

# **Водата като среда и катализатор при тавтомерни реакции**

## *Хабилитационен труд*

на гл.ас. д-р Надежда Василева Маркова  
група по теоретична химия, лаб. Структурен органичен анализ  
Институт по органична химия с център по фитохимия

За участие в конкурс за академичната длъжност "доцент" по професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Теоретична химия“, за нуждите на лаб. “Структурен органичен анализ“, Обявен в Държавен вестник: брой 79 от 08.10.2019 г.

София, 2019

Настоящият хабилитационен труд е изработен на базата на пет научни публикации от списък „В“ (7, 11, 17, 21 и 29), като в представения материал са под номера 78, 33, 39, 50 и 64. Списъкът с публикации „Г“ включва тринадесет статии с номера 6, 9, 10, 12-15, 18, 19, 22, 23, 30, 31.

## Увод

Прототропната тавтомерия е важна част от много химични реакции и процеси в живите организми [1]. Тавтомерията в органичните съединения е системно и задълбочено изследвана през последните три десетилетия поради нейното биологично значение и силна зависимост от природата на разтворителя. Изследванията на тавтомерното равновесие в структурните компоненти на ДНК и РНК днес представляват голям интерес [2-4]. Тавтомерията играе ключова роля в биологичните системи [5], от сдвояването на ДНК [6, 7] до регулирането на функцията и активността на различни ензими [8].

Отдавна е постулирано, че редки тавтомерни форми могат да бъдат включени в процеса на сдвояване на нуклеиновите бази при репликация на ДНК-медирана полимераза, което води до генетични мутации, докато в РНК рядко срещаните тавтомерни форми са предложени за подобряване на структурното и функционално разнообразие на РНК ензими и аптамери [9]. Според Watson и Crick [10], „спонтанната мутация може да се дължи на .... по-малко вероятни тавтомерни форми“. Тази идея е разработена от Toral и Fresco [11] които предполагат, че тези непредпочетени тавтомерни форми могат да присъстват при физиологични условия в много малки количества (от  $10^{-6}$  до  $10^{-5}$ ).

Солватацията е един от важните физични и химични фактори, отговорни за тавтомерното равновесие, тъй като повечето биохимични реакции протичат в разтвор. В литературата са предложени редица теоретични методи за моделиране на взаимодействията разтворено вещество-разтворител [12-15]. Ефектите на разтворителя обикновено се моделират чрез квантово-химични подходи, основани на теорията на реакционното поле на Onsanger [16]. Те са включени в *ab initio* схемите като самосъгласувани модели на реакционни полета. Най-простият модел на реакционно поле използва сферична кухня. Моделът на непрекъснатата поляризационна среда (PCM), разработен от Tomasi и сътрудници [17] и неговите модифицирани версии IPCM и SCIPCM използват т.н. кухня около разтворената молекула, която се определя от набор от припокриващи се сфери на атомите, с приблизително определени радиуси (напр. с 20% по-големи от стандартните радиуси на van der Waals). Потенциалът на енергетичната повърхност може да бъде изчислен чрез числово или аналитично диференциране, като взаимодействията разтворител-разтворено вещество отчитат отделно взаимната поляризация на разтворителя и разтвореното вещество. Всички тези методи моделират разтворителя като диелектрична непрекъсната среда.

Най-популярният сред тези методи, методът PCM, успешно се прилага за тавтомерни системи [18-23]. По отношение на относителната стабилност на тавтомери във воден разтвор, този метод дава резултати, които въпреки някои несъответствия са в съгласие с експерименталните данни. Методът дава възможност за квантово-химично описание на разтвореното вещество в непрекъснатата среда на разтворителя при изчислителни разходи малко по-високи от изискваните при изчисляване в газова фаза. Въпреки това, важните ефекти, свързани със специфичните взаимодействия разтворител-разтворено вещество се пренебрегват, особено в описанието на механизма за пренос на протон в системи с водородни връзки. Разтворителят може да контролира динамиката на реакцията на пренос на протони чрез два различни типа взаимодействия разтворител-разтворено вещество. Първия тип са поляризационни взаимодействия с

разтворителя, действащи на големи разстояния, а вторите са специфични взаимодействия, отчитащи водородни връзки на близки разстояния. Във втория случай протонните разтворители, например вода, могат да приемат протон от донорната част на разтворената молекула и да прехвърлят свой протон към акцепторната част в разтворената молекула. По този начин разтворителят влияе върху целия реакционен път чрез понижаване на енергетичната бариера, поради директното участие на молекулата(ите) на разтворителя в преноса на протони. В този случай молекулите на разтворителя действат като катализатор.

Първата теоретична статия, описваща катализата на тавтомерен процес посредством една водна молекула, е публикувана преди 38 години [24]. Оттогава теоретичната химия обръща специално внимание на ролята на молекулите на разтворителя в тавтомерните и солволитичните процеси. Днес в литературата е показано, че водата е важна като катализатор, улесняващ преноса на протони. В много протеини водородните атоми се прехвърлят по права линия на разстояния от около 10-50 Å между различни аминокиселинни остатъци по така наречените „протонни жици“ [25]. Функцията на водните молекули е да приемат и отдават протони. Такъв механизъм за предаване по протежение на протонните проводници обикновено се нарича механизъм на Grotthuss. Друга възможност протоните да бъдат пренасяни е образуването на псевдоциклична структура. Такива механизми, наричани „подпомогнат от вода пренос на протон“, „бифункционална водна катализа“, „подпомагана от вода хидратация“ или „реле-протонен пренос“, са използвани в много органични и неорганични реакции.

Изследванията върху механизма на подпомогнат от вода пренос на протон показват, че присъствието на водна молекула значително понижава енергетичните бариери при реакции с пренос на протон [26-29]. От друга страна, електростатичното взаимодействие на разтворената молекула с разтворител, представен от модела на непрекъснатото поляризационно поле, влияе само слабо на активационните бариери на реакциите на подпомогнат пренос на протон [30]. Разумен подход към този проблем е предложен от Adamo и Barone [31, 32]. Подходящ брой молекули на разтворителя, които директно взаимодействат с конкретна част(и) от молекулата на разтвореното вещество, се отчитат експлицитно посредством квантово-химични методи, докато останалата част от молекулите на разтворителя се разглежда като непрекъсната среда. В този комбиниран дискретен/SCRF модел са включени както взаимодействията на близки разстояния, така и поляризационното влияние на далечните взаимодействия с разтворителя.

Настоящият труд обобщава научните приноси от теоретичното изследване на термодинамичните и кинетичните аспекти на реакциите на протонен пренос, без и с отчитане на водата като катализатор в структурни компоненти на ДНК и РНК и техни производни, както и Шифови бази с вътрешно-молекулни водородни връзки. Ефектите на разтворителя са разгледани на високо теоретично ниво. Вниманието е фокусирано върху влиянието на водородното свързване и на електростатичното взаимодействие на разтворителя върху относителната стабилност на тавтомерите и механизма на реакциите с пренос на протон.

