

На правах рукописи



СЕРОВ НИКИТА ЮРЬЕВИЧ

**ТЕРМОДИНАМИКА ОБРАЗОВАНИЯ, СТРУКТУРА И
ГИДРАТАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ(II) С АМИНОКИСЛОТАМИ
И ОЛИГОПЕПТИДАМИ, КИНЕТИКА РЕАКЦИЙ ЗАМЕЩЕНИЯ И
СИНТЕЗА ОЛИГОПЕПТИДОВ**

02.00.01 – Неорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Казань — 2021

Работа выполнена на кафедре неорганической химии и в научно-исследовательской лаборатории координационных соединений отдела неорганической и координационной химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: **Штырлин Валерий Григорьевич,**
кандидат химических наук, старший научный сотрудник, доцент кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Официальные оппоненты: **Усачева Татьяна Рудольфовна,**
доктор химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», заведующая кафедрой общей химической технологии.

Зуева Екатерина Михайловна,
доктор химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», профессор кафедры неорганической химии имени Н.С. Ахметова.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва.

Защита диссертации состоится 14 октября 2021 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета КФУ.02.02 ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

E-mail: diss.sovet_kfu_02.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Сведения о защите, автореферат и диссертация размещены на официальных сайтах ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (<http://kpfu.ru>) и ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

М.П. Кутырева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема происхождения жизни является одной из центральных проблем современного естествознания. Ключевой вопрос возникновения жизни заключается в установлении происхождения гомохиральности природных объектов, т. е. исключительной энантиомерной однородности мономеров в составе пептидов и полисахаридов. Некоторые исследователи считают, что происхождение жизни и гомохиральности есть одно и то же событие. Попытка приблизить решение этих проблем и предпринята в настоящей работе.

Изучение термодинамики комплексообразования, кинетики реакций замещения, структуры и гидратации комплексов меди(II) важно не только для разработки проблемы специфичности и селективности процессов в живой природе, но и для понимания транспорта меди в живых организмах и функционирования медьсодержащих ферментов, что имеет большое практическое значение для разработки лекарственных средств на основе комплексов меди. Так, гетеролигандные комплексы меди(II) входят в состав композиций аминокислот с микроэлементами, которые обладают широким спектром биологической активности.

Степень разработанности темы исследования. Общепринятая концепция зарождения жизни подразумевает сложный и составной процесс, который происходил на Земле около 3.8 млрд. лет назад. Первоначальной стадией была химическая эволюция, в ходе которой неорганические вещества (газы атмосферы, вода) формировали простые органические соединения, такие как аминокислоты. Эти соединения вступали в различные реакции конденсации, в ходе которых появились биополимеры.

Особый интерес представляет проблема пептидного синтеза в пребиотических условиях, которая до сих пор остается нерешенной. Одним из руководящих принципов в этой области была гипотеза Бернала о том, что природные минералы (в частности, глины) могли инициировать образование пептидов благодаря своим каталитическим свойствам и способности адсорбировать биополимеры, препятствующей их гидролизу. Следует обратить внимание на то парадоксальное обстоятельство, что попытки проточного пептидного синтеза в пребиотических условиях до сих пор не принимались, хотя потоки различных соединений, включая круговороты веществ, являются наиболее распространенными явлениями в природе. Для ликвидации этого пробела и выполнено данное исследование.

В плане решения проблемы происхождения гомохиральности природных объектов важно отметить, что даже незначительная стереоселективность в отдельных стадиях многократно повторяющихся процессов полимеризации-деполимеризации с участием аминокислот в течение нескольких миллионов лет принципиально могла приводить к гомохиральности. На наш взгляд, решающую роль в происхождении гомохиральности – отборе энантиомеров одинаковой хиральности – могли сыграть процессы координации к аминокислотам и олигопептидам ионов металлов, сопровождающиеся слабыми межлигандными, внешнесферными взаимодействиями и сольватацией в процессах комплексообразования, которые широко распространены в биологических системах. Поэтому детальное исследование тонких стереоселективных эффектов в процессах комплексообразования и замещения лигандов в растворах аминокислот и олигопептидов с биометаллами, в первую очередь с медью(II), представляется задачей первостепенной важности, которая и поставлена в настоящей работе.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в проведении пребиотических синтезов олигопептидов в проточной системе и в изучении закономерностей и стереоселективных эффектов в процессах комплексообразования и замещения ли-

гандов с участием координационных соединений меди(II) с аминокислотами и олигопептидами. Для достижения цели работы необходимо решение следующих задач:

1. определение кинетических параметров образования олигопептидов в системах глицин – триметафосфат натрия, глицин – триметафосфат натрия – имидазол, глицин – *L*-тирозин – триметафосфат натрия и глицин – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – триметафосфат натрия в проточных условиях в термоциклическом режиме;
2. установление механизмов образования олигопептидов под действием триметафосфата натрия без участия и с участием имидазола;
3. определение термодинамических параметров комплексообразования, структуры и гидратации комплексов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин;
4. получение кинетических характеристик реакций замещения олигопептидных лигандов;
5. выявление и структурная интерпретация стереоселективных эффектов в процессах комплексообразования и замещения лигандов.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые:

1. Установлены кинетические зависимости концентраций интермедиатов и продуктов реакций пептидного синтеза в системах глицин – триметафосфат натрия, глицин – триметафосфат натрия – имидазол, глицин – *L*-тирозин – триметафосфат натрия и глицин – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – триметафосфат натрия в проточных условиях в термоциклическом режиме с помощью новой проточной системы, ВЭЖХ анализа и спектроскопии ЯМР ³¹P.
2. Путем моделирования кинетики пептидного синтеза по программе MAT DS оценены константы скорости реакций синтеза и деградации ди- и трипептидов в выбранных системах.
3. Установлены оптимальные условия наиболее эффективных синтезов ди- и трипептидов (рН, температура) в изученных системах в проточном термоциклическом режиме и показано, что по своей эффективности эти синтезы являются одними из наиболее эффективных среди описанных в литературе.
4. Модифицирован известный механизм пептидного синтеза в системах аминокислота – триметафосфат натрия, и с помощью квантово-химической оптимизации по программе GAMESS структур основных, переходных состояний и интермедиатов реакций выявлено хорошее соответствие рассчитанных активационных параметров реакций с экспериментальными.
5. Предложен новый механизм катализа имидазолом пептидного синтеза в системах аминокислота – триметафосфат натрия – имидазол и с помощью квантово-химической оптимизации переходного состояния с участием имидазола по программе GAMESS объяснен его каталитический эффект.
6. Выдвинута новая гипотеза о том, что при удлинении пептида N-имидазолил-О-аминоацилфосфаты играют в пребиотических системах выдающуюся роль, сходную с ролью аминокислотаденилатов, образующихся в присутствии АТФ и аминокислот-тРНК-синтетазы в реальных биосистемах, а предложенный новый механизм катализа отражает ключевой путь пребиотической эволюции в процессе пептидного синтеза.

7. С помощью методов квантовой химии и молекулярной динамики рассчитаны структуры и динамические характеристики сольватного обмена для гидратных оболочек, подтверждающие пентакоординацию меди(II) растворах.
8. Методами рН-метрического и СФ-метрического титрования с привлечением ЭПР определены термодинамические параметры комплексообразования и спектральные характеристики ряда комплексов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D*-гистидин.
9. Выявлены значимые стереоселективные эффекты в термодинамике образования ряда гетеролигандных комплексов в системах медь(II) – глицил-*L*-тирозин – *L/D*-гистидин и медь(II) – глицилглицил-*L*-тирозин – *L/D*-гистидин и дана их структурная интерпретация с учетом эффектов трансвлияния, межлигандного стэкинг-взаимодействия и *d*- π -взаимодействия металл-лиганд.
10. Методом остановленной струи определены кинетические характеристики реакций замещения лигандов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин.
11. Обнаружены значимые эффекты стереоселективности в кинетике реакций замещения лигандов в системах медь(II) – глицил-*L*-тирозин – *L/D*-гистидин, медь(II) – глицилглицилглицин – *L/DL*-гистидин и медь(II) – глицилглицил-*L*-тирозин – *L/D*-гистидин и дана их интерпретация.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы представляют ценность для развития неорганической, координационной, физической, бионеорганической и биоорганической химии, углубляя представления о роли фосфорных производных аминокислот, олигопептидов и имидазола в пептидных синтезах, а также о термодинамике образования, структуре, гидратации и кинетике реакций замещения лигандов из комплексов биометаллов с аминокислотами и олигопептидами. Установленные в работе оптимальные условия наиболее эффективных синтезов ди- и трипептидов (рН, температура) в проточном термоциклическом режиме до известной степени позволяют реконструировать пребиотические синтезы олигопептидов, что имеет не только теоретическую значимость для решения фундаментальной проблемы происхождения жизни, но и большое практическое значение для развития синтетической химии. Предложенный новый механизм катализа может отражать ключевой путь пребиотической эволюции в отношении пептидного синтеза. Выявленные в работе факторы стереоселективности образования комплексов меди(II) с энантиомерными олигопептидами и реакций их замещения на гистидин существенны как для решения фундаментальной проблемы происхождения гомохиральности природных объектов, так и для разработки методов направленного энантиоселективного синтеза с участием координационных соединений.

Методология и методы исследования. Основной методологический подход в работе заключался в комплексном использовании экспериментальных, расчетных и теоретических методов для детального описания термодинамики образования, структуры и гидратации комплексов меди(II) с олигопептидами, а также кинетики и механизмов реакций их замещения и синтеза. Полученные результаты анализировались на основе широкого привлечения литературных и собственных данных, накопленных в НИЛ координационных соединений КФУ. В работе были использованы такие экспериментальные приемы и методы, как проточные синтезы, ВЭЖХ анализ, ЯМР спектроскопия, рН-потенциометрия, спектрофотометрия, ЭПР спектроскопия и метод

остановленной струи. Для обработки результатов экспериментов широко использовался математический аппарат с применением компьютерного моделирования на основе литературных и собственных программ. Важное применение в работе нашли квантово-химические расчеты и расчеты методом МД для определения структуры и гидратации веществ и энергетических параметров основных и переходных состояний в исследуемых реакциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Кинетические зависимости концентраций интермедиатов и продуктов реакций пептидного синтеза в системах глицин – триметафосфат натрия, глицин – триметафосфат натрия – имидазол, глицин – *L*-тирозин – триметафосфат натрия и глицин – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – триметафосфат натрия в проточных условиях в термоциклическом режиме и их интерпретация.
2. Выявленные оптимальные условия наиболее эффективных синтезов ди- и трипептидов (рН, температура) в изученных системах в проточном термоциклическом режиме и результаты модельного расчета констант скорости реакций синтеза и деградации ди- и трипептидов.
3. Механизмы пептидного синтеза в системах аминокислота – триметафосфат натрия и аминокислота – триметафосфат натрия – имидазол, основанные на экспериментальных данных и квантово-химических расчетах структур основных, переходных состояний и интермедиатов реакций.
4. Гипотеза о том, что при удлинении пептида N-имидазолил-О-аминоацилфосфаты играют в пребиотических системах роль, сходную с ролью аминокислотаденилатов в биосистемах, так что предложенный новый механизм катализа отражает ключевой путь пребиотической эволюции в отношении пептидного синтеза.
5. Термодинамические параметры комплексообразования и спектральные характеристики комплексов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D*-гистидин, обнаруженные в них значимые стереоселективные эффекты и их структурная интерпретация.
6. Структурные и динамические характеристики гидратных оболочек, подтверждающие пентакоординацию меди(II) в растворах на основе результатов квантово-химических расчетов и моделирования методом МД.
7. Кинетические характеристики реакций замещения лигандов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин, выявленные в них значимые эффекты стереоселективности и их интерпретация.

