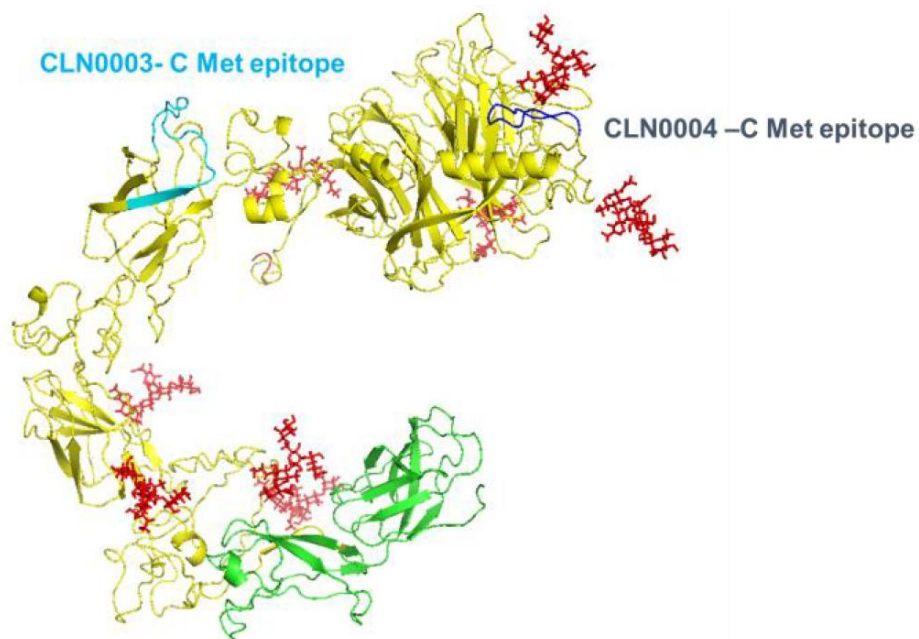
Подводя итоги, можно заключить что одной из задач в понимании работы аптамеров является восстановление трёхмерной молекулярной структуры аптамера из экспериментов МУРР, полученных в растворе. Метод МУРР даёт форму молекулы, но не атомную структуру аптамера. Для решения этой проблемы мы использовали программу Avogadro. При построении молекулы используются длины связей и углы между атомами. В первом приближении целесообразно использовать методы молекулярной динамики и/или полуэмпирические методы квантовой химии, поскольку они позволяют получить геометрию молекулы за разумное время. Поэтому метод РМ6 был использован в качестве вспомогательного метода для быстрого получения длин связей и углов внутри молекулы аптамера. Следовательно, ни рН, ни другие параметры растворителя не были приняты во внимание (поскольку наша задача – получить теоретическую 3D-модель в соответствии с экспериментами МУРР). Тем не менее, существует несколько ограничений для эффективности МУРР. Во-первых, молекула в растворе должна существовать в единой конформации. Таким образом, измерение длинных олигонуклеотидов (>150 нуклеотидов) может быть затруднено из-за интерференции множества структур. Подход, основанный на МУРР, позволяет находить трёхмерную структуру аптамеров в растворе без кристаллизации, необходимой для дифракции рентгеновских лучей, что не даёт надёжной

информации о структуре таких гибких молекул, как нуклеиновые кислоты, в растворе. Успех предлагаемого подхода во многом зависит от знаний о первичной структуре ДНК. В общем, подход, описанный здесь, воссоздаёт исходную структуру для определения актуальной структуры. Этот способ в дальнейшем может быть применён для нахождения трёхмерных структур аптамеров, ДНК-энзимов и рибозимов и может предоставить новые возможности для разработки функциональных нуклеиновых кислот.

По отработанной технологии построения аптамеров смоделировали аптамеры CLN0003 и CLN0004 и сделали молекулярный докинг комплексов С-Met-аптамер (рисунок 6.5, а). Моделирование вторичной структуры было выполнено с использованием веб-сервера Mfold [374] для предсказания сворачивания нуклеиновых кислот и гибридизации. Структуры аптамеров CLN0003 и CLN0004 были построены программой Avogadro [23] на основе заданной последовательности для CLN0003 – 5'-GGA GGG AAA AGT TAT CAG GCT GGA TGG TAG CTC GGT CGG GGT GGG TGG GTT GGC AAG TCT-3' и для CLN0004 – 5'-GAG TGC CTA ATG GTA CGA TTT GGG AAG TGG CTT GGG GTG GGA TTA GTT GAG TAC TCG CTC-3'. Далее структурные модели были оптимизированы с использованием метода молекулярных орбиталей фрагментов (FMO) на уровне двухчастичного расширения FMO2/DFTB3 [380–383] в рамках программы GAMESS. Докинг и исследования ориентации и сайтов связывания комплексов аптамер-С-Met проводили с помощью программы AutoDock4.0 ([www.autodock.scripps.edu](http://www.autodock.scripps.edu)). Выбранные структуры с самой низкой энергией стыковки аптамера показаны на рисунке 6.5, б. Лиганды представлены в виде синих структур, а ДНК-аптамер – в виде зелёных.



(a)



(b)

Рисунок 6.5 – Моделирование аптамеров CLN0003 и CLN0004 и молекулярный докинг комплексов к С-Met белку. (a) – Модель структуры рекомбинантного человеческого белка С-Met/Fc Chimera согласно I-TASSER [384]. Жёлтым выделен внеклеточный домен предшественника с-Met человека, зелёным – используемая С-концевая полигистиридиновая область Fc человеческого IgG1. (b) – Моделирование структуры комплексов С-Met с пептидами эпитопа аптамера CLN0003 (голубой) и CLN0004 (темно-синий) на сайтах связывания эпитопа. В структурах, выбранных с наименьшей энергией стыковки, лиганды эпитопа аптамера показаны зелёными шариками, а С-Met – синими шариками

Далее отработанный подход применили для построения аптамеров необходимых для новых радиофармпрепаратов. Моделирование может показать будет ли меняться новые конструкции аптамеров и, тем самым, можно понять перспективность синтеза новых радиомеченых препаратов. Синтез новых радиофармпрепаратов для исследования метастазов рака имеет большое значение, поскольку существующие радионуклиды для визуализации рака не обладают достаточной избирательностью, накапливаясь в опухолях и тканях с высокой метаболической активностью. Идеальный радиомеченый молекулярный зонд для ПЭТ/КТ с целью диагностики рака должен быть достаточно чувствительным для выявления даже небольших метастазов, специфичным и способным чётко очерчивать объём опухоли. Одновременно он должен иметь ультракороткий период полураспада, чтобы быстро выводиться из организма, и способствовать раннему получению изображения, поскольку это безопаснее для пациента.

Радиоактивные метки могут доставляться к опухоли с помощью таких носителей, как наночастицы [385], антитела [386], ингибиторы тирозинкиназы [387], альбумины [388,389], и пептиды [390]. Аптамеры ДНК и РНК, наряду с антителами и пептидами, могут использоваться в качестве лигандов для адресной доставки меток к клеткам. Для мечения аптамеров можно использовать радионуклиды:  $^{99m}\text{Tc}$  [391],  $^{111}\text{In}$  [392],  $^{64}\text{Cu}$  [393],  $^{18}\text{F}$  [394]. Тем не менее, на сегодняшний день не существует простой универсальной технологии синтеза радиомеченых аптамеров. Сложно получить стабильный целевой продукт с высокой радиохимической чистотой. В настоящее время  $^{11}\text{C}$ -радиофармацевтические препараты приобретают все большее значение в клинической ПЭТ для диагностики рака по нескольким причинам.

Как показало моделирование мечение  $^{11}\text{C}$  не влияет на химическую структуру и свойства биомолекул.  $^{11}\text{C}$  считается одним из самых безопасных радионуклидов для ПЭТ-химии. Углерод, кислород, водород, сера, фосфор и азот – основные элементы органических молекул в живых организмах. Радиомечение  $^{11}\text{C}$  делает радиофармпрепарат неотличимым от его стабильного природного аналога. Таким образом, он может быть использован в качестве истинного трассера

для исследования биологических процессов, не влияя на их скорость или результат в какой-либо измеримой степени. Другим важным аспектом является простота синтеза и малое влияние на присоединённую молекулу как показывает теоретическое моделирование.

Важно отметить, что  $^{11}\text{C}$ -радиомеченый аптамер обнаруживает даже самые маленькие участки опухоли площадью менее  $2 \text{ мм}^2$ , демонстрируя лучшее разрешение по сравнению со стандартным  $^{18}\text{F}$ -FDG при этом  $^{11}\text{CH}_3$ -AS-14 быстро выводится из организма и не токсичен для органов-мишеней [395]. Также радиомеченые аптамеры могут быть использованы для доставки лекарств с помощью ПЭТ/КТ.

Определение 3D-структуры аптамера. Меченый  $^{11}\text{C}$  аптамерный зонд для ПЭТ/КТ визуализации опухолей и метастазов *in vivo* был синтезирован на основе ДНК-аптамера AS-14 [395]. Этот аптамер был ранее выбран для распознавания клеток асцитной карциномы Эрлиха [396]. Целевой белок для аптамера AS-14 был идентифицирован как фибронектин [396] с несколькими посттрансляционными модификациями [397]. Аптамер AS-14 состоит из 80 нуклеотидов, включая 20-нуклеотидное расширение для гибридизации с праймером  $^{11}\text{CH}_3$ .

Третичная структура аптамера была определена с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS на рисунке 6.6). Экспериментальная МУРР-кривая показала наличие мономерного AS-14 с молекулярной массой 22 кДа. Структура аптамера представляет собой вытянутую стержнеобразную форму. Это подтверждается функцией распределения расстояний  $\rho(r)$ , которая имеет высокий пик на малых расстояниях ( $r$  около 2 нм) и меньшие значения на больших расстояниях (рисунок 6.6 В). С помощью полученной функции  $\rho(r)$ , проводили реконструкцию общей формы молекулы в растворе (рисунок 6.6 С, D), которая может быть использована в качестве отправной точки для молекулярного моделирования.



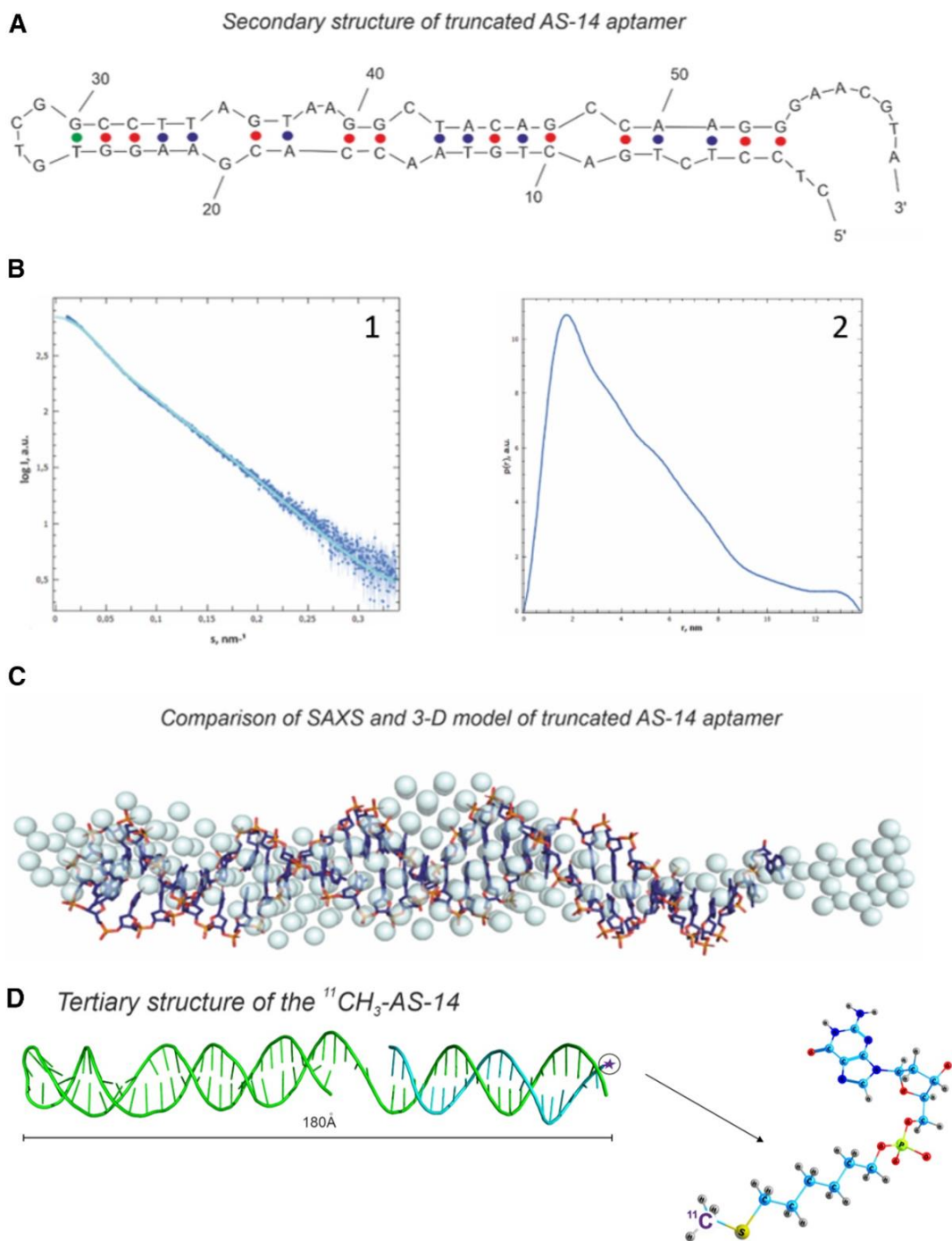


Рисунок 6.6 – Определение 3D-структуры усечённого аптамера AS-14. А – вторичная структура AS-14. В – 1) экспериментальные данные МУРР (SAXS – тёмно-синие точки), подогнанные под теоретическую кривую МУРР (светло-голубая линия); 2) функция распределения парных расстояний  $\rho(r)$  для AS-14, максимальное значение  $r$  –  $D_{\text{max}}$  (размер молекулы). С – наложение смоделированной 3D-структуры на экспериментальную МУРР-модель. D – третичная структура  $^{11}\text{CH}_3$ -AS-14 (зелёная лента – аптамер AS-14; голубая лента – праймер с  $^{11}\text{CH}_3$ ).

Первичная последовательность усечённого аптамера предсказывала возможные вторичные структуры с помощью веб-сервера OligoAnalyzer [398] на основе методов минимизации свободной энергии. Модель была построена на основе экспериментальных данных (рисунок 6.6 С, D). После компьютерного моделирования и оптимизации достигнуто полное соответствие теоретической модели к экспериментальному объёму (рисунок 6.6 С, D).

В целом можно сказать, что при сравнении  $^{11}\text{C}$ -изображения со стандартным радиоактивным веществом и 2-дезоксид-2-[фтор-18]фтор-D-глюкозой ( $^{18}\text{F}$ -FDG) обнаружена лучшая селективность  $^{11}\text{C}$ -аптамера к метастатическим поражениям в метаболически активных органах, чем с  $^{18}\text{F}$ -FDG [395].  $^{11}\text{C}$  радионуклид с ультракоротким (20,4 мин) периодом полураспада считается более безопасным для ПЭТ/КТ-изображений и не вызывает ложноположительных результатов при визуализации сердца. Его комбинация с аптамерами обеспечивает высокоспецифичную и высококонтрастную визуализацию раковых клеток и может применяться для ПЭТ/КТ-направленной доставки лекарств в терапии рака.

### **§6.3. ДИЗАЙН АПТАМЕРОВ ПРОТИВ SARS-COV-2, ОСНОВАННЫЙ НА ЗНАНИЯХ О СТРУКТУРЕ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ**

Разработка аптамеров против новых инфекций – сложный и трудоёмкий подход. Синергетический эффект может быть достигнут при использовании вычислительных методов в сочетании с экспериментальными процедурами. Поэтому актуальна задача, состоящая в том, чтобы разработать надёжную методологию рационального дизайна аптамеров *in silico et vitro*.

Новый подход сочетает в себе несколько этапов:

1. молекулярный дизайн, основанный на скрининге в библиотеке ДНК-аптамеров и направленном мутагенезе для соответствия третичной структуре белка;
2. 3D-молекулярное моделирование мишени;

3. молекулярный докинг аптамера с белком;
4. молекулярная динамика (MD) моделирование комплексов;
5. квантово-механическая (QM) оценка взаимодействий между аптамером и мишенью с последующим анализом;
6. экспериментальная проверка на каждом цикле структуры и аффинности связывания с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния, цитометрии и поляризации флуоресценции.

С помощью этой итеративной процедуры дизайна, основанной на структуре и взаимодействии (SIBDD), был разработан и валидирован высокоспецифичный аптамер к рецептор-связывающему домену белка-шипа SARS-CoV-2. Подход SIBDD повышает скорость разработки высокоаффинных аптамеров с нуля, используя структуру целевого белка. Метод может быть использован для улучшения существующих аптамеров для более сильного связывания. Этот подход выводит на передовой уровень разработку новых аффинных зондов, функциональных нуклеиновых кислот. Он предлагает план для простого проектирования молекул-мишеней для новых патогенных агентов и возникающих вариантов.

Структурными белками вирусов атипичной пневмонии являются: белок шипа (S), белок оболочки (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (N) белки [399]. S-белок SARS-CoV-2 важен для вирусной инфекции, поскольку он опосредует проникновение вируса в клетки хозяина путём связывания с рецептором хозяина через рецептор-связывающий домен (RBD). Поэтому S-белок считается основной мишенью для нейтрализующих антител, противовирусной приставки, ингибиторов проникновения и разработки вакцин [400]. Моноклональные и поликлональные антитела, разработанные ранее против RBD в SARS-CoV, демонстрируют лишь ограниченное связывание с SARS-CoV-2 [401–403]. Низкая биодоступность, высокая стоимость и длительное время, необходимое для разработки и производства моноклональных антител, вызывают необходимость в новой методологии быстрого дизайна лекарств, способных селективно связываться с желаемым эпитопом белка-мишени с известной последовательностью. С другой

стороны, олигонуклеотиды также могут образовывать множество трёхмерных (3D) структур, некоторые из которых могут соответствовать заданной белковой мишени. Они могут быть сконструированы таким образом, чтобы с высокой аффинностью и специфичностью связываться с белками-мишенями [404,405]. Механизм их взаимодействия с мишенью аналогичен механизму взаимодействия антител. Его можно охарактеризовать как гидрофобное, электростатическое, водородное и ван-дер-ваальсовое взаимодействие, а также стэкинг оснований и комплементарность формы [406].

В настоящее время аптамеры конструируются в основном с помощью процедуры SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [404,405]. SELEX используется для создания аптамеров, специфичных для конкретной цели, [407] а технологии высокопроизводительного секвенирования с соответствующими биоинформационными инструментами применяются для деконволюции результатов конвейеров SELEX [408]. Для оптимизации аптамеров было предложено несколько вариантов SELEX [409–413]. Недавно были предложены альтернативные подходы для конструирования аптамеров, основанные на анализе *in silico* [414–419]. Сочетание докинга и классического моделирования молекулярной динамики (MD) часто используется для анализа возможных позиций связывания аптамера с мишенью [420–423]. Для предсказания энергий связывания и взаимодействий в комплексах аптамер-вирус использовались несколько вычислительных методов: анализ взаимодействия [424], докинг [425], и расчёт свободной энергии на основе MD [426]. Эти методы доказали, что они являются важной частью самых для дизайна лекарств.

Далее представлена новая методология рационального дизайна аптамеров, основанная на знании о их структуре и взаимодействии с мишенью, названная SIBDD (Structure and Interaction Based Drug Design), может рассматриваться как расширение SBDD (Structure-Based Drug Design) [427], дополненное обратной связью от классического моделирования молекулярной динамики в сочетании с оценкой энергий квантовохимических взаимодействий. SIBDD – комбинация вычислительного скринингового моделирования и направленного мутагенеза с

экспериментальной проверкой на каждом цикле для получения олигонуклеотидов с высоким сродством и селективностью. Методология SIBDD предназначена для случаев с ограниченной информацией о мишени. Например, её можно использовать для быстрого реагирования на новые опасные инфекции, когда доступ к образцам минимален. Хотя на получение первой экспериментальной структуры мишени может уйти несколько месяцев, первые раунды SIBDD могут быть проведены на основе результатов вычислительного фолдинга, полученных из первичной последовательности мишени. Этот первоначальный набор аптамеров может быть усовершенствован, когда появится больше экспериментальных данных. Наконец, аптамеры могут быть впоследствии скорректированы с учётом различных мутаций патогена. В данной разделе продемонстрировано, как подход SIBDD может быть применён для создания аптамера, связывающегося с RBD белка-шипа SARS-CoV-2. В качестве проверки было разработано несколько аптамеров, связывающих RBD, и экспериментально подтверждено их сродство.

Схема подбора аптамеров. Предварительным шагом в методологии SIBDD (рисунок 6.7) является вычислительный дизайн библиотеки аптамеров. Структуры кандидатов в аптамеры и мишени (RBD белка-шипа SARS-CoV-2) определяются с помощью молекулярного моделирования. Следующий шаг – выбор аптамеров из созданной библиотеки путём молекулярного докинга к белку-мишени. Последовательность с наилучшим сродством, предсказанным в результате докинга, выбирается для итерационного улучшения в конвейере (рисунок 6.7). Электростатический потенциал белка вычисляется и используется для докинга в каждой итерации структур-кандидатов к RBD. Далее проводится моделирование молекулярной динамики (MD) для комплексов аптамер-белок, построенных в процессе докинга. Кластеризация MD-траекторий позволяет получить набор наиболее населённых молекулярных конформаций в динамике. В этих конформациях взаимодействия аптамер-белок подробно анализируются с помощью квантово-механических (QM) расчётов, основанных методе квантовохимических фрагментов (FMO).

Фрагментация белков и аптамеров на более мелкие части, аминокислотные остатки и нуклеотиды, соответственно, позволяет получить подробную карту взаимодействий нуклеотид-остаток с помощью QM-расчётов с использованием анализа электростатического разложения парного взаимодействия (PIEDA). Оптимизация FMO-структуры комплексов белок-аптамер выполнена методом DFTB3, а расчёты PIEDA проведены на уровнях теории DFTB и RI-MP2. Полученные энергии взаимодействия не претендуют на количественную точность, но достаточно точно указывают, какие нуклеотиды и с какими остатками сильно связываются, что позволяет использовать эту информацию на следующих этапах SIBDD. Они могут рассматриваться как качественная мера, влияющая на процесс выбора аптамера.

После моделирования *in silico* проводится экспериментальная проверка сродства связывания наиболее перспективных структур-кандидатов с мишенью. Наиболее эффективные аптамеры будут направлены на дальнейший отбор. В результате экспериментальными и теоретическими методами выявляется лучший связывающий аптамер. В данной работе синтезированные аптамеры были протестированы с рекомбинантным белком RBD с помощью проточного цитометрического анализа. Эксперименты по флуоресцентно-поляризационному анализу продемонстрировали кинетику связывания аптамеров с RBD по сравнению со случайными последовательностями. Кроме того, эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеянию проверили, связывается ли аптамер с RBD в соотношении 1:1 и образует ли он стабильный комплекс.

После завершения всей процедуры (рисунок 6.7) принимается решение о том, достигнут ли желаемый уровень связывания. Если нет, то, основываясь на данных о стабильности комплексов аптамер-белок в MD и взаимодействии нуклеотид-остаток в сочетании с экспериментальной проверкой, можно изготовить новый модифицированный набор аптамеров и повторить всю процедуру. Протокол SIBDD в данном исследовании был применён для поиска аптамера с высокой аффинностью связывания с RBD SARS-CoV-2 S-белка. Тем не менее, предложенный протокол является общим и может быть применён к более

широкому кругу лигандов и белковых мишеней. Следует отметить, что отдельные этапы подхода SIBDD хорошо поддаются распараллеливанию, что делает его пригодным для использования в непрерывных высокопроизводительных рабочих процессах в будущем.

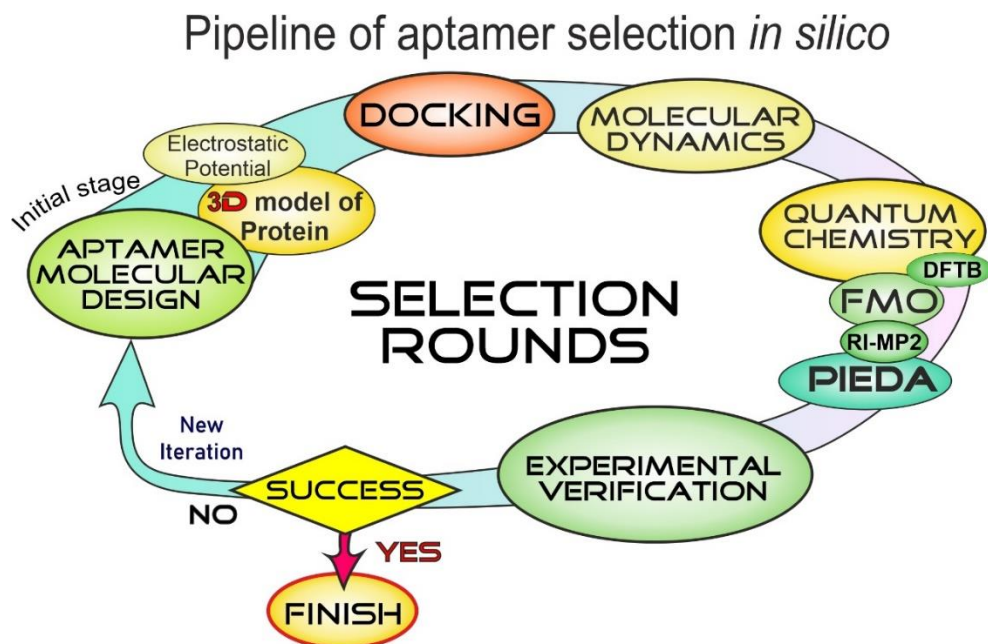


Рисунок 6.7 – Дизайн лекарств на основе структуры и взаимодействия (SIBDD) – итеративная процедура, состоящая из следующих этапов: несколько раундов молекулярного дизайна аптамеров (скрининг библиотеки ДНК и направленный мутагенез для соответствия третичной структуре белка); 3D моделирование белка-мишени и расчёт его электростатического потенциала; молекулярный докинг аптамеров к мишени; моделирование комплексов с помощью молекулярной динамики; квантово-механический анализ взаимодействия нуклеотид-остаток с помощью таких методов, как DFTB3, FMO, RI-MP2 и PIEDA; экспериментальная проверка связывания.

Структура рецептор-связывающего домена шипа SARS-CoV-2. RBD — гибкая область в верхней части шипа коронавируса, которая позволяет вирусу прикрепляться к рецептору ACE2 человека на поверхности клетки [428]. Структура белка шипа SARS-CoV-2 показана на рисунке 6.8 а. Этот белок представляет собой



тример, состоящий из трех идентичных мономеров (рисунок 6.8 b). Каждый мономер содержит RBD (рисунок 6.8 c) и может связываться с клетками человека.

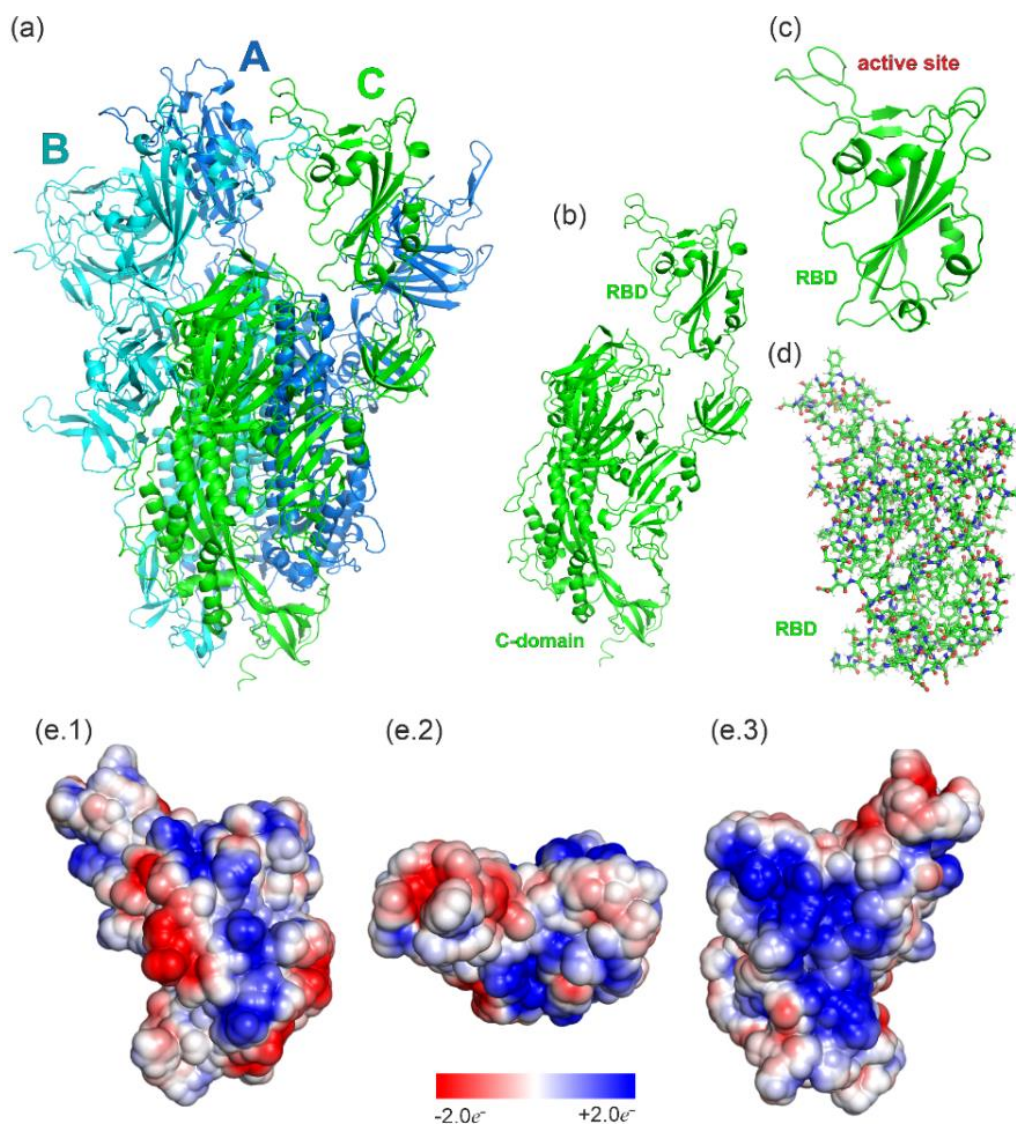


Рисунок 6.8 – Структура и свойства RBD белка шипа SARS-CoV-2. (a) Тример шиповидного белка SARS-CoV-2, мономеры окрашены в синий, голубой и зелёный цвета; (b) положение рецептор-связывающего домена (RBD) в мономере шиповидного белка; (c) активный сайт RBD; (d) атомная модель RBD, где атомы С – зелёные, N – синие, O - красные, S – жёлтые, H - серые атомы.