В тази връзка основните научни приноси са свързани с:

- Механизъм на органични реакции, по-специално на процесите с пренос на протон
- Изясняване на структурата на органичните съединения чрез теоретични подходи

За да се оцени влиянието на водата върху тавтомерното превръщане, са изследвани три основни групи съединения и е изяснен механизмът на реакции на протонен пренос:

<b>I. Производни на нуклеинови бази</b> 1. 5-флуороурацил и неговите аниони 2. 5-азурацил и 6- азурацил	<u>Подпомогнат от вода пренос на протон</u>
<b>II. Нуклеозиди</b> 1. Гуанозин и неговия аналог ацикловир 2. Инозин	
<b>III. Салицилиденанилини</b>	<u>Директен пренос на протон</u>

## I. Тавтомерни равновесия при производни на нуклеиновите бази

### 1. 5-флуороурацил и неговите аниони във вода [33]

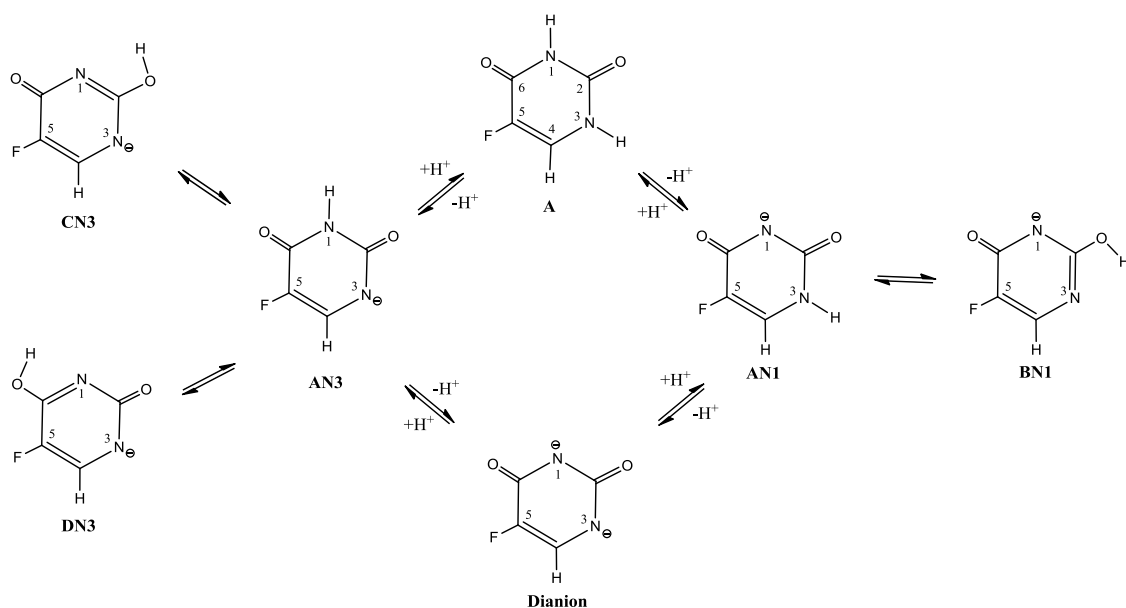
5-заместените пиримидини представляват клас биологично важни производни на нуклеобазите. Замяната в урацил на водороден атом на позиция 5 с флуор води до получаването на 5-флуороурацил (5FU), антинеопластичен агент. По този начин се въвежда допълнителен хетероатом, който е потенциален акцептор при образуването на водородна връзка и значително променя електронните свойства на молекулата [34, 35]. Във воден разтвор това може да предизвика значителни промени във физичните и биологичните му свойства. Йонизационните константи ( $pK_a$ ) на нормалните ДНК бази се различават с около 2-3 рН единици от физиологичното рН, предсказвайки, че йонизираните форми могат да съществуват с няколко порядъка по-често от редките тавтомерни форми. Поведението на 5FU във воден разтвор при различни стойности на рН дава важна информация за неговата роля при контрола на приема на противотуморното лекарство.

Изследвано е тавтомерното равновесие в аниони на 5FU (AN1 и AN3) и техните тавтомерни форми във вода и е сравнено с тавтомерното превръщане в неутралната молекула. Влиянието на водните молекули върху тавтомерните реакции между различните форми е изследвано чрез механизъм, при който се пренасят няколко протона. С помощта на *ab initio* квантови-химични изчисления и ЯМР спектроскопия за първи път се изследват заредени и незаредени структури на 5FU, присъстващи при различни стойности на рН във воден разтвор. За да се изследва превръщането между двете тавтомерни форми (оксо и хидрокси) и двата аниона на диоксо формата N1 и N3 е използвана нормална раманова и SERS спектроскопия, поради нейната висока чувствителност [37, 38]. За да се разграничат коректно различните форми на 5FU, са проведени *ab initio* квантово-химични изчисления на вибрационните честоти в газова фаза и четири хидратиран клъстер на различните форми на 5FU с помощта на програмния пакет GAMESS (US) [36].

Влиянието на разтворителя върху тавтомерното превръщане на 5-флуороурацил и неговите аниони се разглежда чрез модела на супермолекулата по механизъм, при който се осъществява пренос на няколко протона. Според стойностите, получени от нашите изчисления за свободните енергии ( $\Delta G_{298}$ ) на ниво CCSD(T)/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p), най-стабилен е комплексът на 2,4-диоксо формата А, последван от хидратираната хидрокси форма В (7.34 kcal mol<sup>-1</sup>) и D (7.51 kcal mol<sup>-1</sup>).

Поради тези разлики количествата на структурите В и D са съответно  $4.2 \times 10^{-4} \%$  и  $3.1 \times 10^{-4} \%$  и тези форми би трябвало да съществуват съвместно с тавтомер А във воден разтвор при неутрално рН. Реакционната бариера на реакцията  $A \rightarrow B$ , изчислена на ниво CCSD(T)/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p) възлиза на  $17.63 \text{ kcal mol}^{-1}$ , което я прави с  $0.54 \text{ kcal mol}^{-1}$  по-ниска от тази на реакцията с пренос на протон  $A \rightarrow D$ . Съгласно получените стойности за скоростната константа ( $k=10^{-1}-10^1$ ), реакцията катализирана от водни молекули би трябвало да протече.

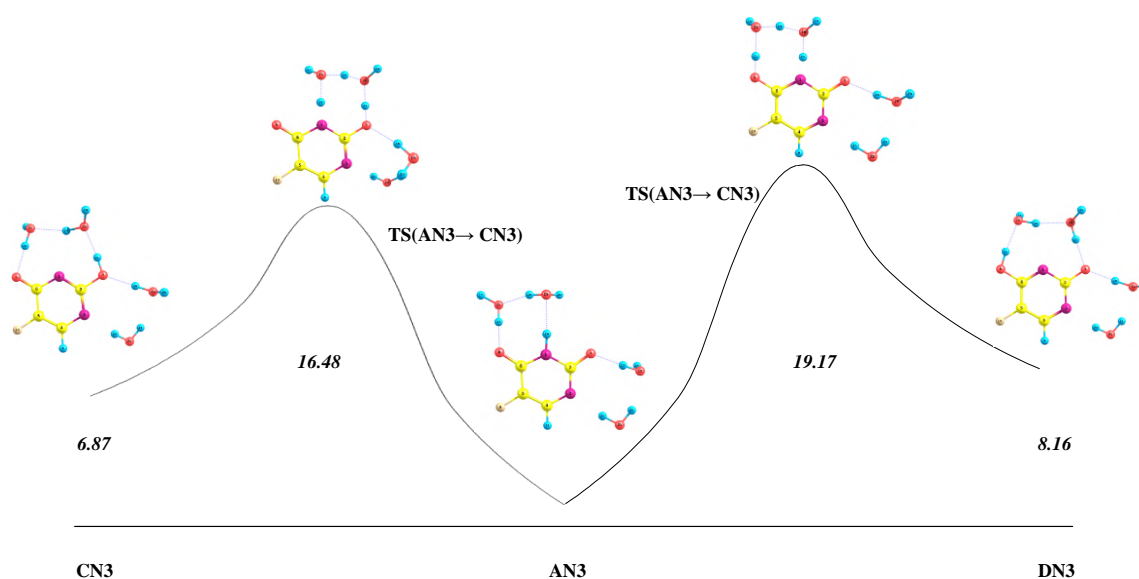
Депротонирането на най-стабилната 2,4-диоксо тавтомерна форма, А, на 5FU може да се осъществи на две възможни места чрез образуване на два аниона: AN1 и AN3. Анион AN1 теоретично може да съществува в две тавтомерни форми (AN1 и BN1), докато AN3 - в три тавтомерни форми (AN3, CN3 и DN3), показани на Фиг. 1.