Личный вклад автора состоит в исследовании экспериментальными методами кинетики и механизмов синтеза олигопептидов в пребиотических условиях, термодинамики комплексообразования и кинетики реакций замещения лигандов в растворах гомо- и гетеролигандных комплексов меди(II) с олигопептидами и гистидином, спектров поглощения и спектров ЭПР координационных соединений, математической обработке и моделировании экспериментальных данных, проведении квантово-химических расчетов, участии в анализе и обобщении полученных результатов.

Степень достоверности результатов. Развитые в работе методологические подходы, использованный комплекс химических, физических и математических методов, критический анализ результатов эксперимента и расчетов гарантировали получение высокоточной и достоверной информации об исследованных системах.

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в международных журналах, входящих в международные системы цитирования Scopus и Web of Science. Результаты диссертации докладывались и обсуждались на XXVI и XXVII Международных Чугаевских конференциях по координационной химии (Казань, 2014 г.; Нижний Новгород, 2017 г.), IX-XI, XIV и XV Всероссийских молодежных научно-инновационных школах «Математика и математическое моделирование» (Саров, 2015-2017, 2020 и 2021 гг.), VII Всероссийской молодежной школеконференции «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул» (Иваново, 2015 г.), международной конференции «EuropaCat XII. Catalysis: Balancing the use of fossil and renewable resources. European Congress on Catalysis» (Казань, 2015 г.), I Международной школеконференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015 г.), международной конференции «21st International Conference on Phosphorus Chemistry» (Казань, 2016 г.), XX и XXI Менделеевских съездах по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016 г.; Санкт-Петербург, 2019 г.) и Всероссийском кластере конференций по неорганической химии «InorgChem 2018» (Астрахань, 2018 г.).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 22 печатные работы, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, из перечня рекомендованных Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и 17 работ (статья и тезисы) по материалам всероссийских и международных конференций.

Объем и структура работы. Данная диссертационная работа изложена на 211 страницах, содержит 16 таблиц, 124 рисунка, 19 схем и 323 библиографических ссылки на работы российских и зарубежных авторов. Основными разделами диссертационной работы являются: введение, три главы (литературный обзор, экспериментальная часть, обсуждение результатов), заключение, библиографический список и приложение. На 36 страницах приложения приведены 39 рисунков, 8 таблиц и 1 схема.

В первой главе представлены литературные данные по пребиотическим синтезам пептидов из аминокислот с участием различных реагентов и рассмотрены механизмы образования пептидной связи в упомянутых системах. Затем представлены сведения о термодинамике комплексообразования и гидратации меди(II) с олигопептидами и аминокислотами, а также кинетике реакций замещения и обмена лигандов.

Во второй главе содержатся постановка задачи и методика эксперимента.

В третьей главе обсуждаются результаты работы. Первая часть посвящена кинетическим результатам образования олигопептидов в проточной системе по данным методов ВЭЖХ и ЯМР, а также механизмам пептидного синтеза с катализом и без катализа имидазолом с привлечением квантово-химических расчетов. Во второй части представлены результаты исследования гомо- и гетеролигандных комплексов меди(II) с олигопептидами по данным рН потенциометрии, СФ-метрии и ЭПР, сведения о структуре и гидратации комплексов из данных квантово-химических расчетов и моделирования методом молекулярной динамики, а также результаты исследования кинетики и механизмов реакций замещения лигандов методом остановленной струи.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Постановка задачи и методика эксперимента (Глава 2)

Проточные синтезы осуществлялись с помощью проточной системы ASIA-330 фирмы Syrris в циклическом режиме: после прохождения через трубчатый реактор

реакционная смесь возвращалась в резервуар, в котором с помощью автоматического титратора Basic Titrino 794 (Metrohm) поддерживалось нужное значение pH. Мониторинг за протеканием синтеза проводился с помощью ВЭЖХ системы Knauer Smartline методом ион-парной обращенно-фазовой хроматографии, а также по спектрам ЯМР ^1H и ^{31}P , зарегистрированным на спектрометре Bruker Avance III 400.

Титрования выполняли на автоматическом титраторе Titrando 907 (Metrohm) со стеклянными электродами Metrohm 6.0258.010 в условиях термостатирования с погрешностью ± 0.05 °C. Точность измерений pH была проверена в специальных экспериментах и составила в среднем ± 0.001 лог. ед. Этот же титратор использовался при проведении спектрофотометрических титрований. Регистрация электронных спектров поглощения осуществлялась на спектрофотометре Perkin-Elmer Lambda EZ-210 в специальной проточной кварцевой кювете, через которую прокачивался исследуемый раствор с помощью перистальтического насоса.

Константы протонирования лигандов, составы и константы образования комплексов определяли из зависимостей функции Бьеррума (n) и электронных спектров поглощения от pH при различных концентрациях металла (c_M) и лигандов (c_L) путем математического моделирования по программе STALABS.

Спектры ЭПР X-диапазона регистрировали на 3-см спектрометре Bruker ESP 300 с ВЧ-модуляцией частотой 100 кГц. Спектры ЭПР моделировали с помощью пакета программ EasySpin. Кинетику реакций замещения исследовали методом остановленной струи на спектрофотометре Varian Cary 50Bio с приставкой быстрого смешивания реагентов Rapid Mix RX2000 фирмы Applied Photophysics, термостатирование осуществлялось с помощью термостата Julabo F25HL.

Структуры изученных соединений были оптимизированы по программам GAMESS (US) и ORCA методом DFT на уровнях CAM-B3LYP/TZVP и PBE/TZVPP с учетом эффектов растворителя в модели C-PCM. Моделирование молекулярной динамики проводилось с использованием программного пакета GROMACS.

Кинетика и механизмы синтеза олигопептидов в проточной системе (Глава 3)

В проточных синтезах в системе глицин (Gly) – триметафосфат натрия – имидазол (1:1:1) было установлено образование значительных количеств глицилглицина (GlyGly) и глицилглицилглицина (GlyGlyGly). Кинетические зависимости для концентраций олигопептидов при различных температурах и значениях pH представлены на Рис. 1, из которого видно, что наиболее оптимальными условиями синтеза являются pH 9.5 и температура 75 °C.

Выполнены эксперименты в отсутствие имидазола (Im), а также несколько экспериментов в присутствии N-метилимидазола (MeIm). Кинетические зависимости для них даны на Рис. 2, из которого видно, что имидазол оказывает небольшое каталитическое действие на образование глицилглицина при pH 9.5 и существенное – при pH 10.5, в то время как положительное влияние имидазола на синтез глицилглицилглицина существенно для обоих значений pH. По сравнению с имидазолом, N-метилимидазол имеет меньшее влияние на образование олигопептидов.

Для прояснения механизма пептидного синтеза в исследованных системах была использована спектроскопия ЯМР ^{31}P . Установлено образование N-фосфатов глицина, N-фосфатов глицилглицина, N-фосфатов имидазола, циклического N,O-фосфорилглицина и N-имидазолил-O-глицилфосфата как интермедиатов в образовании пептидов. Кинетические зависимости для концентраций фосфорсодержащих частиц представлены на Рис. 3.

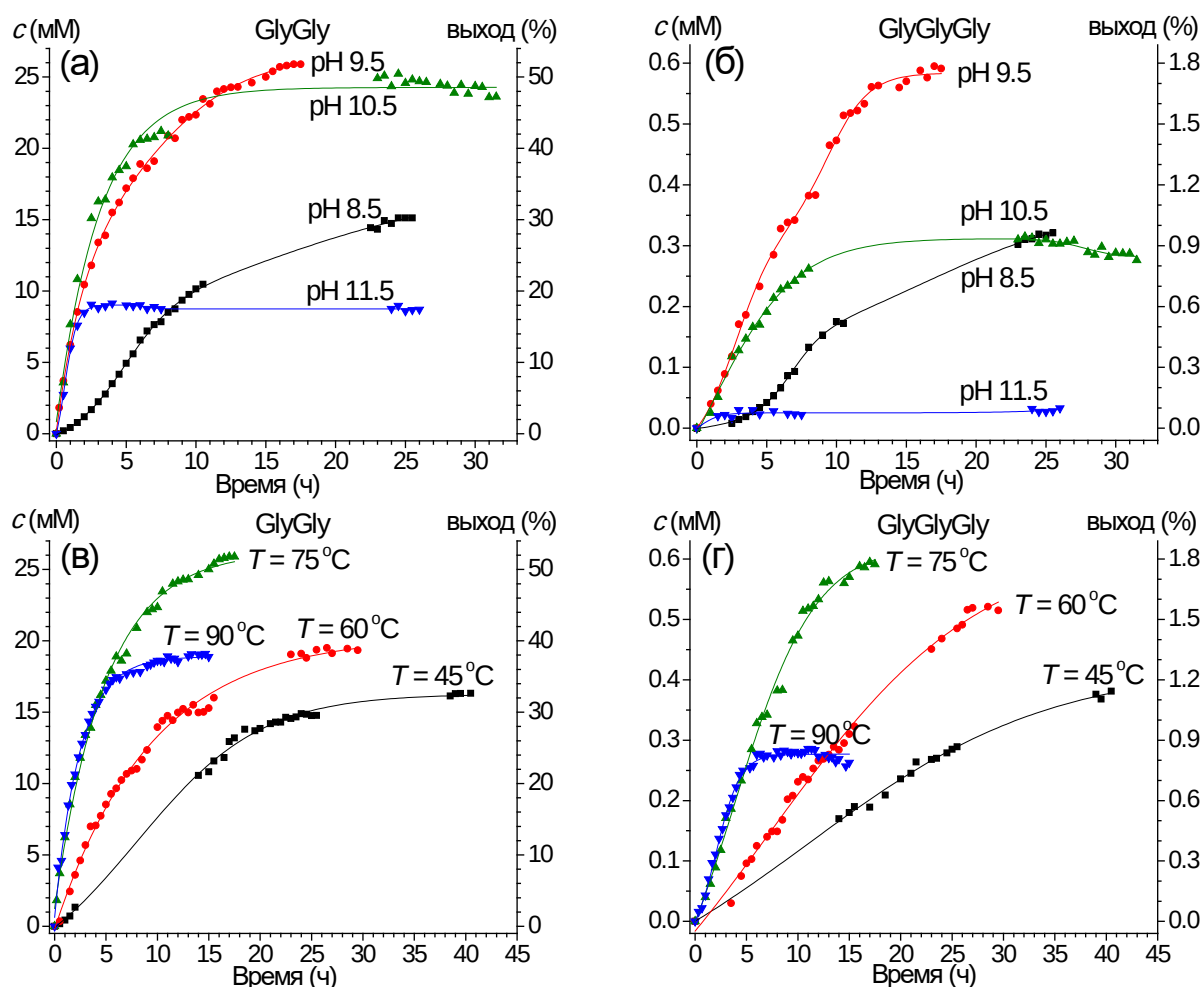


Рис. 1. Зависимости концентраций и выходов глицилглицина (а, в) и глицилглицилглицина (б, г) от времени в системе глицин – триметафосфат натрия – имидазол (1:1:1) в проточных условиях при 75°C и различных pH (а, б) и различных температурах и pH 9.5 (в, г) по данным ВЭЖХ-анализа; исходные концентрации $c_0 = 0.1\text{ M}$, время пребывания в реакторе $\tau_r = 16$ мин, общий объем смеси $V_t = 25$ мл, объем реактора $V_r = 16$ мл.