Электростатический потенциал RBD рассчитан с помощью APBS и нанесён на поверхность, окружающую белок: (e.1) вид изнутри (т.е. со стороны вируса), (e.2) вид сверху и (e.3) вид снаружи (т.е. со стороны клетки-хозяина). Синий цвет – положительное значение потенциала, красный – отрицательное. Общий заряд RBD равен +2.



Модель RBD, использованная в настоящей работе, была взята из рентгеновской разрешённой структуры (PDB код 6M0J) комплекса RBD с человеческим рецептором ACE2 [429]. Наиболее важными остатками для связывания человеческого ACE2, по данным работы [430], являются Asn439, Asn501, Gln493, Gly485 и Phe486.

Потенциал, нанесённый на поверхность RBD (рисунок 6.8 е.1-е.3), показывает несколько заряженных областей. Внешняя сторона домена RBD (рисунок 6.8 е.3) в основном заряжена положительно («внешняя» сторона относится к растворителю и возможным клеткам-хозяевам). Противоположная «внутренняя» сторона RBD (рисунок 6.8 е.1), обращённая к вирусному белку, имеет две заряженные области противоположных знаков. «Верхняя» (рисунок 6.8 е.2) часть домена RBD, которая может взаимодействовать с рецептором ACE2, заряжена лишь слегка отрицательно. Положительно заряженные участки на поверхности RBD являются основными мишенями для связывания аптамеров, содержащих отрицательно заряженные фосфатные группы в двухцепочечной спирали ДНК.

Из этого можно сделать вывод что, наличие двуцепочечного участка в конформации аптамеров может иметь решающее значение для их связывания со шпилем RBD, а длина дуплексного тракта может быть настроена для усиления связывания. Как положительно заряженные внешние, так и внутренние части RBD могут быть мишенью для спирали стебля аптамера. Другой потенциальной мишенью для связывания является верхняя часть RBD. Она образована преимущественно нейтральными полярными аминокислотами, такими как Asn, Gln, Ser, Thr и Tyr. В частности, Asn и Gln хорошо известны как партнёры по водородным связям [431] нуклеобаз в белковых комплексах. Недуплексная часть аптамера может быть настроена на связывание с верхней стороной RBD. Таким образом, карта электростатических потенциалов дала две ценные подсказки для дизайна аптамеров. Он должен иметь двуцепочечную часть, связывающуюся с внешним или внутренним RBD, и недуплексный домен, связывающийся с верхней частью RBD.

Этапы конструирования аптамеров. Создание библиотеки аптамеров. Молекулярное моделирование аптамеров проводилось с использованием нового подхода к подбору *in silico* без предварительных экспериментов. В целом, *in silico* моделирование аптамеров [415,432] можно разделить на два этапа:

- (I) поиск олигонуклеотидных последовательностей, которые формируют часть аптамера, ответственную за селективное связывание, и
- (II) построение структуры аптамера, поддерживающей оптимальную конформацию этой связывающей части.

Рассматривая интерфейс связывания RBD (рисунок 6.8 е.2) в качестве основной мишени для аптамера, в качестве начальной формы аптамера для стыковки с вогнутой верхней областью белка RBD была выбрана шпилька. Для получения первоначальной библиотеки кандидатов в аптамеры была сконструирована 16-нуклеотидная последовательность 5'-GGAATT NNNN AATTCC-3', имеющая центральную переменную петлю «NNNN» из четырёх нуклеотидов и две постоянные комплементарные области на 5' и 3' концах (рисунок 6.9 а). В данном исследовании были рассмотрены все возможные комбинации нуклеотидов ДНК для варибельной области, что привело к созданию исходной библиотеки аптамеров из  $4^4=256$  позиций. Двухцепочечная стволовая часть (5'-GGAATT- и -AATTCC-3') улучшает сродство аптамера к положительно заряженным частям RBD и сохраняет структуру аптамера.

Молекулярный докинг для всех 256 моделей из библиотеки 16-буквенных аптамеров (рисунок 6.9 а) был проведён в соответствии со схемой *in silico* отбора, представленной на рисунке 6.7. Для каждого аптамера было предсказано десять сайтов связывания. Верхняя сторона RBD в основном открыта для рецептора (рисунок 6.8 е.2) и, предположительно, отвечает за распознавание вирусом белка ACE2. Был выбран вариант молекулы, у которого, по прогнозам, было больше всего сайтов связывания, расположенных в верхней части RBD (рисунок 6.9 с). Этот аптамер, имеющий последовательность AGTC в варибельной области (рисунок 6.9 b), обозначен как Apt16. Он был использован в качестве исходной последовательности для дальнейших модификаций с целью повышения

аффинности связывания с ключевыми аминокислотными остатками RBD, о чём сообщалось в работе Lu *et.al.* [430].

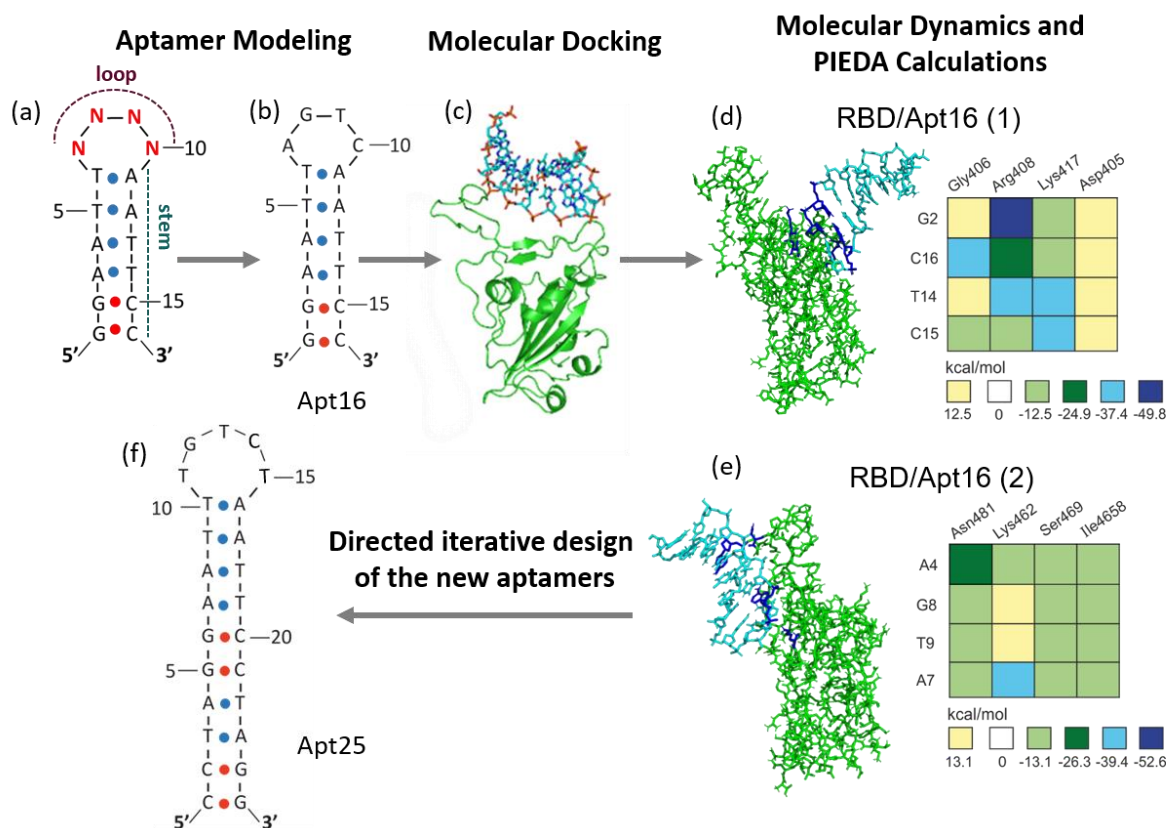


Рисунок 6.9 – Молекулярное моделирование и результаты взаимодействия. (а) Вторичная структура исходных аптамеров, (b) аптамера Apt16 и (f) аптамера Apt25. (c) Комплекс Apt16/RBD, полученный в результате молекулярного докинга. Молекулярная структура и QM взаимодействия нуклеотид-остаток для двух изомеров комплексов RBD/Apt16, (d) Apt16(1) и (e) Apt16(2). RBD выделены зелёным цветом, аптамеры - голубым; основные взаимодействующие аминокислоты и нуклеотиды - темно-синим. Основные QM-взаимодействия показаны в виде двухмерных карт, на которых нуклеотиды (G2 и т.д.) и остатки (Gly406 и т.д.) обозначены на тепловой карте; темно-синий, светло-синий, зелёный и жёлтый цвета обозначают притяжение в порядке убывания.

Моделирование комплекса Apt16-RBD. Как упоминалось выше, Apt16 был выбран в качестве исходной последовательности, и его сайты связывания с белком

были предсказаны путём докинга с RBD (рисунок 6.9 с). Для дальнейшего уточнения места связывания комплекса RBD/Apt16 было проведено MD-моделирование. MD-симуляция проводилась с помощью программного пакета GROMACS в течение не менее 200 нс. После MD-симуляции кластеризация конформеров показала, что Apt16 в основном связывается с верхней частью RBD (рисунок 6.9 d и e). Из всех кластеров конформаций для дальнейшего анализа были выбраны два с наибольшей населённостью в MD-симуляциях. Было обнаружено, что Apt16(1) (рисунок 6.9 d) в основном связывает RBD с 3'-концевыми нуклеотидами. Для конформации Apt16(2) (рисунок 6.9 e) в связывании участвуют нуклеотиды, расположенные как в петле, так и в стволовой части.

Далее был проведён более детальный полуколичественный анализ энергий взаимодействия остатков с нуклеотидами. MD-структуры комплексов RBD / аптамер были оптимизированы на полуэмпирическом уровне функционала плотности, основанного на DFTB3 [433]. Для оптимизированных структур использовали подход фрагментации FMO для получения энергий взаимодействия, которые оценивали с помощью неэмпирического метода RI-MP2/6-31G(d,p). Во всех этих симуляциях растворитель учитывался с помощью РСМ. Далее процедура, описанная для Apt16, была применена и к другим аптамерам.

Суммарные энтальпии взаимодействия,  $E_{total}$ , между RBD и аптамером (таблица 6.1) были получены как сумма энергий взаимодействия пар остаток-нуклеотид (PIE) на теоретическом уровне DFTB3 и RI-MP2. Значения PIE позволяют сравнить частичный вклад в энергию связывания от одного нуклеотида в аптамере и оценить влияние точечных мутаций. Таким образом, они могут быть использованы для систематического улучшения последовательности аптамера для лучшего связывания с молекулой-мишенью. Следует отметить, что поскольку мы не пытались учесть вклад энтропии в PIE,  $E_{total}$  включает только энтальпию связывания. Однако энтропия может играть значительную роль в связывании, что делает экспериментальные проверки важными после каждого цикла SIBDD.

Таблица 6.1. Полная энергия взаимодействия  $E_{total}$  (ккал/моль) и количество водородных связей  $N_{HB}$  между аптамерами и RBD. Энергии рассчитаны с использованием метода FMO2/RI-MP2. Для сравнения приведены энергии FMO2/DFTB3. В скобках указаны номера конформеров.

Аптамер	$N_{HB}$	$E_{total}$	Аптамер	$N_{HB}$	$E_{total}$
Apt16 (1)	12	-153.0	Apt27 (1)	14	-200.1
Apt16 (2)	9	-91.6	Apt27 (2)	17	-217.4
Apt25 (1)	11	-159.2	Apt31 (1)	13	-221.6
Apt25 (2)	12	-162.7	Apt31 (2)	9	-152.2

Например, для двух разных комплексов RBD/Apt16(1) и RBD/Apt16(2) значения  $E_{total}$  составляют -153,0 ккал/моль и -91,6 ккал/моль, соответственно, что говорит о том, что RBD/Apt16(1) более стабилен по сравнению с RBD/Apt16(2). Тепловые (цветные) карты на рисунке 6.9 d, e иллюстрируют пары нуклеотидов и аминокислот, вклад которых в энергию связывания принимает наибольшее значение. В комплексе RBD/Apt16(1) связывание происходит в основном за счёт нуклеотидов ствола G2, C15, T14 и C16, тогда как в RBD/Apt16(2) связывание происходит в основном за счёт нуклеотидов петли A7, G8 и T9. Участие дуплексных пар оснований в связывании нежелательно, поскольку эта область может быть использована для усиления аптамера впоследствии функциональными группами, например, флуоресцентными метками. Таким образом, стратегия улучшения средства связывания Apt16 с RBD заключалась в модификации аптамера с целью увеличения взаимодействия с нуклеотидами петли, а не с нуклеотидами дуплексного стебля.

Итеративный дизайн аптамеров для связывания с RBD. Результаты экспериментальной проточной цитометрии (см. ниже рисунок 6.12 а) показали, что Apt16 связывается слабее, чем случайная последовательность из 40 нуклеотидов. Таким образом, для повышения аффинности и специфичности связывания аптамеров с доменом RBD SARS-CoV-2 исходная последовательность Apt16 была

изменена. На основании результатов MD-моделирования и расчётов квантовой химии, рассмотренных выше, были расширены как дуплексные, так и петлевые области аптамера Apt16. Во-первых, для усиления комплементарной дуплексной структуры стеблевые области были удлинены с шести до десяти пар оснований на 3' и 5' концах, что привело к образованию нового шаблона шпильки 5'-ССТАГГААТТ-петля-ААТТССТАГГ-3'. Во-вторых, в комплексах RBD/Apt16 взаимодействие с белком происходило в основном за счёт гуанинов и цитозинов, и, в гораздо меньшей степени, аденинов. В работах [432,434] указывается, что аспарагин и глутамат, экспонированные на поверхности RBD, предпочтительно связывают тимин по сравнению с другими основаниями. Мы заменили аденин на тимин в петле, чтобы увеличить сродство связывания, и добавили ещё один тимин на 3' конце петли. В результате этих модификаций был создан новый аптамер Apt25 5'-ССТАГГААТТ- TGTCT-ААТТССТАГГ-3' (рисунок 6.9 f), который прошёл через схему подбора аптамеров *in silico*, приведённую на рисунке 6.8, аналогично Apt16.

Сравнение результатов расчётов для RBD/Apt16 и RBD/Apt25 показало, что модификации структуры аптамера улучшают связывание. В таблице 6.1 показано, что общая энергия взаимодействия  $E_{total}$  для комплексов RBD/Apt25 более привлекательна, чем для двух комплексов RBD/Apt16. Дуплексный сегмент Apt25 был стабилен во время MD-симуляций. В комплексах RBD/Apt25 при анализе FMO PIEDA наблюдались сильные электростатические взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными группами дуплексной основы аптамера и положительно заряженными областями RBD. По сравнению с RBD/Apt16, количество сильно взаимодействующих пар остаток-нуклеотид в RBD/Apt25 больше, включая взаимодействие с тимином Apt25 (карты представлены на рисунок 6.10 а.2). Две наиболее представительные структуры RBD/Apt25 в MD-симуляциях показаны на рисунке 6.10 (а.3, а.5). Общее количество водородных связей почти такое же, как и в комплексах RBD/Apt16, но в кластерах RBD/Apt25 они образованы в основном тимидами T9, T11, T13, T15, расположенными как в петле, так и в стеблевых частях.

Как уже упоминалось, функция дуплекса заключается в поддержании жёсткой конформации шпильки и обеспечении электростатических взаимодействий с белком. Для дальнейшего улучшения этой функции одна из пар оснований А-Т была заменена на пару С-Г, чтобы ещё больше укрепить дуплекс, учитывая, что пары С-Г связаны тремя водородными связями, а пары А-Т - только двумя. Поскольку данные по взаимодействию показали, что в Apt25 нуклеотид Т9 дуплекса связывается с RBD (рисунок 6.10 а.2, а.4), Т9 был заменён на А9, а также был изменён порядок пар в центральной области дуплекса, чтобы убедиться, что специфичность связывания обусловлена нуклеотидами петли, а не стебля. Новая последовательность стебля была 5' - CGGATGGAAT – петля – АТТССАТССГ - 3'.

С другой стороны, размер петли аптамера был увеличен, чтобы увеличить поверхность взаимодействия с RBD и компенсировать изменения в части стебля. Петля была расширена за счёт дополнительной пары (в Apt27) и двух пар (в Apt31) нуклеотидов. В результате были получены два новых аптамера с одинаковым дуплексным стеблем, но петлей разного размера: Apt27 (5'-стебель - TTG TCTG - стебель-3') и Apt31 (5'-стебель - АСТТ TGTC TGTC - стебель-3'). Структуры всех рассмотренных аптамеров представлены на рисунке 6.11. Аптамеры Apt27 и Apt31 подверглись моделированию в соответствии с рисунком 6.7.

Комплексы RBD/аптамер – сравнительный анализ. Связывание аптамеров с RBD может быть изучено с точки зрения структуры и взаимодействий. Для каждого комплекса (RBD/аптамер) аптамер оставался связанным с RBD на протяжении всей MD-симуляции, принимая несколько сайтов связывания. Apt16 и Apt27 связываются преимущественно с верхней частью RBD, как показано на рисунках 6.9 d и e и рисунках 6.10 b.3 и b.5, а Apt25 и Apt31 предпочтительно связываются с боковыми сторонами RBD (рисунок 6.10 а.3 и а.5 и рисунок 6.10 с.3 и с5), что обусловлено электростатическими взаимодействиями между фосфатными группами дуплексной части аптамера и положительно заряженными остатками RBD.

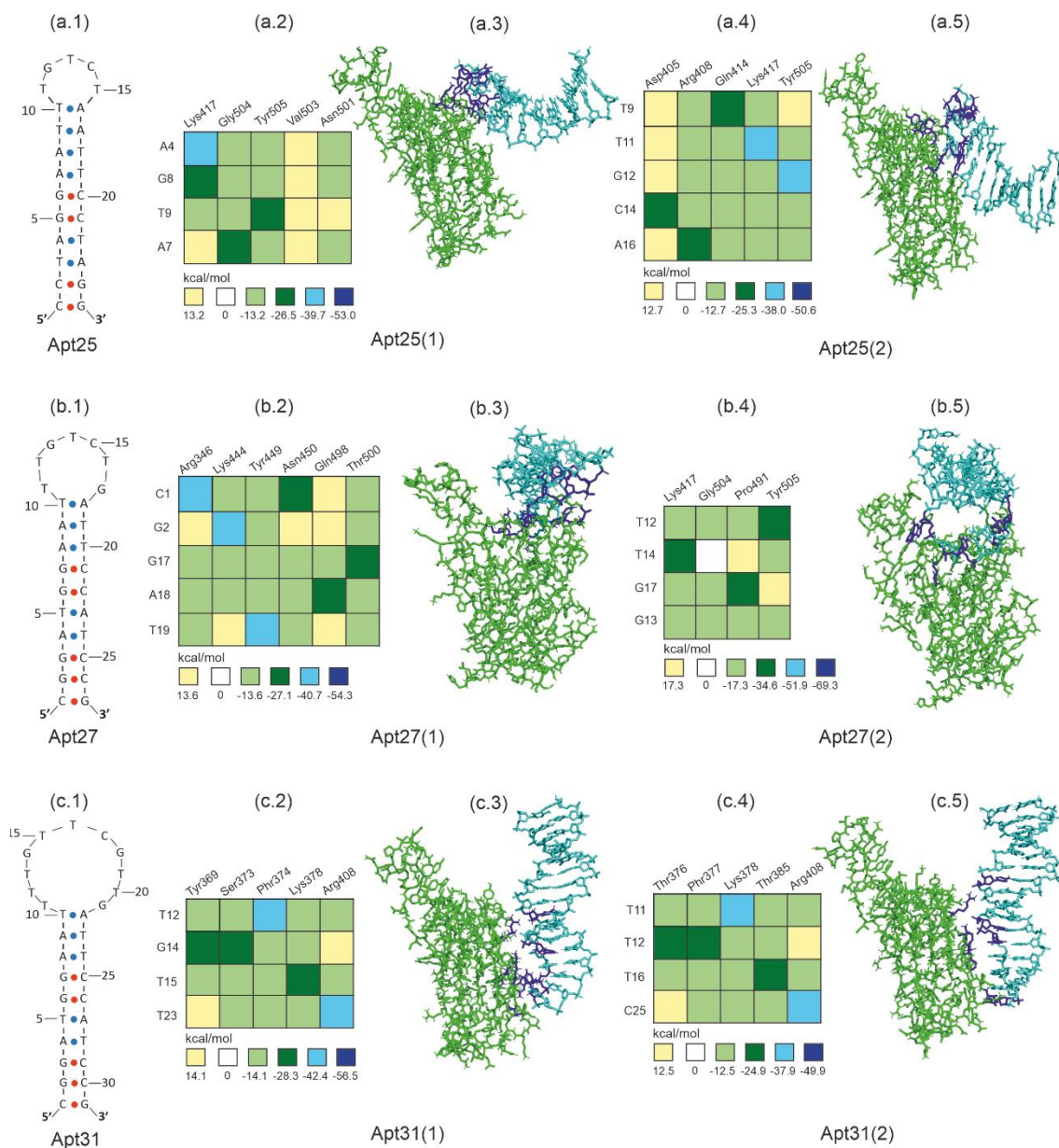


Рисунок 6.10 – Молекулярная структура и энергии взаимодействия для комплексов RBD и аптамеров. RBD – зелёный цвет, аптамеры – голубой. (a.1), (b.1), (c.1) – вторичная структура Apt25, Apt27, Apt31, соответственно.

Основные взаимодействия PIEDA показаны в виде карт, на которых нуклеотиды (A4 и т.д.) и остатки (Lys417 и т.д.) обозначены на тепловой карте; темно-синий, светло-синий и зелёный цвета обозначают притяжение в порядке убывания.

Для анализа связывания были рассчитаны энергии парных взаимодействий между остатками RBD и нуклеотидами аптамеров. Значения парных



взаимодействий для первичных участников связывания представлены в виде тепловых карт на рисунках 6.10 с.2 и с.4 для кластеров RBD/Apt31 и на рисунках 6.10 а.2, а.4, б.2 и б.4 и рисунках 6.10 d и e для других комплексов. Общая энергия взаимодействия  $E_{total}$  между RBD и аптамером для каждого комплекса была рассчитана путём суммирования всех энергий взаимодействия остатков и нуклеотидов. Результаты представлены в таблице 6.1, где более отрицательные значения  $E_{total}$  соответствуют более сильному притяжению.

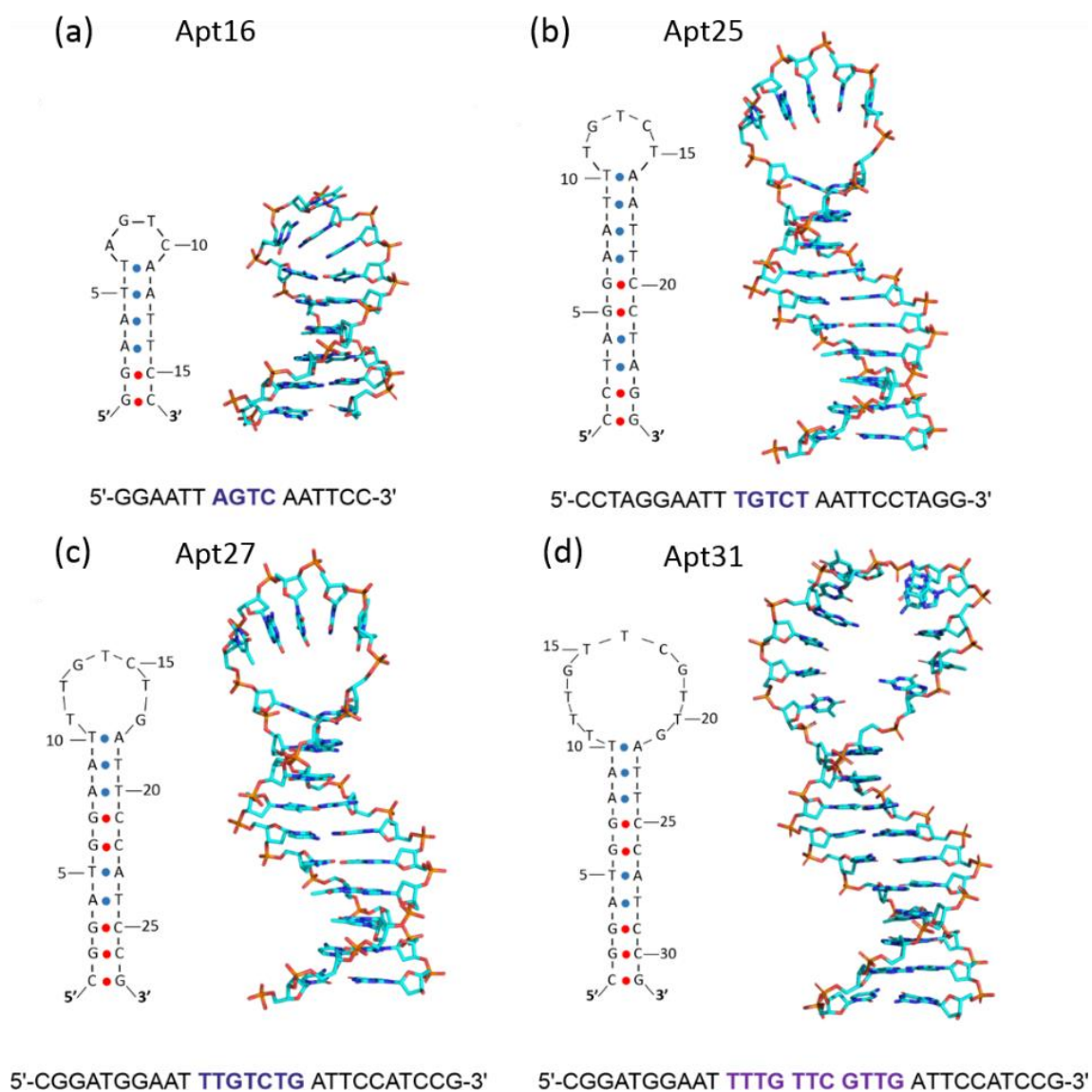


Рисунок 6.11 – Вторичные структуры и соответствующие третичные структуры, оптимизированные с помощью FMO2-DFTB3/PCM( $H_2O$ ).

Другой важной характеристикой является количество водородных связей в комплексах RBD/аптамер (таблица 6.1). Чем больше число водородных связей, тем

выше сродство связывания аптамера с RBD. Из таблицы 6.1 видно, что в результате дизайна аптамеров общее взаимодействие  $E_{total}$  стало сильнее от -91,6 ккал/моль для Apt16(2) до -221,6 ккал/моль для Apt31(1). Согласно таблице 6.1, самые сильные взаимодействия наблюдались для Apt27(2), показавшего сильное взаимодействие - 217,4 ккал/моль. Между RBD и фрагментами аптамеров в комплексах RBD/Apt27(2) существует 17 водородных связей, а в комплексах RBD/Apt31(1) - 13 водородных связей. Тепловые карты взаимодействий на рисунках 6.10 с.2 и в.4 показывают, что в комплексах RBD/Apt31(1) и RBD/Apt27(2) одни из самых сильных взаимодействий обусловлены тиминами, расположенными в петле. В комплексе RBD/Apt27(2) наибольший вклад в связывание вносят пары T12-Tyr505, T14-Lys417 и G17-Pro491, а в комплексе RBD/Apt31(1) самые сильные взаимодействия наблюдаются для пар фрагментов G14-Tyr369, G14-Ser373 и T15-Lys378.

Экспериментальный анализ сродства аптамеров к RBD. Экспериментальное подтверждение связывания аптамера с RBD проводилось тремя различными методами: проточной цитометрией, поляризацией флуоресценции и малоугловым рентгеновским рассеянием (Рисунок 6.12). *In silico* моделирование предсказывает различное сродство связывания аптамеров с RBD. Для подтверждения этого результата были проведены проточно-цитометрические эксперименты по связыванию аптамеров-кандидатов с рекомбинантным очищенным пептидом RBD. Как показано на рисунке 6.12 а, интенсивность флуоресценции, вызванная всеми аптамерами, за исключением Apt16, выше, чем интенсивность флуоресценции, вызванная случайной последовательностью. Более того, уровень связывания каждого последующего аптамера, разработанного в ходе эволюции *in silico*, выше, чем у всех предшествующих, что подтверждает правильность дизайна, основанного на моделировании. Данные проточной цитометрии подтвердили, что Apt31 обладает наиболее сильным сродством к RBD по сравнению со случайной последовательностью ДНК, что хорошо согласуется с энергиями взаимодействия, полученными в результате QM-расчётов.