Фигура 1. Структури на двата възможни аниона на 5-флуорурацил (AN1 и AN3), техните тавтомерни форми и дианион.

Според стойностите за свободните енергии, изчислени на ниво CCSD(T)/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p), анион AN3 е по-стабилен от AN1 в газова фаза и във воден разтвор съответно с  $10.41$  и  $5.31 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Относителната стабилност, изчислена на ниво CCSD(T), показва, че формите CN3 и DN3 са съответно  $9.2 \times 10^{-4} \%$  и  $1.0 \times 10^{-4} \%$ . Тези стойности са сравними с изчислените за тавтомерите на 5FU, В ( $4.2 \times 10^{-4}$ ) и D ( $3.1 \times 10^{-4}$ ). Тавтомер BN1 не се разглежда, тъй като би могъл да се образува от енергетично несприемливия AN1. По този начин се изследват тавтомерните равновесия само на моноанион AN3:  $AN3 \rightarrow DN3$  и  $AN3 \rightarrow CN3$ .

Тъй като двете енергетични бариери са близки (Фиг. 2), съществува възможност за две паралелни реакции. Подобно на неутралната форма на 5FU, изчислените скоростни константи на  $AN3 \rightarrow CN3$  ( $k = 5.16 \text{ s}^{-1}$ ) и  $AN3 \rightarrow DN3$  ( $k = 5.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) са достатъчно големи, за да могат да генерират концентрация на редки хидроксидни анионни тавтомерни форми, достатъчни за да възпроизведат точкови мутации с голяма честота. И двете изследвани реакции с пренос на протон се осъществяват по съгласуван механизъм.



Фигура 2. Енергийен профил на реакциите на тавтомерно превръщане на моноанион AN3 на 5FU ( $\text{DN3} \leftarrow \text{AN3} \rightarrow \text{CN3}$ ), изчислен на ниво CCSD(T)/6-31+G(d,p)/MP2/6-31+G(d,p). Относителните свободни енергии и активационни бариери са дадени в kcal mol<sup>-1</sup>.

Когато протича тавтомерно превръщане с пренос на повече от един протон, в същото време се променят и междуатомните разстояния в областта на протонния трансфер, т.е. процесът става кооперативен. От механистична гледна точка това означава, че съгласуваният троен протонен пренос се осъществява асинхронно, в една стъпка, без никакви междинни продукти.

За да се установят структурните промени в молекулата на 5FU, вследствие на промяна в рН, са проведени NBO анализ, изчисления на Раманови активности и ЯМР химични отмествания. Бяха направени и <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, и <sup>13</sup>C ЯМР спектри във воден разтвор при рН = 6.9-13.8. Въз основа на ЯМР спектроскопските данни, получени за 5FU във воден разтвор при алкално рН, се предполага наличие на смес от анионни тавтомерни форми, предвидени от нашите теоретични изчисления. Теоретичните и експерименталните данни, получени за неутрални и депротонирани йони (AN1 и AN3) на 5-FU позволяват да се заключи, че депротонирането при алкално рН би трябвало да протече при N3. Следователно е възможно съвместното съществуване на различни тавтомерни форми на AN3 във воден разтвор при рН = 7.8-10.

## 2. 5-азаурацил и 6-азаурацил във воден разтвор [39]

За изследване на тавтомерното равновесие и механизма на реакциите с пренос на протон в разтвор е приложен хибриден модел на базата на комбинация от методи на молекулната динамика и квантовата химия. По този начин се изучава по-задълбочено механизма на подпомаганите от разтворителя процеси на протонен пренос.

Прилага се следната процедура:

- **Първи етап** - Геометриите на възможните тавтомерни и ротамерни форми се оптимизират на *ab initio* квантово-химично ниво.

- **Втори етап** - Тавтомерните и ротамерни форми с най-ниска енергия се използват като изходни структури в Монте Карло (МК) симулации за определяне на центровете на молекулите, които могат да се свързват към молекулите на разтворителя чрез водородни връзки. За да се генерира обкръжаваща среда около тавтомерната или ротамерна структура в разтвор, се провеждат серия от МК симулации. При всяка МК симулация се счита, че тавтомерната (ротамерна) молекула е заобиколена от няколкостотин молекули разтворител в куб с дължина на страната 25 Å. По този начин може да бъде конструирана първата солватна обвивка - струпване на няколко молекули разтворител около разтворената молекула.

- **Трети етап** - Получената с помощта на МК симулации структура от клъстери е оптимизирана на *ab initio* квантово-химично ниво. В същото време се локализира и преходна структура и се определя енергетичната бариера на реакцията с пренос на протон. Близките взаимодействия (short-range) между молекулите на разтвореното вещество и разтворителя се отчитат чрез междумолекулни водородни връзки. В този модел разтворителят играе ролята на катализатор в реакцията на вътрешномолекулен пренос на протон.

- **Четвърти етап** – Създава се по-сложен модел, при който се отчитат и далечните взаимодействия (long-range), т.е. електростатичният ефект на разтворителя също се взема предвид. Следва нова оптимизация на получените клъстери в непрекъсната среда от разтворителя. По този начин се получава по-пълна картина на процеса, тъй като се отчитат както близките, така и далечните взаимодействия на разтворителя с молекулите на разтвореното вещество.

Подходът, описан по-горе, първо беше приложен при теоретичното изследване на тавтомерията при 5-азаурацил и 6-азаурацил във воден разтвор.

Азааналозите на нуклеобазите представляват особен интерес поради тяхната биологична и фармакологична активност. Заместване на СН-групите с азотен атом в ароматния пръстен на урацил е една от възможните структурни модификации, при която се получават негови азааналози - 5- и 6-азаурацили (Фиг. 3). През годините интензивно се изследва биологичната активност на азааналозите на урацил. Описано е, че 5- и 6-азаурацилите притежават противоракови, антидепресантни, хипнотични, антиалергични, антиастматични, анксиолитични и антикоксидни свойства [40].

5-азаурацил (1,3,5-триазин-2,4(1H,3H)-дион, 5-AU) се счита за потенциално противотуморно средство. Експерименталните изследвания [41-44], проведени в газова фаза, твърдо състояние или в разтвор, показват, че amino-оксо тавтомерът на 5-азаурацил е най-стабилната форма. Интерпретацията на ИЧ, УВ и ЯМР-спектрите на 5-AU е нееднозначна и резултатите не са категорични.