Для описания пептидного синтеза в отсутствие имидазола был модифицирован механизм Чанга с соавторами (Схема 1), энергетическая диаграмма для которого представлена на Рис. 4. Реакция глицина с триметафосфатом имеет наибольшую энергию активации (112.5 кДж/моль). Следующая стадия образования циклического N,O-фосфорилглицина также требует большого количества энергии (90.0 кДж/моль), в то время как третья стадия, на которой происходит образование пептидной связи, имеет меньшую энергию активации (64.8 кДж/моль). Последняя стадия – гидролиз N-фосфата глицилглицина с образованием дипептида имеет сравнительно большой барьер активации (82.0 кДж/моль). Последние стадии для синтеза трипептида обладают несколько более высокой энергией активации (78.0 и 87.2 кДж/моль соответственно), чем аналогичные стадии образования дипептида.

Для объяснения каталитической роли имидазола в пептидном синтезе был предложен новый механизм (Схема 2), согласно которому имидазол реагирует с циклическим N,O-фосфорилглицином с образованием N-имидазолил-O-глицилфосфата ($P_1\text{-(N)Im(O)Gly}$). Реакция этого соединения с глицином или глицилглицином приводит к образованию ди- или трипептида соответственно и N-фосфорилимидазола, гидролиз которого на последней стадии регенерирует имидазол.

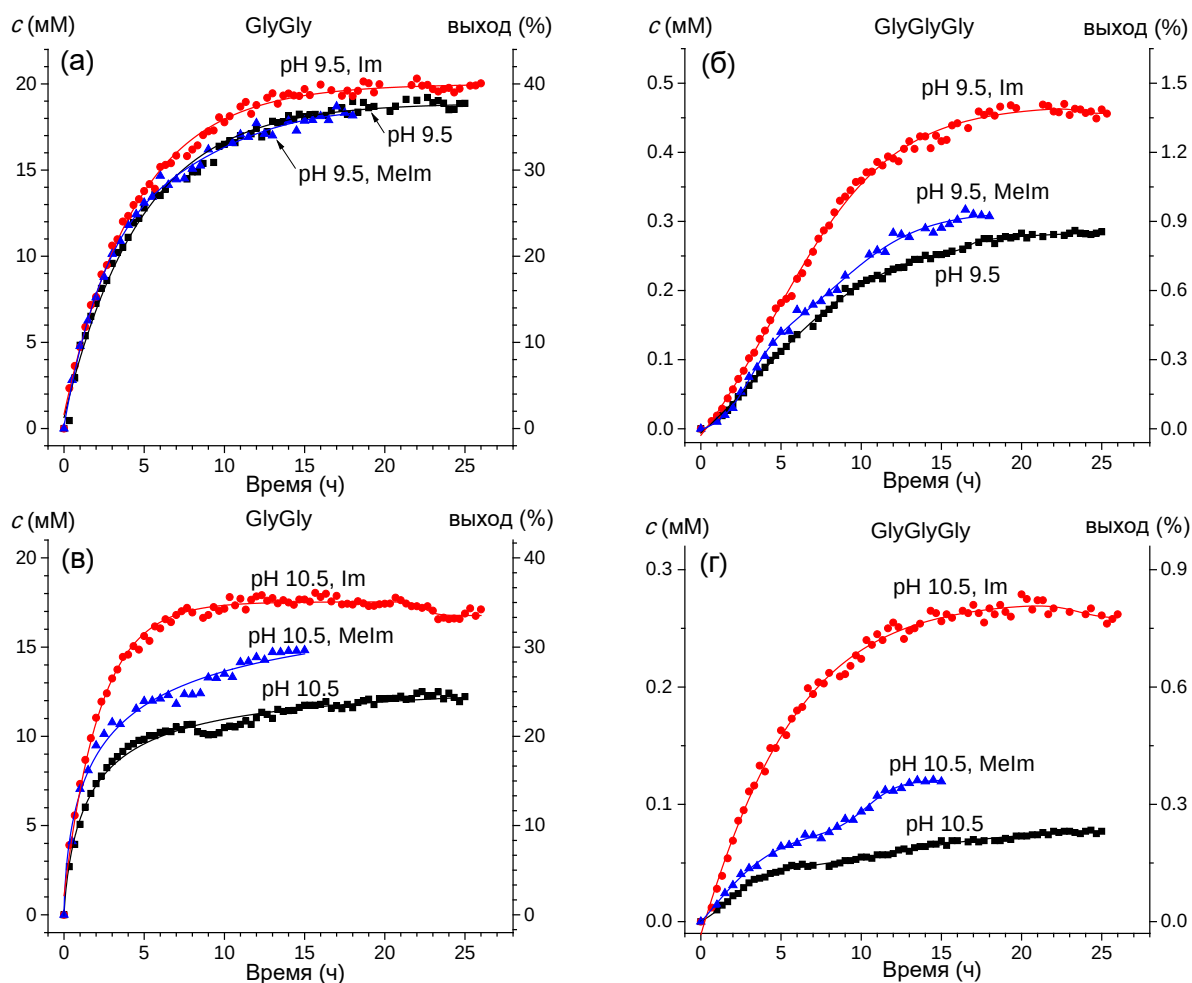


Рис. 2. Зависимости концентраций и выходов глицилглицина (а, в) и глицилглицилглицина (б, г) от времени в системах глицин – триметафосфат натрия (1:1), глицин – триметафосфат натрия – имидазол (1:1:1) и глицин – триметафосфат натрия – N-метиличидазол (1:1:1) в проточных условиях при pH 9.5 (а, б) и pH 10.5 (в, г) по данным ВЭЖХ-анализа; $T = 75^\circ\text{C}$, $c_0 = 0.1\text{ M}$, $\tau_r = 16\text{ мин}$, $V_t = 32\text{ мл}$, $V_r = 16\text{ мл}$.

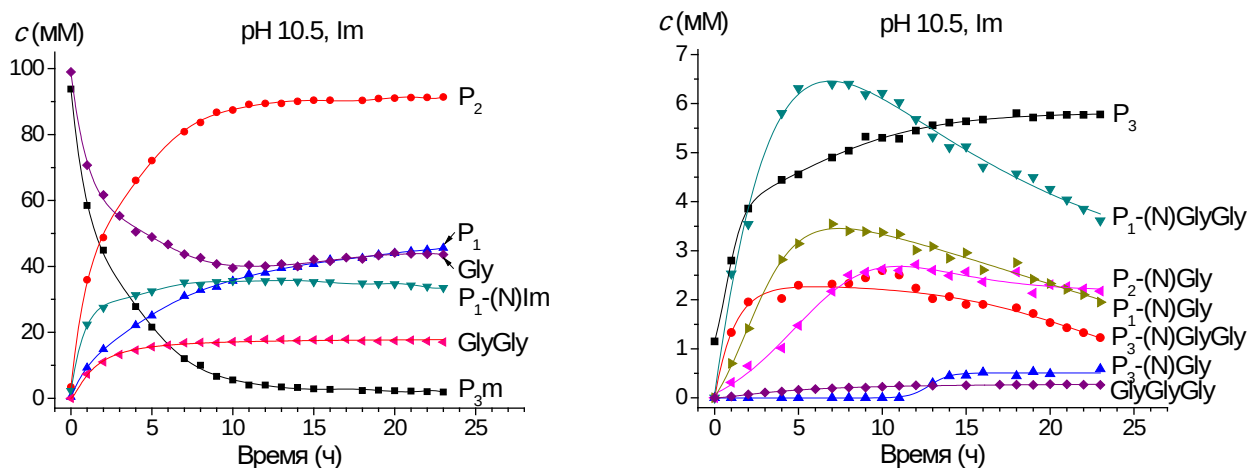


Рис. 3. Зависимости концентраций триметафосфата (P_{3m}), пирофосфата (P_2), ортофосфата (P_1), N-фосфорил имидазола ($P_1-(N)Im$), триполифосфата (P_3), N-дифосфорил глицина ($P_2-(N)Gly$), N-трифосфорил глицина ($P_3-(N)Gly$), N-фосфорил глицилглицина ($P_1-(N)GlyGly$) и N-трифосфорил глицилглицина ($P_3-(N)GlyGly$) от времени (данные ЯМР ^{31}P) в системе глицин – триметафосфат натрия – имидазол (1:1:1) в проточных условиях; $T = 75^\circ\text{C}$, pH 10.5, $c_0 = 0.1\text{ M}$, $\tau_r = 16\text{ мин}$, $V_t = 32\text{ мл}$, $V_r = 16\text{ мл}$. На рисунке также представлены зависимости для аминокислоты и олигопептидов (данные ВЭЖХ).

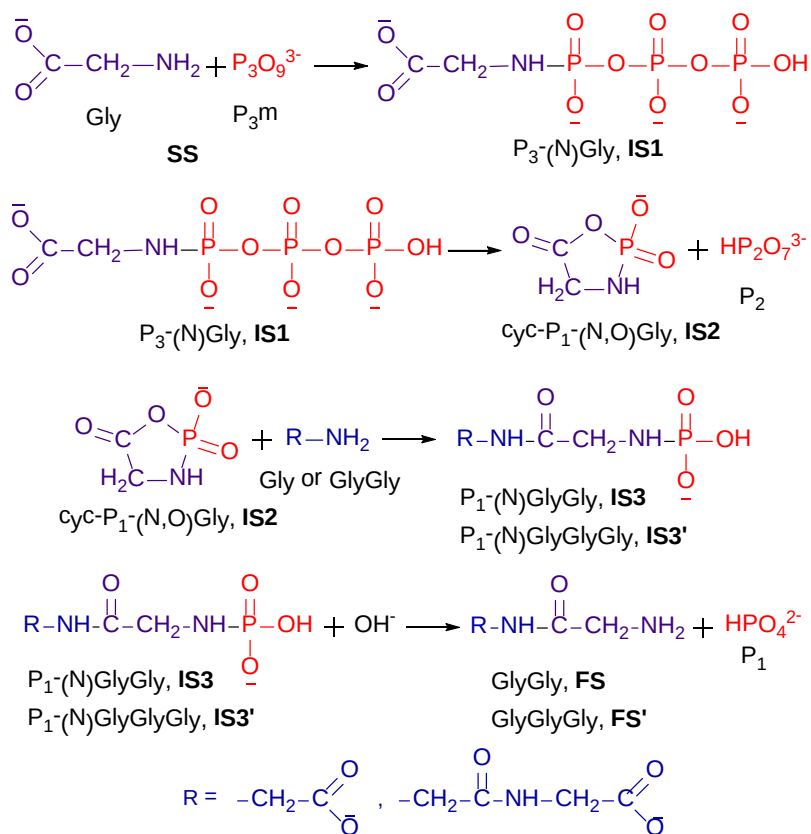


Схема 1. Механизм образования олигопептидов в системе глицин – триметафосфат натрия. SS – начальное состояние, IS – промежуточные состояния (интермеdiаты), FS – конечное состояние.