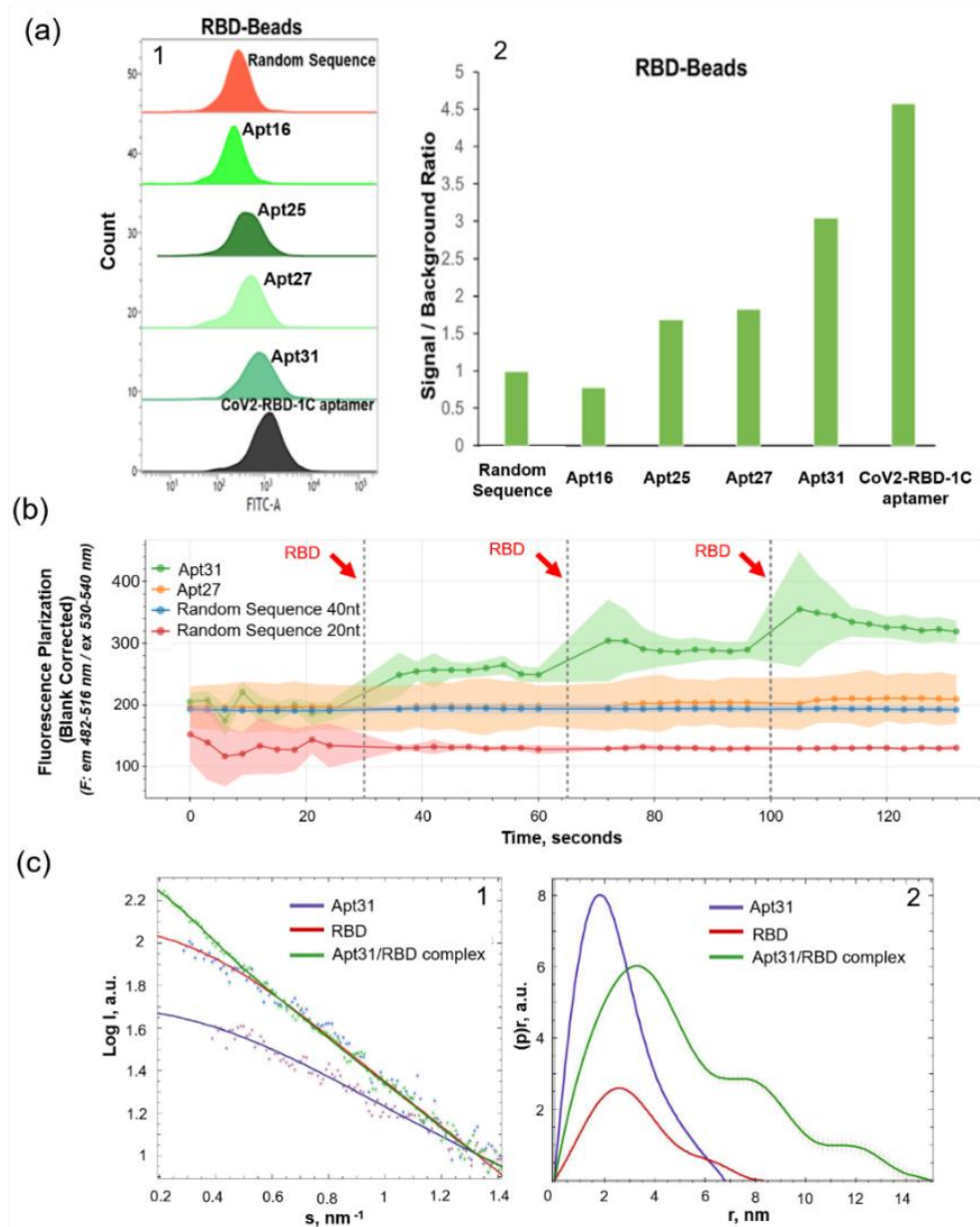


Рисунок 6.12 – Экспериментальный анализ средства аптамеров к RBD. (a) Проточно-цитометрический анализ случайной последовательности, аптамеров-кандидатов и CoV-2-RBD, который представлен в виде гистограмм связывания и соотношения сигнал/фон аптамеров к RBD в буфере. (b) Анализ поляризации флуоресценции аптамеров, связывающихся с рекомбинантным RBD, плавающим в растворе. (c) МУПП (SAXS) -данные Apt31, RBD и их комплекса. Кривые МУПП соответствуют аптамеру, RBD и их связанному состоянию.

Также проведён экспериментальный анализ связывания аптамеров с рекомбинантным RBD с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Используя графики зависимости интенсивности МУРР от угла рассеяния, можно оценить размеры и форм-фактор молекул в растворе. Наклон кривой МУРР показывает особенности формы молекул (рисунок 6.12 с). Был получен МУРР-спектр эквимольной смеси аптамера и белка RBD. Наблюдаются дополнительные пики по отношению к отдельным МУРР-спектрам RBD или аптамера, соответствующие комплексу с приблизительным размером 15 нм (рисунок 6.12 с). Общий объём электронной плотности соответствует молекулярной массе в диапазоне 40-52 кДа. Массы аптамера и белка были оценены в диапазонах 10,8-13,1 и 20,8-33,5 кДа, соответственно (с достоверностью 95 %). В итоге можно сказать, что МУРР подтвердил гипотезу о связывании RBD и аптамера

В итоге можно сказать, что ДНК-аптамеры являются перспективными лигандами для обнаружения SARS-CoV-2 и блокирования его вирусной активности благодаря своей высокой специфичности, простоте модификации и использования. В работе представлена новая методология – дизайн лекарств на основе структуры и взаимодействия (SIBDD), которая была применена для разработки нового 31-буквенного ДНК-аптамера, нацеленного с высокой аффинностью на RBD-домен белка-шипа SARS-CoV-2.

Процедура выбора в SIBDD сочетает в себе:

- 1) библиотеку структур аптамеров *in silico*;
- 2) расчёты электростатического потенциала для докинга аптамеров к RBD;
- 3) моделирование молекулярной динамики и
- 4) анализ энергий связывания на основе квантовой механики.

Полученные в ходе этой процедуры качественные представления об остаточно-нуклеотидных взаимодействиях используются для рациональной модификации аптамеров *in vitro*. Валидность подхода SIBDD была подтверждена с помощью (1) проточной цитометрии, (2) поляризации флуоресценции и (3) измерений малоуглового рентгеновского рассеяния (рисунок 6.12).

Экспериментальные результаты показали, что аптамер Apt31 является наиболее эффективным, что полностью подтверждает предсказание SIBDD *in silico*.

В целом можно сказать, что применение вычислительных методов в сочетании с экспериментальными процедурами может ускорить конструирование аптамеров. С помощью новой итеративной процедуры дизайна, основанной на структуре и взаимодействии (SIBDD), был разработан и проверен высокоспецифичный аптамер к рецептор-связывающему домену белка SARS-CoV-2. Подход сочетает молекулярную динамику и квантовую химию для оценки сродства связывания *in silico* с проверкой *in vitro*.

#### **§6.4. СОЗДАНИЕ ДНК-АПТАМЕРОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА НУКЛЕОКАПСИДНЫЙ БЕЛОК SARS-COV-2 И БЕЛОК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЭПИТОПЫ, ДЛЯ БЫСТРОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19**

Распространение вируса COVID-19 показало, что ранняя диагностика вирусной инфекции все ещё нуждается в улучшении. Для снижения уровня смертности необходимо разработать надёжные и быстрые средства диагностики, которые отражали бы ранние стадии вирусной инфекции. При этом хотелось бы чтобы они были достаточно простые, быстрые и дешёвые. Благодаря высокой иммуногенности и обильной экспрессии во время вирусной инфекции, нуклеокапсидный (N) белок SARS-CoV-2 может стать важным диагностическим маркером. При разработке оптического аптасенсора, изготовленного с использованием нового одноцепочечного ДНК-аптамера (tNSP3) для обнаружения белка N полезно использовать теоретические подходы для понимания природы связывания между аптамером и целевым белком. N-связывающие аптамеры были отобраны экспериментально с помощью асимметрично-эмульсионного PCR-SELEX, а их сродство к связыванию и перекрёстная реактивность были охарактеризованы с помощью биослойной интерферометрии. Масс-спектрометрический анализ был проведён вместе с моделированием молекулярной

динамики, чтобы получить представление о том, как tNSP3 связывается с белком N. Благодаря этому выявленные эпитопные пептиды ответственные за данное связывание. Таким образом, подтверждена эффективность данного аптамера в качестве аналитического инструмента для диагностики COVID-19

В исследовании были отобраны новые аптамеры одноцепочечной ДНК (ssDNA) с помощью асимметрично-эмульсионной ПЦР-SELEX, чтобы нацелить их на белок SARS-CoV-2 N, стратегии и последовательности которого отличаются от тех, что были получены в предыдущих исследованиях. SARS-CoV-2. N-белок это РНК-связывающий белок для инкапсуляции вирусного генома, обильно экспрессируется в инфицированных клетках с очень низкой генетической изменчивостью с течением времени по сравнению с шип белком [435,436]. В связи с этим N-белок может быть использован в качестве потенциального биомаркера для ранней диагностики [437]. Связанные с аптамером пептиды были обработаны методом протеомики, а взаимодействие связывающего эпитопа с аптамером было дополнительно оценено с помощью моделирования молекулярной динамики (MD). Данное исследование может быть использовано не только для различения SARS-CoV-2 положительных и отрицательных клинических образцов, но и для выявления мотивов связывания аптамера с белком, которые в будущем могут быть использованы в терапевтических целях.

Рекомбинантный N-белок был использован в качестве мишени для отбора аптамеров к ssDNA с помощью процедуры SELEX в результате данного эксперимента были получена первичная последовательность аптамера tNSP3. Далее первичная последовательность аптамера tNSP3 была использована для предсказания его вторичной структуры с помощью веб-сервера mFold [438] (рисунок 6.13 А). Соответствующая третичная структура tNSP3 была смоделирована с помощью программ SimRNA [439] и VMD [440,441]. После этого с помощью пакета GROMACS [442] было проведено 200-нс моделирование молекулярной динамики (MD) для получения пространственной структуры аптамера tNSP3 в растворе (рисунок 6.13 В). В связи с высокой аффинностью связывания аптамера tNSP3 был проведён молекулярный докинг для этого

аптамера с целью предсказания пространственной структуры комплекса белок-лиганд и выявления критических нуклеотидов, обеспечивающих связывание.

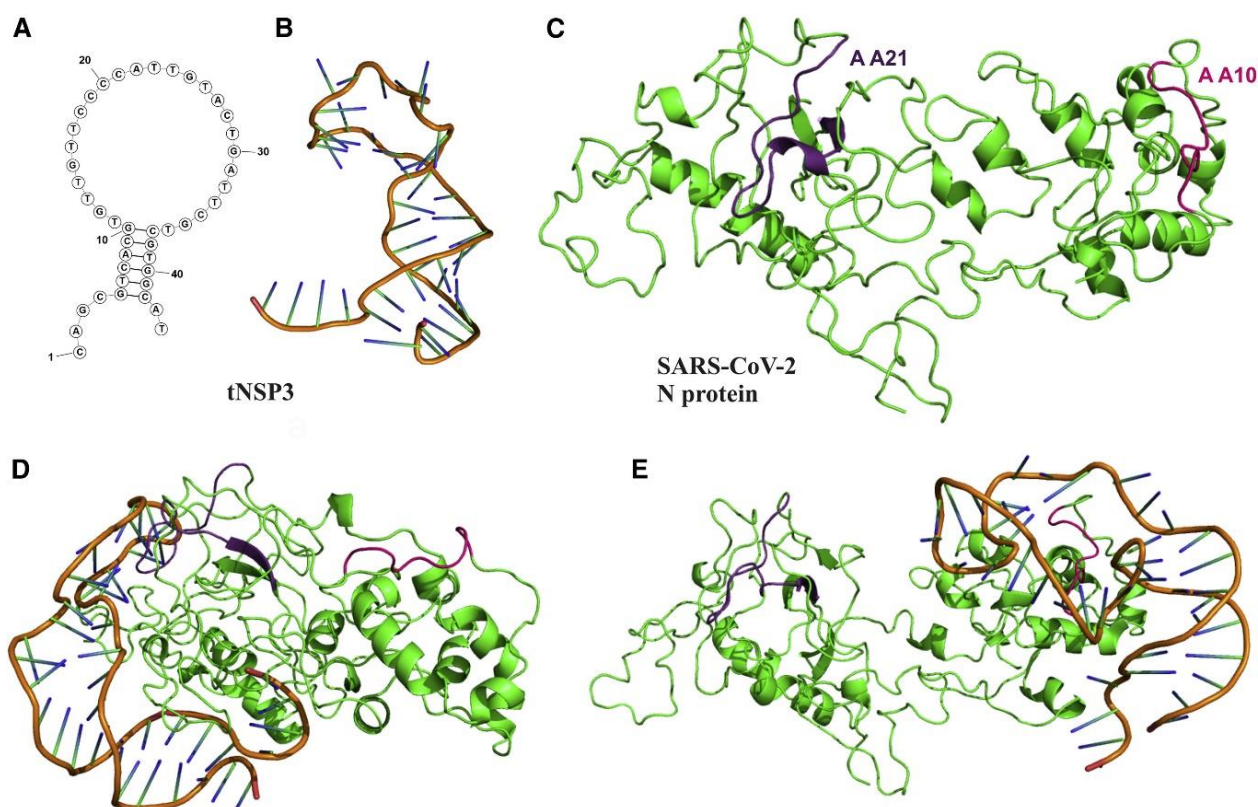


Рисунок 6.13 – Структура белковых комплексов tNSP3-N. (А) Вторичная и (В) третичная структуры аптамера tNSP3. (С) Третичная структура нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2. (D и E) Комплексы tNSP3, связывающиеся с мотивами AA21 и AA10 на белке N. Пептидные мотивы AA21 и AA10 окрашены в фиолетовый и красный цвета, соответственно.

На сегодняшний день экспериментальная структура всего белка N не известна поэтому дополнительно в работе третичная структура белка N была предсказана путём моделирования с использованием сервиса Iterative Threading ASSEmblY Refinement (I-TASSER) [384]. Выбрана модель с наилучшей оценкой, относящаяся к шаблону моделирования [443], и подвергнута 200-нс MD-симуляции с последующим кластерным анализом MD-траекторий. Полученная равновесная структура белка N (рисунок 6.13 С) была использована для молекулярного докинга. Рассматривая пептиды AA10 и AA21 в качестве сайтов связывания с белком N, молекулярный докинг проводили с помощью веб-сервера HDOCK [425]. В



результате программа HDOCK дала десять различных комплексов аптамер-белок для сайтов связывания AA10 и AA21. Для изучения взаимодействия аптамера с белком были взяты сайты связывания, получившие наибольшее количество баллов. Модели этих сайтов связывания были уточнены с помощью MD-симуляций для получения наилучших структур в условиях раствора (рисунок 6.13 D и E). Оба рассматриваемых комплекса были стабильны в течение 200 нс MD-симуляций и не проявляли диссоциации. Для более детальной оценки остаточно-нуклеотидного взаимодействия для каждого комплекса были выбраны два кластера с большой заселённостью при MD-симуляции.

В связывании с эпитопами AA10 и AA21 участвуют разные нуклеотиды. Для эпитопа AA10 связывание происходило в основном за счёт нуклеотидов G15, T17, C18 и C19, тогда как связывание эпитопа AA21 происходило в основном за счёт нуклеотидов T32, A22 и T23. Все эти нуклеотиды расположены в петле аптамера tNSP3. Подробная информация о водородных связях приведена в таблице 6.2, и оба комплекса не выявили существенной разницы в общем количестве водородных связей.

Новизна работы заключается в выборе ДНК-аптамеров, связывающихся с нуклеокапсидом SARS-CoV-2 с помощью асимметричной эмульсионной ПЦР, определении эпитопов, связывающих аптамер с N-белком, и использовании аптамеров для обнаружения N-белка в слюне человека с помощью простых медицинских методик. Экспериментально были получены новые последовательности ДНК-аптамеров к N-белку дикого типа SARS-CoV-2. Структура аптамера демонстрирует высокую аффинность связывания с N-белком. Кроме того, взаимодействие AA10-связывающего сайта с tNSP3 было смоделировано с помощью MD-симуляции. Интересно, что в комплексах аптамер/белок нет одинаковых пар нуклеотид-аминокислота, что предполагает, что отдельный нуклеотид может предпочтительно связываться с конкретными аминокислотами на сайтах связывания. Несмотря на то, что аптамер tNSP3 показал частичное связывание с пептидом AA21, локализованным в РНК-связывающем домене, это может быть неспецифическим взаимодействием, в основном за счёт



электростатических взаимодействий между положительными остатками на N-белке и фосфатной основой ДНК-аптамера. Эффективность аптамера tNSP3 была оценена экспериментально путём обнаружения белка SARS-CoV-2 N в слюне человека [444].

Таблица 6.2. Водородные связи в комплексах N-белок-tNSP3. Число в скобках – номер конформера. Аминокислоты пептида AA10 выделены жирным шрифтом.

N protein/NSP3 (1)		N protein/NSP3 (2)		N protein/NSP3 (1)		N protein/NSP3 (2)	
<b>Binding site AA21</b>		<b>Binding site AA21</b>		<b>Binding site AA10</b>		<b>Binding site AA10</b>	
Residue	Nucleotide	Residue	Nucleotide	Residue	Nucleotide	Residue	Nucleotide
GLN 9	G 35	GLN 9	G 35	LYS 338	C 4	ASN 126	T 23
ARG 10	G 35	ARG 10	G 35	LYS 361	C 37	LYS 127	T 23
ARG 14	C 34	ASN 29	C 1	GLU 367	G 30	ARG 276	T 23
ASN 29	T 6	<b>ASN 77</b>	T 32	<b>ARG 385</b>	T 17	ARG 293	C 19
ASN 29	A 2	<b>SER 79</b>	T 23	<b>GLN 384</b>	G 15	LYS 338	C 4
GLU 31	C 1	THR 14	C 21	<b>GLN 384</b>	C 18	LYS 361	C 37
GLU 31	A 2	LYS	C 19	GLN 386	T 14	GLU 367	G 30
SER 37	C 1	143	C 20	LYS 387	T 16	LYS 373	T 29
<b>ASN 77</b>	T 32	LYS	G 25	LYS 387	T 14	LYS 375	T 33
<b>SER 79</b>	A 22	143	A 27	GLN 408	C 4	<b>GLN 384</b>	G 15
<b>SER 79</b>	T 23	GLN	T 29	GLN 408	T 6	<b>GLN 384</b>	C 18
LYS	C 20	160	G 3			<b>GLN 384</b>	C 19
143	G 25	ARG				<b>ARG 385</b>	T 17
GLN	T 24	189				<b>ARG 385</b>	C 18
160	T 29	SER				GLN 386	T 14
GLN	T 29	193				GLN 386	T 16
163	G 30	LYS				LYS 387	T 16
SER	T 29	237				GLN 408	C 4
193	G 3						
SER	A 2						
201							
ARG							
203							
ARG							
203							
LYS							
237							
LYS							
256							

В качестве заключения можно указать, что получены новые ДНК-аптамеры, связывающиеся с нуклеокапсидным белком SARS-CoV-2 и его вариантами, Delta и Omicron. Выбранный аптамер под названием tNSP3, успешно обнаруживает N-белок в слюне человека. Будущая работа в этом направлении может быть направлена на применение данного подхода, на основе аптамеров, к клиническим образцам.

## §6.5. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ АРАБИНОГАЛАКТАНА

Перспективным направлением мирового научно-технического прогресса в области изыскания новых материалов биогенного происхождения является изучение способов получения, свойств и применения арабиногалактана. К числу основных направлений их применения можно отнести: медицину, ветеринарию, фармацевтическую и косметическую промышленности, а также полиграфию и целлюлознобумажную промышленность. В последние годы исследования биологической активности арабиногалактана резко активизировались. Этому способствуют такие его свойства, как высокая растворимость в воде, уникально низкая вязкость растворов, узкое молекулярно-массовое распределение. Соединения являются экологически чистыми и полностью распадаются в природных условиях.

Арабиногалактан (AG) это полисахарид, выделенный из лиственницы, и представляет собой сухой, несмачиваемый порошок, с лёгким хвойным запахом и сладковатым вкусом. Легко растворяется в воде (в холодной воде 5 г/100 мл) и образует раствор с низкой вязкостью. Большое преимущество состоит в том, что процесс водной экстракции не требует применения растворителей, поэтому он экологически чистый и безопасный продукт. Существуют широкие перспективы использования арабиногалактана в медицине, ветеринарии, фармацевтической и косметической промышленности, а также в полиграфии и целлюлозно-бумажной промышленности. Исследования этого чрезвычайно ценного продукта ведутся с середины прошлого века чему посвящён ряд обзоров [445].

Макромолекула арабиногалактана имеет высоко разветвлённое строение (рисунок 6.14); главная цепь её состоит из звеньев галактозы, соединённых гликозидными связями  $\beta$ -(1→3), а боковые цепи со связями  $\beta$ -(1→6) – из звеньев галактозы и арабинозы, из единичных звеньев арабинозы, а также урановых кислот, в основном глюкуроновой. Соотношение звеньев галактозы и арабинозы примерно 6:1, причём 1/3 звеньев арабинозы находится в пиранозной форме, а 2/3

– в фуранозной [446]. Эти соотношения, а также молекулярная масса АГ могут колебаться не только в зависимости от вида лиственницы, но и в пределах одного вида. Термическая и гидролитическая стабильность являются важными характеристиками АГ, во многом определяющими возможность его использования.

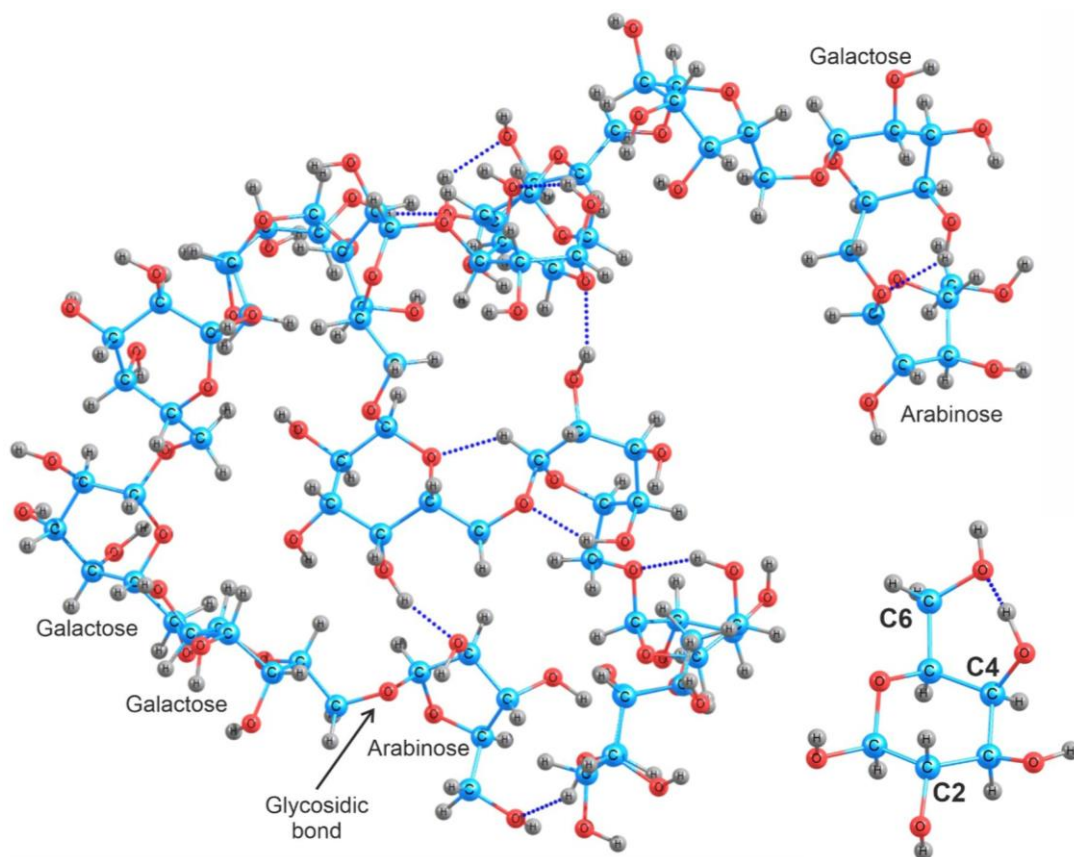


Рисунок 6.14 – Фрагмент молекулы арабиногалактана. Помеченные гидроксильные группы (С2, С4 и С6), ответственны за сульфатирования. Основная цепь состоит из звеньев галактозы, связанных гликозидными связями, боковые цепи состоят из звеньев галактозы и арабинозы, и отдельных звеньев арабинозы. Синие пунктирные линии показывают возможные внутримолекулярные водородные связи

Важной характеристикой для таких материалов является антикоагулянтная активность (АК). Она зависит от вида материала, содержания серы, степени сульфатирования, количества и расположения сульфатных групп, а также от скелета молекулы полисахарида. С увеличением количества серы в образцах возрастает антикоагулянтная активность [447–450]

Исследование электронной структуры методами теории функционала плотности может дать новое представление о свойствах биологически активных полисахаридов, таких как арабиногалактан и сульфатированный арабиногалактан. Основные характеристики арабиногалактана и сульфатированного арабиногалактана (SAG) могут быть предсказаны с использованием теории функционала плотности. Теоретические расчёты полисахаридов обеспечивают знание их структуры, свойств и взаимодействия с окружающей средой. Полученные данные имеют большое дальнейшее значение, так как они обеспечивают понимание внутримолекулярной структуры и могут быть использованы в дальнейшем моделировании и в технологии производства наночастиц. В работе проведены расчёты структуры арабиногалактана и его сульфатированных производных методами квантовой химии (рисунок 6.15). Начальная оптимизация молекулярной геометрии выполнена полуэмпирическим методом PM6. Расчёты оптимизации геометрии и колебательных спектров в вакууме и воде проводили с использованием теории функционала плотности на уровне B3LYP базиса 6-31+G(d), в модели PCM для воды в программы GAMESS.

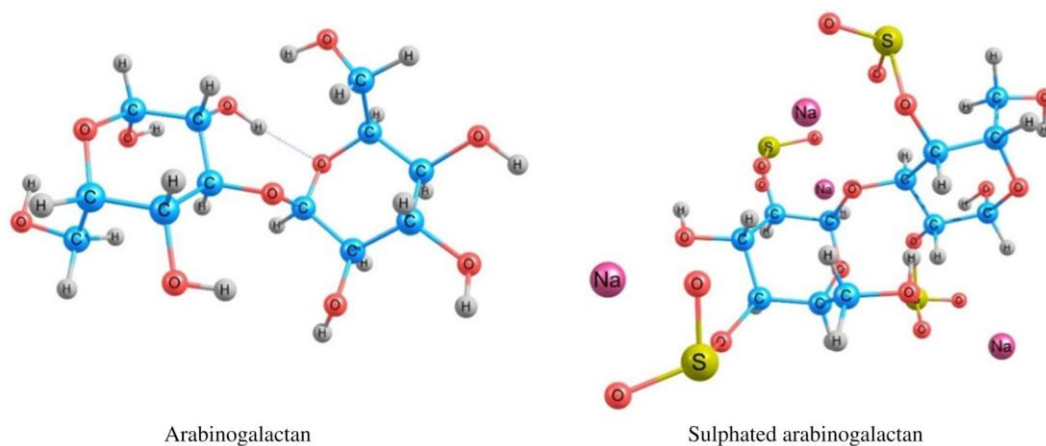


Рисунок 6.15 – Молекулярная структура галактозных звеньев арабиногалактана и сульфатированного арабиногалактана в положении 2,4.

Как показано на рисунке 6.16, спектры, относящиеся к SAG-2, SAG-4, SAG-6, SAG-2,4, имеют аналогичные полосы поглощения в области 0-1700  $\text{cm}^{-1}$ . В области 2800-3700  $\text{cm}^{-1}$  для образца SAG-2,4 идёт значительное смещение полосы поглощения высокой интенсивности, соответствующей -ОН группе, в область

меньших значений, а также наблюдается смещение пика в области 610-620  $\text{cm}^{-1}$  в сторону больших значений, который соответствует колебаниям сульфатной группы.

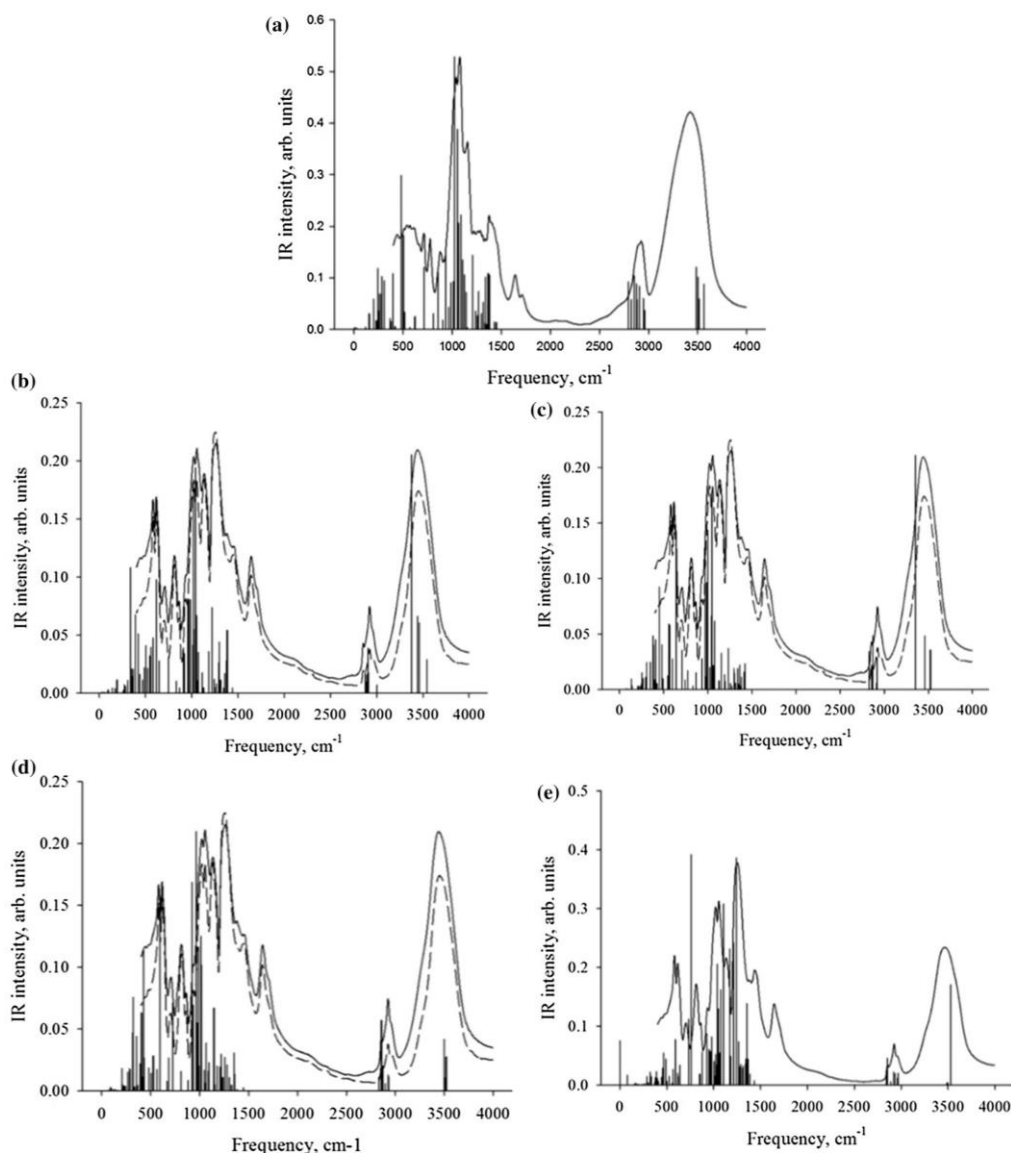


Рисунок 6.16 – Экспериментальные и теоретические ИК-спектры арабиногалактана и его сульфатированных производных. (а) – AG, (b) – SAG-2, (c) – SAG-4, (d) – SAG-6, (e) – SAG-2,4. Сплошная – 3,2%, пунктирная линия – 5,1% содержания серы (для SAG-2,4 содержание серы 9,4%). Теоретические ИК-спектры (B3LYP/6-31+) – вертикальные линии, экспериментальные – чёрные сплошные и пунктирные линии

Для образцов SAG-4, AG-6, по сравнению с SAG-2, наблюдается аналогичная картина, однако, смещение не такое значительное, как в случае с SAG-2,4. Для

образца SAG-2,4 наблюдаются полосы большей интенсивности, в сравнении с образцами SAG-2, SAG-4, SAG-6, в области 1240-1260  $\text{см}^{-1}$ .