6-азаурацил (1,2,4-триазин-3,5(2H,4H)-дион, 6-AU) е широко изследвано противотуморно лекарство. Много експериментални и теоретични изследвания са свързани с неговите структурни, химични и спектроскопски свойства [45-47]. Въпреки това, няма проучвания за тавтомерни превръщания в разтвор (особено във вода) на неутрални азаурацили. Тъй като има открития, че 6-азаурациловите производни на 4,5-дидехидро-5,6-дидеоокси-L-аскорбиновата киселина притежават изразена цитостатична активност срещу някои злокачествени туморни клетъчни линии, идеята за тавтомерно превръщане при такива съединения придобива съществено значение [48]. ,

Обект на изследване е тавтомерията при 5- и 6-азаурацилите в присъствието на водни молекули. Разглежда се ефектът на хидратация, използвайки подхода на супермолекулата, при който четири водни молекули, образуващи два клъстера, са прикрепени към тавтомерите на азаурацил. За да избегнем необходимостта да се

разчита само на „класическата химическа интуиция“, ние прилагаме хибриден модел на базата на комбинация от методи на статистическата физика и квантовата химия. Двуетапният подход се основава на последователна симулация на Metropolis Monte Carlo (ММК), последвана от анализ на моделите на взаимодействие между разтворител и разтворено вещество и последващо квантово механично (КМ) изследване на процеса на образуване на клъстер, под влиянието на водата като разтворител. Хидратацията, при която водата играе ролята на среда се описва от метода на самосъгласуваното реакционно поле (SCRF), като се използва моделът на проводимата непрекъсната поляризуема среда (С-PCM) [49].

За изследване на тавтомерията в 5-AU и 6-AU се изчисляват относителните свободни енергии на Gibbs на диоксо А и различни хидроксидни тавтомери В-Е (Фиг. 3) на азаурацилите в газова фаза и във воден разтвор. Изчислените енергии на петте възможни изследвани тавтомера показват, че в газова фаза на ниво MP2/6-31+G(d,p) диоксо формата А на 5-AU и 6-AU е най-стабилната, последвана от хидроксидна форма D. Следващите по стабилност форми на 5-AU са Е и В, докато редът в който се подреждат тавтомерите на 6-AU по своята стабилност е  $A > D > C > B > E$ . Влиянието на водата като среда се отчита с метода С-PCM на ниво MP2/6-31+G(d,p). Редът на енергетичната стабилност не се променя за 6-AU, докато тавтомерът В става по-стабилен от Е в реда на относителната стабилност на тавтомерите на 5-AU.

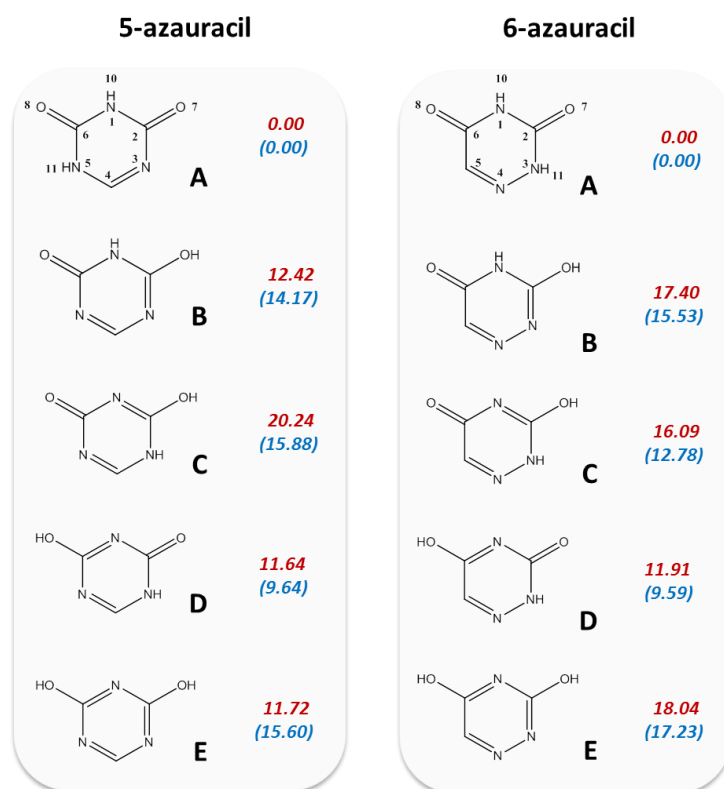
С помощта на хибриден модел на базата на комбинация от методи на статистическата физика и квантовата химия е разгледана възможността за подпомогнат от водни молекули междумолекулен пренос на протон на 5- и 6-азаурацил. Влиянието на разтворителя е отчетено чрез експлицитно включване на две двойки водни молекули, моделиращи първата хидратна обвивка около разтворената молекула. Позицията на тези водни молекули първоначално се оценява чрез извършване на класическа опростена ММК симулация от разреждени водни разтвори на азаурацилите и впоследствие анализиране на междумолекулните взаимодействия разтворител-разтворено вещество в генерираните чрез Monte Carlo конфигурации. Към симулацията на статистическата физика последователно са приложени *ab initio* квантово-химични методи.

Ефектът на водата като разтворител (на *ab initio* ниво) е разгледан чрез два различни модела - с помощта на клъстери разтворител-разтворена молекула (четири-водни молекули) и същите клъстери, поставени в непрекъсната среда от разтворител. Пълните геометрични оптимизации на структурите на тези комплекси са направени на нива MP2/6-31+G(d,p) и С-PCM/MP2/6-31+G(d,p). На теоретично ниво CCSD(T)/6-31+G(d, p)//MP2/6-31+G(d,p) са проведени еднократни изчисления за получаване на точни енергии.

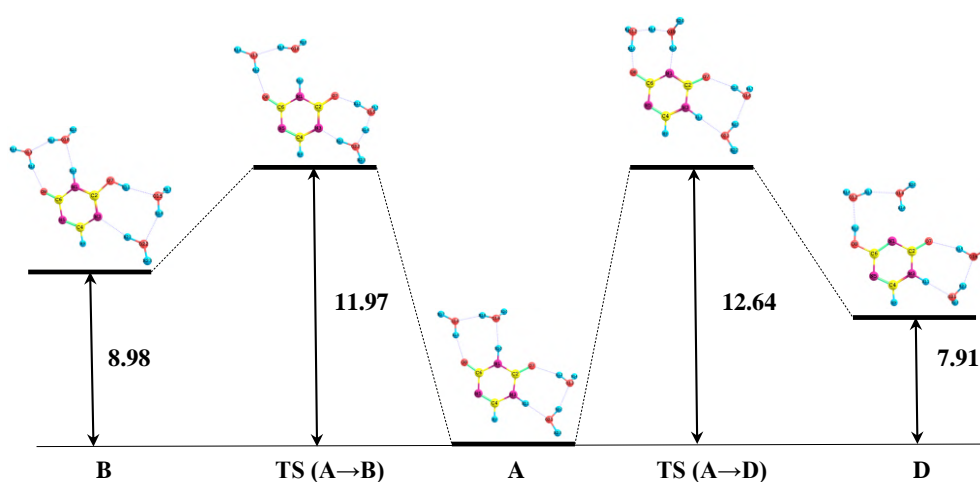
Според нашите изчисления хидратираният азаурацил би трябвало да съществуват в три форми: основна диоксо форма и две хидроксидни форми. Изчислените активационни енергии на протонния пренос за тавтомерните реакции при 5-азаурацил (Фиг. 4) и 6-азаурацил (Фиг. 5) показват различни картини за тези две съединения.