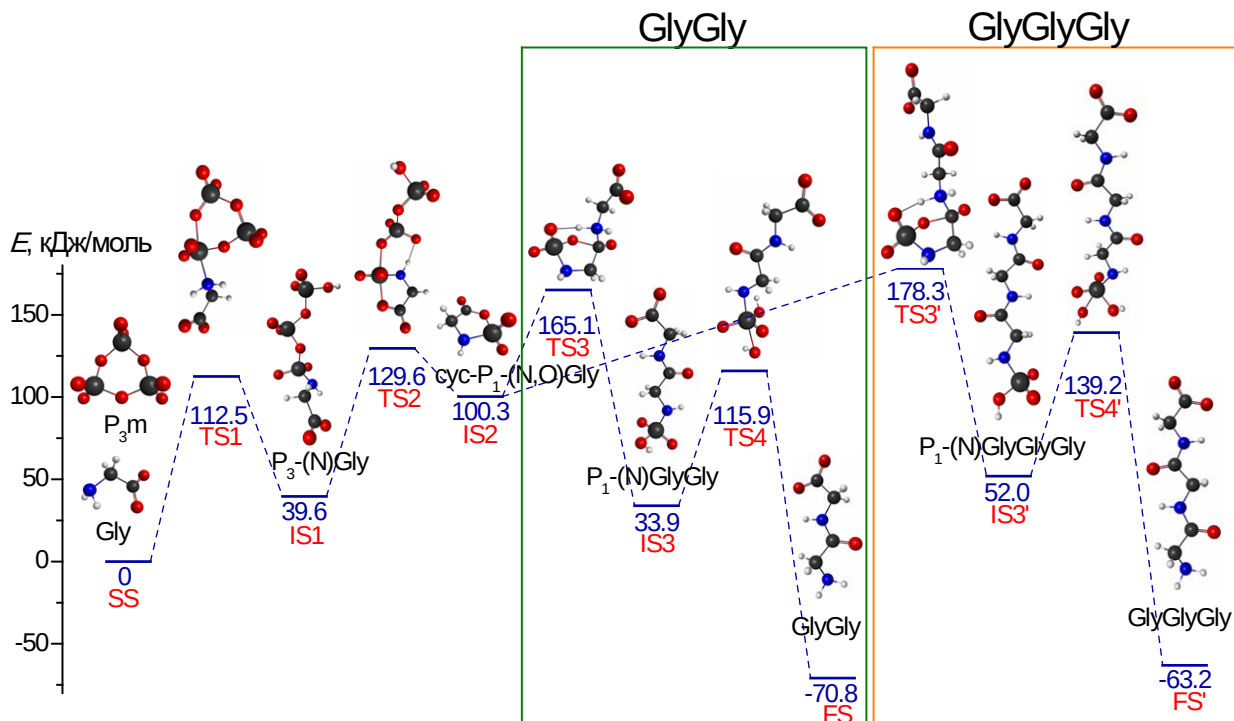


Рис. 4. Энергетическая диаграмма образования глицилглицина и глицилглицилглицина (в соответствии со Схемой 1) со структурами ключевых соединений. TS – переходные состояния. GAMESS, уровень CAM-B3LYP/TZVP, модель C-PCM.

Квантово-химических расчеты, результаты которых представлены на Рис. 5, показывают, что наиболее высоколежащие переходные состояния в присутствии имида-

зола (155.4 кДж/моль для образования глицилглицина и 158.4 кДж/моль – для глицилглицилглицина) лежат ниже, чем в отсутствии гетероцикла (165.1 и 178.3 кДж/моль для ди- и трипептида соответственно).

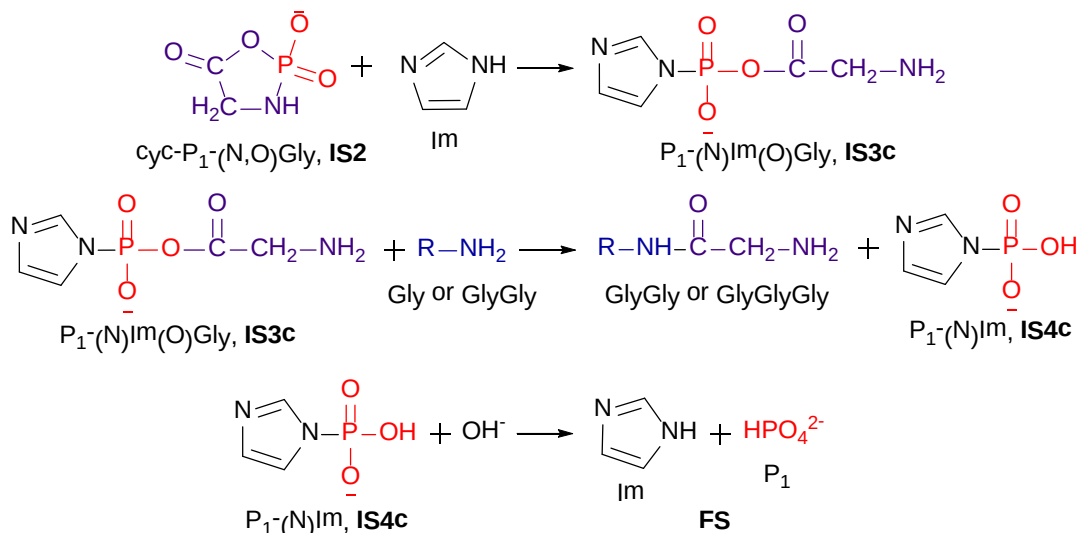


Схема 2. Новый механизм каталитического эффекта имидазола в пептидном синтезе. Фрагмент R такой же, как на Схеме 1.

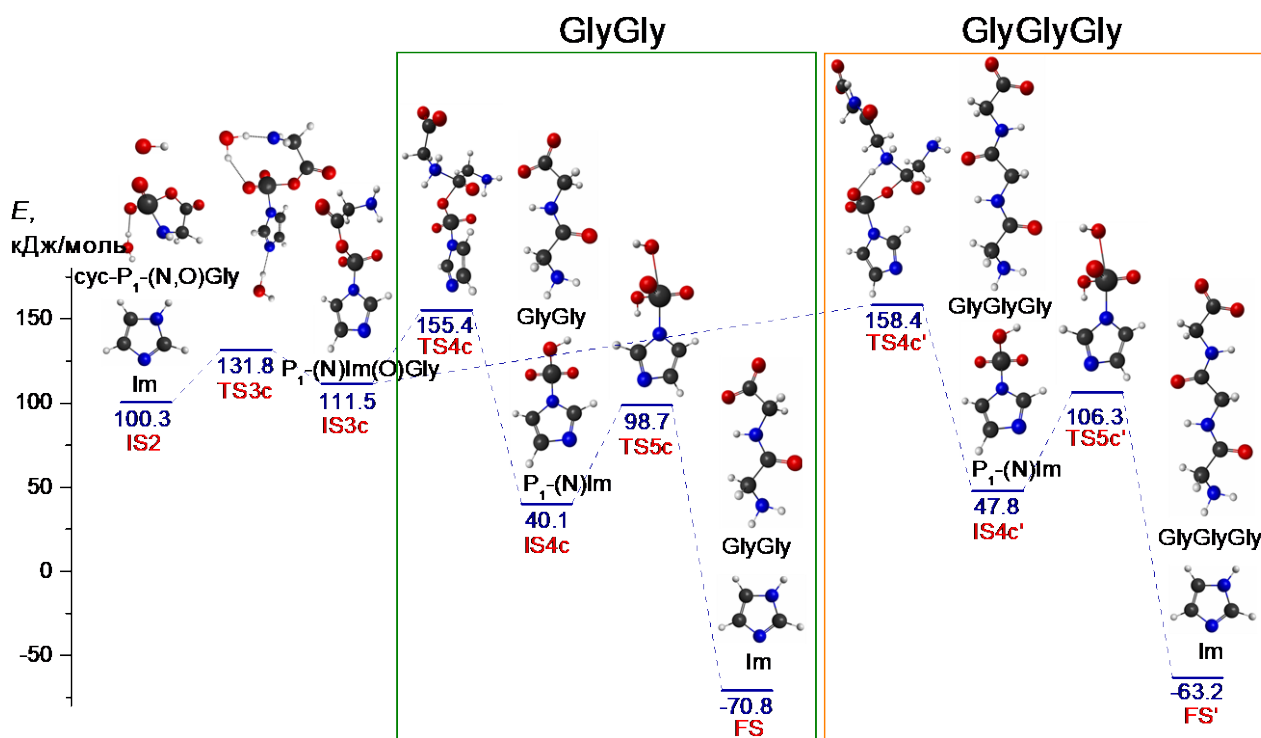


Рис. 5. Энергетическая диаграмма образования глицилглицина и глицилглицилглицина с участием имидазола (в соответствии со схемой 2) со структурами ключевых соединений. GAMESS, уровень CAM-B3LYP/TZVP, модель C-PCM.

Стадия образования пептидной связи в системе с имидазолом имеет меньшую энергию активации (43.9 и 64.9 кДж/моль для ди- и трипептида), чем в системе без имидазола (64.9 и 78.0 кДж/моль соответственно). Таким образом, предложенный механизм объясняет каталитический эффект имидазола в образовании олигопептидов глицина под действием триметафосфата натрия. При этом N-имидазолил-О-аминоацилфосфаты играют в пребиотических системах роль, сходную с ролью аминокислотаденилатов, образующихся в присутствии АТФ и аминокислот-тРНК-синтетазы в ре-

альных биосистемах. Следовательно, предложенный новый механизм катализа может отражать ключевой путь пребиотической эволюции в отношении пептидного синтеза.

Термодинамика образования, структура и гидратация комплексов меди(II) с аминокислотами и олигопептидами и кинетика реакций замещения лигандов (Глава 3)

Понимание закономерностей комплексообразования, а также процессов с участием координационных соединений меди тесно связано с проблемой структуры и гидратации комплексов меди(II) в растворах. На основе экспериментальных данных с привлечением математического моделирования и квантово-химических расчетов была установлена пентакоординация меди(II) в комплексах с N,O-содержащими лигандами, такими как аминокислоты, глицилглицин и глицилглицилглицин. Моделирование методом молекулярной динамики также ясно подтверждает пентакоординацию.

Для изучения кинетики реакций замещения олигопептидных лигандов на гистидин необходимы данные по термодинамике образования гомо- и гетеролигандных комплексов меди(II) с выбранными олигопептидами и гистидином. Константы протонирования лигандов, составы и константы образования комплексов были определены методом рН-потенциометрического титрования. Результаты исследования бинарных систем меди(II) с олигопептидами представлены в Таблице 1. Следует отметить, что в исследованных системах образуются разнообразные комплексные формы: с координацией протонированных форм лигандов, с депротонированием пептидных атомов азота, *бис*-комплексы, а также биядерные соединения.

Для получения спектральной информации и для изучения комплексообразования в сильнощелочной среде выполнено спектрофотометрическое титрование бинарных систем медь(II) – олигопептид в интервале рН от 2 до 13.5 (исключение составляет система с глицилглицил-*L*-тирозином, в которой после рН 11 начинается окисление феноксильного фрагмента). Результаты подвергнуты математической обработке с использованием программы STALABS. Примеры рассчитанных диаграмм распределения и реконструированных спектров поглощения комплексных форм представлены на Рис. 6, из которого видно, что депротонирование пептидных атомов азота приводит к смещению максимума поглощения в область коротких длин волн и росту коэффициента экстинкции.

Следует отметить наличие очень интенсивного максимума поглощения при 382 нм ($\epsilon = 326 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) для биядерной формы $\text{Cu}_2(\text{GY}\cdot\text{H}_1)_3^{2-}$, что согласуется с литературными и расчетными данными по координации депротонированной феноксильной группы в экваториальное положение меди(II). Для комплексов с тирозинсодержащими олигопептидами характерно наличие *d*- π -взаимодействия между ионом комплексообразователя и феноксильным фрагментом, что проявляется в аксиальной координации последнего. Об этом свидетельствуют анализ констант устойчивости (Таблица 1), результаты квантово-химических расчетов (Рис. 7), а также изменения параметров спектров ЭПР при переходе от комплекса с $\text{GGG}\cdot\text{H}$ к $\text{GGY}\cdot\text{H}$.