В целом можно сделать вывод, что сульфатирование арабиногалактана идёт преимущественно по положению C2 и C4, в небольшом количестве – по C6. Также имеются области, не подвергающиеся сульфатированию (ввиду способности арабиногалактана образовывать «клубки» [451]), вероятно, благодаря процессам диффузии [452], приводящие к смещению и размыванию пиков в экспериментальных ИК-спектрах, которые соответствуют -ОН и -СН<sub>2</sub>- связям в молекуле полисахарида.

Таким образом, молекулярная и электронная структура и инфракрасные спектры арабиногалактана и его биологически активных сульфатированных производных были интерпретированы с использованием уровня теории B3LYP/6-31+G(d). Основные экспериментальные спектральные особенности были отнесены к конкретным колебаниям химической связи. Было обнаружено, что молекулярные модели на основе изолированных мономерных звеньев галактозы и арабинозы арабиногалактана и его сульфатированных производных могут быть использованы для корректного моделирования ИК-спектров во всей спектральной области 4000-500  $\text{см}^{-1}$ . Несоответствие теоретических и экспериментальных ИК-спектров может быть вызвано недостатками простых молекулярных моделей на основе 1-2 структурных единиц галактозы и арабинозы по сравнению с реальной структурой макромолекул, которая характеризуется отсутствием регулярного состава и кристаллического состояния.

## **§6.6. АРАБИНОГАЛАКТАН КАК КОНЬЮГАТ ДЛЯ АПТАМЕРА И МАГНИТНОЙ НАНОЧАСТИЦЫ ИЛИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

В настоящее время достижения в синтезе конъюгатов аптамеров с различными лекарствами, биополимерами и наночастицами позволяют увеличить

количество исследований в области биомедицины. Конъюгат это молекула (вещество или наноструктура, например), через которую связываются вместе две другие различные молекулы. Большой интерес в лечении рака вызывает применение конъюгатов аптамеров с наноструктурами из-за их высокой специфичности для раковых клеток и низкой токсичности для всего организма [453,454]. Традиционные низкомолекулярные противоопухолевые препараты очень токсичны для нормальных клеток, а иногда и неэффективны и даже могут увеличивать злокачественность опухоли. В последние годы были разработаны новые нанотехнологии, включающие физические методы разрушения опухолей с помощью наночастиц. Несмотря на высокую эффективность этих методов, они также имеют ограничения, такие как токсичность для клеток и низкая селективность из-за накопления наночастиц в тканях и органах, не являющихся мишенями.

Магнитные наночастицы становятся важными для целевой и малоинвазивной терапии рака [453,455,456]. К настоящему времени несколько ферромагнитных и суперпарамагнитных наночастиц уже нашли применение в медицинских целях [457–459]. Суперпарамагнитные частицы предпочтительнее ферромагнитных, потому что в отсутствие магнитного поля они не имеют магнитного момента и действуют только при приложении магнитного поля. Такие частицы используются для магнитно-резонансной томографии (МРТ), индукции гипертермии и механического разрушения клеток. Особое внимание следует уделять железосодержащим ферроарабиногалактанам (FeAG), в которых железо стабилизировано арабиногалактаном (AG). Железо в этих FeAG находится в форме гидратированного оксида железа с общей формулой  $Fe_3O_4 \cdot nH_2O$ , аналог минералов магнетита-маггемита или ферригидритов [460,461]. Преимуществами FeAG являются низкая токсичность, а также антиоксидантные, иммуномодулирующие и детоксикационные свойства. Избыток AG способствует выведению продуктов распада опухоли.

Для улучшения адресной доставки наночастицы можно модифицировать с помощью специфических лигандов-антител или аптамеров. Производство

аптамеров в сто раз дешевле моноклональных антител. Аптамеры уже продемонстрировали огромный потенциал в качестве агентов для молекулярного распознавания [462]. Аптамеры являются идеальными кандидатами для терапии в качестве агентов доставки из-за высокой селективности и низкой иммуногенности [359,462]. Аптамеры считаются синтетическим химическим продуктом, а не биологическим, потому что они химически синтезируются с высокой чистотой с помощью автоматизированной процедуры. Функционализация наночастиц с помощью аптамеров улучшает их биосовместимость, коллоидную стабильность и увеличивает время циркуляции *in vivo* [463,464].

Компьютерное моделирование комплекса AG с аптамером было выполнено с использованием высокоуровневых квантово-механических расчётов. На основе наночастицы, показанной в крайней правой части рисунка 6.17, а, была выбрана подходящая модель для моделирования, которая исключает феррокластер и включает репрезентативную часть арабиногалактана (5 сахарных единиц) и восемь нуклеотидов из аптамера ДНК (двухцепочечный Пары AT, TA, CG, GC на двух концевых участках аптамера), см. рисунок 6.17, а, б. Чтобы моделирование было более реалистичным, противоионы (катионы натрия) были добавлены вокруг каждой отрицательно заряженной фосфатной группы в аптамере (1 противоион к  $\text{PO}_3^{-2}$  и два противоиона к концевым группам  $-\text{PO}_3^{2-}$ ), за исключением двух фосфатных групп T1 и C1. (рисунок 6.17, б) не получали противоион, поскольку предполагалось, что эти группы связываются непосредственно с арабиногалактаном. Нумерация нуклеотидов включает цифру 1 или 2 в зависимости от того, к какой цепи они принадлежат; цепь 1 наиболее близка к аптамеру.

Молекулярная структура была оптимизирована с использованием метода фрагментных молекулярных орбиталей (FMO) на уровне двухчастичного FMO-разложения с использованием DFTB3 (FMO2-DFTB3) с использованием параметров *3ob* [383] в сочетании с континуальной моделью сольватации поляризуемого проводника (C-PCM) [465]. FMO-DFTB/PCM – это быстрый и



точный метод, что было продемонстрировано при сравнении оптимизированных белковых структур с экспериментами [465].

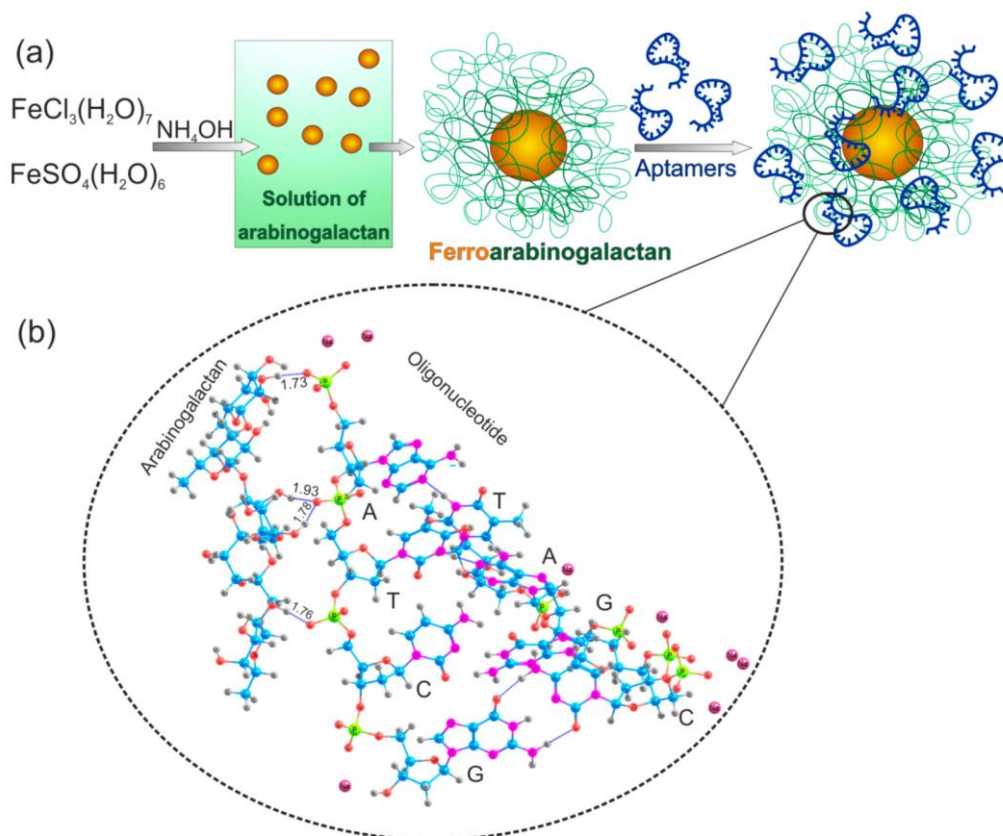


Рисунок 6.17 – Синтез наночастиц ферроарабиногалактана, конъюгированных с аптамером (AS-FeAG). (a) Схематическое изображение синтеза наночастиц ферроарабиногалактана и их конъюгации с аптамерами. (b) Часть комплекса аптамер-арабиногалактан. С – цитозин, G – гуанин, А – аденин и Т – тимин.

Водородные связи между атомами показаны пунктирными линиями.

Фрагментацию проводили в соответствии с химической природой (см. рисунок 6.18, а) путём разделения арабиногалактана и аптамера на 5 и 8 фрагментов соответственно. Атомы натрия были отнесены к соседнему нуклеотидному фрагменту. Фрагменты T1 и C1 имеют заряд  $-1e^-$ , а все остальные фрагменты нейтральны.

Чтобы выявить физическую картину связывания арабиногалактана и аптамера, был использован анализ разложения энергии парного взаимодействия (PIEDA) [466] на уровне теории возмущений Мёллера-Плессета второго порядка (MP2) с базисным набором 6-31G(d,p) и C-PCM. Все расчёты FMO выполнены с

использованием MP2 – хороший метод описания как электростатических, так и неэлектростатических (гидрофобных) взаимодействий на квантово-механическом (QM) уровне *ab initio* без использования каких-либо параметров [18]. Из-за своей QM-природы он также описывает поляризацию и перенос заряда. Учитывалась экранировка растворителя, эффективно экранирующая сильные ионные взаимодействия [466]. Хотя PIEDA предоставляет много компонентов [467], в этой работе для простоты некоторые из них были добавлены вместе, так что взаимодействие фрагмент-фрагмент разделено на электростатическое (ES), квантово-механическое (QM) и ван-дер-ваальсовы (vdW) компоненты. ES включает в себя взаимодействие растворенного вещества и растворенного вещества между плотностями поляризованных электронов двух фрагментов, ядерные термы и экранирование растворенного вещества и растворителя. QM включает перенос заряда и обменное отталкивание (короткодействующее отталкивание между электронами). vdW вычисляется из энергии корреляции электронов в MP2 и в основном описывает гидрофобные взаимодействия.

При моделировании было обнаружено, что нуклеотиды аптамера ДНК взаимодействуют с моносахаридами AG, образуя большое количество водородных связей (длиной от 1,734 до 1,927 Å). В зависимости от конформации моносахарид может образовывать одну или две водородные связи с атомами кислорода в фосфатной группе нуклеотида. На рисунке 6.18, а показано, что водородные связи образуются между A1 и Ar11 (одна связь), T1 и Ar9 (две связи), C1 и Ar13 (одна связь).

Количественная картина была получена с помощью анализа разложения энергии парного взаимодействия. Компоненты PIEDA обнаруживают характерные сигнатуры [468]. Он подтвердил, что все три парных взаимодействия происходят между парами фрагментов, соединёнными водородными связями (рисунок 6.10, b), что проясняет физическую природу связывания. Показаны все взаимодействия, превышающие 1 ккал/моль. Все они притягательные (наибольшее отталкивающее взаимодействие, не показано, составляет 0,4 ккал/моль).

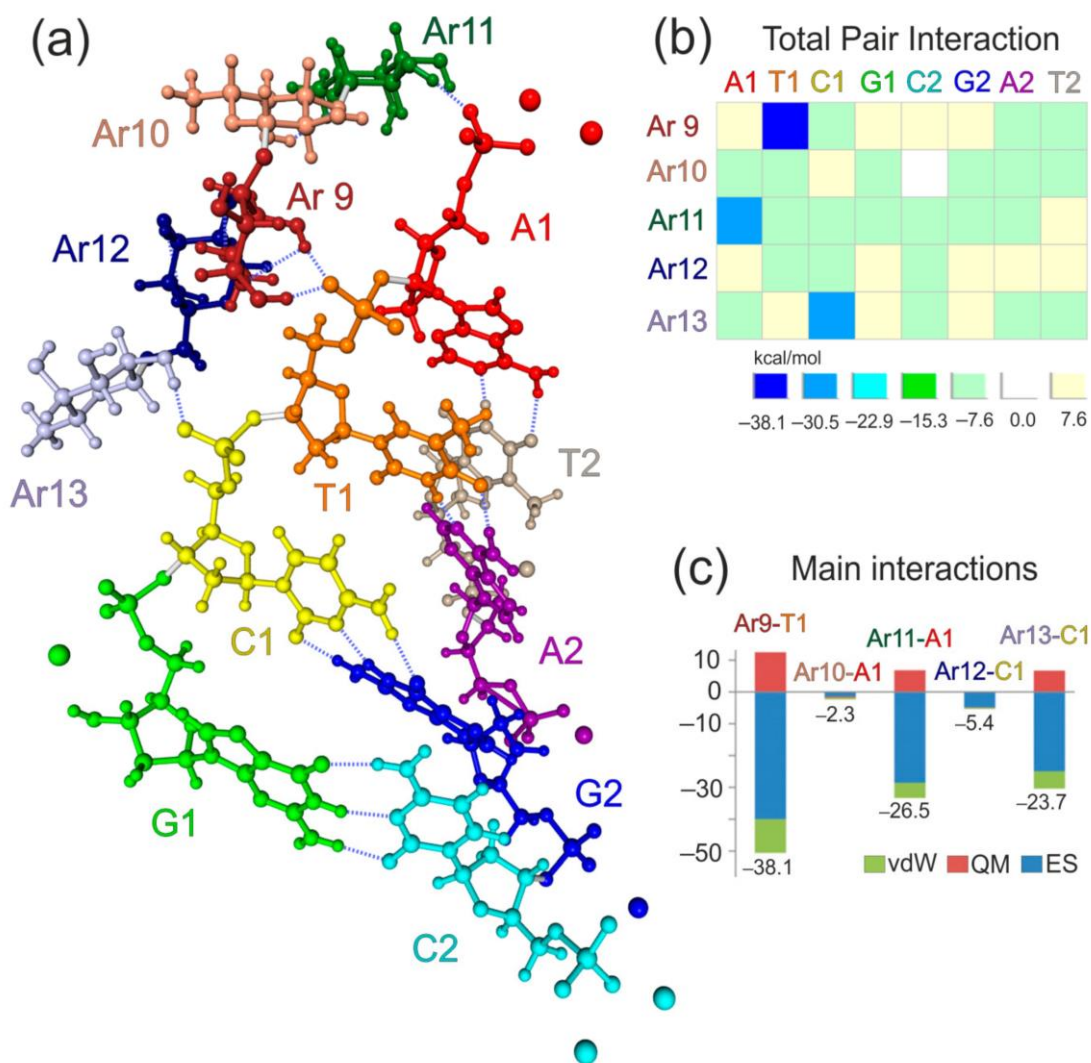


Рисунок 6.18 – Молекулярная структура и результаты метода FMO применительно к комплексу аптамер-арабиногалактан. (a) Фрагменты арабиногалактана и аптамера AS-14 показаны разными цветами. (b) Полные парные взаимодействия между арабиногалактаном (Ar9 – Ar13) и фрагментами аптамера (A1, T1, C1, G1, A2, T2, C2, G2,). (c) Основные взаимодействия между арабиногалактаном (Ar9 – Ar13) и фрагментами аптамера (T1, A1, C1). Общие значения показаны под каждой колонкой. Все значения указаны в ккал/моль. Каждое парное взаимодействие делится на электростатическую (ES), квантово-механическую (QM) и ван-дер-ваальсовую (vdW) составляющие.

Как было обнаружено при моделировании, взаимодействия водородных связей между -ОН группами моносахаридов и фосфатными группами в нуклеотидах выделяются большими значениями -23,7, -26,5 и -38,1 ккал/моль

(рисунок 6.18, с). Эти значения соответствуют взаимодействиям фрагмент-фрагмент и включают взаимодействия, отличные от водородных связей; в этом случае зарядово-дипольные взаимодействия являются основным фактором для T1 и C1. Ar9-T1 является самым большим, потому что он включает две водородные связи (рисунок 6.18, а).

Интересно и, возможно, менее интуитивно понятно, что нейтральный A1 имеет большое взаимодействие. К концевой группе  $-PO_3^{2-}$  добавляются два иона натрия в качестве противоионов, так что общий заряд равен нулю. Однако в оптимизированной структуре один атом натрия удалён от AG. Следовательно, кулоновское поле от него слабее, и эффективно взаимодействие увеличивается из-за притяжения к заряду  $-2e^-$  на фосфате, лишь частично компенсируемого противоионами. Вторая цепь с T2, A2, G2 и C2 не взаимодействует с AG. Основным связующим в аптамере в первой цепи является T1, а A1 и C1 также прочно связаны. G1 геометрически разделён и не связан с AG. Эти результаты точно определяют, какие нуклеотиды связываются с AG, и дают подсказки относительно того, как модифицировать аптамер, чтобы усилить или ослабить связывание.

В текущей части работы была сделана попытка понять природу взаимодействия аптамеров с природными полисахаридами, тем самым, создав основу для целенаправленного синтеза или улучшения имеющейся технологии синтеза конъюгатов аптамеров с магнитными наночастицами. Аптамеры могут усиливать накопление наночастиц возле раковых клеток с последующим повреждением клеток магнитным полем. Кроме того, избыток AG способствует выведению продуктов распада опухоли благодаря его антиоксидантным, иммуномодулирующим и детоксикационным свойствам. Направленная магнитодинамическая нанотерапия с аптамер-конъюгированными суперпарамагнитными наночастицами открывает новые возможности для малотоксичной, малоинвазивной и направленной тераностики рака.

В развитии данного направления предложено ещё одно использование биоконъюгатов но уже на основе арабиногалактана, аптамера и цисплатина (рисунок 6.19). Цисплатин – эффективный препарат для лечения различных видов

рака. Однако он высокотоксичен как для здоровых, так и для опухолевых клеток. Поэтому необходимо снизить его терапевтическую дозу и увеличить целевую биодоступность. Одной из стратегий в этом вопросе может стать покрытие цисплатина полисахаридами и специфическими носителями для адресной доставки. Аптамеры нуклеиновых кислот могут быть использованы в качестве носителей для специфической доставки лекарства в раковые клетки.

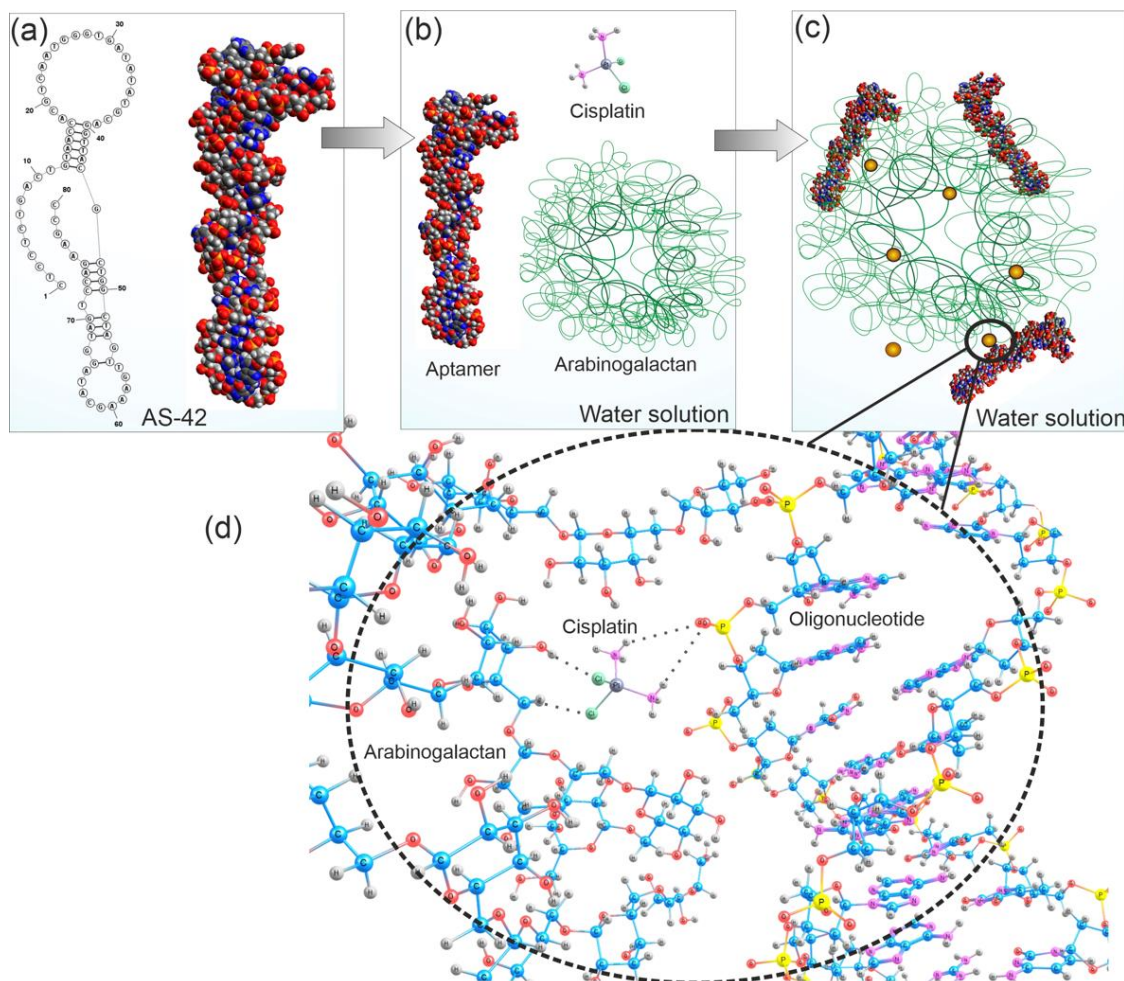


Рисунок 6.19 – Структура конъюгата цисплатина с арабиногалактаном и аптамером AS-42. (a) – вторичная и третичная структура аптамера. (b) – молекулярные структуры цисплатина с арабиногалактаном и аптамером. (c) – конъюгат. (d) – межмолекулярные связи цисплатина, арабиногалактана и аптамера.

Для молекулярного моделирования использовали репрезентативную часть арабиногалактана (5 единиц сахара) и восемь нуклеотидов из ДНК-аптамера (двухцепочечная область аптамера) с цисплатином между ними. Молекулярное моделирование и квантовохимический анализ PIEDA проводили так же, как описано выше. Пространственные структуры AS-42 и аптамер-модифицированного конъюгата цисплатин/арабиногалактан показаны на рисунке 6.19.

Как показало моделирование, цисплатин образовывал водородные связи между своими Cl с -ОН и -СН группами арабиногалактана; и между гидрогенами с кислородами в фосфатной группе олигонуклеотидов. Энергия этой водородной связи составила 20-25 кДж/моль. Несмотря на взаимодействие между фосфатными группами аптамера и конъюгатом цисплатин/арабиногалактан, дуплексные сегменты AS-42 оставались стабильными во время моделирования. Таким образом, конформация аптамера оставалась неизменной.

Эксперимент [469] показал, что конъюгат цисплатин-арабиногалактан-аптамер (Cis-AG-Ap) синтезированный на основе цисплатина, арабиногалактана и аптамера AS-42 имеет противоопухолевый эффект. Оценка произведена на примере асцитной и модельной метастатической опухоли Эрлиха. Токсичность Cis-AG-Ap оценивали по биохимии крови здоровых мышей. Была продемонстрирована повышенная противораковая активность данного конъюгата и его специфическое накопление в опухолевых очагах. Самое ценное видится то, что адресная доставка позволяет в пятнадцать (15 !!!) раз снизить терапевтическую дозу цисплатина и, как следствие, его токсичности [469]. Роль арабиногалактана и аптамера состояла в повышении эффективности цисплатина, через увеличения его биодоступность в нужном месте. Описанная стратегия может быть очень перспективной для целевой противораковой терапии.



## §6.7 ВЫВОДЫ

Разработан подход для определения атомной структуры наноразмерных некристаллических объектов на основе данных малоуглового рассеяния синхротронного излучения и результатов теоретического моделирования структуры. Данный подход позволил получить сведения об атомной и электронной структуре аптамеров в растворе при реальных условиях для биомедицинских исследований. Верификация метода на примере аптамера RE-31 показала количественное согласие расчётных характеристик с экспериментальными данными по рентгеновской дифракции образцов, имеющих кристаллическую структуру с белком. Разработан алгоритм проектирования новых аптамеров, использующий связь между структурой, свойствами молекул и результатами теории функционала плотности. Данный подход апробирован на аптамерах, направленных на борьбу против коронавируса COVID-19, и позволяет конструировать с наименьшими тратами новые функциональные материалы с оптимизацией финансовых, человеческих и временных ресурсов.

Молекулярная структура арабиногалактана которая характеризуется отсутствием регулярного состава и кристаллического состояния была интерпретирована с помощью инфракрасных спектров и модельных расчётов структуры. Было показано, что молекулярные модели на основе изолированных мономерных звеньев галактозы и арабинозы арабиногалактана и его сульфатированных производных могут быть использованы для корректного моделирования ИК-спектров во всей спектральной области. На основе моделирования конъюгатов аптамера и арабиногалактана с магнитными наночастицами была выявлена природа взаимодействия между аптамерами и природными полисахаридами. Было показано, что в зависимости от конформации моносахарид образует одну или две водородные связи с атомами кислорода в фосфатной группе нуклеотида. Взаимодействия водородных связей между -ОН группами моносахаридов и фосфатными группами в нуклеотидах выделяются большими значениями от -24,0 до -38,1 ккал/моль.

В работе участвовали – И.А. Щугорева, П.В. Артюшенко, В. Миронов, Д. Морозов, А.А. Позднякова, Д.Г. Фёдоров, П.В. Аврамов, С.Г. Овчинников. Экспериментальная поддержка осуществлялась в лаборатории физики магнитных явлений Института физики ФИЦ КНЦ СО РАН – В.Н. Заблудой, А.Э. Соколовым, Р.В. Морячковым, сотрудниками Института химии и химической технологии ФИЦ КНЦ СО РАН – Ю.Н. Маляром, А.С. Козаченко, Н.Ю. Васильевой, в лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики ФИЦ КНЦ СО РАН под общим руководством А.С. Кичкайло и сотрудниками МГУ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского под руководством В.А. Спиридоновой.

Материалы данной главы представлены в следующих работах из списка публикаций автора: 3, 5, 6, 7, 12, 13, 15, 16.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы были получены следующие результаты:

1. С помощью теории функционала плотности, в приближении B3LYP, развит подход позволивший рассчитать молекулярные структуры и фотофизические характеристики ионных форм флуоресцеина, эозина и эритрозина. Применение данного подхода позволило провести прогнозирование спектров флуоресценции ионных и молекулярных форм, экспериментальное определение которых невозможно, и построить линейную регрессию для расчётных и экспериментальных энергий переходов по D, M1, M2, Q, Z и C-формам. Предсказанные длины волн испускания хиноида, моноаниона и цвиттериона составляют 549, 494 и 482 нм, соответственно. При этом доминирующей флуоресцентной формой в широком интервале pH остаётся дианионная форма с испусканием в области 513 нм, определяющая энергетическое положение и интенсивность максимума испускания смеси ионных форм.
2. Установлено, что место присоединения флуорена к карбазолу меняет природу сопряжения связи и сказывается на спектральных свойствах полимеров. Наименьшее значение энергетической щели достигается, если присоединение флуорена к карбазолу происходит в положениях 2 и 7, в которых электронная плотность равномерно делокализована на всей сопряжённой части полимера. При этом для сополифлуорена с местом присоединения карбазола в положении 2 и 7 максимум поглощения составил 373 нм в толуоле, а длина волны излучения в вакууме равняется 431 нм. Расчёты показали, что в молекуле с местом присоединения 3 и 6 максимум поглощения приходится на 353 нм в толуоле, а длина волны люминесценции равняется 395 нм. Посредством сравнения спектральных свойств установлено значительное влияние места присоединения флуорена к карбазолу на красный сдвиг пиков поглощения и излучения.
3. Рассчитана кристаллическая структура и оптические свойства

металлоорганического люминофора *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] с гетерогенным локальным окружением иона свинца. Установлено, что спектр возбуждения формируется за счёт вкладов от прямого возбуждения ионов Pb<sup>2+</sup> и переносом заряда с орбиталей органических лигандов, модифицированных в результате образования *транс*-[Pb(DMTU-S)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса. Показано, что люминесценция определяется ионами Pb<sup>2+</sup>, находящимися внутри октаэдров DMTU<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>. На основе проведённых расчётов установлено, что 3*p*-орбитали иона хлора и 6*p*-орбитали иона свинца, имеющие несвязывающий характер, определяют фотофизические процессы. Такая природа связи приводит к высокому квантовому выходу люминесценции. Актуальность данного люминофора определяет его перспективность применения в фотонике.