Според резултатите, получени на теоретично ниво С-PCM/MP2/6-31+G(d,p), подпомогнатият от вода пренос на протон при 5-азаурацил се осъществява посредством две паралелни реакции: 1,3,5-триазин-2,4(1H, 3H)-дион  $\rightarrow$  6-хидроксид-1,3,5-триазин-2(1H)-он и 1,3,5-триазин-2,4(1H, 3H)-дион  $\rightarrow$  4-хидроксид-1,3,5-триазин-2(1H)-он.

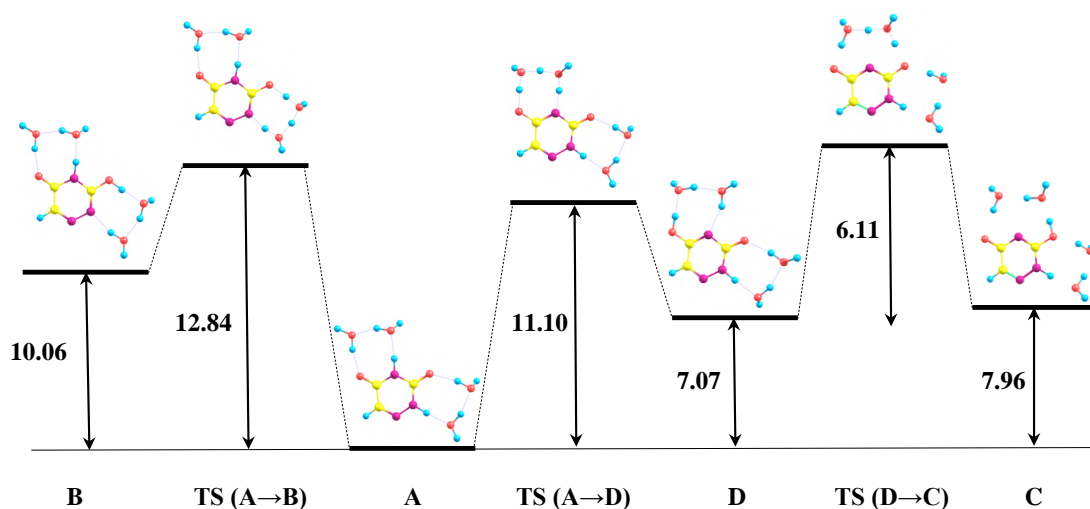




Фигура 3. Възможни тавтомерни форми на 5-азаурацил и 6-азаурацил, както и изчислените на ниво MP2/6-31+G(d,p) енергетични разлики ( $\Delta G_{298}$ ) между тавтомерите и най-стабилната диоксо форма в kcal mol<sup>-1</sup> в газова фаза и в разтвор (в скоби).



Фигура 4. Енергетични разлики ( $\Delta G_{298}$ ) и бариери ( $\Delta G_{298}^{\#}$ ) (kcal mol<sup>-1</sup>) на тавтомерни реакции при 5-азаурацил, изчислени на ниво C-PCM/MP2/6-31+G(d,p).



Фигура 5. Енергетични разлики ( $\Delta G_{298}$ ) и бариери ( $\Delta G_{298}^{\#}$ ) kcal mol<sup>-1</sup>) на тавтомерни реакции при 6-азаурацил, изчислени на ниво C-PCM/MP2/6-31+G(d,p).

Енергетичните бариери на реакциите на подпомогнат от водни молекули пренос на протон, за двете паралелни реакции  $A \rightarrow B$  и  $A \rightarrow D$  на 6-AU (Фиг. 5) са близки, но ситуацията е различна от тази при 5-AU. Реакцията  $A \rightarrow D$  е предпочетена от кинетична и термодинамична гледна точка, в сравнение с  $A \rightarrow B$ . Скоростната константа  $k$  на реакцията  $A \rightarrow D$  е  $4.53 \times 10^4$  s<sup>-1</sup> и е с порядък по-висока от тази на реакцията  $A \rightarrow B$  ( $2.4 \times 10^3$  s<sup>-1</sup>). В същото време тавтомер D е с 2.99 kcal mol<sup>-1</sup> енергетично по-изгоден от тавтомер B. Тъй като бариерата на реакцията  $D \rightarrow C$  е само 6.11 kcal mol<sup>-1</sup> (Фиг. 5) и съответната скоростна константа  $k$  е  $2.06 \times 10^8$  s<sup>-1</sup>, е по-вероятно във воден разтвор да протекат две последователни реакции: 1,2,4-триазин-3,5 (2H, 4H) - дион,  $A \rightarrow$  5-хидрокси-1,2,4-триазин-3(2H) - он, D и 5-хидрокси-1,2,4-триазин-3(2H)-он,  $D \rightarrow$  3-хидрокси-1,2,4-триазин-5(2H)-он, C и хидрокси тавтомери D и C би трябвало да съществуват съвместно с тавтомер A.

В изследваните реакции подпомогнатият от водни молекули пренос на протон в 5- и 6-азаурацили се осъществява по съгласуван механизъм.

## II. Тавтомерно равновесие в нуклеозиди

### 1. Гуанозин и неговия аналог ацикловир във воден разтвор [50]

Подходът на супермолекула + непрекъсната среда се прилага за втори път за по-пълно изследване на тавтомерия при нуклеозиди - гуанозин и неговия аналог ацикловир. Трябва да се подчертае, че във всички публикувани досега работи за нуклеозидни и нуклеотидни кристални структури са наблюдавани само каноничните тавтомерни форми на нуклеиновите бази. Въпреки това, няколко тавтомерни форми на пуриновия пръстен могат да бъдат теоретично формулирани както за гуанин [51, 52], така и за гуанозин [53, 54]. Възможността за тавтомерно превръщане в 2'-дезоксигуанозин е изследвана [55], но не и в гуанозин.

Гуанозин (Gs), гуанинов нуклеозид е основен компонент на повечето видове РНК. От ИЧ спектрите на моно- и дихидратираните клъстери на Gs [56] е установено,

че съществуват множество структурни изомери както в моно-, така и в дихидратите на Gs и че вътрешномолулната водородна връзка на мономера на Gs се запазва във всички хидрати.

2-Амино-1,9-дихидро-9-((2-хидроксиетоксил)метил)-6Н-пурин-6-он или ацикловир (ACV) е антивирусно лекарство, аналог на гуанозин [57, 58]. ACV е широко изследван от фармацевтична и медицинска гледна точка. Въпреки това са публикувани само няколко изследвания, свързани с молекулната му структура. Тавтомерното равновесие в ACV, включващо кето и енолни форми, е наблюдавано с УВ абсорбционна спектроскопия [59]. Това равновесие зависи от полярността на разтворителя и следователно във воден разтвор преобладава кето формата, докато в разтвор на метиленхлорид е енолната [59, 60].