Результаты исследования тройных систем методом рН-потенциометрии представлены в Таблице 2, из которой видно, что статистически значимая стереоселективность (когда разность логарифмов констант устойчивости $\Delta \lg \beta$ превышает удвоенную сумму их стандартных отклонений) наблюдается в образовании $\text{Cu}(\text{GY}\cdot\text{H}_1)(\text{His})^-$, $\text{Cu}(\text{GY}\cdot\text{H}_2)(\text{His})^{2-}$, $\text{Cu}_2(\text{GY}\cdot\text{H}_1)(\text{His})_2$ и $\text{Cu}(\text{GGY})(\text{His})$, причем более устойчивыми являются комплексы с *L*-гистидином. Наличие стереоселективности для формы $\text{Cu}(\text{GGY})(\text{His})$ подтверждается и данными квантово-химических расчетов (Рис. 8).

Таблица 1. Логарифмы констант комплексообразования с медью(II) глицилглицина (GG·H), глицил-*L*-тирозина (GY·H), глицилглицилглицина (GGG·H) и глицилглицил-*L*-тирозина (GGY·H) при 298 К на фоне 1.0 моль/л KNO₃

№	Равновесие	lgK
1	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG} \cdot \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG} \cdot \text{H})^{2+}$	1.20*
2	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG})^+$	5.569(2)
3	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG} \cdot \text{H}_1) + \text{H}^+$	1.276(1)
4	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG} \cdot \text{H}_1)(\text{OH})^- + 2\text{H}^+$	-8.051(2)
5	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG} \cdot \text{H}_1)(\text{GG})^- + \text{H}^+$	4.34*
6	$2\text{Cu}^{2+} + 2\text{GG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GG} \cdot \text{H}_1)_2(\text{OH})^- + 3\text{H}^+$	-4.65(2)
7	$2\text{Cu}^{2+} + 3\text{GG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GG} \cdot \text{H}_1)_2(\text{GG})^- + 2\text{H}^+$	9.03(5)
8	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY} \cdot \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H})^{2+}$	1.515(4)
9	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY})^+$	5.610(6)
10	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_1) + \text{H}^+$	1.553(1)
11	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_1)(\text{OH})^- + 2\text{H}^+$	-7.618(4)
12	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY} \cdot \text{H}_1^{2-} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_2)(\text{OH})^{2-} + 2\text{H}^+$	-8.451(6)
13	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_1)(\text{GY})^- + \text{H}^+$	3.83(6)
14	$2\text{Cu}^{2+} + 3\text{GY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GY} \cdot \text{H}_1)_2(\text{GY})^- + 2\text{H}^+$	8.79(2)
15	$2\text{Cu}^{2+} + 2\text{GY}^- + \text{GY} \cdot \text{H}_1^{2-} \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GY} \cdot \text{H}_1)_3^{2-} + 2\text{H}^+$	8.97(6)
16	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG} \cdot \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H})^{2+}$	1.52*
17	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG})^+$	5.188(3)
18	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H}_1) + \text{H}^+$	-0.385(3)
19	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H}_2)^- + 2\text{H}^+$	-7.040(3)
20	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H}_2)\text{OH}^{2-} + 3\text{H}^+$	-18.81*
21	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG})(\text{GGG} \cdot \text{H}_1)^- + \text{H}^+$	3.43*
22	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H}_1)_2^{2-} + 2\text{H}^+$	-4.94*
23	$2\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GGG})_2^{2+}$	12.18*
24	$2\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGG}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GGG} \cdot \text{H}_1)_2 + 2\text{H}^+$	1.26*
25	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY} \cdot \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H})^{2+}$	1.920(2)
26	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY})^+$	5.296(1)
27	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H}_1) + \text{H}^+$	-0.230(1)
28	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H}_2)^- + 2\text{H}^+$	-6.630(2)
29	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY} \cdot \text{H}_1^{2-} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H}_3)^{2-} + 2\text{H}^+$	-6.547(3)
30	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY})_2^{2-} + 2\text{H}^+$	8.76(3)
31	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY})(\text{GGY} \cdot \text{H}_1)^- + \text{H}^+$	3.512(5)
32	$\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H}_1)_2^{2-} + 2\text{H}^+$	-4.70(5)
33	$2\text{Cu}^{2+} + 2\text{GGY}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GGY} \cdot \text{H}_1)_2 + 2\text{H}^+$	1.44(1)

* – значение фиксировано по литературным данным

Особого внимания заслуживают биядерные гетеролигандные комплексы, содержащие в своем составе одну молекулу олигопептида и две молекулы аминокислоты. На Рис. 8 приведена структура комплекса $\text{Cu}_2(\text{GGG} \cdot \text{H}_2)(\text{His})(\text{HisH}_1)^{2-}$, в котором мостиковую роль выполняет депротонированный имидазольный фрагмент одной из молекул аминокислоты. Для гетеролигандных комплексов меди(II) с выбранными

олигопептидами и гистидином впервые получены индивидуальные спектры поглощения (примеры даны на Рис. 9), а с трипептидами – и спектры ЭПР, параметры которых представлены в Таблице 3, из которой видны различия как в спектрах поглощения, так и в спектрах ЭПР для комплексов меди(II) с глицилглицил-*L*-тирозином и оптическими изомерами гистидина.

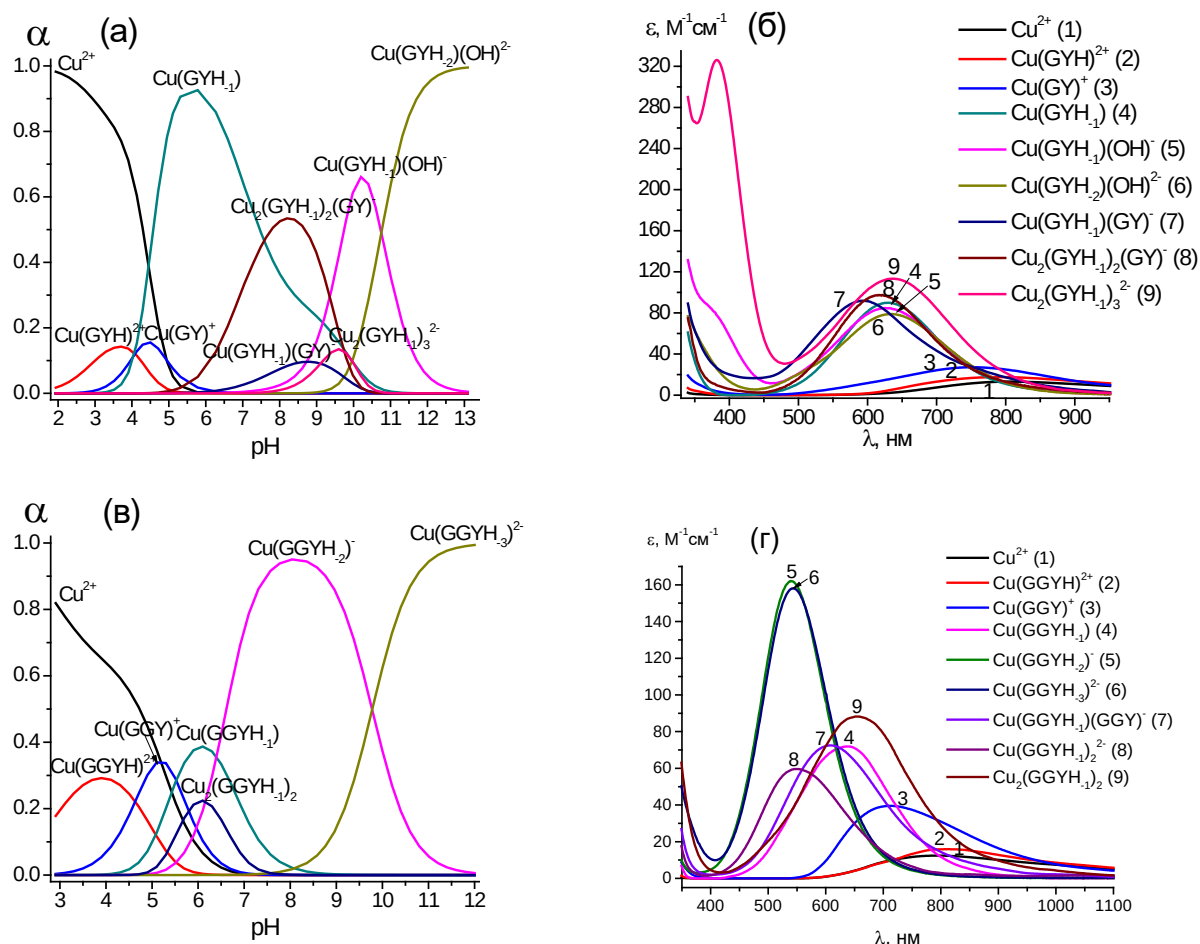


Рис. 6. Распределение долей накопления комплексов (α) в зависимости от pH в системах медь(II) – глицил-*L*-тирозин (GY·H) (1:2) (а) и медь(II) – глицилглицил-*L*-тирозин (GGY·H) (1:1) (в) в условиях СФ-титрования; $T = 298 \text{ K}$, 1.0 M KNO_3 . Реконструированные индивидуальные спектры поглощения комплексных форм с GY·H (б) и GGY·H (г).

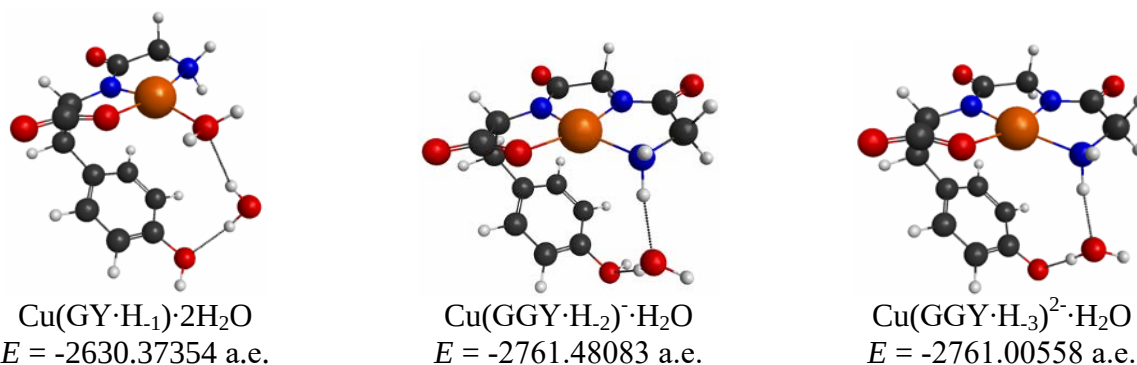
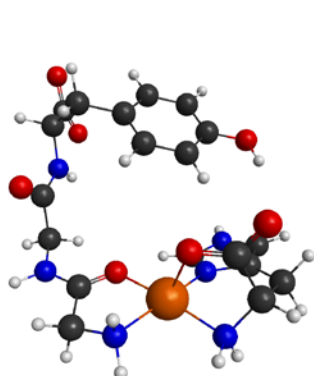


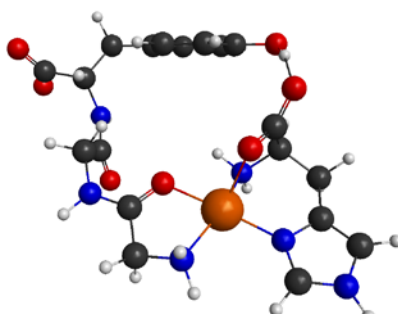
Рис. 7. Структуры и энергии (в атомных единицах, а.е.) некоторых комплексов меди(II) с глицил-*L*-тирозином (GY·H) и с глицилглицил-*L*-тирозином (GGY·H); GAMESS, уровень CAM-B3LYP/TZVP, модель C-PCM.