4. Предсказано, что устойчивые эндоэдральные комплексы с общей формулой Gd@C<sub>82</sub>O<sub>x</sub>N<sub>y</sub> с  $x = 0$  и 3 и  $y > 24$  обладают антиоксидантными свойствами, важными для биомедицинских исследований. Внедрённый атом гадолиния способствует реакционной способности комплекса, при этом углеродный каркас и  $\pi$ -электронная система сохраняется, если число функциональных групп относительно невелико. Проведённые исследования показали, что физические характеристики эндоэдральных комплексов фуллеренолов на основе C<sub>82</sub> с гадолинием в качестве гостевого иона определяют их перспективность как агентов для магнитно-резонансной томографии.
5. Показано, что во время длительного синтеза фуллеренола происходит нарушение целостности углеродного каркаса с образованием на поверхности карбокси-, гидрокси- и эпоксидных функциональных групп. При этом окисление фуллерена C<sub>82</sub> сопровождается разрывом части связей C-C с образованием пор. Построена модель атомной структуры фуллеренола C<sub>82</sub>O<sub>6</sub>(OON)<sub>2</sub>(OH)<sub>18</sub> с эпоксидной, карбонильной и карбоксильной группами и рассчитан спектр колебаний, позволивший согласовать теоретические представления с экспериментальными данными из инфракрасной и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии.

6. Проведённое моделирование атомной структуры и спектральных свойств молекул феромонов показало, что в зависимости от функциональных групп максимумы поглощения лежат в диапазоне от 130 до 230 нм. Установлена корреляция между поведением насекомых и положением максимума поглощения молекул. При этом в возбуждённом состоянии атомная структура и распределение электронной плотности феромонов инициирует безбарьерные реакции соединения с водой или кислородом.
7. Предложена модель процесса флуоресценции фотопротеина обелина и показано, что при возбуждении светом происходит формирование «комплекса с переносом протона» между кислородом целентерамида и гистидином His22, что индуцирует излучение с длиной волны на 500 нм, согласующейся с экспериментальными наблюдениями. Установлено, что фотовозбуждение с длиной волны 260–300 нм переводит систему в верхнее электронно-возбуждённое состояние и вызывает дополнительную флуоресценцию в ближней УФ-области.
8. Рассчитаны спектры поглощения двух конформеров 2-гидропероксицелентеразина, отличающихся разным положением протона. Наилучшее согласие с экспериментальным спектром поглощения с максимумом длины волны в диапазоне 460-470 нм было получено для конформации, когда пероксидная группа находится над хромофорной группой 2-гидропероксицелентеразина, а водород направлен во внешнюю сторону. Выявлены основные причины, влияющие на различия в спектрах поглощения конформеров субстратов фотопротеинов в видимой области. Это открывает возможность использования данных структур для моделирования субстратов в аминокислотном окружении.
9. Разработан подход для определения атомной структуры наноразмерных некристаллических объектов на основе данных малоуглового рассеяния синхротронного излучения и результатов теоретического моделирования структуры. Данный подход позволил получить сведения об атомной и электронной структуре аптамеров в растворе при реальных условиях для

биомедицинских исследований. Верификация метода на примере аптамера RE-31 показала количественное согласие расчётных характеристик с экспериментальными данными из рентгеновской дифракции образцов, имеющих кристаллическую структуру с белком.

10. На основе моделирования конъюгатов аптамера и арабиногалактана выявлен характер межмолекулярного взаимодействия в этих системах. Показано, что в зависимости от конформации, арабиногалактан образует одну или две водородные связи с атомами кислорода в фосфатной группе нуклеотида. Водородные связи между -ОН группами арабиногалактана и фосфатными группами в нуклеотидах характеризуются большими энергиями взаимодействий.
11. Разработан алгоритм проектирования новых аптамеров, использующий связь между структурой и свойствами молекул и результатами теории функционала плотности. Данный подход апробирован на аптамерах, направленных на борьбу против коронавируса COVID-19, и позволяет конструировать новые функциональные материалы с оптимизацией ресурсов.

**БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает благодарность своим учителям, проф. С.Г. Овчинникову и П.В. Аврамову, за многолетнее успешное сотрудничество и консультирование на всех этапах подготовки работы. Своим коллегам по работе А.А. Кузубову, С.А. Варганову, Д.Г. Фёдорову А.С. Фёдорову, П.О. Краснову, А.А. Шубину, А.Э. Соколову, С.Н. Варнакову, Л.Ю. Антипиной, П.В. Артюшенко, И.А. Щугоревой, А.В. Роговой. Благодарю В.В. Валькова за поддержку и помощь при работе над диссертацией. Сотрудникам Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН за замечания и помощь в обсуждении результатов и, самое главное, поддержку.

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Статьи в реферируемых журналах входящих в базы данных «Web of Science», «Scopus» и РИНЦ.

1. Evsei A. Stepin, Ekaterina S. Sushko, Natalia G. Vnukova, Grigoriy N. Churilov, Anastasia V. Rogova, Felix N. Tomilin, Nadezhda S. Kudryasheva. Effects of Endohedral Gd-Containing Fullerenols with a Different Number of Oxygen Substituents on Bacterial Bioluminescence. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25(2), 708; 10.3390/ijms25020708
2. Anton A. Yakimanskii, Ksenia I. Kaskevich, Elena V. Zhukova, Ivan A. Berezin, Larisa S. Litvinova, Tatiana G. Chulkova, Dmitriy A. Lypenko, Artem V. Dmitriev, Sergey I. Pozin, Natalia V. Nekrasova, Felix N. Tomilin, Daria A. Ivanova Alexander V. Yakimansky. Synthesis, Photo- and Electroluminescence of New Polyfluorene Copolymers Containing Dicyanostilbene and 9,10-Dicyanophenanthrene in the Main Chain. *Materials* 2023, 16(16), 5592; 10.3390/ma16165592
3. Poolsup Suttinee, Zaripov Emil, Hüttmann Nico, Minic Zoran, Artyushenko Polina V., Shchugoreva Irina A., Tomilin Felix N. Kichkailo Anna S., Berezovski Maxim V. Discovery of DNA aptamers targeting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and protein-binding epitopes for label-free COVID-19 diagnostics. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. Volume 31, 14 March 2023, Pages 731-743. 10.1016/j.omtn.2023.02.010
4. Tomilin, F.N.; Artyushenko, P.V.; Shchugoreva, I.A.; Rogova, A.V.; Vnukova, N.G.; Churilov, G.N.; Shestakov, N.P.; Tchaikovskaya, O.N.; Ovchinnikov, S.G.; Avramov, P.V. Structure and Vibrational Spectroscopy of C<sub>82</sub> Fullerenol Valent Isomers: An Experimental and Theoretical Joint Study. *Molecules*, 2023, 28, 1569. 10.3390/molecules28041569
5. Tatiana N. Zamay, Alexander K. Starkov, Olga S. Kolovskaya, Galina S. Zamay, Dmitry V. Veprintsev, Natalia Luzan, Elena D. Nikolaeva, Kirill A. Lukyanenko, Polina V. Artyushenko, Irina A. Shchugoreva, Yury E. Glazyrin, Anastasia A.

- Koshmanova, Alexey V. Krat, Dariya S. Tereshina, Sergey S. Zamay, Yuriy S. Pats, Ruslan A. Zukov, Felix N. Tomilin, Maxim V. Berezovski, and Anna S. Kichkailo. Nucleic Acid Aptamers Increase the Anticancer Efficiency and Reduce the Toxicity of Cisplatin-Arabinogalactan Conjugates *in vivo*. *Nucleic Acid Therapeutics*. Vol. 32, Is. 6, p. 497, 2022. 10.1089/nat.2022.0024
6. Vladimir Mironov, Irina A. Shchugoreva, Polina V. Artyushenko, Dmitry Morozov, Nicola Borbone, Giorgia Oliviero, Tatiana N. Zamay, Roman V. Moryachkov, Olga S. Kolovskaya, Kirill A. Lukyanenko, Yangling Song, Iuliia A. Merkuleva, Vladimir N. Zabluda, Georgy Peters, Lyudmila S. Koroleva, Dmitry V. Veprintsev, Yury E. Glazyrin, Ekaterina A. Volosnikova, Svetlana V. Belenkaya, Tatiana I. Esina, Anastasiya A. Isaeva, Valentina S. Nesmeyanova, Daniil V. Shanshin, Anna N. Berlina, Nadezhda S. Komova, Valery A. Svetlichnyi, Vladimir N. Silnikov, Dmitriy N. Shcherbakov, Galina S. Zamay, Sergey S. Zamay, Tatyana Smolyarova, Elena P. Tikhonova, Kelvin H.-C. Chen, U-Ser Jeng, Gerolama Condorelli, Vittorio de Franciscis, Gerrit Groenhof, Chaoyong Yang, Alexander A. Moskovsky, Dmitri G. Fedorov, Felix N. Tomilin, Weihong Tan, Yuri Alexeev, Maxim V. Berezovski, Anna S Kichkailo. Structure and Interaction Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers. *Chemistry – A European Journal*. 2022. 10.1002/chem.202104481
  7. Anastasia V Ozerskaya, Tatiana N Zamay, Olga S Kolovskaya, Nikolay A Tokarev, Kirill V Belugin, Natalia G Chanchikova, Oleg N Badmaev, Galina S Zamay, Irina A Shchugoreva, Roman V Moryachkov, Vladimir N Zabluda, Vladimir A Khorzhevskii, Nikolay Shepelevich, Stanislav V Gappoev, Elena A Karlova, Saveleva Anastasia, Alexander A Volzhentsev, Anna N Blagodatova, Kirill A Lukyanenko, Dmitry V Veprintsev, Tatyana Smolyarova, Felix N Tomilin, Sergey S Zamay, Vladimir N Silnikov, Maxim V Berezovski, Anna S Kichkailo. <sup>11</sup>C-Radiolabeled Aptamer for Imaging of Tumor and Metastasis Using Positron Emission Tomography-Computed Tomography. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. Vol. 26, pp. 1159-1172, 2021, 10.1016/j.omtn.2021.10.020
  8. Felix N. Tomilin, Anastasia V. Rogova, Ludmila P. Burakova, Olga N. Tchaikovskaya, Pavel V. Avramov, Dmitri G. Fedorov and Eugene S. Vysotski.

- Unusual shift in the visible absorption spectrum of an active ctenophore photoprotein elucidated by time-dependent density functional theory. *Photochem Photobiol Sci* 20(4), 559–570 (2021). 10.1007/s43630-021-00039-5
9. Nicolay N. Golovnev, Aleksandr S. Aleksandrovsky, Marina A. Gerasimova, Felix N. Tomilin, Vladimir A. Mironov, Anastasia V. Demina, Zhiguo Xia, and Maxim S. Molokeev. Luminescent Zero-Dimensional Hybrid Lead Thiohalide Nanostructures for High Quantum Yield and Broadband Excitation. *ACS Applied Nano Materials*. 4 (4), pp. 3654-3663, April 2021, 10.1021/acsnm.1c00162
  10. Shakirova AA, Tomilin FN, Pomogaev VA, Vnukova NG, Churilov GN, Kudryasheva NS, Tchaikovskaya ON, Ovchinnikov SG, Avramov PV. Synthesis, Mass Spectroscopy Detection, and Density Functional Theory Investigations of the Gd Endohedral Complexes of C<sub>82</sub> Fullerenols. *Computation*. 2021; 9(5):58. 10.3390/computation9050058
  11. Rogova, A.V., Tomilin, F.N., Gerasimova, M.A., Slyusareva, E.A. Modeling of Electronic Spectra of Ionic Forms of Eosin and Erythrosin. *Russian Physics Journal*, 2020, 63(8), pp. 1417–1423
  12. Aleksandr S. Kazachenko, Felix N. Tomilin, Anastasia A. Pozdnyakova, Natalia Yu. Vasilyeva, Yuriy N. Malyar, Svetlana A. Kuznetsova and Pavel V. Avramov. Theoretical DFT interpretation of infrared spectra of biologically active arabinogalactan sulphated derivatives. *Chemical Papers* 74, p. 4103–4113 (2020). 10.1007/s11696-020-01220-3
  13. O.S. Kolovskaya, T.N. Zamay, G.S. Zamay, V.A. Babkin, E.N. Medvedeva, N.A. Neverova, A.K. Kirichenko, S.S. Zamay, I.N. Lapin, E.V. Morozov, A.E. Sokolov, A.A. Narodov, D.G. Fedorov, F.N. Tomilin, V.N. Zabluda, Y. Alekhina, K.A. Lukyanenko, Y.E. Glazyrin, V.A. Svetlichnyi, M.V. Berezovski, A.S. Kichkailo. Aptamer-Conjugated Superparamagnetic Ferroarabinogalactan Nanoparticles for Targeted Magnetodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* 2020, 12(1), 216; 10.3390/cancers12010216
  14. M.A. Gerasimova, F.N. Tomilin, E.Yu. Malyar, S.A. Varganov, D.G. Fedorov, S.G. Ovchinnikov, E.A. Slyusareva Fluorescence and photoinduced proton transfer in the



- prolytic forms of fluorescein: Experimental and computational study. *Dyes and Pigments*, 2020, Volume 173, 107851. 10.1016/j.dyepig.2019.107851.
15. Michael Przybylski, Loredana Lupu, Pascal Wiegand, Nico Hüttmann, Stephan Rawer, Wolfgang Kleinekofort, Irina Shugoreva, Anna S. Kichkailo, Felix N. Tomilin, Alexander Lazarev, and Maxim V. Berezovski. Molecular Epitope Determination of Aptamer Complexes of the Multi-domain Protein C-Met by Proteolytic Affinity- Mass Spectrometry. *ChemMedChem* 2020, 15, pp. 1–8. 10.1002/cmdc.201900489.
  16. Felix N. Tomilin, Roman Moryachkov, Irina Shchugoreva, Vladimir N. Zabluda, Georgy Peters, Mikhail Platunov, Vera Spiridonova, Anastasia Melnichuk, Anastasia Atrokhova, Sergey S. Zamay, Sergey G. Ovchinnikov, Galina S. Zamay, Alexey Sokolov, Tatiana N. Zamay, Maxim V. Berezovski, Anna S. Kichkailo. Four steps for revealing and adjusting the 3D structure of aptamers in solution by small-angle X-ray scattering and computer simulation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2019, 411, pp. 6723-33. 10.1007/s00216-019-02045-0.
  17. Ruslan Yu Smyslov, Felix N. Tomilin, Irina A. Shchugoreva, Galina I. Nosova, Elena V. Zhukova, Larisa S. Litvinova, Alexander V. Yakimansky, Ilya Kolesnikov, Igor G. Abramov, Sergei G. Ovchinnikov, Paul V. Avramov. Synthesis and photophysical properties of copolyfluorenes for light-emitting applications: Spectroscopic experimental study and theoretical DFT consideration. *Polymer*, April 2019, Volume 168, 2 Pages 185-198. 10.1016/j.polymer.2019.02.015.
  18. F.N. Tomilin, A.S. Fedorov, P.V. Artyushenko, S.G. Ovchinnikov, T.M. Ovchinnikova, P.E. Tsikalova, V.G. Soukhovolsky. Estimation of the thermal and photochemical stabilities of pheromones Estimation of the thermal and photochemical stabilities of pheromones. *Journal of Molecular Modeling*. 2018 24:323 (9 pages). 10.1007/s00894-018-3859-5.
  19. P.V. Artyushenko, F.N. Tomilin, A.A. Kuzubov, S.G. Ovchinnikov, P.E. Tsikalova, T.M. Ovchinnikova, V.G. Soukhovolsky. The stability of the pheromones of xylophagous insects to environmental factors: An evaluation by quantum chemical analysis. *Biophysics*, 2017, Vol. 62, No. 4, pp. 532–538. doi

10.1134/S0006350917040029

20. R Alieva, F. Tomilin, A. Kuzubov, S. Ovchinnikov, N. Kudryasheva. Ultraviolet fluorescence of coelenteramide and coelenteramide-containing fluorescent proteins. Experimental and theoretical study. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 162 (2016) 318–323 10.1016/j.jphotobiol.2016.07.004.
21. P.V. Artyushenko, F.N. Tomilin, A.A. Kuzubov, S.G. Ovchinnikov, P.E. Tsikalova, T.M. Ovchinnikova, V.G. Soukhovolsky. Action of the atomic and electronic structure of pheromone molecules on the effectiveness of communication in xylophagous insects. *Journal of structural chemistry*, 2016, Vol. 57, No. 2, pp. 287-293.
22. O.A. Yaykova, F.N. Tomilin, I.A. Dubinina, A.A. Kuzubov, A.I. Dudnik, N.G. Vnukova, S.G. Ovchinnikov, G.N. Churilov. The properties of the water-soluble hydroxy-polyhydroxy fullerenes in auto-oxidation reactions epinephrine. *Journal of Siberian federal university. Chemistry* 4 (2015 8) pp. 533-540. 10.17516/1998-2836-2015-8-4-533-540
23. E.A. Slyusareva, F.N. Tomilin, A.G. Sizykh, E. Yu. Tankevich, A.A. Kuzubov, S.G. Ovchinnikov. The effect of halogen substitution on the structure and electronic spectra of fluorone dyes. *Optics and spectroscopy*, T. 112 Vol.15 , pp. 671-678, 2012.
24. F.N. Tomilin, L.V. Tikhonova, E.V. Ereemeeva, S.G. Ovchinnikov, E.S. Vysotski. Quantum chemical study of 2-hydroperoxycoelenterazine generation. *Luminescence*, T. 27 Vol 2, pp. 165-166, 2012.
25. L.Yu Antipina, F.N. Tomilin, E.S. Vysotskii, S.G. Ovchinnikov. A quantum chemical study of the formation of 2-hydroperoxy-coelenterazine in the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin. *Journal of structural chemistry*, T. 52 Vol. 5, pp. 870-875, 2011.
26. F.N. Tomilin, O.V. Osina, A.A. Kuzubov, S.G. Ovchinnikov, P.E. Volkova, T.M. Ovchinnikova, V.G. Soukhovolsky. Stability of forest lepidopteran pheromones against environmental factors. *Biophysics* 56, pp. 695–701 (2011). /10.1134/S0006350911040282
27. F.N. Tomilin, Antipina L.Iu., E.S. Vysotskii, S.G. Ovchinnikov, I.I. Gitel'zon. The

mechanism of formation of emitter by fluorescence of calcium-discharged obelin/  
 Biofizika, 01 Jul 2009, 54(4):630-637

28. F.N. Tomilin, L.U. Antipina, E.S. Vysotski, S.G. Ovchinnikov, I.I. Gitelzon, Fluorescence of calcium-discharged obelin: The structure and molecular mechanism of emitter formation. Dokl. Biochem. Biophys, 422 (2008) 279-284.

### **Монографии**

1. В.Г. Суховольский, П.В. Артюшенко, Ф.Н. Томилин, П.Е. Цикалова, А.В. Ковалев. Феромоны лесных насекомых: системный и квантовохимический анализ. Монография, Товарищество научных изданий КМК, Москва. ISBN: 978-5-907372-66-5, 2021. – Стр. 150.
2. Ovchinnikov S., Tomilin F., Artushenko P., Sukhovol'sky V., Ovchinnikova T., Volkova P., Baranchikov Y., Vysotskii E. Quantum chemical modeling in the molecular ecology. Глава в книге «Models of the ecological hierarchy: From molecules to the ecosphere». - 2012. - P. 3-13. - (Developments in environmental modelling; Vol. 25), 10.1016/B978-0-444-59396-2.00001-8. ISSN 0167-8892. ISSN 978-0-444
3. Л. Антипина, Ф. Томилин, С. Овчинников. Биолюминесценция фотопротейна обелина. Квантовохимическое описание. Монография. LAP Lambert Academic Publishing ISBN: 978-3-8433-0038-4, 2010. – Стр. 101.

### **Конференции**

1. Tomilin F.N., Artyushenko P.V., Shchugoreva I.A., Rogova, A.V., Moryachkov R.V., Zabluda V.N., Kichkailo A.S. Molecular Simulations and Restoration of the Atomic Structure of DNA-Aptamers from SAXS Data. II International Conference Synchrotron Radiation Techniques for Catalysts and Functional Materials. p. 123, Novosibirsk, Russia, October 23-27, 2023
2. Kichkailo A.S., Zabluda V.N., Moryachkov R.V., Tomilin F.N. The Role of Small-Angle X-Ray Scattering and Molecular Simulations in Elucidation of Aptamers 3D Structure. II International Conference Synchrotron Radiation Techniques for

- Catalysts and Functional Materials. p. 60-61, Novosibirsk, Russia, October 23-27, 2023
3. Tomilin F.N., Artyushenko P.V., Shchugoreva I.A., Rogova, A.V., Moryachkov R.V., Zabluda V.N., Kichkailo A.S. Synergy of SAXS and Molecular Modeling for DNA Aptamer Bioapplications. Международная конференция «Синхротронное излучение и интеллектуальные материалы» — IWSN 2023, стр. 15, г. Ростов на Дону, Южный федеральный университет, 14-16 сентября 2023г.
  4. A.S. Kichkailo, V.N. Zabluda, R.V. Moryachko, F.N. Tomilin. Three-dimensional structure determination of DNA oligonucleotides by Small-angle X-ray scattering. Международная конференция «Синхротронное излучение и интеллектуальные материалы» — IWSN 2023, стр. 16, г. Ростов на Дону, Южный федеральный университет, 14-16 сентября 2023г.
  5. Ф.Н. Томилин, И.А. Щугорева, А.В. Рогова, Р.Ю. Смыслов. «Моделирование фотофизических свойств органических светоизлучающих диодов на основе индоло[3,2-b]карбазола квантовохимическими методами» Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «Енисейская фотоника — 2022» стр. 173, г. Красноярск, 19-23 сентября 2022 г.
  6. А. В. Рогова, Ф. Н. Томилин, Н. П. Маликова, Е. С. Высоцкий. «Теоретическое исследование фотофизических свойств фотопротеинов с аминокислотными заменами в активных центрах обелина и акворина». Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «Енисейская фотоника — 2022» стр. 149-150, г. Красноярск, 19-23 сентября 2022 г.
  7. И. А. Щугорева, А.В. Рогова, П.В. Артюшенко, Ф.Н. Томилин. «Квантовохимическое исследование структуры и оптических свойств фотоактивных полимеров» Тезисы Всероссийской научной конференции с международным участием «Енисейская фотоника — 2022» стр. 107, г. Красноярск, 19-23 сентября 2022 г.
  8. Рогова А.В., Томилин Ф.Н., Герасимова М.А., Слюсарева Е.А. Исследование люминесцентных свойств ксантеновых красителей в комплексе с хитозаном

- Материалы XVIII молодёжной конференции с международным участием по люминесценции и лазерной физике. С. 113. Иркутск, Россия, июль 5-9, 2021.
9. F.N. Tomilin, A.V. Rogova, M.A. Gerasimova, E.A. Slyusareva. Theoretical and experimental studies of the optical properties of organic materials with a high luminescence yield used in biomedical applications. The 15th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2021, Tomsk, Russia September 13-17, 2021.
  10. Gryaznova Anastasia, Khegay Svetlana, Rogova Anastasia, Tomilin F.N. The effect of solvents on the solvatochromic properties of the dicyanomethylene-(pyran) molecule. The 14th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2019, September 15-20, 2019, Tomsk, Russia
  11. Artyushenko Polina, Rogova Anastasia, Shchugoreva Irina, Gryaznova Anastasia, Tomilin F.N. Study of the spectral properties of obelin photoprotein: Quantum-Chemical Consideration. The 14th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2019, September 15-20, 2019, Tomsk, Russia
  12. A.V. Rogova, P.V. Artyushenko, I.A. Shchugoreva, A. A Gryaznova, F.N. Tomilin. Study of the spectral properties of berovin photoprotein: quantum-chemical calculations. The 14th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2019, September 15-20, 2019, Tomsk, Russia
  13. Shchugoreva Irina, Artyushenko Polina, Nikolaeva Kristina, Khegay Svetlana, Tomilin F.N. Study of the optical properties of copolyfluorenes by theoretical methods. The 14th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2019, September 15-20, 2019, Tomsk, Russia
  14. The 14th International Conference on Pulse Lasers and Laser Applications – AMPL-2019, September 15-20, 2019, Tomsk, Russia
  15. Морячков Р.В., Заблуда В.Н., Кичкайло А.С., Щугорева И.А., Томилиן Ф.Н., Замай Г.С., Соколов А.Э. Исследование пространственной структуры биомолекул ДНК-аптамеров с помощью синхротронного рентгеновского излучения. В сборнике: Сборник тезисов, материалы XXV Всероссийской

- научной конференции студентов-физиков и молодых учёных (ВНКСФ-25, Крым). 2019. С. 306.
16. F. Tomilin, R. Moryachkov, I. Shchugoreva, E. Kaufman, A. Drevolsky, A. Sokolov. Molecular structure restoration of aptamers by Small Angle X-ray Scattering and Computer Simulation. конференция 1st International Conference “Aptamers in Russia 2019”, Molecular Therapy Nucleic Acids. Volume 17, Supplement 1, 20 August 2019, Pages 1-24
  17. Tomilin F. N., Rogova A. V., Kaufman E. V., Drevolsky A. S., Gerasimova M. A., Slyusareva E. A. Solvent effect in the theoretical absorption and emission spectra of fluorescein dyes. тезисы доклада, статья из сборника материалов конференций 2019, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering September 15-20, 2019, Tomsk, Russia
  18. Суховольский В.Г., Артюшенко П.В., Томилин Ф.Н., Тарасова О.В., Цикалова П.Е., Ковалев А.В., Овчинникова Т.М. Эффективность канала феромонной коммуникации при различных конформациях молекул феромонов. В сборнике: XIX симпозиум «Сложные системы в экстремальных условиях». Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук». Красноярск, 2018. С. 107-118.
  19. Томилин Ф.Н., Щугорева И.А., Смыслов Р.Ю., Носова Г.И., Овчинников С.Г. Теоретический расчёт и фотофизические свойства светоизлучающих сополифлуоренов. В книге: XVI Международная молодёжная конференция по люминесценции и лазерной физике, посвящённая 100-летию Иркутского государственного университета. Иркутск, Россия, 2018. С. 152-153.
  20. Артюшенко П.В., Томилин Ф.Н. Влияние структуры феромонных молекул на эффективность канала феромонной коммуникации насекомых. Материалы XIX Всероссийского симпозиума с международным участием. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук». Красноярск, Россия, 2018. С. 19-22.