Ефектът на водата като разтворител при тавтомерното превръщане на ACV придобива съществено значение. Разтворимостта във вода е важно молекулно свойство за успешното разработване на лекарства, тъй като е ключов фактор, регулиращ транспорта на лекарството до биологичните мембрани. Според Faller и Ertl [61], основната причина за неточно изчисляване на параметъра на хидрофобността ( $\log P$ ) е използването на неправилни структури на тавтомерните форми в изчисленията. Поради „тавтомерния проблем“ някои от структурите, лекарства като ACV, могат да съществуват в десетки енергетично близки тавтомерни форми. В някои случаи формата, присъстваща в базата данни (и следователно използвана за изчисляване на свойствата) не съответства на формата, която действително присъства в лекарствената опаковка.

### 1.1. Гуанозин

Изчислените енергии на тавтомерите на гуанозин (Фиг. 6) в газова фаза показват, че 2-амино-6-(sZ)-хидрокси тавтомер (Gs-B1) и 1H-2-амино-6-оксо тавтомер (Gs-A) са почти изоенергетични, но тавтомерът Gs-B1 е по-стабилен с  $0,26 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Енергетичната разлика между ротамерите 2-амино-6-(sZ)-хидрокси (Gs-B1) и 2-амино-6-(sE)-хидрокси (Gs-B2) е същата, като разликата между Gs-B1 и Gs-A. Количествата на тези три структури според изчислената им относителна стабилност възлизат съответно на 43.26% за Gs-B1 и 27.89 и 28.85% за Gs-A и Gs-B2. Въпреки това, във воден разтвор, където разтворителят е представен като непрекъсната среда, би трябвало тавтомерът Gs-A да бъде най-стабилната форма и енергетичната разлика между Gs-A и Gs-B1 е  $4.42 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Изчисленото количество на Gs-A нараства до 99.93%, докато това на Gs-B1 намалява до 0.06%.

Изследвани са различни конформации на рибозния пръстен в тавтомерната структура Gs-A на гуанозин [62] и е установено, че конформацията на разглеждания захарен остатък е близка до експерименталната, наблюдавана в естествената РНК. В твърдо състояние гуанозинът съществува в 1H-2-амино-6-оксо тавтомерна форма, Gs-A [54]. Нашите изчисления на ниво MP2/6-31+G(d,p) предсказват структура на гуанозин, близка до експериментално установената.

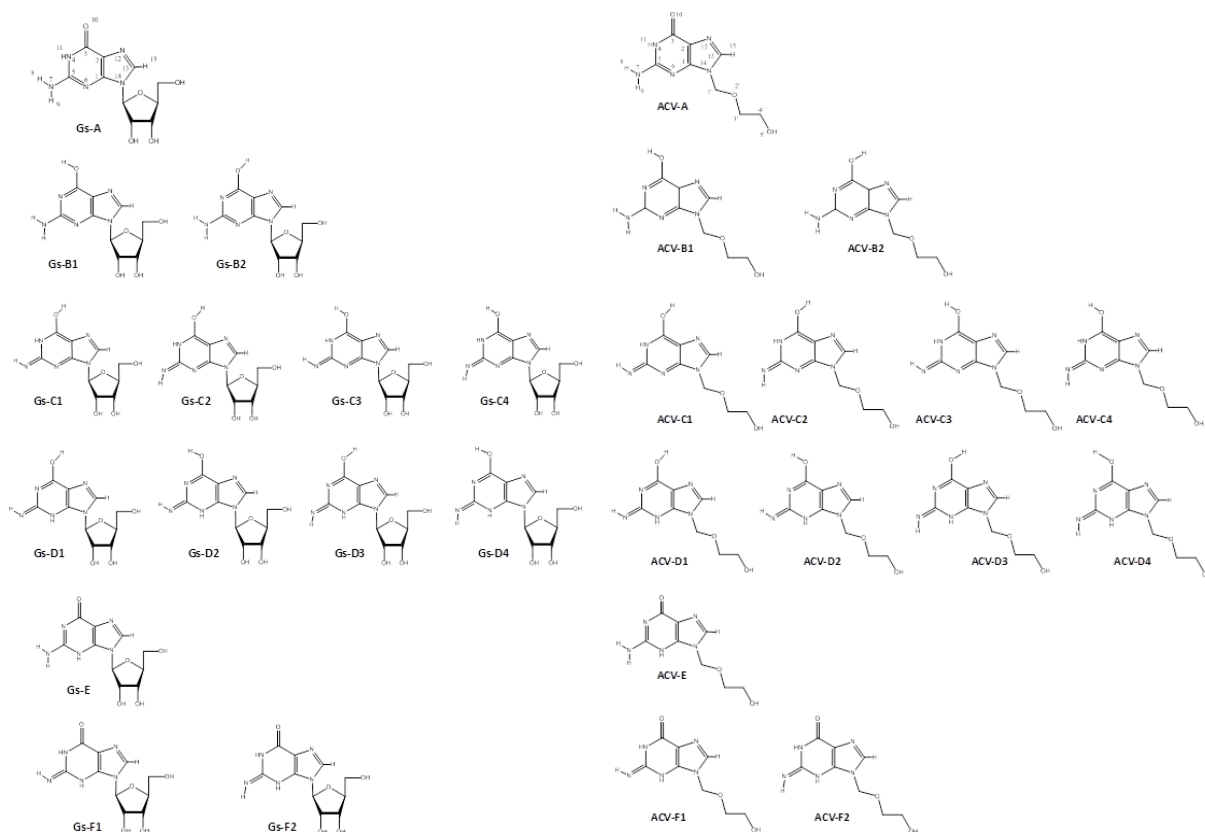


Figure 6. Тавтомерни и ротамерни форми на гуанозин и ацикловир с номерация на гуаниновия фрагмент.

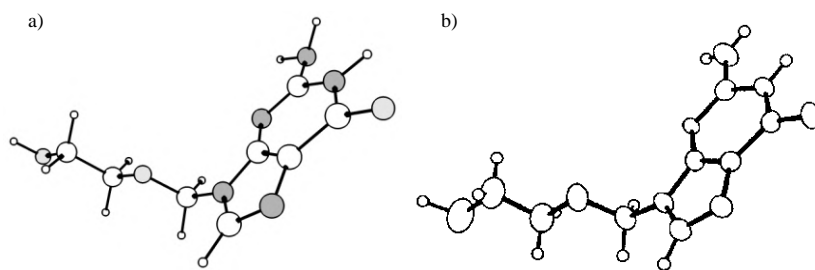
## 1.2. Ацикловир

Според теоретичното проучване на ACV [60] най-стабилна е структурата, съответстваща на amino-оксо тавтомер ACV-A, последвана от ротамер на amino-хидрокси тавтомера ACV-B1 (37.7%) и ротамер ACV-B2 (14.3%). Останалите тавтомери са в нищожно количество, по-малко от 0.05%. Получените от нас резултати са сходни и показват, че в газова фаза и във воден разтвор най-стабилна е 1H-2-амино-6-оксо форма ACV-A, последвана от 2-амино-6-(sZ)-хидрокси форма, ACV-B1. Когато се разглеждат изолирани молекули, енергетичната разлика между ACV-A и ACV-B1 е малка ( $0.36 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), подобно на разликата в енергията между двата тавтомера на гуанозин. Според изчисленията населености, количеството на amino-оксо тавтомер ACV-A е 55.83% и 2-амино-6-(sZ)-хидрокси формата ACV-B1 (30.41%) преобладава над ACV-B2 (13.76%).