Таблица 2. Логарифмы констант гетеролигандных равновесий в системах медь(II) – *L/D*-гистидин (HisH) – олигопептид при 298K на фоне 1.0 М KNO₃ (жирным шрифтом выделены статистически значимые стереоселективные эффекты)

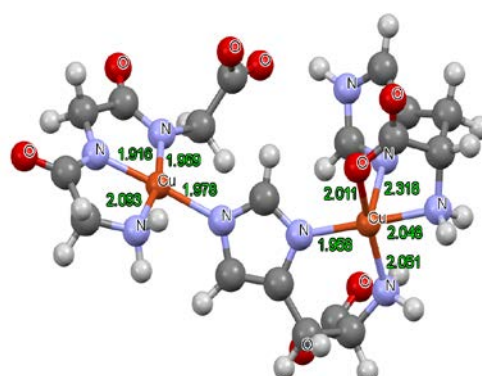
№	Равновесие	lgβ		Δlgβ
		<i>L</i> -HisH	<i>D</i> -HisH	
1	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- + \text{HisH} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG})(\text{HisH})^+$	10.74(2)	10.75(2)	-0.01
2	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG})(\text{His})$	15.416(7)	15.410(7)	0.006
3	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG} \cdot \text{H}_1)(\text{His})^- + \text{H}^+$	6.91(1)	6.88(3)	0.03
4	$\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GG} \cdot \text{H}_1)(\text{HisH}_1)^{2-} + 2\text{H}^+$	-4.49(1)	-4.46(2)	-0.03
5	$2\text{Cu}^{2+} + \text{GG}^- + 2\text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GG} \cdot \text{H}_1)(\text{His})_2 + \text{H}^+$	21.90(4)	21.87(5)	0.03
6	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- + \text{HisH} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY})(\text{HisH})^+$	10.64(3)	10.65(3)	-0.01
7	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY})(\text{His})$	15.455(9)	15.421(9)	0.034
8	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_1)(\text{His})^- + \text{H}^+$	7.00(1)	6.87(1)	0.13
9	$\text{Cu}^{2+} + \text{GY} \cdot \text{H}_1^{2-} + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_2)(\text{His})^{2-} + \text{H}^+$	6.857(7)	6.817(7)	0.040
10	$2\text{Cu}^{2+} + \text{GY}^- + 2\text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GY} \cdot \text{H}_1)(\text{His})_2 + \text{H}^+$	22.89(1)	22.75(1)	0.14
11	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- + \text{HisH} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG})(\text{HisH})^+$	10.56(2)	10.58(2)	-0.02
12	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG})(\text{His})$	14.915(5)	14.906(6)	0.011
13	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H}_1)(\text{His})^- + \text{H}^+$	6.39(2)	6.36(2)	0.03
14	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGG} \cdot \text{H}_2)(\text{His})^{2-} + 2\text{H}^+$	-4.141(8)	-4.126(9)	0.015
15	$2\text{Cu}^{2+} + \text{GGG}^- + 2\text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GGG} \cdot \text{H}_2)(\text{His})(\text{HisH}_1)^{2-} + 3\text{H}^+$	1.99(8)	2.04(8)	-0.05
16	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- + \text{HisH} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY})(\text{HisH})^+$	10.75(1)	10.76(1)	-0.01
17	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY})(\text{His})$	15.086(3)	14.983(4)	0.103
18	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H}_1)(\text{His})^- + \text{H}^+$	6.72(1)	6.74(2)	-0.02
19	$\text{Cu}^{2+} + \text{GGY} \cdot \text{H}_1^{2-} + \text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{GGY} \cdot \text{H}_2)(\text{His})^{2-} + \text{H}^+$	6.94(1)	6.91(2)	0.03
20	$2\text{Cu}^{2+} + \text{GGY}^- + 2\text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GGY} \cdot \text{H}_1)(\text{His})_2 + \text{H}^+$	20.65(9)	20.61(8)	0.04
21	$2\text{Cu}^{2+} + \text{GGY} \cdot \text{H}_1^{2-} + 2\text{His}^- \rightleftharpoons \text{Cu}_2(\text{GGY} \cdot \text{H}_3)(\text{His})(\text{HisH}_1)^{3-} + 3\text{H}^+$	2.34(5)	2.37(6)	-0.03



cis-Cu(GGY)(*L*-His)
 $E = -3234.28346$ a.e.



trans-Cu(GGY)(*D*-His)
 $E = -3234.28035$ a.e.



$\text{Cu}_2(\text{GGG} \cdot \text{H}_2)(\text{His})(\text{HisH}_1)^{2-}$
 $E = -5076.14672$ a.e.

Рис. 8. Структуры и энергии наиболее устойчивых изомеров комплекса Cu(GGY)(His) с *L*- и *D*-изомерами гистидина (GAMESS), а также комплекса Cu₂(GGG·H₂)(His)(HisH₁)²⁻ (ORCA); уровень CAM-B3LYP/TZVP, модель C-PCM.

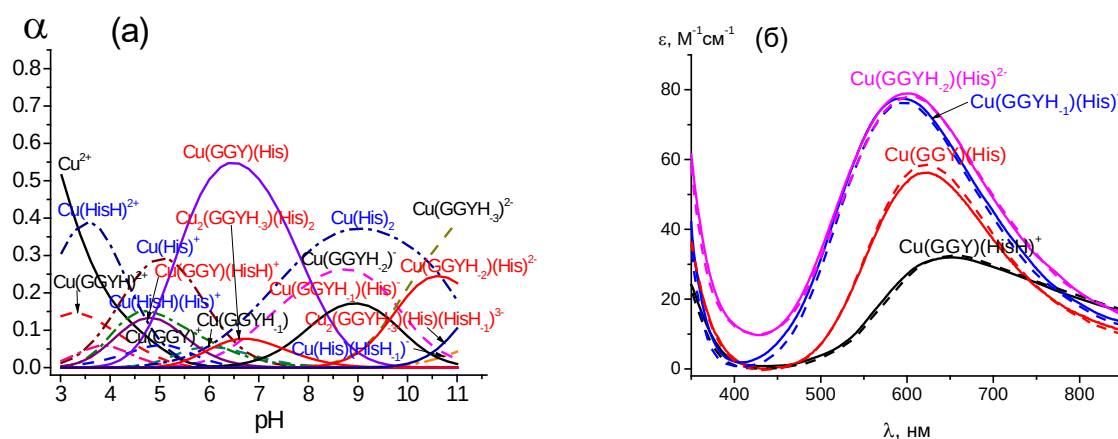
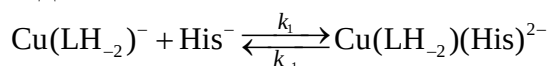
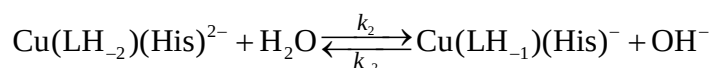


Таблица 3. Параметры электронных спектров поглощения и спектров ЭПР гетеролигандных комплексов меди(II) с трипептидами и *L*-гистидином

Методом остановленной струи исследована кинетика замещения олигопептидных лигандов на гистидин в условиях псевдопервого порядка. Зависимости наблюдаемой константы скорости от рН для систем с трипептидами представлены на Рис. 10, откуда видно, что с ростом рН происходит увеличение скорости замещения. В этом же диапазоне происходит увеличение концентрации анионной формы гистидина.





И, наконец, третья стадия – окончательное замещение трипептида на вторую молекулу аминокислоты:

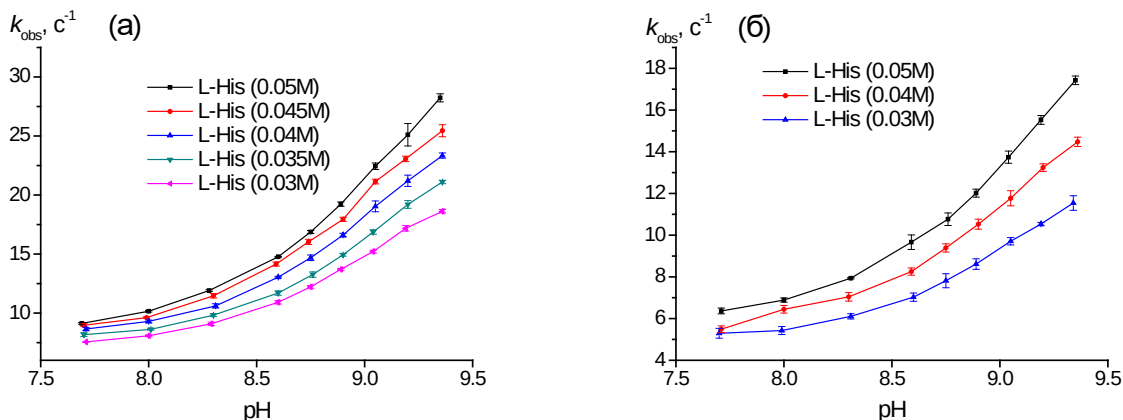
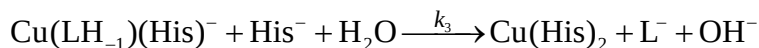
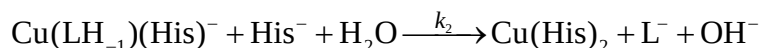
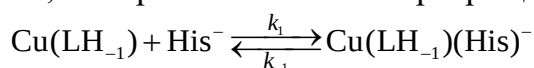


Рис. 10. Зависимости наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от pH в системах медь(II) – глицилглицилглицин – *L*-гистидин (1:1:10) (а) и медь(II) – глицилглицил-*L*-тирозин – *L*-гистидин (1:1:10) (б), полученные методом остановленной струи при быстром смешивании равных объемов растворов I и II с регистрацией при $\lambda = 550$ нм ($l = 1$ см); I – Cu(II), GGY·H; II – *L*-HisH; $c_{\text{tris}} = 0.10$ М, $T = 298$ К, 1.0 М KNO_3 .

В случае дипептидов имеется только один депротонированный атом азота, поэтому процесс замещения состоит из двух стадий, первая из которых заключается в замещении экваториально-координированной карбокси-группы с образованием гетеролигандного интермедиата, а вторая включает его превращение в *бис*-гистидинат:



Скорость-определяющей как в случае дипептидов, так и в случае трипептидов является последняя стадия, причем активность в замещении может проявлять и протонированная форма гистидина:



Тогда выражение для наблюдаемой скорости реакции в условиях псевдопервого порядка имеет вид:

$$v = k_{\text{obs}}[\text{Cu}(\text{LH}_{-2})^{-}] = (k_0 + k_{\text{L}}[\text{His}^{-}] + k_{\text{LH}}[\text{HisH}])(\text{Cu}(\text{LH}_{-2})^{-})$$

Наблюдаемая константа скорости может быть представлена следующим выражением:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{L}}[\text{His}^{-}] + k_{\text{LH}}[\text{HisH}] = k_0 + k_{\text{LH}} \cdot c_{\text{HisH}} + (k_{\text{L}} - k_{\text{LH}})[\text{His}^{-}]$$

Все три вклада в реакцию замещения олигопептидов на гистидин были определены из зависимостей наблюдаемой константы скорости от концентрации анионной формы аминокислоты при различных общих концентрациях гистидина. Пример такой зависимости дан на Рис. 11, а в Таблице 4 суммированы результаты кинетических экспериментов.