21. Николаева К.М., Щугорева И.А., Томилин Ф.Н., Ковалева Е.А. Квантово-химическое моделирование адсорбции атомов переходных металлов на дефектах в биграфене. В книге: Четвёртый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии". Санкт-Петербург, Россия, 2018. С. 398-399.
22. Щугорева И.А., Николаева К.М., Томилин Ф.Н., Ковалёва Е.А. Квантово-химическое моделирование интерфейсов Co/h-BN/Pt. В книге: Четвёртый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии". Санкт-Петербург, Россия, 2018. С. 557-558.
23. Ф.Н. Томилин, С.Г. Овчинников. Квантово-химические подходы при изучении биологически активных систем. 14–я Российская школа-симпозиум «Фундаментальные основы атомистического многомасштабного моделирования». Новый Афон, Абхазия, 16-27 августа 2017
24. Яйкова О.А., Томилин Ф.Н., Дубинина И.А., Кузубов А.А., Дудник А.И., Внукова Н.Г., Овчинников С.Г., Чурилов Г.Н. Свойства водорастворимых окси-полигидрокси фуллеренов в реакции автоокисления адреналина. В сборнике: Химическая наука и образование Красноярья. Материалы X юбилейной Межрегиональной научно-практической конференции, посвящённой 85-летию КГПУ им. В.П. Астафьева. Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева. Красноярск, Россия, 2017. С. 155-159.
25. Артюшенко П.В., Томилин Ф.Н., Цикалова П.Е. Применение квантово-химических методов для оценки влияния физико-химических характеристик феромонов пядениц *Geometridae* на эффективность химической коммуникации. В сборнике: Лесной и химический комплексы - проблемы и решения. Сборник материалов по итогам Всероссийской научно-практической конференции. ред. Логинов Ю. Ю., Красноярск, Россия, 2017. С. 16-20.
26. Ф.Н. Томилин, П.В. Артюшенко, С.Г. Овчинников, П.Е. Цикалова, Т.М. Овчинникова и В.Г. Суховольский. Влияние электронной структуры молекул

- феромонов на эффективность коммуникации насекомых-ксилофагов. Первая российская конференция с международным участием «Физика — наукам о жизни» Санкт-Петербург, Россия, 18–22 сентября 2016 г
27. Смыслов Р.Ю., Г.И. Носова, И.В. Берёзин, Е.Ф. Жукова, Т.Н. Некрасова, Томилин Ф., Щугорева И., Овчинников С., Копица Г.П., Naramus V., Angelov V. Сополифлуорены как светоизлучающие полимеры: хемо- и биосенсоры. Первая российская конференция с международным участием «Физика — наукам о жизни» Санкт-Петербург, Россия, 18–22 сентября 2016 г
  28. Артюшенко П.В., Томилин Ф.Н. Оценка влияния факторов среды на устойчивость молекул феромонов чешуекрылых насекомых квантово-химическими методами. В книге: Сложные системы в экстремальных условиях. Тезисы докладов XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием. Сибирский федеральный университет; Институт экономики, управления и природопользования. Красноярск, Россия, 2016. С. 10.
  29. Томилин Ф.Н., Маляр Е.Ю., Слюсарева Е.А., Герасимова М.А., Овчинников С.Г. Изучение спектральных свойств ионных форм красителей флуоронов в зависимости от теоретических моделей расчётов. В книге: XV Международная молодёжная конференция по люминесценции и лазерной физике. Тезисы лекций и докладов. Иркутск, Россия, 2016. С. 164.
  30. Артюшенко П.В., Томилин Ф.Н., Кузубов А.А., Овчинников С.Г., Цыкалова П.Е., Овчинникова Т.М. Устойчивость молекул феромонов насекомых-ксилофагов к внешним факторам. В сборнике: Лесной и химический комплексы - проблемы и решения. Сборник статей по материалам Всероссийской (с международным участием) научно-практической конференции. Конференция посвящена 85-летию СибГТУ -первого ВУЗа Красноярского края. Красноярск, Россия, 2015. С. 89-90.
  31. S. Ovchinnikov, P. Artushenko, F. Tomilin, V. Sukhovol'sky, T. Ovchinnikova, P. Volkova. Quantum-chemical study of the stability of pheromone molecules to environmental factors. Международная конференция Ecological Modelling for



- Ecosystem Sustainability in the context of Global Change (ISEM 2013) Toulouse, France, October 28-31, 2013
32. Ф.Н. Томилин, Е.Ю. Танкевич, Е.А. Слюсарева, А.Г. Сизых, С.Г. Овчинников. Квантово-химическое изучение влияния растворителя и галогензамещения на электронные спектры молекул флуоронов. XIII Международную конференцию по люминесценции и лазерной физике. Иркутск, Россия, 15-22 июля 2012 г., г.
  33. F.N. Tomilin, L.V. Tikhonova, E.V. Ereemeeva, S.G. Ovchinnikov, and E.S. Vysotski, Quantum chemical study of 2 hydroperoxycoelenterazine generation. 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. 27 мая – 02 июня 2012 г. Гуэльф, Канада
  34. П.В. Артюшенко, Ф.Н. Томилин, А.А. Кузубов, С.Г. Овчинников. Исследование устойчивости молекул феромонов некоторых видов насекомых к солнечной радиации квантово-химическими методами. Тезисы доклада XV Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Экология. Человек. Общество», 26 сентября – 5 октября г. Киев, Украина, 2012 г.
  35. S. Ovchinnikov, F Tomilin. Quantum chemical modeling in the molecular ecology // 7th European Conference on Ecological Modeling – ECEM 2011, 30 May – 2 June 2011 Riva del Garda (Trento, Italy) p. 124
  36. Томилин, Ф.Н. Л.Ю. Антипина, Е.С. Высоцкий, С.Г. Овчинников. Моделирование образования активного фотопротейна обелина квантово-химическими методами // Тезисы доклада VI Съезда российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, Россия, 15-22 сентября 2011 г., стр 194
  37. F.N. Tomilin, L.U. Antipina, E.V. Ereemeeva, S.G. Ovchinnikov, and E.S. Vysotski. Quantum chemical study of mechanism of active photoprotein generation. 16th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Апрель 19-23, 2010, г. Лион, Франция

38. Л.Ю. Антипина, Ф.Н. Томилин, С.Г. Овчинников. Квантово-химическое исследование процесса формирования целентеразина и его изомерных форм // Тезисы Международной школы-конференции для студентов, аспирантов и молодых учёных «Фундаментальная математика и её приложения в естествознании» С. 171., Уфа. Россия, 3 – 7 октября 2010 года, г.
39. Tomilin, F.N., Antipina, L.U., Ovchinnikov, S.G., Vysotski E.S. The theoretical studies of light emitters in bioluminescence of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin. 15th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (15th ISBC) May 13 -17, 2008, Shanghai, China
40. Antipina L.Y., Tomilin F.N., Ovchinnikov S.G., Quantum-chemical methods of research Ca-regulated photoprotein obelin // The scientific conference of student of physics, Krasnoyarsk, Russia, 2007, pp. 25-26.
41. Antipina L.Y., Tomilin F.N., Kachin S.V., Quantum-chemical investigation of bioluminescence process of Ca-regulated photoprotein // The Chemistry and chemical technology in XXI century, Tomsk, Russia, 2007, pp. 251-252.

**СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Stewart J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method // J. Comput. Chem. Wiley Online Library, 1989. Vol. 10, № 2. P. 209–220.
2. MOPAC2016 J.J.P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2016 // Google Sch. There is no Corresp. Rec. this Ref.
3. Lee C., Yang W., Parr R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density // Phys. Rev. B. American Physical Society, 1988. Vol. 37, № 2. P. 785–789.
4. Yanai T., Tew D.P., Handy N.C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP) // Chem. Phys. Lett. 2004. Vol. 393, № 1–3. P. 51–57.
5. Runge E., Gross E.K.U. Density-functional theory for time-dependent systems // Phys. Rev. Lett. American Physical Society, 1984. Vol. 52, № 12. P. 997–1000.
6. CASIDA M.E. Time-Dependent Density Functional Response Theory for Molecules // Recent Advances in Density Functional Methods. P. 155–192.
7. Jacquemin D. et al. Extensive TD-DFT benchmark: singlet-excited states of organic molecules // J. Chem. Theory Comput. ACS Publications, 2009. Vol. 5, № 9. P. 2420–2435.
8. Hirota E. High-resolution spectroscopy of transient molecules. Springer Science & Business Media, 2012. Vol. 40.
9. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models // Chem.Rev.American Chem. Society, 2005. Vol. 105, №8. P. 2999–3094.
10. Купервассер О.Ю. et al. Континуальная модель растворителя: программа DISOLV--алгоритмы, реализация и валидация // Вычислительные методы и программирование. Московский государственный университет имени МВ Ломоносова, 2011. Vol. 12, № 2. P. 247–261.
11. Marenich A. V, Cramer C.J., Truhlar D.G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions // J. Phys. Chem. B. ACS

- Publications, 2009. Vol. 113, № 18. P. 6378–6396.
12. Cossi M., Barone V. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions // *J. Chem. Phys.* 2001. Vol. 115, № 10. P. 4708–4717.
  13. Hariharan P.C., Pople J.A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies // *Theor.Chim.Acta.* 1973. Vol. 28, №3. P. 213–222.
  14. Kendall R.A., Dunning T.H., Harrison R.J. Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions // *J. Chem. Phys.* 1992. Vol. 96, № 9. P. 6796–6806.
  15. Schuchardt K.L. et al. Basis set exchange: a community database for computational sciences // *J.Chem.Inf.Model.* ACS Publications, 2007. Vol. 47, №3. P. 1045–1052.
  16. Feller D. The role of databases in support of computational chemistry calculations // *J. Comput. Chem.* Wiley Online Library, 1996. Vol. 17, № 13. P. 1571–1586.
  17. Schmidt M.W. et al. General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.* 1993. Vol. 14, № 11. P. 1347–1363.
  18. Barca G.M.J. et al. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics Inc., 2020. Vol. 152, № 15. P. 154102.
  19. Kresse G., Furthmüller J. Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set // *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 1996. Vol. 54, № 16. P. 11169–11186.
  20. Dovesi R. et al. Quantum-mechanical condensed matter simulations with CRYSTAL // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2018. Vol. 8. P. e1360.
  21. Dovesi R. et al. The CRYSTAL code, 1976-2020 and beyond, a long story // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics Inc., 2020. Vol. 152, № 20.
  22. Cummings P.T. *Reviews in Computational Chemistry, Volume 21* Edited by Kenny B. Lipkowitz (North Dakota State University), Raima Larter (Indiana University-Purdue University), and Thomas R. Cundari (University of North Texas). John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2005 // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2005. Vol. 127, № 48. P. 17128.
  23. Hanwell M.D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor,

- visualization, and analysis platform // *J. Cheminform. BioMed Central*, 2012. Vol. 4, № 8. P. 17.
24. Zheng H. et al. Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors // *Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry*, 2013. Vol. 49, № 5. P. 429–447.
  25. Urano Y. et al. Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 13. P. 4888–4894.
  26. Xiong X. et al. Construction of long-wavelength fluorescein analogues and their application as fluorescent probes/*Chem. A Eur.J.* 2013. Vol.19, №21. P.6538–6545.
  27. Li G. et al. Ratiometric imaging of mitochondrial pH in living cells with a colorimetric fluorescent probe based on fluorescein derivative // *Sensors Actuators, B Chem. Elsevier B.V.*, 2017. Vol. 253. P. 58–68.
  28. Bazylevich A., Patsenker L.D., Gellerman G. Exploiting fluorescein based drug conjugates for fluorescent monitoring in drug delivery // *Dye. Pigment. Elsevier Ltd*, 2017. Vol. 139. P. 460–472.
  29. Wolf A. et al. A simulation-guided fluorescence correlation spectroscopy tool to investigate the protonation dynamics of cytochrome: C oxidase // *Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 18, № 18. P. 12877–12885.
  30. Abou-Zied O.K., Sulaiman S.A.J. Site-specific recognition of fluorescein by human serum albumin: A steady-state and time-resolved spectroscopic study // *Dye. Pigment. Elsevier Ltd*, 2014. Vol. 110. P. 89–96.
  31. Dutt G.B. Do ionic and hydrophobic probes sense similar microenvironment in Triton X-100 nonionic reverse micelles? // *J. Chem. Phys.* 2008. Vol. 129, № 1.
  32. Ghini G. et al. Carbon nanotubes modified with fluorescein derivatives for pH nanosensing/*Sensors Actuators, B Chem. Elsevier B.V.*, 2013. Vol.179. P.163–169.
  33. Saha J. et al. Effect of Zinc oxide nanoparticle on Fluorescence Resonance Energy transfer between Fluorescein and Rhodamine 6G // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V.*, 2017. Vol. 175. P. 110–116.
  34. Chen J. et al. Design and fabrication of fluorescence resonance energy transfer-mediated fluorescent polymer nanoparticles for ratiometric sensing of lysosomal

- pH // *J. Colloid Interface Sci. Academic Press Inc.*, 2016. Vol. 484. P. 298–307.
35. Slyusareva E.A., Gerasimova M.A. pH-Dependence of the Absorption and Fluorescent Properties of Fluorone Dyes in Aqueous Solutions // *Russ. Phys. J.* 2014. Vol. 56, № 12. P. 1370–1377.
  36. Patil V.S. et al. ESIPT-inspired benzothiazole fluorescein: Photophysics of microenvironment pH and viscosity/*Dye. Pigment.* 2013. Vol. 98, № 3. P. 507–517.
  37. Johann R.M. Indicating pressure and environmental effects by means of the spectral shift with rhodamine B and fluorescein // *AIP Adv. American Institute of Physics Inc.*, 2015. Vol. 5, № 7.
  38. Slyusareva E.A. et al. Spectral and fluorescent indication of the acidbase properties of biopolymer solutions // *Russ. Phys. J.* 2011. Vol. 54, № 4. P. 485–492.
  39. Венкатараман К. Химия синтетических красителей/Л. Ленгосхимиздат. 1956.
  40. Гордон П.Ф., Грегори П. Органическая химия красителей. Мир, 1987.
  41. Коган И.М. Химия красителей // М. Госхимиздат. 1956. P. 431.
  42. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. 1967.
  43. Лакович Д., Козьменко М.В., Савицкий А.П. Основы флуоресцентной спектроскопии. Мир, 1986.
  44. Гармаш А.В. Введение в спектроскопические методы анализа. Оптические методы анализа // М. РАН. 1995.
  45. Lee J.H. et al. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, № 52. P. 18902–18907.
  46. Klonis N., Sawyer W.H. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution // *J. Fluoresc.* 1996. Vol. 6, № 3. P. 147–157.
  47. Silva D.L. et al. One- and two-photon absorption of fluorescein dianion in water: A study using S-QM/MM methodology and ZINDO method // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2014. Vol. 119. P. 63–75.
  48. Silva D.L., Coutinho K., Canuto S. Electronic spectroscopy of biomolecules in solution: fluorescein dianion in water doi/10.1080/00268976.2010.497779. Taylor

- & Francis Group, 2010. Vol. 108, № 21–23. P. 3125–3130.
49. Mchedlov-Petrosyan N.O., Ivanov V. V. Effect of the solvent on the absorption spectra and protonation of fluorescein dye anions // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2007. Vol. 81, № 1. P. 112–115.
  50. Król M. et al. Macroscopic pKa calculations for fluorescein and its derivatives // *J. Chem. Theory Comput.* 2006. Vol. 2, № 6. P. 1520–1529.
  51. Tamulis A. et al. Quantum mechanical studies of intensity in electronic spectra of fluorescein dianion and monoanion forms // *Struct. Chem.* 2003. Vol. 14, № 6. P. 643–648.
  52. Jang Y.H., Hwang S., Chung D.S. Tautomeric equilibrium of fluorescein in solution: Ab initio calculations // *Chem. Lett. Chemical Society of Japan*, 2001. № 12. P. 1316–1317.
  53. Wang L. et al. Raman and FTIR spectroscopies of fluorescein in solutions // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2001. Vol. 57, № 9. P. 1781–1791.
  54. Fabian W.M.F., Schuppler S., Wolfbeis O.S. Effects of annulation on absorption and fluorescence characteristics of fluorescein derivatives: A computational study / *J.Chem.Soc.Perkin Trans. 2. Royal Society of Chemistry*, 1996. Vol.5. P.853–856.
  55. Lebed A. V., Biryukov A. V., Mchedlov-Petrosyan N.O. A quantum-chemical study of tautomeric equilibria of fluorescein dyes in DmsO // *Chem. Heterocycl. Compd. Springer New York LLC*, 2014. Vol. 50, № 3. P. 336–348.
  56. Buonocore F., Matteo A. di. New insights into oxidation properties and band structure of fluorescein dyes from ab initio calculations // *Theor. Chem. Acc. Springer New York LLC*, 2012. Vol. 131, № 2. P. 1–9.
  57. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II* / ed. Schulz S. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. Vol. 240.
  58. Zhou P. et al. The invalidity of the photo-induced electron transfer mechanism for fluorescein derivatives // *Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Society of Chemistry*, 2012. Vol. 14, № 43. P. 15191–15198.
  59. Slyusareva E.A. et al. The effect of halogen substitution on the structure and

- electronic spectra of fluorone dyes // *Opt. Spectrosc.* (English Transl. *Opt. i Spektrosk.* 2012. Vol. 112, № 5.
60. Batistela V.R. et al. Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies // *Dye. Pigment.* 2010. Vol. 86, № 1. P. 15–24.
  61. Fazzi D., Castiglioni C., Negri F. Resistive memories based on Rose Bengal and related xanthene derivatives: Insights from modeling charge transport properties // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. Vol. 12, № 7. P. 1600–1609.
  62. Spagnuolo C.C. et al. Photostability and spectral properties of fluorinated fluoresceins and their biarsenical derivatives: A combined experimental and theoretical study // *Photochem. Photobiol.* 2009. Vol. 85, № 5. P. 1082–1088.
  63. Sjöback R., Nygren J., Kubista M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 1995. Vol. 51, № 6.
  64. Martin M.M., Lindqvist L. The pH dependence of fluorescein fluorescence // *J. Lumin.* 1975. Vol. 10, № 6. P. 381–390.
  65. Gerasimova M.A. et al. Fluorescence and photoinduced proton transfer in the protolytic forms of fluorescein: Experimental and computational study // *Dye. Pigment.* Elsevier, 2020. Vol. 173. P. 107851.
  66. Peach M.J.G. et al. Excitation energies in density functional theory: An evaluation and a diagnostic test // *J. Chem. Phys.* 2008. Vol. 128, № 4. P. 44118.
  67. Zhang X.F., Zhang I., Liu L. Photophysics of halogenated fluoresceins: Involvement of both intramolecular electron transfer and heavy atom effect in the deactivation of excited states *Photochem. Photobiol.* 2010. Vol.86, №3. P.492–498.
  68. Slyusarenko N. et al. Photoluminescence properties of self-assembled chitosan-based composites containing semiconductor nanocrystals // *Phys. Chem. Chem. Phys.* Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 21, № 9. P. 4831–4838.
  69. Lim C.S. et al. Fabrication of microcrystalline NaPbLa (WO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>: Yb<sup>3+</sup>/Ho<sup>3+</sup> phosphors and their upconversion photoluminescent characteristics // *Korean J. Mater. Res.* Materials Research Society of Korea, 2019. Vol. 29, № 12. P. 741–746.
  70. Peumans P., Yakimov A., Forrest S.R. Small molecular weight organic thin-film photodetectors and solar cells // *J. Appl. Phys.* American Institute of Physics, 2003.



- Vol. 93, № 7. P. 3693–3723.
71. Karzazi Y., others. Organic light emitting diodes: devices and applications // *J. Mater. Environ. Sci. Citeseer*, 2014. Vol. 5, № 1. P. 1–12.
  72. Liu J. et al. Fullerene pipes // *Science* (80-. ). American Association for the Advancement of Science, 1998. Vol. 280, № 5367. P. 1253–1256.
  73. Liu H. et al. Polyfluorene electrolytes interfacial layer for efficient polymer solar cells: controllably interfacial dipoles by regulation of polar groups // *ACS Appl. Mater. & interfaces*. ACS Publications, 2016. Vol. 8, № 15. P. 9821–9828.
  74. Jahanfar M. et al. Polyfluorene-polytriarylamine block copolymer as an additive for electroluminescent devices based on polymer blends. Scientific Research Publishing, 2013.
  75. Ilgach D.M. et al. Polyfluorene copolymers containing 2, 5-difluoro-1, 4-phenylene chains and carbazole conjugates with 1, 8-naphthalimides for stable blue OLEDs // *Mendeleev Commun. Elsevier*, 2017. Vol. 27, № 4. P. 357–359.
  76. Fathollahi M.-R., Boroumand F.A. Fabrication and simulation of polyfluorene-based organic light-emitting diodes // 20th Iranian Conference on Electrical Engineering (ICEE2012). 2012. P. 77–81.
  77. Hodgkinson W.R., Matthews F.E. XXIII.—Note on some derivatives of fluorene, C<sub>13</sub> H<sub>10</sub> // *J. Chem. Soc. Trans. Royal Society of Chemistry*, 1883. Vol. 43. P. 163–172.
  78. Smedley I. CXXV.—Studies on the origin of colour. Derivatives of fluorene // *J. Chem. Soc. Trans. Royal Society of Chemistry*, 1905. Vol. 87. P. 1249–1255.
  79. Palai A.K. et al. Fluorene-based conjugated poly (arylene ethynylene) s containing heteroaromatic bicycles: preparation and electro-optical properties // *J. Mater. Sci. Springer*, 2014. Vol. 49, № 21. P. 7408–7417.
  80. Miteva T. et al. Improving the performance of polyfluorene-based organic light-emitting diodes via end-capping // *Adv. Mater. Wiley Online Library*, 2001. Vol. 13, № 8. P. 565–570.
  81. Sun J. et al. Polyfluorene-based white light conjugated polymers incorporating orange iridium (III) complexes: the effect of steric configuration on their

- photophysical and electroluminescent properties // RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 8, № 3. P. 1638–1646.
82. Ying L. et al. White polymer light-emitting devices for solid-state lighting: materials, devices, and recent progress // Adv. Mater. Wiley Online Library, 2014. Vol. 26, № 16. P. 2459–2473.
  83. Hwang D.-H. et al. Conjugated polymers based on phenothiazine and fluorene in light-emitting diodes and field effect transistors // Chem. Mater. ACS Publications, 2004. Vol. 16, № 7. P. 1298–1303.
  84. Geffroy B., Le Roy P., Prat C. Organic light-emitting diode (OLED) technology: materials, devices and display technologies // Polym. Int. Wiley Online Library, 2006. Vol. 55, № 6. P. 572–582.
  85. Kularatne R.S. et al. Donor--acceptor semiconducting polymers based on pyromellitic diimide // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. Wiley Online Library, 2015. Vol. 53, № 13. P. 1617–1622.
  86. Giovanella U. et al. Stabilized blue emission from polyfluorene-based light-emitting diodes: The role of triphenylamine // Synth. Met. Elsevier, 2008. Vol. 158, № 3–4. P. 113–119.
  87. Raithel D. et al. Direct observation of backbone planarization via side-chain alignment in single bulky-substituted polythiophenes // Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences, 2018. Vol. 115, № 11. P. 2699–2704.
  88. Huang J. et al. Efficient flexible polymer light emitting diodes with conducting polymer anodes // J. Mater. Chem. Royal Society of Chemistry, 2007. Vol. 17, № 33. P. 3551–3554.
  89. Huang S.-T. et al. Synthesis and electroluminescent properties of polyfluorene-based conjugated polymers containing bipolar groups // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. Wiley Online Library, 2009. Vol. 47, № 22. P. 6231–6245.
  90. Grimsdale A.C. et al. Synthesis of Light-Emitting Conjugated Polymers for Applications in Electroluminescent Devices // Chem. Rev. American Chemical Society, 2009. Vol. 109, № 3. P. 897–1091.
  91. Beaujuge P.M., Reynolds J.R. Color Control in  $\pi$ -Conjugated Organic Polymers for

- Use in Electrochromic Devices // Chem. Rev. American Chemical Society, 2010. Vol. 110, № 1. P. 268–320.
92. Khasbaatar A. et al. From Solution to Thin Film: Molecular Assembly of  $\pi$ -Conjugated Systems and Impact on (Opto)electronic Properties // Chem. Rev. American Chemical Society, 2023. Vol. 123, № 13. P. 8395–8487.
93. Bezgin Carbas B. Fluorene based electrochromic conjugated polymers: A review // Polymer (Guildf). 2022. Vol. 254. P. 125040.
94. Kim K. et al. Synthesis of polyfluorene-polytriarylamine block copolymers with light-emitting benzothiadiazole moieties: effect of chromophore location on electroluminescent properties // Polym. J. 2017. Vol. 49, № 10. P. 721–728.
95. Afanasenko A.M. et al. Intermolecular interactions-photophysical properties relationships in phenanthrene-9,10-dicarbonitrile assemblies // J. Mol. Struct. 2020. Vol. 1199. P. 126789.
96. Wang Q. et al. Acene enlargement for absorption red-shifting and photosensitization enhancement of photosensitizers with aggregation-induced emission // Chem. Sci. The Royal Society of Chemistry, 2023. Vol. 14, № 3. P. 684–690.
97. Panthi K., Adhikari R.M., Kinstle T.H. Aromatic Fumaronitrile Core-Based Donor–Linker–Acceptor–Linker–Donor (D- $\pi$ -A- $\pi$ -D) Compounds: Synthesis and Photophysical Properties // J. Phys. Chem. A. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 13. P. 4542–4549.
98. Allendorf M.D. et al. Luminescent metal–organic frameworks // Chem. Soc. Rev. 2009. Vol. 38. P. 1330.
99. Benin B.M. et al. Highly Emissive Self-Trapped Excitons in Fully Inorganic Zero-Dimensional Tin Halides // Angew. Chem., Int. Ed. 2018. Vol. 57. P. 11329.
100. Zhou C. et al. Luminescent zero-dimensional organic metal halide hybrids with near-unity quantum efficiency // Chem. Sci. 2018. Vol. 9. P. 586.
101. Lin H. et al. Bulk assembly of zero-dimensional organic lead bromide hybrid with efficient blue emission // ACS Mater. Lett. 2019. Vol. 1. P. 594.
102. Mohammed O.F. Outstanding challenges of zero-dimensional perovskite materials

- // J. Phys. Chem. Lett. 2019. Vol. 10. P. 5886.
103. Lin H. et al. Low-dimensional organometal halide perovskites // ACS Energy Lett. 2018. Vol. 3. P. 54.
  104. Singhal N. et al. Low-bandgap Cs<sub>4</sub>CuSb<sub>2</sub>Cl<sub>12</sub> layered double perovskite: Synthesis, reversible thermal changes, and magnetic interaction // Chem. - Asian J. 2018. Vol. 13. P. 2085.
  105. Han P. et al. All-Inorganic Lead-Free 0D Perovskites by a Doping Strategy to Achieve a PLQY Boost from 2% to 90%. Angew.Chem., Int.Ed. 2020. Vol.59. P.12709.
  106. McCall K.M. et al. Efficient Lone-Pair-Driven Luminescence: Structure–Property Relationships in Emissive 5s<sup>2</sup> Metal Halides. ACS Mater. Lett. 2020. Vol.2. P.1218.
  107. Anis M. et al. Monocrystal growth, X-ray diffraction, photoluminescence, thermal and dielectric studies of cadmium thiourea acetate complex doped with L-cystine // Optik (Stuttg). 2016. Vol. 127. P. 12043.
  108. Mahendra K., D'Souza A., Udayashankar N.K. Effect of Zn doping on the structural, optical, photoluminescence and mechanical properties of thiourea barium chloride (TBC) crystal // Mater. Today Comm. 2017. Vol. 13. P. 178.
  109. Oliveira D. V et al. BSSE-correction scheme for consistent Gaussian basis sets of double- and triple-zeta valence with polarization quality for solid-state calculations // J. Comput. Chem. 2019. Vol. 40. P. 2364.
  110. Zagorac D. et al. Ab initio structure prediction for lead sulfide at standard and elevated pressures // Phys. Rev. B. 2011. Vol. 84. P. 45206.
  111. Metz B., Stoll H., Dolg M. Small-core multiconfiguration-Dirac–Hartree–Fock-adjusted pseudopotentials for post-d main group elements: Application to PbH and PbO // J. Chem. Phys. 2000. Vol. 113. P. 2563.
  112. Kroto H.W. et al. C<sub>60</sub>: buckminsterfullerene // Nature. Nature Publishing Group, 1985. Vol. 318, № 6042. P. 162–163.
  113. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon // Nature. Nature Publishing Group, 1991. Vol. 354, № 6348. P. 56–58.