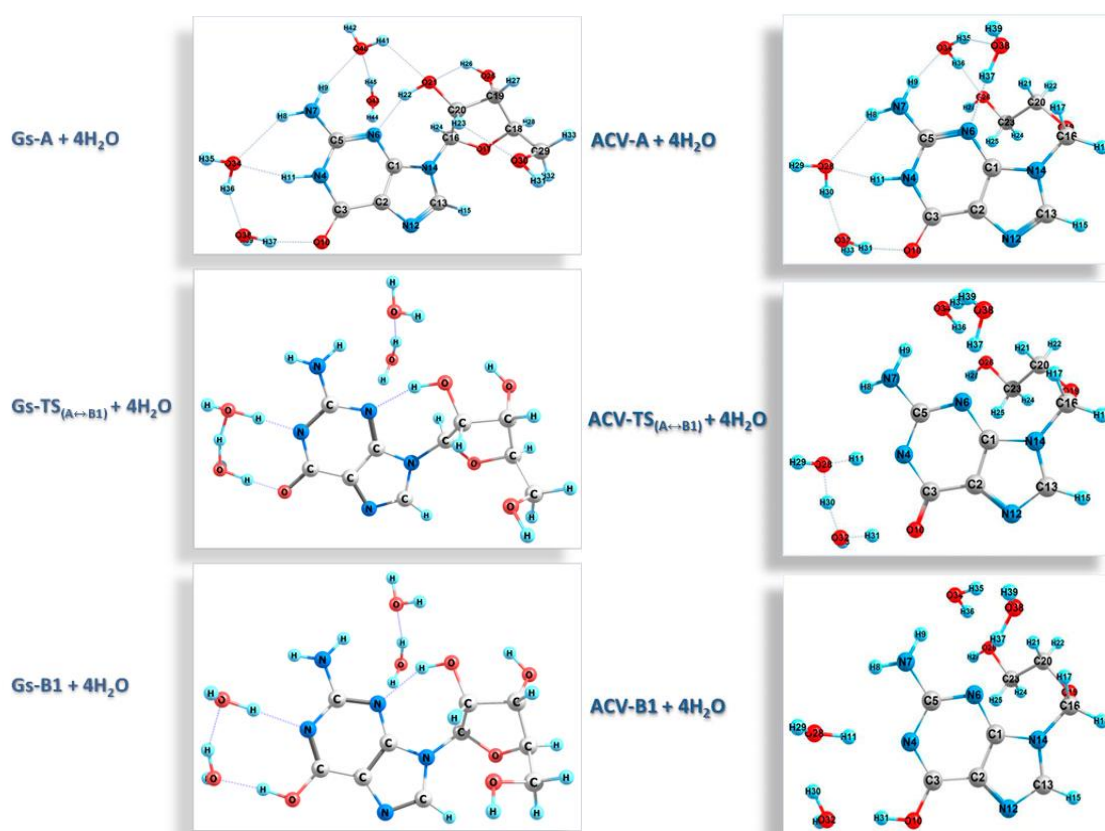
Отчитайки ефекта на водата само като диелектрична среда в модела на C-PCM на ниво MP2, енергетичната разлика между 1H-2-амино-6-оксо и 2-амино-6-(sZ)-хидрокси формите значително се увеличава. Разликата в енергиите между ACV-A и ACV-B1 се увеличава 15 пъти и става  $5.43 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Количеството на amino-оксо тавтомерът преобладава над двете amino-хидрокси форми и съотношението става ACV-A: ACV-B1: ACV-B2 = 99.98: 0.01:  $9.8 \times 10^{-3}\%$ .

Според кристалографските данни [63] и конформационния анализ [60] в твърдо състояние се наблюдава само една тавтомерна форма на ацикловир, ACV-A. Появяват се три вида структури за ацикловир по отношение на страничната верига, която е свързана към N14. Докато в първите две молекули връзките са в предпочитаната гош-конформация, в третата връзките в страничната верига са в транс-конформация, което

води до почти зиг-заг разположение в равнината. Нашите резултати за геометричните параметри на тавтомерна форма ACV-A, изчислени на ниво MP2/6-31+G(d,p) са почти до зиг-заг-конформация на молекулата (Фиг. 7).



Фигура 7. Структура на тавтомерната форма А на ацикловир, получена чрез оптимизация на ниво MP2 (a) и рентгенова дифракция (b) [63].

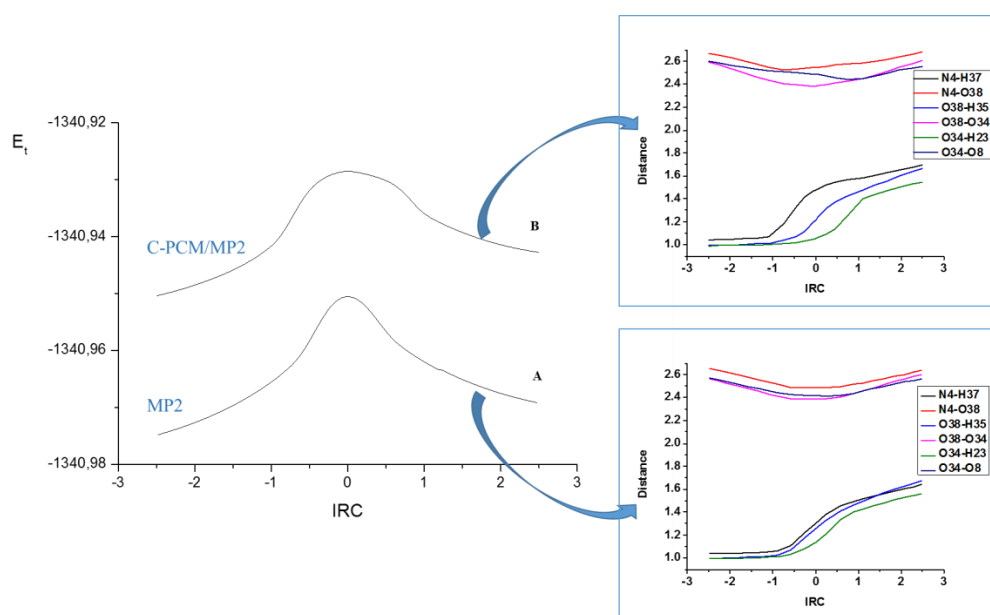


Фигура 8. Структури на хидратирани тавтомерни форми А и В1 на Gs и ACV и съответната преходна структура, изчислени на ниво MP2/6-31+G(d,p).

Влиянието на разтворителя беше симулирано по описаната по-горе процедура чрез експлицитно включване на водни молекули, моделиращи първата хидратна обвивка около молекулата на разтвореното вещество. Позицията на тези водни молекули беше уточнена чрез класическа симулация на Metropolis Monte Carlo на разреждени водни разтвори на гуанозин (Gs) и ацикловир (ACV) и впоследствие анализ на междумолекулните взаимодействия разтворител-разтворено вещество в статистически независими конфигурации, генерирани от МК. Механизмът на подпомогнат от водните молекули пренос на протон е изследван и с помощта на два различни *ab initio* подхода. В първия от тях на ниво MP2/6-31+G(d,p) са разгледани

близките взаимодействия между водните молекули и разтвореното вещество в образуваните клъстери (Фиг. 8), докато при втория модел – клъстерите са поставени в непрекъсната среда на разтворител, C-PCM/MP2/6-31+G(d,p) и са отчетени както близките, така и далечните взаимодействия с молекулите на разтворителя.