Из Таблицы 4 видно, что скорость замещения лигандов уменьшается с введением феноксильной группы как для дипептидов, так и для трипептидов, что можно объяснить стерическим блокированием боковой цепью тирозина одного из аксиальных

положений меди(II) как места атаки вступающего лиганда. Скорость замещения дипептидных лигандов ниже, чем трипептидных, что объясняется различием в электростатическом отталкивании при вхождении второй молекулы аминокислоты – в случае дипептидов карбокси-группа в гетеролигандном интермедиате расположена ближе к комплексообразователю, чем в случае трипептидов, и тем самым сильнее препятствует вхождению другого лиганда в координационную сферу меди(II).

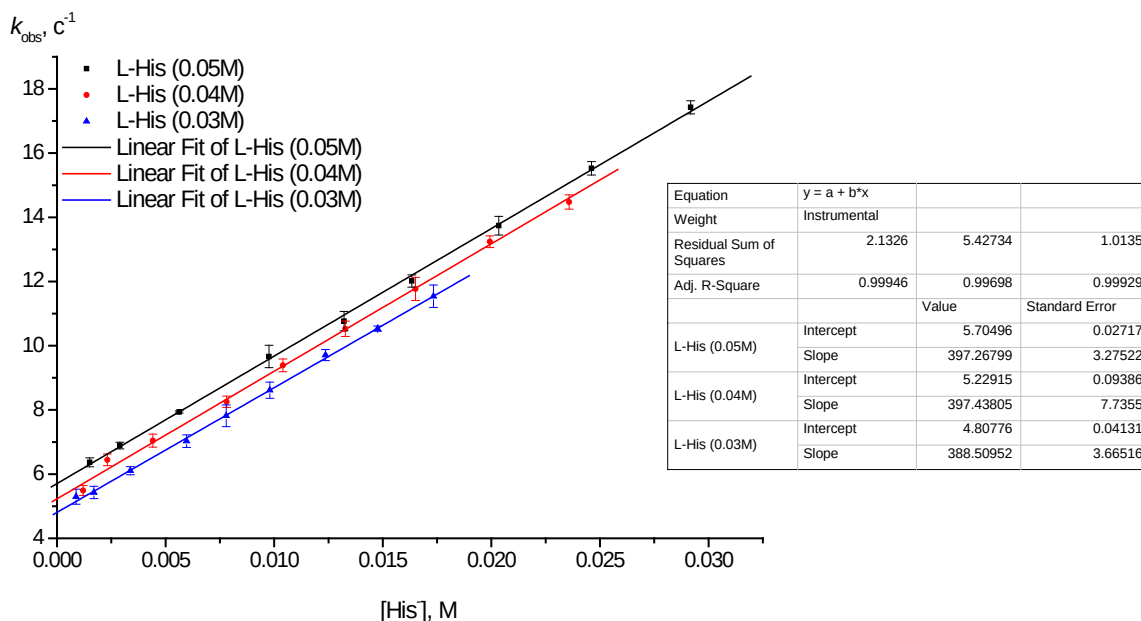


Рис. 11. Зависимости наблюдаемой константы скорости (k_{obs}) от pH в системе медь(II) – глицилглицил-*L*-тирозин – *L*-гистидин (1:1:10) при различных общих концентрациях гистидина.

Таблица 4. Константы скорости реакций замещения олигопептидных лигандов из комплексов меди(II) на гистидин; 298 К, 1.0 М KNO₃, трис-буфер

Комплекс	Аминокислота	$k_0, \text{с}^{-1}$	$k_{\text{LH}}, \text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{\text{L}}, \text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{с}^{-1}$
Cu(GG·H ₁)	<i>L</i> -гистидин	0.7±0.1	34.9±1.6	359±6
Cu(GG·H ₁)	<i>DL</i> -гистидин	0.9±0.1	32.8±2.0	337±7
Cu(GY·H ₁)	<i>L</i> -гистидин	0.20±0.01	-	26.7±1.0
Cu(GY·H ₁)	<i>D</i> -гистидин	0.25±0.01	-	21.8±0.7
Cu(GGG·H ₂) ⁻	<i>L</i> -гистидин	4.9±0.2	68.7±6.0	740±6
Cu(GGG·H ₂) ⁻	<i>DL</i> -гистидин	4.1±0.3	87.7±8.5	782±6
Cu(GGY·H ₂) ⁻	<i>L</i> -гистидин	3.46±0.03	44.9±0.7	439±5
Cu(GGY·H ₂) ⁻	<i>D</i> -гистидин	3.37±0.10	43.9±3.1	459±3

Следует отметить, что для замещения глицил-*L*-тирозина отсутствует вклад от протонированной формы гистидина, что может быть связано с большими стерическими препятствиями для превращения его гетеролигандного интермедиата в бис-гистидинат. В пользу этого факта свидетельствуют гораздо более низкие значения константы скорости замещения на анионную форму аминокислоты для данного олигопептида по сравнению с остальными, представленными в Таблице 4.

Как видно из Таблицы 4, для замещения глицил-*L*-тирозина на анионную форму гистидина наблюдается статистически значимая стереоселективность, причем более активным в замещении является *L*-изомер аминокислоты. В замещении глицилгли-

цил-*L*-тирозина анионом гистидина также проявляется стереоселективность, однако более высокая скорость реакции замещения наблюдается в системе с *D*-гистидином.

Наличие стереоселективности в замещении оптически неактивного лиганда (глицилглицилглицина) на гистидин, когда энантиомерно однородная форма аминокислоты менее активна, чем рацемат, является неожиданным фактом. Однако этот эффект хорошо объясняется приведенной выше многостадийной схемой замещения, когда скорость-определяющей является стадия превращения гетеролигандного интермедиата в *бис*-гистидинат меди(II). В таком случае один из лигандов (гистидин) является оптически активным, поэтому скорость вхождения в координационную сферу другого оптически активного лиганда может различаться для аминокислоты с такой же и противоположной хиральностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты и выводы:

1. Впервые установлены кинетические зависимости концентраций интермедиатов и продуктов реакций пептидного синтеза в системах глицин – триметафосфат натрия, глицин – триметафосфат натрия – имидазол, глицин – *L*-тирозин – триметафосфат натрия, глицин – глицилглицин – триметафосфат натрия и глицин – глицил-*L*-тирозин – триметафосфат натрия в проточных условиях в термоциклическом режиме с помощью проточной системы, ВЭЖХ анализа и спектроскопии ЯМР ^{31}P . На основе моделирования кинетики пептидного синтеза по программе MATDS впервые оценены константы скорости реакций синтеза и деградации ди- и трипептидов в выбранных системах.
2. Определены оптимальные условия наиболее эффективных синтезов ди- и трипептидов (рН, температура) в изученных системах в проточном термоциклическом режиме, которые по своей эффективности входят в число наилучших среди описанных в литературе и могут имитировать пребиотические пептидные синтезы. Показано, что оптимальными для синтеза глицилглицина являются щелочные среды с рН 9.5 и 10.5. В случае глицилглицилглицина оптимальным является значение рН 9.5, при котором выходы трипептида более чем в два раза превосходят таковые при других кислотностях среды. Оптимальная температура синтеза составляет 75 °С, при которой возрастают выходы ди- и трипептидов и уменьшается время выхода их концентраций на предел.
3. Предложена модификация известного механизма пептидного синтеза в системах аминокислота – триметафосфат натрия, и с помощью квантово-химической оптимизации по программе GAMESS структур основных, переходных состояний и интермедиатов реакций выявлено хорошее соответствие рассчитанных активационных параметров реакций с экспериментальными. Согласно данному механизму на первой стадии из глицина и триметафосфата натрия образуется *N*-трифосфат глицина, который далее циклизуется с отщеплением пирофосфата и образованием циклического *N,O*-фосфата аминокислоты, реагирующего с глицином или глицилглицином, в результате чего образуется *N*-фосфат ди- или трипептида соответственно, а на заключительной стадии происходит гидролиз этих фосфатов с образованием олигопептидов.
4. Предложен новый механизм катализа имидазолом пептидного синтеза в системах аминокислота – триметафосфат натрия – имидазол и с помощью квантово-химической оптимизации по программе GAMESS переходного состояния с участием имидазола впервые корректно объяснен его каталитический эффект. Показано, что имидазол реагирует с циклическим фосфатом глицина с образованием *N*-имидазолил-

О-глицилфосфата, реакция которого с аминокислотой или дипептидом приводит к образованию ди- и трипептида соответственно, а также N-фосфорилимидазола. Гидролиз последнего дает ортофосфат и регенирует имидазол.

5. Выдвинута гипотеза о том, что при удлинении пептида N-имидазолил-О-аминоацилфосфаты играют в пребиотических системах выдающуюся роль, сходную с ролью amino-ациладенилатов, образующихся в присутствии АТФ и aminoацил-тРНК-синтетазы в реальных биосистемах. Сделано заключение, что предложенный новый механизм катализа может отражать ключевой путь пребиотической эволюции в отношении пептидного синтеза.

6. С помощью методов рН-метрического и СФ-метрического титрования определены термодинамические параметры комплексообразования и спектральные характеристики ряда комплексов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D*-гистидин. Методами квантовой химии и молекулярной динамики рассчитаны структуры и динамические характеристики сольватного обмена для гидратных оболочек, подтверждающие пентакоординацию меди(II) растворах.

7. Впервые выявлены значимые стереоселективные эффекты в термодинамике образования комплексов $\text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_{-1})(\text{His})^-$, $\text{Cu}(\text{GY} \cdot \text{H}_{-2})(\text{His})^{2-}$, $\text{Cu}_2(\text{GY} \cdot \text{H}_{-1})(\text{His})_2$ и $\text{Cu}(\text{GGY})(\text{His})$, причем более устойчивыми во всех этих случаях являются формы с *L*-гистидином. Полученные результаты объяснены с учетом эффектов трансвлияния, *d*- π - и π - π -стэкинг-взаимодействий и подтверждены данными квантово-химических расчетов.

8. Методом остановленной струи определены кинетические характеристики реакций замещения лигандов в системах медь(II) – дипептид (глицилглицин, глицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин и медь(II) – трипептид (глицилглицилглицин, глицилглицил-*L*-тирозин) – *L/D/DL*-гистидин. Предложены и подтверждены двух- и трехстадийные механизмы замещения ди- и трипептидов соответственно.

9. Впервые обнаружен статистически значимый стереоселективный эффект в замещении глицил-*L*-тирозина на гистидин с более высокой константой скорости в случае *L*-His⁻, что согласуется с двухстадийным механизмом замещения, когда скоростью определяющей является стадия превращения гетеролигандного интермедиата $\text{Cu}(\text{GYH}_{-1})(\text{His})^-$ в *бис*-гистидинат меди(II). Впервые обнаруженная статистически значимая стереоселективность для реакции замещения глицилглицил-*L*-тирозина на гистидин с большей активностью *D*-His⁻. Впервые установлена неожиданная стереоселективность в замещении оптически неактивного лиганда (глицилглицилглицина) на гистидин, когда энантиомерно однородная форма аминокислоты менее активна, чем рацемат, что объясняется предложенной многостадийной схемой замещения.