114. Piskoti C., Yarger J., Zettl A. C 36, a new carbon solid // Nature. Nature Publishing Group, 1998. Vol. 393, № 6687. P. 771–774.
115. Wang X.-Q. et al. Relative stability of C78 isomers // Chem. Phys. Lett. Elsevier, 1992. Vol. 200, № 1–2. P. 35–38.
116. Diederich F. et al. Fullerene isomerism: isolation of c2v,-c78 and d3-c78 // Science (80-. ). American Association for the Advancement of Science, 1991. Vol. 254, № 5039. P. 1768–1770.
117. Kikuchi K. et al. NMR characterization of isomers of C 78, C 82 and C 84 fullerenes // Nature. Nature Publishing Group, 1992. Vol. 357, № 6374. P. 142–145.
118. Soderholm L. et al. An EXAFS study of the metallofullerene YC82: is the yttrium inside the cage? J. Phys. Chem. ACS Publications, 1992. Vol. 96, №18. P.7156.
119. Suzuki S. et al. Isomers and carbon-13 hyperfine structures of metal-encapsulated fullerenes M@ C82 (M= Sc, Y, and La) // J. Phys. Chem. ACS Publications, 1992. Vol. 96, № 18. P. 7159–7161.
120. Lawson D.R. et al. Near-IR absorption spectra for the C70 fullerene anions // J. Phys. Chem. ACS Publications, 1992. Vol. 96, № 18. P. 7175–7177.
121. Klimko G.T. et al. C28 and C48 fullerenes special properties // J. Mol. Struct. Elsevier, 1999. Vol. 480. P. 329–333.
122. Krätschmer W. et al. Solid C 60: a new form of carbon // Nature. Nature Publishing Group, 1990. Vol. 347, № 6291. P. 354–358.
123. Haufler R.E. et al. Efficient production of C60 (buckminsterfullerene), C60H36, and the solvated buckide ion // J. Phys. Chem. ACS Publications, 1990. Vol. 94, № 24. P. 8634–8636.
124. Елецкий А.В., Смирнов Б.М. Фуллерены и структуры углерода // Усп. физ. наук. Успехи физических наук, 1995. Vol. 165, № 9. P. 977–1009.
125. Елецкий А.В. Эндодраальные структуры // Успехи физических наук. 2000. Vol. 170, № 2. P. 113–142.
126. Jones D.E.H. Ariadne // New Sci. 1966. Vol. 32, № 245. P. 1.
127. Osawa E. Kagaku (Kyoto) 1970, 25, 854-863. Chem.Abstr. 1971. Vol. 74. P. 75698
128. Бочвар Д.А., Гальперн Е.Г. О гипотетических системах: карбододекаэдре, s-

- икосаэдре и карбо-*s*-икосаэдре // Докл. АН СССР. 1973. Vol. 209, № 3. P. 610–612.
129. David W.I.F. et al. Crystal structure and bonding of ordered C<sub>60</sub> // Nature. Nature Publishing Group, 1991. Vol. 353, № 6340. P. 147–149.
130. Hedberg K. et al. Bond lengths in free molecules of buckminsterfullerene, C<sub>60</sub>, from gas-phase electron diffraction // Science (80-. ). American Association for the Advancement of Science, 1991. Vol. 254, № 5030. P. 410–412.
131. White C.T. et al. Predicting properties of fullerenes and their derivatives // Buckminsterfullerenes. VCH New York, 1993. P. 125.
132. Andreoni W. Computational approach to the physical chemistry of fullerenes and their derivatives // Annu. Rev. Phys. Chem. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 1998. Vol. 49, № 1. P. 405–439.
133. Chiang L.Y., Lu F.-J., Lin J.-T. Free radical scavenging activity of water-soluble fullerenols // J. Chem. Soc. Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 1995. № 12. P. 1283–1284.
134. Dai X. et al. The ground state and electronic structure of Gd@ C<sub>82</sub>: A systematic theoretical investigation of first principle density functionals // J. Chem. Phys. AIP Publishing LLC, 2014. Vol. 141, № 24. P. 244306.
135. Думпис М.А. et al. Биологическая активность фуллеренов-реалии и перспективы // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Общество с ограниченной ответственностью Эко-Вектор, 2018. Vol. 16, № 1.
136. Wang Z., Gao X., Zhao Y. Mechanisms of antioxidant activities of fullerenols from first-principles calculation // J. Phys. Chem. A. ACS Publications, 2018. Vol. 122, № 41. P. 8183–8190.
137. Popov A.A., Yang S., Dunsch L. Endohedral fullerenes // Chem. Rev. ACS Publications, 2013. Vol. 113, № 8. P. 5989–6113.
138. Akentiev A. V et al. Surface properties of fulleranol C<sub>60</sub> (OH)<sub>20</sub> solutions // J. Mol. Liq. Elsevier, 2020. Vol. 306. P. 112904.
139. Grebowski J. et al. Fulleranol C<sub>60</sub> (OH)<sub>36</sub> protects human erythrocyte membrane

- against high-energy electrons // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes*. Elsevier, 2018. Vol. 1860, № 8. P. 1528–1536.
140. Nakamura H. et al. Effect of number of hydroxyl groups of fullereneol C<sub>60</sub> (OH)<sub>n</sub> on its interaction with cell membrane // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* Elsevier, 2018. Vol. 90. P. 18–24.
141. Eropkin M.Y. et al. Synthesis and biological activity of fullereneols with various contents of hydroxyl groups // *Pharm.Chem.J.* Springer, 2013. Vol.47, №2. P. 87-91.
142. Goncharova E.A. et al. Obtaining of water-soluble polyhydroxylated fullereneols with iron nanoparticles as catalyzers // *Vestn. SibGAU*. 2009. Vol. 22. P. 90–93.
143. Wang Z. et al. Syntheses, structures and antioxidant activities of fullereneols: knowledge learned at the atomistic level // *J. Clust. Sci.* Springer, 2015. Vol. 26, № 2. P. 375–388.
144. Yin J.-J. et al. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials // *Biomaterials*. Elsevier, 2009. Vol. 30, № 4. P. 611–621.
145. Becke A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior // *Phys. Rev. A*. APS, 1988. Vol. 38, № 6. P. 3098.
146. Schmidt M.W. et al. General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.* John Wiley & Sons, Ltd, 1993. Vol. 14, № 11. P. 1347–1363.
147. Stewart J.J.P. MOPAC2012. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs // CO, USA. 2012.
148. Guirado-López R.A., Rincón M.E. Structural and optical properties of highly hydroxylated fullerenes: Stability of molecular domains on the C<sub>60</sub> surface // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics, 2006. Vol. 125, № 15. P. 154312.
149. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании реакции автоокисления адреналина: возможность полярографического определения активности супероксиддисмутазы и антиоксидантных свойств различных препаратов // *Биомедицинская химия. НИИ биомедицинской химии имени ВН Ореховича*, 2012. Vol. 58, № 1. P. 77–87.
150. Naoyu S.Y. et al. MN15: A Kohn--Sham global-hybrid exchange--correlation

- density functional with broad accuracy for multi-reference and single-reference systems and noncovalent interactions // *Chem. Sci.* The Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 7, № 8. P. 5032–5051.
151. Weigend F., Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* The Royal Society of Chemistry, 2005. Vol. 7, № 18. P. 3297–3305.
  152. Pearson R.G. *Hard and Soft Acids and Bases* (Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA, 1973)(b) RG Pearson, *Chemical Hardness: Applications from Molecules to Solids*. Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
  153. Frisch M. et al. gaussian 09, Revision d. 01, Gaussian // Inc., Wallingford CT. 2009. Vol. 201.
  154. Gulde R., Pollak P., Weigend F. Error-balanced segmented contracted basis sets of double- $\zeta$  to quadruple- $\zeta$  valence quality for the lanthanides // *J. Chem. Theory Comput.* ACS Publications, 2012. Vol. 8, № 11. P. 4062–4068.
  155. Zhang J. et al. Gd<sub>3</sub>N@ C<sub>84</sub> (OH) x: a new egg-shaped metallofullerene magnetic resonance imaging contrast agent // *J. Am. Chem. Soc.* ACS Publications, 2014. Vol. 136, № 6. P. 2630–2636.
  156. Nishibori E. et al. Anomalous endohedral structure of Gd@C<sub>82</sub> metallofullerenes // *Phys. Rev. B.* APS, 2004. Vol. 69, № 11. P. 113412.
  157. Dawid A., Górny K., Gburski Z. Water Solvent Effect on Infrared and Raman Spectra of C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> Fullerenol Isomers: DFT Study // *J. Phys. Chem. C.* American Chemical Society, 2017. Vol. 121, № 4. P. 2303–2315.
  158. Li X.-J. et al. A DFT study on structure, stability, and optical property of fullerenols // *Struct. Chem.* 2013. Vol. 24, № 4. P. 1185–1192.
  159. Dawid A., Górny K., Gburski Z. The influence of distribution of hydroxyl groups on vibrational spectra of fullerenol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> isomers: DFT study // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015. Vol. 136. P. 1993–1997.
  160. Bai H. et al. Interaction in Li@Fullerenes and Li<sup>+</sup>@Fullerenes: First Principle Insights to Li-Based Endohedral Fullerenes // *Nanomaterials.* 2019. Vol. 9, № 4.



161. Gao H. et al. Understanding endohedral behaviors of ten-electron atomic and cluster system inside C<sub>60</sub> from first-principles // *Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures*. 2021. Vol. 127. P. 114532.
162. Martínez-Flores C., Basiuk V.A. Ln@C<sub>60</sub> endohedral fullerenes: A DFT analysis for the complete series from lanthanum to lutetium // *Comput. Theor. Chem.* 2022. Vol. 1217. P. 113878.
163. AlZahrani A.Z. Cerium-Doped Endohedral Fullerene: A Density-Functional Theory Study // *ISRN Condens. Matter Phys.* / ed. Krimmel A., Andreani C., Cantarero A. International Scholarly Research Network, 2012. Vol. 2012. P. 208234.
164. Senapati L., Schrier J., Whaley K.B. Electronic Transport, Structure, and Energetics of Endohedral Gd@C<sub>82</sub> Metallofullerenes // *Nano Lett.* American Chemical Society, 2004. Vol. 4, № 11. P. 2073–2078.
165. Velarde-Salcedo M. V, Gallo M., Guirado-López R.A. Low Hydroxylated Fullerenes: Stability, Thermal Behavior, and Vibrational Properties // *J. Phys. Chem. C.* American Chemical Society, 2018. Vol. 122, № 24. P. 13117–13129.
166. Palotás J. et al. Laboratory IR Spectra of the Ionic Oxidized Fullerenes C<sub>60</sub>O<sup>+</sup> and C<sub>60</sub>OH<sup>+</sup> // *J. Phys. Chem. A.* American Chemical Society, 2022. Vol. 126, № 19. P. 2928–2935.
167. Zou T. et al. The effect of hemiketals on the relaxivity of endohedral gadofullerenols // *RSC Adv.* The Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 5, № 117. P. 96253–96257.
168. Cui R. et al. Novel carbon nanohybrids as highly efficient magnetic resonance imaging contrast agents // *Nano Res.* 2015. Vol. 8, № 4. P. 1259–1268.
169. Wei T. et al. Capturing the Long-Sought Small-Bandgap Endohedral Fullerene Sc<sub>3</sub>N@C<sub>82</sub> with Low Kinetic Stability // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2015. Vol. 137, № 8. P. 3119–3123.
170. Roy D. et al. Theoretical Studies on C<sub>82</sub> Fullerene with Encapsulated Germanium Metal // *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* Taylor & Francis, 2006. Vol. 36, № 1. P. 43–46.

171. Shimada T. et al. Transport properties of C78, C90 and Dy@C82 fullerenes-nanopeapods by field effect transistors // *Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures*. 2004. Vol. 21, № 2. P. 1089–1092.
172. Mikawa M. et al. Paramagnetic Water-Soluble Metallofullerenes Having the Highest Relaxivity for MRI Contrast Agents // *Bioconjug. Chem. American Chemical Society*, 2001. Vol. 12, № 4. P. 510–514.
173. Meng J. et al. Biological characterizations of [Gd@C82(OH)22]n nanoparticles as fullerene derivatives for cancer therapy // *Integr. Biol. The Royal Society of Chemistry*, 2013. Vol. 5, № 1. P. 43–47.
174. Horiguchi Y., Kudo S., Nagasaki Y. Gd@C82 metallofullerenes for neutron capture therapy—fullerene solubilization by poly(ethylene glycol)-block-poly(2-(N, N-diethylamino)ethyl methacrylate) and resultant efficacy in vitro // *Sci. Technol. Adv. Mater. Taylor & Francis*, 2011. Vol. 12, № 4. P. 44607.
175. Li X., Wang C. The potential biomedical platforms based on the functionalized Gd@C82 nanomaterials / VIEW. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 1, №1. P. e7.
176. Shakirova A.A. et al. Synthesis, Mass Spectroscopy Detection, and Density Functional Theory Investigations of the Gd Endohedral Complexes of C82 Fullerenols // *Computation. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2021. Vol. 9, № 5. P. 58.
177. Rodríguez-Zavala J.G. et al. Theoretical study on the sequential hydroxylation of C82 fullerene based on Fukui function // *Mol. Phys. Taylor & Francis*, 2011. Vol. 109, № 14. P. 1771–1783.
178. Zhang J. et al. Most stable structures of polyhydroxylated endohedral metallofullerene Gd@C82(OH)<sub>x</sub> (x=1–24) from density function theory // *Chem. Phys. Lett.* 2010. Vol. 492, № 1. P. 68–70.
179. Dudnik A.I. et al. Electrophysical properties of hydroxylated endohedral metallofullerene with gadolinium // *J. Phys. Chem. Solids*. 2019. Vol.135. P. 109094
180. Gaus M. et al. Parameterization of DFTB3/3OB for sulfur and phosphorus for chemical and biological applications // *J. Chem. Theory Comput. American Chemical Society*, 2014. Vol. 10, № 4. P. 1518–1537.

181. Husebo L.O. et al. Fullerenols Revisited as Stable Radical Anions // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2004. Vol. 126, № 38. P. 12055–12064.
182. Wang B.-C. et al. Theoretical studies of C<sub>70</sub>(OH)<sub>n</sub> (n=14, 16, 18 and 20) fullerenols // *J. Mol. Struct. THEOCHEM*. 2002. Vol. 581, № 1. P. 177–186.
183. Li J. et al. A water-soluble gadolinium metallofullerenol: facile preparation, magnetic properties and magnetic resonance imaging application // *Dalt. Trans. The Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 45, № 21. P. 8696–8699.
184. Gaus M., Goez A., Elstner M. Parametrization and Benchmark of DFTB3 for Organic Molecules // *J. Chem. Theory Comput. American Chemical Society*, 2013. Vol. 9, № 1. P. 338–354.
185. Rürger R. et al. Vibrationally resolved UV/Vis spectroscopy with time-dependent density functional based tight binding // *J. Chem. Phys. American Institute of Physics*, 2016. Vol. 145, № 18. P. 184102.
186. Inakollu V.S.S., Yu H. A systematic benchmarking of computational vibrational spectroscopy with DFTB3: Normal mode analysis and fast Fourier transform dipole autocorrelation function // *J. Comput. Chem. John Wiley & Sons, Ltd*, 2018. Vol. 39, № 25. P. 2067–2078.
187. Tang C. et al. Stabilities, aromaticity, infrared spectra, and optical properties of exohedral fullerene derivatives C<sub>76</sub>X<sub>18</sub> (X = H, F, Cl, and Br) // *Eur. Phys. J. D*. 2014. Vol. 68, № 2. P. 19.
188. Liu Q. et al. Enhanced Photodynamic Efficiency of an Aptamer-Guided Fullerene Photosensitizer toward Tumor Cells // *Chem. – An Asian J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2013. Vol. 8, № 10. P. 2370–2376.
189. Zhao M. et al. Eco-Friendly and Scalable Synthesis of Fullerenols with High Free Radical Scavenging Ability for Skin Radioprotection // *Small. John Wiley & Sons, Ltd*, 2021. Vol. 17, № 37. P. 2102035.
190. Lee C.-W. et al. Water-Soluble Fullerene C<sub>60</sub>(OH)<sub>36</sub> toward Effective Anti-Air Pollution Induced by Urban Particulate Matter in HaCaT Cell // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, № 17.
191. Chen X. et al. Fullerene protects cornea from ultraviolet B exposure // *Redox Biol.*

2022. Vol. 54. P. 102360.
192. Shafiq F. et al. Fullerenol regulates oxidative stress and tissue ionic homeostasis in spring wheat to improve net-primary productivity under salt-stress // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. Vol. 211. P. 111901.
193. Ye L. et al. Antitumor Activity and Potential Mechanism of Novel Fullerene Derivative Nanoparticles // *Molecules.* 2021. Vol. 26, № 11.
194. Chen C. et al. Multihydroxylated [Gd@C82(OH)22]<sub>n</sub> Nanoparticles: Antineoplastic Activity of High Efficiency and Low Toxicity // *Nano Lett. American Chemical Society*, 2005. Vol. 5, № 10. P. 2050–2057.
195. Anderson S.A., Lee K.K., Frank J.A. Gadolinium-Fullerenol as a Paramagnetic Contrast Agent for Cellular Imaging // *Invest. Radiol.* 2006. Vol. 41, № 3.
196. Chen K. et al. Fullerenols boosting the therapeutic effect of anti-CD47 antibody to trigger robust anti-tumor immunity by inducing calreticulin exposure // *Nano Today.* 2021. Vol. 37. P. 101070.
197. Grebowski J., Kazmierska P., Krokosz A. Fullerenols as a New Therapeutic Approach in Nanomedicine // *Biomed Res. Int.* / ed. Camins A. Hindawi Publishing Corporation, 2013. Vol. 2013. P. 751913.
198. Cai X. et al. The polyhydroxylated fullerene derivative C60(OH)24 protects mice from ionizing-radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010. Vol. 243, № 1. P. 27–34.
199. Slavic M. et al. Fullerenol C60(OH)24 nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction // *J. Nanoparticle Res.* 2013. Vol. 15, № 5. P. 1650.
200. Mirkov S.M. et al. Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullerenol, C60(OH)24 // *Nitric Oxide.* 2004. Vol. 11, № 2. P. 201–207.
201. Injac R., Prijatelj M., Strukelj B. Fullerenol Nanoparticles: Toxicity and Antioxidant Activity BT-Oxidative Stress and Nanotechnology: Methods and Protocols/ed. Armstrong D., Bharali D. Totowa, N:Humana Press, 2013.P.75–100.
202. Li J. et al. A Novel Drug Design Strategy: An Inspiration from Encaging Tumor by Metallofullerenol Gd@C82(OH)22 // *Molecules.* 2019. Vol. 24, № 13.

203. Li J. et al. The pharmaceutical multi-activity of metallofullerenol invigorates cancer therapy // *Nanoscale*. The Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 11, № 31. P. 14528–14539.
204. Fernandes N.B. et al. Fullerenes for the treatment of cancer: an emerging tool // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022. Vol. 29, № 39. P. 58607–58627.
205. Maravilla K.R. et al. Comparison of Gadoterate Meglumine and Gadobutrol in the MRI Diagnosis of Primary Brain Tumors: A Double-Blind Randomized Controlled Intraindividual Crossover Study (the REMIND Study) // *Am. J. Neuroradiol.* 2017. Vol. 38, № 9. P. 1681 LP – 1688.
206. Ersoy H., Rybicki F.J. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis // *J. Magn. Reson. Imaging*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 26, № 5. P. 1190–1197.
207. Sosnovik D.E., Caravan P. Molecular MRI of the Cardiovascular System in the Post-NSF Era // *Curr. Cardiovasc. Imaging Rep.* 2013. Vol. 6, № 1. P. 61–68.
208. Yang S., Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply // *Mol. Cell. Biochem.* 2020. Vol. 467, № 1. P. 1–12.
209. Yang B., Chen Y., Shi J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2019. Vol. 119, № 8. P. 4881–4985.
210. Roda A. et al. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence // *Trends Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 6. P. 295–303.
211. Abbas M. et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review // *Sci. Total Environ.* 2018. Vol. 626. P. 1295–1309.
212. Ismailov A.D., Aleskerova L.E. Photobiosensors containing luminescent bacteria // *Biochem.* 2015. Vol. 80, № 6. P. 733–744.
213. Ventura F.F. et al. Evaluation of Phenolic Compound Toxicity Using a Bioluminescent Assay with the Fungus *Gerronema viridilucens* // *Environ. Toxicol. Chem.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 39, № 8. P. 1558–1565.
214. Li Y. et al. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. Vol. 414, № 1. P. 75–83.
215. Tomilin F.N. et al. Structure and Vibrational Spectroscopy of C82 Fullerenol Valent

- Isomers: An Experimental and Theoretical Joint Study. *Molecules* 2023. Vol. 28, №4.
216. Скиркявичюс А.В. Феромонная коммуникация насекомых Вильнюс. 1986.
217. Джекобсон И. Половые феромоны насекомых. М.: Мир. 321 с. 1976.
218. Лебедева К.В., Миняйло В.А., Пятнова Ю.Б. Феромоны насекомых. Наука, 1984.
219. Cormier R.A., Hoban J.N. Laboratory syntheses of insect pheromones // *J. Chem. Educ. ACS Publications*, 1984. Vol. 61, № 10. P. 927.
220. Mori K. Organic synthesis in pheromone science // *Molecules. Molecular Diversity Preservation International*, 2005. Vol. 10, № 9. P. 1023–1047.
221. Regnier F.E., Law J.H. Insect pheromones // *J. Lipid Res. Elsevier*, 1968. Vol. 9, № 5. P. 541–551.
222. Волкова П.Е., Овчинникова Т.М., Суховольский В.Г. Системный анализ механизмов феромонного поиска у лесных чешуекрылых // *Хвойные бореальной зоны. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева»*, 2009. Vol. 2, № 2.
223. Артюшенко П.В. Атомная и электронная структуры феромонов в основном и возбуждённом состояниях. Диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук. 01.04.07. Красноярск. Институт Физики им.Киренского СОРАН. 100 стр., 2019.
224. Каабак Л.В. Бабочки мира. Мир энциклопедий Аванта+, 2011.
225. d’Abrera V. *World Butterflies*. Hill House Publishers, 2006.
226. Львовский А.Л. Определители по флоре и фауне России // АЛ Львовский, ДВ Моргун. 2007. № 8. P. 126.
227. Некрутенко Ю.П. Дневные бабочки Кавказа. Определитель. Семейства Papilionidae, Pieridae, Satyridae, Danaidae // Киев Наукова думка.--215 с. 1990.
228. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I* / ed. Schulz S. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. Vol. 239.
229. Маслов А.Д., Комарова И.А., Матусевич Л.С. Сосновый походный шелкопряд в лесах национального парка “Куршская коса” // *Лесоведение. Федеральное*

- государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2009. № 4. P. 66–71.
230. Акулов Е.Н. Фитосанитарное состояние лесопродукции в Красноярском крае // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии.-СПб. 2009. P. 3.
231. Kirichenko N.I., Baranchikov Y.N., Vidal S. Performance of the potentially invasive Siberian moth *Dendrolimus superans sibiricus* on coniferous species in Europe // Agric. For. Entomol. Wiley Online Library, 2009. Vol. 11, № 3. P. 247–254.
232. Priesner E. et al. Identification and field evaluation of a sex pheromone of the European pine moth // Zeitschrift für Naturforsch. C. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 1984. Vol. 39, № 11–12. P. 1192–1195.
233. Klun J.A. et al. A sex attractant for the Siberian moth *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) // J. Entomol. Sci. Georgia Entomological Society, Inc., 2000. Vol. 35, № 2. P. 158–166.
234. Xiangbo K., Chenghua Z., Wei G. Identification of sex pheromones of four economically important species in genus *Dendrolimus* // Chinese Sci. Bull. Springer, 2001. Vol. 46, № 24. P. 2077–2081.
235. Kovalev B.G. et al. Identification of additional components of the sex pheromone of *Dendrolimus pini*//Chem. Nat. Compd. Springer, 1993. Vol. 29, №1. P. 135–136.
236. Баранчиков Ю.Н. et al. О внутривидовой и межвидовой химической коммуникации чешуекрылых на примере соснового коконопряда и сибирского шелкопряда (*Dendrolimus pini* L., *Dendrolimus superans sibiricus* Tschetv.(Lepidoptera, Lasiocampidae)) // Сенсорные системы. Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2007. Vol. 21, № 3. P. 246–250.
237. Гниненко Ю.И., Кавоси М.Р. Вспышка массового размножения непарного шелкопряда *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Erebidae) на севере Ирана // Лесохозяйственная информация. Федеральное бюджетное учреждение Всероссийский научно-исследовательский, 2016. № 2.
238. Aukema J.E. et al. Economic impacts of non-native forest insects in the continental

- United States // PLoS One. Public Library of Science San Francisco, USA, 2011. Vol. 6, № 9. P. e24587.
239. Thorpe K.W. et al. Effectiveness of gypsy moth mating disruption from aerial applications of plastic laminate flakes with and without a sticking agent // *Agric. For. Entomol.* Wiley Online Library, 2000. Vol. 2, № 3. P. 225–231.
240. Bierl B.A., Beroza M., Collier C.W. Potent sex attractant of the gypsy moth: its isolation, identification, and synthesis // *Science* (80- ). American Association for the Advancement of Science, 1970. Vol. 170, № 3953. P. 87–89.
241. Karsholt O., Razowski J. *The Lepidoptera of Europe: a distributional checklist.* Brill Academic Pub, 1996.
242. Симоненкова В.А., Осмирко А.А., Ионова Е.А. Особенности видового состава вредной энтомофауны городских насаждений // *Актуальные проблемы лесного комплекса.* ФГБОУ ВПО Брянский государственный инженерно-технологический университет, 2015. № 41.
243. Стриганова Б.Р., Захаров А.А. *Пятиязычный словарь названий животных: насекомые.* Руссо, 2000.
244. Chinery M., others. *Collins guide to the insects of Britain and Western Europe.* Collins, 1986.
245. Berndt L. et al. Biology and rearing of *Pseudocoremia suavis*, an endemic looper (Lepidoptera: Geometridae) with a history of outbreaks on exotic conifers // *New Zeal. Entomol.* Taylor & Francis, 2004. Vol. 27, № 1. P. 73–82.
246. Цветков Е.В. Пяденицы Ставропольского края (Lepidoptera: Geometridae) // *Эверсманния.* Тульское отделение Русского энтомологического общества при РАН, 2010. № 23–24. P. 64–82.
247. Zhang Z.-Q. Phylum Arthropoda. In: Zhang, Z.-Q.(Ed.) *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013)* // *Zootaxa.* 2013. Vol. 3703, № 1. P. 17–26.
248. Данилевский М.Л., Мирошников А.И. *Жуки-дровосеки Кавказа* // *Определитель.* Краснодар Объед. изд во Краснодарск. Крайисполкома. 1985.
249. Шаблиовский В.В. *Жуки-дровосеки Приморского края* // *Автореф. дисс....*



- канд. сельскохозяйственных. 1950.
250. Tilden P.E. et al. Trapping the western pine beetle at and near a source of synthetic attractive pheromone Effects of trap size and position // *J. Chem. Ecol.* Springer, 1979. Vol. 5, № 4. P. 519–531.
251. Bakke A., Riege L. The pheromone of the spruce bark beetle *Ips typographus* and its potential use in the suppression of beetle populations. 1982.
252. Лебедева К.В., Вендило Н.В., Плетнев В.А. Феромоны вредных насекомых // *Защита и карантин растений*. Автономная некоммерческая организация Редакция журнала *Защита и карантин*..., 2006. № 4. P. 40–41.
253. Исаев А.С., Рожков А.С., Киселев В.В. Черный пихтовый усач *Monochamus urussovi* (Fisch.). Новосибирский филиал Федерального государственного унитарного предприятия..., 1988.
254. Rützler M., Zwiebel L.J. Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models // *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 2005. Vol. 191, № 9. P. 777–790.
255. Shostak S.L., Ebenstein W.L., Muentzer J.S. The dipole moment of water. I. Dipole moments and hyperfine properties of H<sub>2</sub>O and HDO in the ground and excited vibrational states // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics AIP, 1991. Vol. 94, № 9. P. 5875–5882.
256. Richerson J. V, Cameron E.A., Brown E.A. Sexual activity of the gypsy moth // *Am. Midl. Nat.* JSTOR, 1976. P. 299–312.
257. Richerson J. V. Pheromone-mediated behavior of the gypsy moth // *J. Chem. Ecol.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 1977. Vol. 3, № 3. P. 291–308.
258. Solari P. et al. Release mechanism of sex pheromone in the female gypsy moth *Lymantria dispar*: A morpho-functional approach // *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* Springer, 2007. Vol. 193, № 7. P. 775–785.
259. Hausmann A. *The Geometrid Moths of Europe: Sterrhinae*, Vol. 2. Apollo Books, Denmark, 600pp, 2004.

260. Твайделл, Джон - Возобновляемые источники энергии - Search RSL.
261. Plemenkov V. V. *Khimiya izoprenoidov (the chemistry of isoprenoids)* // Izd. Altais. Univer, Barnaul. 2007.
262. Храмцов Н.Н., Падий Н.Н. Вредители леса и борьба с ними.
263. Peng C., Bernhard Schlegel H. *Combining Synchronous Transit and Quasi-Newton Methods to Find Transition States* // *Isr. J. Chem.* John Wiley & Sons, Ltd, 1993. Vol. 33, № 4. P. 449–454.
264. Shimomura O., Johnson F.H. *Regeneration of the photoprotein aequorin* // *Nature*. 1975. Vol. 256, № 5514. P. 236–238.
265. Liu Z.-J. et al. *Atomic resolution structure of obelin: soaking with calcium enhances electron density of the second oxygen atom substituted at the C2-position of coelenterazine* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier, 2003. Vol. 311, № 2. P. 433–439.
266. Head J.F. et al. *The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution* // *Nature*. Nature Publishing Group, 2000. Vol. 405, № 6784. P. 372–376.
267. Prendergast F.G. *Bioluminescence illuminated* // *Nature*. 2000. Vol. 405, № 6784. P. 291–292.
268. Usami K., Isobe M. *Low-temperature photooxygenation of coelenterate luciferin analog synthesis and proof of 1,2-dioxetanone as luminescence intermediate* // *Tetrahedron*. Pergamon, 1996. Vol. 52, № 37. P. 12061–12090.
269. Лабас Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. *Свет и цвет живых организмов: Флуоресцирующие и цветные белки* // *Природа*. 2003. № 3. P. 33–43.
270. Berman H.M. et al. *The Protein Data Bank* // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 1. P. 235–242.
271. Campbell A.K. *Save those molecules! Molecular biodiversity and life\** // *J. Appl. Ecol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2003. Vol. 40, № 2. P. 193–203.
272. Johnson P.C. et al. *Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein aequorin. Comparison with Quin 2.* // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 1985. Vol. 260, № 4. P. 2069–2076.
273. Knight M.R. et al. *Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic*

- recombinant aequorins. // *J. Cell Biol.* 1993. Vol. 121, № 1. P. 83–90.
274. Rees J.F. et al. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. // *J. Exp. Biol.* 1998. Vol. 201, № 8. P. 1211–1221.
275. Rudolf R. et al. Looking forward to seeing calcium // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 4, № 7. P. 579–586.
276. Shimomura O. *Bioluminescence: chemical principles and methods.* World Scientific, 2012.
277. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein // *J. Microsc.* Blackwell Science Ltd Oxford, UK, 2005. Vol. 217, № 1. P. 3–15.
278. Nakai S. et al. Fundamental Studies on the Structures and Spectroscopic Properties of Imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one Derivatives // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* The Chemical Society of Japan, 2003. Vol. 76, № 12. P. 2361–2387.
279. Hori K. et al. Renilla Luciferin as the Substrate for Calcium Induced Photoprotein Bioluminescence, Assignment of Luciferin Tautomers in Aequorin and Mnemiopsin // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14, № 11. P. 2371–2376.
280. Mori K. et al. Real light emitter in the bioluminescence of the calcium-activated photoproteins aequorin and obelin: light emission from the singlet-excited state of coelenteramide phenolate anion in a contact ion pair // *Tetrahedron.* 2006. Vol. 62, № 26. P. 6272–6288.
281. Kondo H. et al. Substituent effects on the kinetics for the chemiluminescence reaction of 6-arylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (Cypridina luciferin analogues): support for the single electron transfer (SET)–oxygenation mechanism with triplet molecular oxygen // *Tetrahedron Lett.* Pergamon, 2005. Vol. 46, № 45. P. 7701–7704.
282. Goto T., Inoue S., Sugiura S. Cypridina bioluminescence IV. Synthesis and chemiluminescence of 3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one and its 2-methyl derivative // *Tetrahedron Lett.* 1968. Vol. 9, № 36. P. 3873–3876.
283. Shimomura O., Teranishi K. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine // *Luminescence.* 2000. Vol. 15. P. 58.

284. Vysotski E.S., Lee J. Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoproteins: Structural Insight into the Bioluminescence Mechanism // *Acc. Chem. Res.* 2004. Vol. 37, № 6. P. 405–415.
285. Liu Z.-J. et al. Crystal structure of obelin after Ca<sup>2+</sup>-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2006. Vol. 103, № 8. P. 2570–2575.
286. McCapra F., Chang Y.C. Chemiluminescence of a Cypridina luciferin analogue // *Chem. Commun.* 1967. Vol. 19. P. 1012.
287. Лабзовский Л.Н. Влияние электронной корреляции на реакционную способность сопряженных молекул., 1968.
288. Vysotski E.S. et al. Violet bioluminescence and fast kinetics from W92F obelin: structure-based proposals for the bioluminescence triggering and the identification of the emitting species // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42. P. 6024.
289. Vysotski E.S., Lee J. Bioluminescent mechanism of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins from three-dimensional structures/Luciferases *Fluoresc. proteins Princ. Adv. Biotechnol. bioimaging. Transworld Research Network Kerala, India*, 2007. p.19-41.
290. Liu Z.-J. et al. Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure // *Protein Sci. Wiley*, 2000. Vol. 9, № 11. P. 2085–2093.
291. Min C.G. et al. The fluorescent properties of coelenteramide, a substrate of aequorin and obelin *J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier*, 2013. Vol. 251. p.182-188
292. Chen S.F., Ferré N., Liu Y.J. QM/MM study on the light emitters of aequorin chemiluminescence, bioluminescence, and fluorescence: A general understanding of the bioluminescence of several marine organisms // *Chem. - A Eur. J.* 2013. Vol. 19, № 26. P. 8466–8472.
293. Chen S.F. et al. Chemiluminescence of coelenterazine and fluorescence of coelenteramide: A systematic theoretical study // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8, № 8. P. 2796–2807.
294. Li Z.S. et al. The effect of micro-environment on luminescence of aequorin: The role of amino acids and explicit water molecules on spectroscopic properties of coelenteramide // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2013. Vol. 127. P. 94–99.

295. Li Z.S. et al. The dynamics simulation and quantum calculation investigation about luminescence mechanism of coelenteramide // *Photochem. Photobiol.* 2013. Vol. 89, № 4. P. 849–855.
296. Tomilin F.N. et al. Fluorescence of calcium-discharged obelin: The structure and molecular mechanism of emitter formation // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008. Vol. 422, № 1.
297. Shimomura O., Johnson F.H. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975. Vol. 72, № 4. P. 1546–1549.
298. Frank L.A. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters // *Sensors. Molecular Diversity Preservation International*, 2010. Vol. 10, № 12. P. 11287–11300.
299. Krasitskaya V. V et al. Bioluminescent reporters for identification of gene allelic variants // *Russ. J. Bioorganic Chem. Springer*, 2012. Vol. 38, № 3. P. 298–305.
300. Vysotski E.S., Bondar V.S., Letunov V.N. Extraction and purification of obelin, the Ca<sup>2+</sup>-dependent photoprotein from the hydroid *Obelia longissima* // *Biokhimiya*. 1989. Vol. 54. P. 965–973.
301. Vysotski E.S., Markova S. V, Frank L.A. Calcium-regulated photoproteins of marine coelenterates // *Mol. Biol.* 2006. Vol. 40, № 3. P. 355–367.
302. Ereemeeva E. V et al. Oxygen activation of apo-obelin-coelenterazine complex // *Chembiochem.* 2013. Vol. 14, № 6. P. 739–745.
303. Natashin P. V et al. Structures of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin Y138F mutant before and after bioluminescence support the catalytic function of a water molecule in the reaction // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2014. Vol. 70, № 3. P. 720–732.
304. Ereemeeva E. V. et al. Role of key residues of obelin in coelenterazine binding and conversion into 2-hydroperoxy adduct // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2013. Vol. 127. P. 133–139.
305. Malikova N.P. et al. Spectral tuning of obelin bioluminescence by mutations of Trp92 // *FEBS Lett.* 2003. Vol. 554. P. 188.
306. Belogurova N. V., Alieva R.R., Kudryasheva N.S. Activity of upper electron-

- excited states in bioluminescence of coelenterates // *J. Mol. Struct.* 2009. Vol. 924–926, № C. P. 148–152.
307. Nemtseva E.V., Kudryasheva N.S. The mechanism of electronic excitation in the bacterial bioluminescent reaction // *Russ. Chem. Rev.* IOP Publishing, 2007. Vol. 76, № 1. P. 91.
308. Van Oort B. et al. Picosecond fluorescence relaxation spectroscopy of the calcium-discharged photoproteins aequorin and obelin // *Biochemistry.* 2009. Vol. 48, № 44. P. 10486–10491.
309. Belogurova N. V. et al. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2008. Vol. 92, № 2. P. 117–122.
310. Belogurova N. V., Kudryasheva N.S. Discharged photoprotein obelin: Fluorescence peculiarities // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2010. Vol. 101, № 1. P. 103–108.
311. Alieva R.R. et al. Fluorescence properties of Ca<sup>2+</sup>-independent discharged obelin and its application prospects // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. Vol. 405, № 10. P. 3351–3358.
312. Alieva R.R. et al. Effects of alcohols on fluorescence intensity and color of a discharged-obelin-based biomarker // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer Verlag, 2014. Vol. 406, № 12. P. 2965–2974.
313. Petrova A.S. et al. Variation of Spectral Characteristics of Coelenteramide-Containing Fluorescent Protein from *Obelia Longissima* Exposed to Dimethyl Sulfoxide // *Russ. Phys. J.* 2016. Vol. 59, № 4. P. 562–567.
314. Saito R. et al. Solvent and substituent effects on the fluorescent properties of coelenteramide analogues // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* The Royal Society of Chemistry, 1997. № 9. P. 1711–1716.
315. Shimomura O., Johnson F.H. Structure of the light-emitting moiety of aequorin // *Biochemistry.* 2002. Vol. 11, № 9. P. 1602–1608.
316. Cormier M.J. et al. Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates // *J. Cell. Physiol.* 1973. Vol. 81, № 2. P. 291–297.
317. Fourrage C. et al. An endogenous green fluorescent protein–photoprotein pair in

- Clytia hemisphaerica* eggs shows co-targeting to mitochondria and efficient bioluminescence energy transfer // *Open Biol. The Royal Society*, 2014. Vol. 4, № 4. P. 130206.
318. Ohmiya Y., Hirano T. Shining the light: The mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins // *Chem. Biol. Elsevier Ltd*, 1996. Vol. 3, № 5. P. 337–347.
319. Kawasaki H., Nakayama S., Kretsinger R.H. Classification and evolution of EF-hand proteins // *Biometals. Springer*, 1998. Vol. 11, № 4. P. 277–295.
320. Liu Z.-J. et al. Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure // *Protein Sci. Cambridge University Press*, 2000. Vol. 9, № 11. P. 2085–2093.
321. Titushin M.S. et al. NMR-derived topology of a GFP-photoprotein energy transfer complex // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2010. Vol. 285, № 52. P. 40891–40900.
322. Deng L. et al. Crystal structure of a Ca<sup>2+</sup>-discharged photoprotein: implications for mechanisms of the calcium trigger and bioluminescence // *J. Biol. Chem. ASBMB*, 2004. Vol. 279, № 32. P. 33647–33652.
323. Ereemeeva E. V et al. Oxygen activation of apoobelin-coelenterazine complex // *ChemBioChem*. 2013. Vol. 14.
324. Anctil M., Shimomura O. Mechanism of photoinactivation and reactivation in the bioluminescence system of the ctenophore *Mnemiopsis*/Biochemistry. 1984. Vol. 23. P. 221.
325. Crick F. Central Dogma of Molecular Biology/Nature.1970.Vol.227,№5258.p. 563
326. Алимova Ф.К., Невзорова Т.А. Обмен нуклеиновых кислот.
327. Кухта В.К., Морозкина Т.Е., Олецкий З.И. Биологическая химия: учебник // Минск Асар. 2008. P. 131–193.
328. Кульбачинский А.В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням // *Успехи биологической химии*. 2006. Vol. 46. P. 193–224.
329. Shangguan D. et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. Vol. 103, № 32.
330. Sampson T. Aptamers and SELEX: the technology // *World Pat. Inf. Pergamon*,

2003. Vol. 25, № 2. P. 123–129.
331. Bock L.C. et al. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin // *Nature*. 1992. Vol. 355, № 6360. P. 564–566.
332. Shimada T. et al. Systematic search for the Cra-binding promoters using genomic SELEX system // *Genes to Cells*. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 10, № 9. P. 907–918.
333. White R. et al. Generation of Species Cross-reactive Aptamers Using “Toggle” SELEX // *Mol. Ther.* 2001. Vol. 4, № 6. P. 567–573.
334. Klug S.J., Famulok M. All you wanted to know about SELEX // *Mol. Biol. Rep.* Springer, 1994. Vol. 20, № 2. P. 97–107.
335. Djordjevic M. SELEX experiments: New prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways // *Biomol. Eng.* Elsevier, 2007. Vol. 24, № 2. P. 179–189.
336. Winfree E. et al. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals // *Nature*. 1998. Vol. 394, № 6693. P. 539–544.
337. Douglas S.M. et al. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes // *Nature*. 2009. Vol. 459, № 7245. P. 414–418.
338. Nagarkatti R. et al. Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. Public Library of Science San Francisco, USA, 2012.
339. Dhivya R. et al. RNA Aptamers Directed to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Bind to the Matrix and Nucleocapsid Domains and Inhibit Virus Production // *J. Virol.* American Society for Microbiology, 2011. Vol. 85, № 1. P. 305–314.
340. Debbage P. Targeted drugs and nanomedicine: present and future // *Curr. Pharm. Des.* Bentham Science Publishers, 2009. Vol. 15, № 2. P. 153–172.
341. Heppell B., Lafontaine D.A. Folding of the SAM aptamer is determined by the formation of a K-turn-dependent pseudoknot // *Biochemistry*. ACS Publications, 2008. Vol. 47, № 6. P. 1490–1499.
342. Patel D.J. Structural analysis of nucleic acid aptamers // *Curr. Opin. Chem. Biol.*



- Elsevier, 1997. Vol. 1, № 1. P. 32–46.
343. Keniry M.A. Quadruplex structures in nucleic acids // *Biopolym. Orig. Res. Biomol.* Wiley Online Library, 2000. Vol. 56, № 3. P. 123–146.
344. Nagatoishi S., Tanaka Y., Tsumoto K. Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier, 2007. Vol. 352, № 3. P. 812–817.
345. Rambo R.P., Tainer J.A. Super-resolution in solution x-ray scattering and its applications to structural systems biology // *Annu. Rev. Biophys.* 2013. Vol. 42, № 1. P. 415–441.
346. Hammel M. Validation of macromolecular flexibility in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS) // *European Biophysics Journal.* Springer, 2012. Vol. 41, № 10. P. 789–799.
347. Orlova E. V, Saibil H.R. Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy // *Chem. Rev. American Chemical Society*, 2011. Vol. 111, № 12. P. 7710–7748.
348. Mascini M., Palchetti I., Tombelli S. Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects // *Angew. Chemie Int. Ed.* John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 51, № 6. P. 1316–1332.
349. Thomas H., J. P.D. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers // *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science, 2000. Vol. 287, № 5454. P. 820–825.
350. Labib M. et al. Aptamer-Based Impedimetric Sensor for Bacterial Typing // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2012. Vol. 84, № 19. P. 8114–8117.
351. Labib M. et al. Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2012. Vol. 84, № 21. P. 8966–8969.
352. Liu J., Cao Z., Lu Y. Functional Nucleic Acid Sensors // *Chem. Rev. American Chemical Society*, 2009. Vol. 109, № 5. P. 1948–1998.
353. Pang X. et al. Bioapplications of Cell-SELEX-Generated Aptamers in Cancer Diagnostics, Therapeutics, Theranostics and Biomarker Discovery: A

- Comprehensive Review // *Cancers* . 2018. Vol. 10, № 2.
354. Zhang J. et al. Aptamer-conjugated gold nanoparticles for bioanalysis // *Nanomedicine. Future Medicine*, 2013. Vol. 8, № 6. P. 983–993.
355. Zhou W. et al. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics // *Analyst*. The Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 139, № 11. P. 2627–2640.
356. Zimbres F.M. et al. Aptamers: Novel Molecules as Diagnostic Markers in Bacterial and Viral Infections? // *Biomed Res. Int.* / ed. Mishra S. Hindawi Publishing Corporation, 2013. Vol. 2013. P. 731516.
357. Keefe A.D., Pai S., Ellington A. Aptamers as therapeutics // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. Vol. 9, № 7. P. 537–550.
358. Kruspe S. et al. Aptamers as Drug Delivery Vehicles // *ChemMedChem*. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 9, № 9. P. 1998–2011.
359. Sun H. et al. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy // *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 2014. Vol. 3. P. e182.
360. Adrian M., Heddi B., Phan A.T. NMR spectroscopy of G-quadruplexes // *Methods*. Academic Press, 2012. Vol. 57, № 1. P. 11–24.
361. Mao X.A., Marky L.A., Gmeiner W.H. Nmr structure of the thrombin-binding dna aptamer stabilized by sr<sup>2+</sup> // *J. Biomol. Struct. Dyn.* Taylor & Francis Group, 2004. Vol. 22, № 1. P. 25–33.
362. Van Buuren B.N.M. et al. NMR Spectroscopic Determination of the Solution Structure of a Branched Nucleic Acid from Residual Dipolar Couplings by Using Isotopically Labeled Nucleotides // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2003. Vol. 43, № 2. P. 187–192.
363. Van Der Werf R.M., Tessari M., Wijmenga S.S. Nucleic acid helix structure determination from NMR proton chemical shifts // *J. Biomol. NMR*. 2013. Vol. 56, № 2. P. 95–112.
364. Hammel M. Validation of macromolecular flexibility in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS) // *Eur. Biophys. J.* 2012. Vol. 41, № 10. P. 789–799.
365. Viéville J.M.P. et al. Duplex formation and secondary structure of PNA observed by NMR and CD // *Biophys. Chem.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 210. P. 9–13.

366. Preus S., Wilhelmsson L.M. *Advances in Quantitative FRET-Based Methods for Studying Nucleic Acids // ChemBioChem*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 13, № 14. P. 1990–2001.
367. Bai X. et al. Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 49. P. 20012 LP – 20017.
368. Martin T.G. et al. Design of a molecular support for cryo-EM structure determination // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2016. Vol. 113, № 47. P. E7456–E7463.
369. Ruigrok V.J.B. et al. Characterization of aptamer-protein complexes by x-ray crystallography and alternative approaches // *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 2012. Vol. 13, № 8. P. 10537–10552.
370. Bood M. et al. Fluorescent nucleobase analogues for base–base FRET in nucleic acids: synthesis, photophysics and applications // *Beilstein J. Org. Chem.* 2018. Vol. 14. P. 114–129.
371. Paramasivan S., Rujan I., Bolton P.H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding // *Methods*. 2007. Vol. 43, № 4. P. 324–331.
372. Jeffries C.M. et al. Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-Angle X-ray and neutron-scattering experiments // *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 11, № 11. P. 2122–2153.
373. Svergun D., Barberato C., Koch M.H. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 1995. Vol. 28, № 6. P. 768–773.
374. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 13. P. 3406–3415.
375. Ikebukuro K. et al. A novel method of screening thrombin-inhibiting DNA aptamers using an evolution-mimicking algorithm // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 12. P. e108–e108.
376. Padmanabhan K., Tulinsky A. An Ambiguous Structure of a DNA 15-mer

- Thrombin Complex // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 1996. Vol. 52, № 2. P. 272–282.
377. Russo Krauss I. et al. Thrombin–aptamer recognition: a revealed ambiguity // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 17. P. 7858–7867.
378. Russo Krauss I. et al. High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 16. P. 8119–8128.
379. Spiridonova V.A. et al. A family of DNA aptamers with varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin // *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 589, № 16. P. 2043–2049.
380. Gordon M.S. et al. Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2012. Vol. 112, № 1. P. 632–672.
381. Fedorov D.G. The fragment molecular orbital method: theoretical development, implementation in GAMESS, and applications // *WIREs Comput. Mol. Sci.* Blackwell Publishing Inc., 2017. Vol. 7, № 6.
382. Gaus M., Cui Q., Elstner M. Density functional tight binding: application to organic and biological molecules // *WIREs Comput. Mol. Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 4, № 1. P. 49–61.
383. Gaus M., Goez A., Elstner M. Parametrization and Benchmark of DFTB3 for Organic Molecules // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 9, № 1. P. 338–354.
384. Yang J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction // *Nat. Methods.* 2015. Vol. 12, № 1. P. 7–8.
385. Forte E. et al. Radiolabeled PET/MRI Nanoparticles for Tumor Imaging // *Journal of Clinical Medicine.* 2020. Vol. 9, № 1.
386. van Dongen G.A.M.S. et al. Immuno-PET: A Navigator in Monoclonal Antibody Development and Applications // *Oncologist.* 2007. Vol. 12, № 12. P. 1379–1389.
387. van Dongen G.A.M.S., Poot A.J., Vugts D.J. PET imaging with radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors: immuno-PET and TKI-PET // *Tumor Biol.* 2012. Vol. 33, № 3. P. 607–615.

388. Niu G. et al. In Vivo Labeling of Serum Albumin for PET // J. Nucl. Med. 2014. Vol. 55, № 7. P. 1150 LP – 1156.
389. Thorneloe K.S. et al. The biodistribution and clearance of AlbuAb, a novel biopharmaceutical medicine platform, assessed via PET imaging in humans // EJNMMI Res. 2019. Vol. 9, № 1. P. 45.
390. Goldberg H.L. et al. Exercise left ventriculography utilizing intravenous digital angiography // J. Am. Coll. Cardiol. 1983. Vol. 2, № 6. P. 1092–1098.
391. Yoon S., Rossi J.J. Targeted Molecular Imaging Using Aptamers in Cancer // Pharmaceuticals. 2018. Vol. 11, № 3.
392. Kryza D. et al. Ex Vivo and In Vivo Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas // PLoS One. Public Library of Science, 2016. Vol. 11, № 2. P. e0149387.
393. Li J. et al. Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: Preliminary assessment in lung cancer // Nucl. Med. Biol. 2014. Vol. 41, № 2. P. 179–185.
394. Zhu G. et al. Combinatorial Screening of DNA Aptamers for Molecular Imaging of HER2 in Cancer // Bioconjug. Chem. American Chemical Society, 2017. Vol. 28, № 4. P. 1068–1075.
395. Ozerskaya A. V et al. <sup>11</sup>C-radiolabeled aptamer for imaging of tumors and metastases using positron emission tomography- computed tomography // Mol. Ther. - Nucleic Acids. 2021. Vol. 26. P. 1159–1172.
396. Kolovskaya O.S. et al. DNA-aptamer/protein interaction as a cause of apoptosis and arrest of proliferation in Ehrlich ascites adenocarcinoma cells // Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2014. Vol. 8, № 1. P. 60–72.
397. Belyanina I. V et al. *In Vivo* Cancer Cells Elimination Guided by Aptamer-Functionalized Gold-Coated Magnetic Nanoparticles and Controlled with Low Frequency Alternating Magnetic Field // Theranostics. Ivyspring International Publisher, 2017. Vol. 7, № 13. P. 3326–3337.
398. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT.
399. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis // Coronaviruses: Methods and Protocols. Springer New York, 2015.

- Vol. 1282. P. 1–23.
400. Ahmed S.F., Quadeer A.A., McKay M.R. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies // *Viruses*. MDPI AG, 2020. Vol. 12, № 3. P. 254.
  401. Tai W. et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine // *Cell. Mol. Immunol.* Springer Nature, 2020. Vol. 17, № 6. P. 613–620.
  402. Ou X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV // *Nat. Commun.* Nature Research, 2020. Vol. 11, № 1. P. 1620.
  403. Wrapp D. et al. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. // *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2020.
  404. Ellington A.D., Szostak J.W. No Title // *Nature*. 1990. Vol. 346, № null. P. 818.
  405. Tuerk C., Gold L. No Title // *Science* (80-. ). 1990. Vol. 249, № null. P. 505.
  406. Nimjee S.M., Rusconi C.P., Sullenger B.A. Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics // *Annu. Rev. Med.* Annual Reviews, 2005. Vol. 56, № 1. P. 555–583.
  407. Kinghorn A.B. et al. Aptamer bioinformatics // *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 2017. Vol. 18, № 12.
  408. Nguyen V.-T. et al. Aptamer-aptamer linkage based aptasensor for highly enhanced detection of small molecules // *Biotechnol. J.* Wiley-VCH Verlag, 2016. Vol. 11, № 6. P. 843–849.
  409. Blind M., Blank M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 4, № 1. P. e223.
  410. Sefah K. et al. No Title // *Nat. Protoc.* 2010. Vol. 5. P. 1169.
  411. Gao S. et al. Post-SELEX optimization of aptamers // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer Verlag, 2016. Vol. 408, № 17. P. 4567–4573.
  412. Yüce M., Ullah N., Budak H. Trends in aptamer selection methods and applications // *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 140, № 16. P. 5379–5399.

413. Kalra P. et al. Simple methods and rational design for enhancing aptamer sensitivity and specificity // *Front. Mol. Biosci.* Frontiers Media S.A., 2018. Vol. 5, № MAY. P. 41.
414. Ashrafuzzaman M. et al. A Computationally Designed DNA Aptamer Template with Specific Binding to Phosphatidylserine // *Nucleic Acid Ther.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2013. Vol. 23, № 6. P. 418–426.
415. Shcherbinin D.S. et al. Computer-aided design of aptamers for cytochrome p450 // *J. Struct. Biol.* Academic Press Inc., 2015. Vol. 191, № 2. P. 112–119.
416. Belinskaia D.A. et al. Rational in silico design of aptamers for organophosphates based on the example of paraoxon // *Comput. Biol. Chem.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 80. P. 452–462.
417. Bell D.R. et al. In silico design and validation of high-affinity RNA aptamers targeting epithelial cellular adhesion molecule dimers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2020. Vol. 117, № 15. P. 8486–8493.
418. Soon S., Nordin N.A. In silico predictions and optimization of aptamers against streptococcus agalactiae surface protein using computational docking // *Materials Today: Proceedings.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 16. P. 2096–2100.
419. Ahirwar R. et al. In silico selection of an aptamer to estrogen receptor alpha using computational docking employing estrogen response elements as aptamer-alike molecules // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № 1. P. 1–11.
420. Gong Z. et al. Role of ligand binding in structural organization of add a-riboswitch aptamer: A molecular dynamics simulation // *J. Biomol. Struct. Dyn.* Taylor & Francis Group, 2011. Vol. 29, № 2. P. 403–416.
421. Rhinehardt K.L., Srinivas G., Mohan R. V. Molecular dynamics simulation analysis of anti-MUC1 aptamer and mucin 1 peptide binding // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2015. Vol. 119, № 22. P. 6571–6583.
422. Biniuri Y., Albada B., Willner I. Probing ATP/ATP-Aptamer or ATP-Aptamer Mutant Complexes by Microscale Thermophoresis and Molecular Dynamics Simulations: Discovery of an ATP-Aptamer Sequence of Superior Binding

- Properties // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2018. Vol. 122, № 39. P. 9102–9109.
423. Jeevanandam J. et al. Advancing Aptamers as Molecular Probes for Cancer Theranostic Applications—The Role of Molecular Dynamics Simulation // *Biotechnology Journal. Wiley-VCH Verlag*, 2020. Vol. 15, № 3.
424. Alexeev Y. et al. GAMESS As a Free Quantum-Mechanical Platform for Drug Research // *Curr. Top. Med. Chem. Bentham Science Publishers Ltd.*, 2012. Vol. 12, № 18. P. 2013–2033.
425. Yan Y. et al. The HDOCK server for integrated protein–protein docking // *Nat. Protoc. Nature Research*, 2020. Vol. 15, № 5. P. 1829–1852.
426. Gapsys V., De Groot B.L. Alchemical Free Energy Calculations for Nucleotide Mutations in Protein-DNA Complexes // *J. Chem. Theory Comput. American Chemical Society*, 2017. Vol. 13, № 12. P. 6275–6289.
427. Śledź P., Caflisch A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics // *Curr. Opin. Struct. Biol. Elsevier*, 2018. Vol. 48. P. 93–102.
428. Chen Y. et al. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 525, № 1. P. 135–140.
429. Lan J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor // *Nature. Nature Research*, 2020. Vol. 581, № 7807. P. 215–220.
430. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding // *Lancet*. 2020. Vol. 395. P. 565–574.
431. Kondo J., Westhof E. Classification of pseudo pairs between nucleotide bases and amino acids by analysis of nucleotide-protein complexes // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 2011. Vol. 39, № 19. P. 8628–8637.
432. Hoffman M.M. et al. AANT: The Amino Acid-Nucleotide Interaction Database // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 2004. Vol. 32, № DATABASE ISS. P. D174.
433. Gaus M. et al. Parameterization of DFTB3/3OB for sulfur and phosphorus for



- chemical and biological applications // *J. Chem. Theory Comput.* American Chemical Society, 2014. Vol. 10, № 4. P. 1518–1537.
434. Lejeune D. et al. Protein-nucleic acid recognition: Statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure // *Proteins Struct. Funct. Genet. Proteins*, 2005. Vol. 61, № 2. P. 258–271.
435. Savastano A. et al. Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London, 2020. Vol. 11, № 1. P. 6041.
436. Chen Z. et al. A DNA Aptamer Based Method for Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein // *Viol. Sin.* 2020. Vol. 35, № 3. P. 351–354.
437. Che X.-Y. et al. Nucleocapsid Protein as Early Diagnostic Marker for SARS // *Emerg. Infect. Dis. J.* 2004. Vol. 10, № 11. P. 1947.
438. Owczarzy R. et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № Web Server issue.
439. Boniecki M.J. et al. SimRNA: a coarse-grained method for RNA folding simulations and 3D structure prediction // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 7. P. e63–e63.
440. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* Elsevier Inc., 1996. Vol. 14, № 1. P. 33–38.
441. Jeddi I., Saiz L. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group UK London, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1178.
442. Abraham M.J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* Elsevier B.V., 2015. Vol. 1–2. P. 19–25.
443. Sankararaman S. et al. Active site prediction of phosphorylated SARS-CoV-2 N-Protein using molecular simulation // *Informatics Med. Unlocked.* Elsevier, 2022. Vol. 29. P. 100889.
444. Poolsup S. et al. Discovery of DNA aptamers targeting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and protein-binding epitopes for label-free COVID-19 diagnostics // *Mol.*

- Ther. - Nucleic Acids. 2023. Vol. 31. P. 731–743.
445. Babkin V.A. et al. Investigation of physicochemical properties of arabinogalactan of different larch species /Russ.J.Bioorganic Chem. 2016. Vol.42, №7. P. 707–711.
446. Willför S., Holmbom B. Isolation and characterisation of water soluble polysaccharides from Norway spruce and Scots pine // Wood Sci. Technol. 2004. Vol. 38, № 3. P. 173–179.
447. Nader H.B. et al. Heparins and Heparinoids: Occurrence, Structure and Mechanism of Antithrombotic and Hemorrhagic Activities // Current Pharmaceutical Design. 2004. Vol. 10, № 9. P. 951–966.
448. Desai U.R. New antithrombin-based anticoagulants // Med. Res. Rev. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. Vol. 24, № 2. P. 151–181.
449. Drozd N.N. et al. [Anticoagulant activity of sulfated polysaccharides] // Eksp. Klin. Farmakol. 2006. Vol. 69, № 6. P. 51–62.
450. Chaidedgumjorn A. et al. Effect of (1→3)- and (1→4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity // Carbohydr. Res. 2002. Vol. 337, № 10. P. 925–933.
451. Kuznetsov B.N. et al. The Raman Spectroscopy, XRD, SEM, and AFM Study of Arabinogalactan Sulfates Obtained Using Sulfamic Acid // Russ. J. Bioorganic Chem. 2017. Vol. 43, № 7. P. 722–726.
452. Vasilyeva N.Y. et al. Sulfation of Mechanically Activated Arabinogalactan by Complex Sulfuric Anhydride-Pyridine in Pyridine Medium // J. Sib. Fed. Univ. 2013. Vol. 6, № 2. P. 158–169.
453. Cole A.J., Yang V.C., David A.E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles // Trends Biotechnol. 2011. Vol. 29, № 7. P. 323–332.
454. Veiseh O., Gunn J.W., Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging // Adv. Drug Deliv. Rev. 2010. Vol. 62, № 3. P. 284–304.
455. Chu X., Yu J., Hou Y.-L. Surface modification of magnetic nanoparticles in biomedicine // Chinese Phys. B. IOP Publishing, 2015. Vol. 24, № 1. P. 14704.
456. Corot C. et al. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical

- imaging // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58, № 14. P. 1471–1504.
457. Angelakeris M. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern theranostics // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2017. Vol. 1861, №6. P. 1642–1651
458. Gobbo O.L. et al. Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2015. Vol. 5, № 11. P. 1249–1263.
459. Mosayebi J., Kiyasatfar M., Laurent S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications // *Adv. Healthc. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 6, № 23. P. 1700306.
460. Aleksandrova G.P. et al. Synthesis of nanosized particles with magnetic properties for biomedical purposes // *Phys. Mesomech.* 2004. Vol. 7. P. 139–142.
461. Feoktistova L.P. et al. Radiographic study of iron-containing arabinogalactan derivatives // *J. Appl. Chem.* 2002. Vol. 75. P. 1951–1954.
462. Aleksandrova G.P. et al. Magnetic Activity of Nanostructured Hybrid Composites // *Electron. J. Phase Transit. Ordered States New Mater.* 2009. Vol. 4. P. 1–2.
463. Kim D., Jeong Y.Y., Jon S. A Drug-Loaded Aptamer–Gold Nanoparticle Bioconjugate for Combined CT Imaging and Therapy of Prostate Cancer // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2010. Vol. 4, № 7. P. 3689–3696.
464. Engelberg S. et al. Cancer cell-selective, clathrin-mediated endocytosis of aptamer decorated nanoparticles // *Oncotarget*; Vol 9, No 30. 2018.
465. Nishimoto Y., Fedorov D.G. The fragment molecular orbital method combined with density-functional tight-binding and the polarizable continuum model // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, №32. P. 22047–22061
466. Fedorov D.G. Solvent Screening in Zwitterions Analyzed with the Fragment Molecular Orbital Method // *J. Chem. Theory Comput.* American Chemical Society, 2019. Vol. 15, № 10. P. 5404–5416.
467. Fedorov D.G., Kitaura K. Pair interaction energy decomposition analysis // *J. Comput. Chem.* Wiley Online Library, 2007. Vol. 28, № 1. P. 222–237.
468. Fedorov D.G., Kitaura K. Extending the Power of Quantum Chemistry to Large Systems with the Fragment Molecular Orbital Method // *J. Phys. Chem. A*. American Chemical Society, 2007. Vol. 111, № 30. P. 6904–6914.

469. Zamay T.N. et al. Nucleic Acid Aptamers Increase the Anticancer Efficiency and Reduce the Toxicity of Cisplatin-Arabinogalactan Conjugates In Vivo // *Nucleic Acid Ther.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2022. Vol. 32, № 6. P. 497–506.