Разработанный подход к проточным синтезам олигопептидов с участием триметафосфата натрия является оригинальным и может быть использован для синтеза олигопептидов, состоящих из других аминокислот (помимо использованных в настоящей работе). В развитие данного направления важным продолжением может стать разработка стереоспецифичных и стереоселективных синтезов олигопептидов с применением проточных систем.

Изучение стереоселективных эффектов в термодинамике комплексообразования и кинетике реакций замещения имеет большое значение для решения такой важной проблемы, как специфичность и селективность процессов в живой природе. Важно, что такого рода исследования могут пролить свет на решение важнейшей проблемы современного естествознания – происхождение гомохиральности биомолекул.

Исследования реакций замещения в комплексах меди(II) с биолигандами являются перспективными для разработки таких важных вопросов, как транспорт меди в живых организмах и функционирование медьсодержащих ферментов. Использование различных лигандов в процессах замещения поможет пониманию закономерностей взаимопревращения комплексов меди(II). Полученные результаты являются практически значимыми в плане разработки лекарственных препаратов на основе медьсодержащих соединений, в особенности, для лечения онкологических заболеваний.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

Статьи

1. Bukharov, M.S. Structure and Dynamics of Solvation Shells of Copper(II) Complexes with N,O-Containing Ligands / M.S. Bukharov, V.G. Shtyrilin, G.V. Mamin, S. Stapf, C. Mattea, A.S. Mukhtarov, **N.Yu. Serov**, E.M. Gilyazetdinov // Inorganic Chemistry. – 2015. – V. 54, N 20. – P. 9777-9784.
2. **Serov, N.Yu.** Trimetaphosphate and imidazole – possible reagents in prebiotic peptide synthesis / **N.Yu. Serov**, V.G. Shtyrilin, Kh.R. Khayarov // Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements. – 2016. – V. 191, N 11-12. – P. 1558-1559.
3. Bukharov, M.S. Hydration of copper(II) amino acids complexes / M.S. Bukharov, V.G. Shtyrilin, E.M. Gilyazetdinov, **N.Yu. Serov**, T.I. Madzhidov // Journal of Computational Chemistry. – 2018. – V. 39, N. 14. – P. 821-826.
4. **Serov, N.Yu.** The kinetics and mechanisms of reactions in the flow systems glycine-sodium trimetaphosphate-imidazoles: the crucial role of imidazoles in prebiotic peptide syntheses / **N.Yu. Serov**, Kh. R. Khayarov, V.G. Shtyrilin // Amino Acids. – 2020. – V. 52, I. 5. – P. 811-821.
5. **Serov, N.Yu.** Complex structures, formation thermodynamics and substitution reaction kinetics in the copper(II) – glycylglycylglycine – L/D/DL-histidine system / **N.Yu. Serov**, V.G. Shtyrilin, M.S. Bukharov, A.V. Ermolaev, E.M. Gilyazetdinov, A.A. Rodionov // Polyhedron. – 2021. – V.197. – Номер статьи 115041.

Материалы конференций

1. **Серов, Н.Ю.** Синтез олигопептидов глицина в проточной системе / **Н.Ю. Серов**, В.Г. Штырлин // Сборник тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс]. – Казань: Изд-во КФУ, 2014. – С.318. – 1 электрон. опт. Диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод CD-ROM; Adobe Acrobat Reader.
2. Штырлин, В.Г. Структура и стереоселективность образования гомо- и гетеролигандных комплексов 3d-переходных металлов с аминокислотами в растворах / В.Г. Штырлин, М.С. Бухаров, Э.М. Гилязетдинов, **Н.Ю. Серов**, А.А. Крутиков, А.Н. Ильин, А.В. Захаров // XXVI Международная Чугаевская конференция по координационной химии (Казань, 6-10 октября, 2014 г.): тезисы докладов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2014. – С. 101.
3. **Серов, Н.Ю.** Квантово-химическое моделирование механизма синтеза олигопептидов в системе глицин – триметафосфат натрия – имидазол / **Н.Ю. Серов**, В.Г. Штырлин // Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул: сборник статей VII Всероссийской молодежной школы-конференции (Иваново, 14-17 апреля 2015 г.). – Иваново: Иван. гос. ун-т, 2015. – С. 270-272.
4. Гилязетдинов, Э.М. Моделирование структуры, термодинамики и стереоселективности образования комплексов в системах медь(II) – D/L-гистидин – олигопептиды / Э.М. Гилязетдинов, **Н.Ю. Серов**, М.С. Бухаров, А.А. Крутиков, В.Г. Штырлин // Математика

и математическое моделирование: сборник материалов IX Всероссийской молодежной научно-инновационной школы (Саров, 8-10 апреля 2015 г.). – Саров: ООО «Интерконтакт», 2015. – С. 118-119.

5. **Серов, Н.Ю.** Моделирование кинетики и механизма синтеза олигопептидов в проточной системе / **Н.Ю. Серов, В.Г. Штырлин** // Математика и математическое моделирование: сборник материалов IX Всероссийской молодежной научно-инновационной школы (Саров, 8-10 апреля 2015 г.). – Саров: ООО «Интерконтакт», 2015. – С.121-122.

6. **Serov, N.Yu.** Catalytic flow syntheses of oligopeptides in the glycine – trimetaphosphate – imidazole system / **N.Yu. Serov, V.G. Shtyrln** // EuropaCat XII. Catalysis: Balancing the use of fossil and renewable resources. European Congress on Catalysis. Kazan (Russia) 30th Aug. - 4th Sept., 2015. [Electronic resource] / ed.: V.I. Bukhtiyarov, A.Yu. Stakheev – Novosibirsk: Boreskov Institute of Catalysis, 2015. – P. 1931-1932. – 1 USB flash.

7. **Серов, Н.Ю.** Синтез олигопептидов в системе глицин – триметафосфат натрия – имидазол / **Н.Ю. Серов, В.Г. Штырлин** // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 25-28 ноября 2015 г.). – [Электронный ресурс] / Отв. ред. А.В. Герасимов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – С. 546. – 1 электрон. опт. Диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором с тактовой частотой не менее 1ГГц; Windows XP; дисковод CD-ROM; Adobe Acrobat Reader.

8. **Серов, Н.Ю.** Квантово-химическое моделирование механизмов синтеза олигопептидов в системах аминокислота – триметафосфат натрия – имидазол / **Н.Ю. Серов, В.Г. Штырлин** // Математика и математическое моделирование: сборник материалов X Всероссийской молодежной научно-инновационной школы (Саров, 12-14 апреля 2016 г.). – Саров: ООО «Интерконтакт», 2016. – С. 132-133.

9. **Serov, N.Yu.** Trimetaphosphate and imidazole – possible reagents in prebiotic peptide synthesis / **N.Yu. Serov, V.G. Shtyrln, Kh.R. Khayarov** // XXI Международная конференция по фосфорной химии (Казань, 5-10 июня 2016 г.): тезисы докладов. – М.: Эко-Пресс, 2016. – С. 254.

10. Штырлин, В.Г. Природа стереоселективности комплексообразования ионов переходных металлов с биолигандами / В.Г. Штырлин, Э.М. Гилязетдинов, М.С. Бухаров, **Н.Ю. Серов, А.А. Крутиков, А.В. Захаров** // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 26-30 сентября 2016 г): тезисы докладов. В 5 т. Т.1. Фундаментальные проблемы химической науки. – Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук, 2016. – С. 110.

11. **Серов, Н.Ю.** Кинетика, механизмы и стереоселективность реакций замещения лигандов в растворах комплексов меди(II) с олигопептидами и гистидином / **Н.Ю. Серов, А.В. Ермолаев, В.Г. Штырлин** // Математика и математическое моделирование: сборник материалов XI Всероссийской молодежной научно-инновационной школы (Саров, 11-13 апреля 2017 г.). – Саров: ООО «Интерконтакт», 2017. – С. 203-204.

12. **Serov, N.Yu.** Complex formation thermodynamics, substitution reactions kinetics and stereoselective effects in the copper(II) – oligopeptide – L/D/DL-histidine systems / **N.Yu. Serov, A.V. Ermolaev, V.G. Shtyrln** // XXVII Международная Чугаевская конференция по координационной химии и IV Молодежная школа-конференция «Физико-химические методы в химии координационных соединений», 2–6 октября 2017 г., Нижний Новгород: тезисы докладов конференции, посв. 80-летию академика РАН Г.А.Абакумова. – Нижний Новгород, 2017. – С.У38.

13. Shtyrln, V.G. Stereoselective effects in structure, formation thermodynamics, and ligand substitution reactions kinetics of 3d-metal complexes with amino acids and oligopeptides / V.G. Shtyrln, E.M. Gilyazetdinov, **N.Yu. Serov, M.S. Bukharov, A.A. Krutikov, A.V. Zakharov** // XXVII Международная Чугаевская конференция по координационной химии и IV Моло-

дежная школа-конференция «Физико-химические методы в химии координационных соединений», 2–6 октября 2017 г., Нижний Новгород: тезисы докладов конференции, посв. 80-летию академика РАН Г.А.Абакумова. – Нижний Новгород, 2017. – С.О103.

14. **Serov, N.Yu.** Kinetics and mechanisms of substitution reactions and redox processes with participation of copper(II) tripeptide complexes / **N.Yu. Serov**, K.V. Urazaeva, A.V. Ermolaev, E.M. Gilyazetdinov, M.S. Bukharov, V.G. Shtyrilin // Всероссийский кластер конференций по неорганической химии «InorgChem 2018» (Астрахань, 17–21 сентября 2018 г.) [Электр. ресурс]: тезисы докладов. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2018. – С. 206-207. – Режим доступа: 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

15. **Серов, Н.Ю.** Проточные синтезы олигопептидов глицина с участием триметафосфата натрия / **Н.Ю. Серов**, В.Г. Штырлин, Х.Р. Хаяров // XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (9-13 сентября 2019 г., Санкт-Петербург): сборник тезисов. – В 6 т. Т.1. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 447.

16. **Серов, Н.Ю.** Моделирование кинетики и механизма пептидного синтеза в проточной системе / **Н.Ю. Серов**, Х.Р. Хаяров, В.Г. Штырлин // Математика и математическое моделирование: сборник материалов XIV Всероссийской молодежной научно-инновационной школы (Саров, 7-9 апреля 2020 г.). – Саров: Интерконтакт, 2020. – С. 23-24.

17. **Серов, Н.Ю.** Термодинамика образования, кинетика реакций замещения и структура комплексов в системах медь(II) – олигопептиды – гистидин / **Н.Ю. Серов**, А.В. Ермолаев, Э.М. Гилязетдинов, М.С. Бухаров, Э.Л. Гоголашвили, В.Г. Штырлин // Математика и математическое моделирование: сборник материалов XV Всероссийской молодежной научно-инновационной школы (Саров, 13-15 апреля 2021 г.). – Саров: Интерконтакт, 2021. – С. 9-10.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность научному руководителю Валерию Григорьевичу Штырлину, а также Хасану Рафаэлевичу Хаярову, Михаилу Сергеевичу Бухарову, Эдуарду Махмутовичу Гилязетдинову, Анвару Шарафулисламовичу Мухтарову, Юлии Игоревне Журавлевой, Александру Александровичу Крутикову, Александру Николаевичу Ильину, Антону Валерьевичу Ермолаеву, Никите Сергеевичу Аксенину, Кире Валерьевне Уразаевой и всем сотрудникам кафедры неорганической химии и студентам и сотрудникам НИЛ координационных соединений Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ за оказанную помощь и поддержку.