Установено е, че в газова фаза и във воден разтвор 1Н-2-амино-6-оксо формата е най-стабилната тавтомерна структура за гуанозин и ацикловир, последвана от 2-амино-6-(sZ)-хидрокси формата. Енергетичните бариери на реакцията на подпомогнат от вода пренос на протон при гуанозин и ацикловир са много близки –  $11.74 \text{ kcal mol}^{-1}$  за гуанозин и  $11.16 \text{ kcal mol}^{-1}$  за ацикловир и съответните скоростни константи ( $k = 1.5 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ , гуанозин и  $k = 4.09 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ , ацикловир) са достатъчно големи, за да генерират 2-амино-6-(sZ)-хидрокси тавтомер. Времето, необходимо за достигане на 99,9% от равновесната концентрация между тавтомерните форми 1Н-2-амино-6-оксо, А и 2-амино-6-(sZ) –хидрокси, В1, е изчислено да бъде  $\tau_{99,9\%} = 3.53 \times 10^{-5} \text{ s}$  за Gs и  $\tau_{99,9\%} = 1.2 \times 10^{-6} \text{ s}$  за ACV.



Фигура 9. IRC профил на реакцията на подпомогнат от вода протонен пренос при гуанозин  $\text{Gs-A} \rightarrow \text{Gs-B1}$ , изчислен на ниво MP2/6-31+G(d,p) (профил А) и C-PCM/MP2/6-31+G(d,p) (профил В). Представени са и изменененията на междуатомните разстояния в четири хидратирани комплекси на гуанозин по хода на реакционната координата, изчислени на нива MP2 и C-PCM/MP2. Пълната енергия е представена в а.у., разстоянията са в Å и IRC - в  $\text{amu}^{1/2} \text{ bohr}$ .

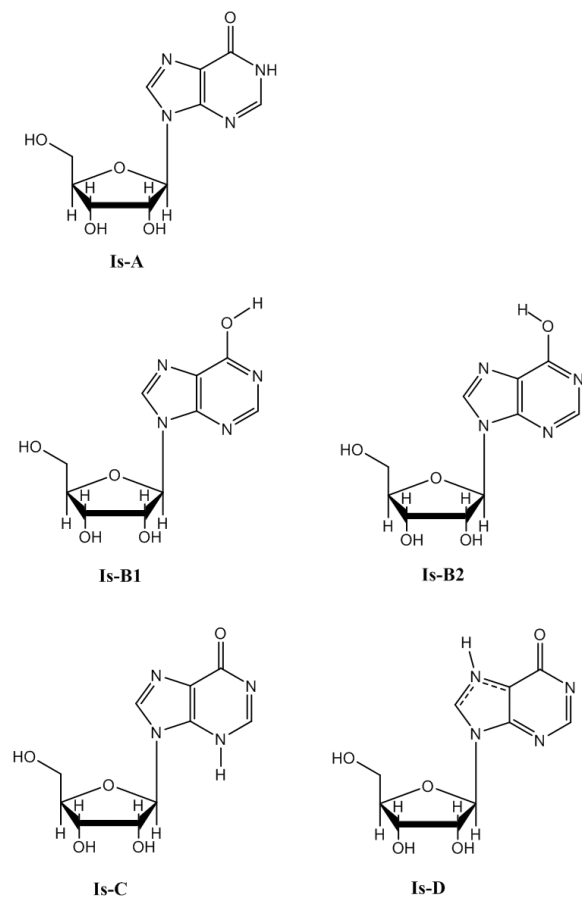
След като стационарните точки по повърхността на потенциалната енергия са локализирани се проследява пътят на реакцията по вътрешната реакционна координата в права и обратна посока, стартирайки от преходната структура TS (Фиг. 9). Тези изчисления гарантират, че е намерен правилният реакционен път, свързващ реагента и продукта от двете страни на TS. Когато са отчетени само близките взаимодействия на разтворителя на ниво MP2/6-31+G(d,p) (крива А, Фиг. 9), процесът е кооперативен и от механистична гледна точка това означава, че преносът на протон се осъществява в една стъпка без междинни продукти. Профилът на реакцията е различен, когато разгледаме втория, по-усложнен изчислителен модел - оптимизиране на клъстера с четири водни молекули в диелектрична водна среда, т.е. C-PCM/MP2/6-31+G(d,p) (крива В, Фиг. 9).

Анализът на реакционните профили и в двете съединения показва, че процесите на пренос на протон протичат по асинхронен съгласуван механизъм.

### 1. Инозин във воден разтвор [64]

Инозин, 9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-дихидрокси-5-(хидроксиметил)оксолан-2-ил]-3Н-пурин-6-он е пуринов нуклеозид, съдържащ хипоксантин, свързан чрез N9 с C1 ( $\beta$ -N<sub>9</sub>-гликозидна връзка) от рибозния пръстен. Той е междинен продукт при разграждането на пурини и пуринови нуклеозиди до пикочна киселина. Инозин обикновено се намира в tRNA и е от съществено значение за правилната трансляция на генетичния код в нуклеобазите.

Тавтомерията при инозин е разгледана в няколко статии [65-67]. Според направени спектри на инозин във воден разтвор в областта 2000-200 cm<sup>-1</sup>, след лазерно възбуждане в аргон, инозин съществува предимно в кето форма. В твърдо състояние инозин кристализира в три различни кристални форми [68]. Две от тях са моноклинни, а една - орторомбичната форма. Местоположението в кристала на протона при N1 потвърждава amino-оксо тавтомер А (Фиг. 10) или така наречената 6-кето форма за двете молекули.



Фигура 10. Тавтомерни и ротамерни форми на инозин

Много теоретични работи са посветени на конформационната изомерия на структурните компоненти на ДНК и РНК [69-71], но малко изследвания са свързани с инозин. Прототропната тавтомерия при хипоксантин, като продукт на дезаминирането на аденин в ДНК, е изследвана за изясняване на неговото мутагенно действие [69]. Теоретично инозин може да съществува под формата на пет тавтомерни форми, структурите на които са оптимизирани на теоретични нива MP2 и B3LYP и е направен

цялостен конформационен анализ на най-стабилния кето тавтомер [72]. Установено е, че най-малко представеният тавтомер (Fig. 10, Is-D) в газова фаза е най-предпочетената форма в поляризуема водна среда, поради това, че има най-голям диполен момент. Тъй като тавтомерията при нуклеобазы и нуклеозиди е изследвана в газова фаза, апротонни разтворители или във възбудено състояние, получените резултати не са приложими за структурните компоненти на ДНК и РНК. При тези условия тавтомерните равновесия са в голяма степен изместени и съотношението между основните и по-слабо представените тавтомерни форми е изменено, дори и при каноничните нуклеобазы [73]. Изследването на тавтомерията във воден разтвор е по-трудно, тъй като водните молекули играят ролята и на медиатори в тавтомерните процеси. В резултат на това се увеличава скоростта на достигане до тавтомерно равновесие и присъствие на малки количества от тавтомерни форми [50]. Тъй като тавтомерията при инозин във вода не е достатъчно изследвана, изясняването на възможността за подпомогнат от вода пренос на протон придобива съществено значение. В реални среди, особено важни за биомедицинските науки, такъв процес протича във воден разтвор със значително и неизбежно влияние на разтворителя.

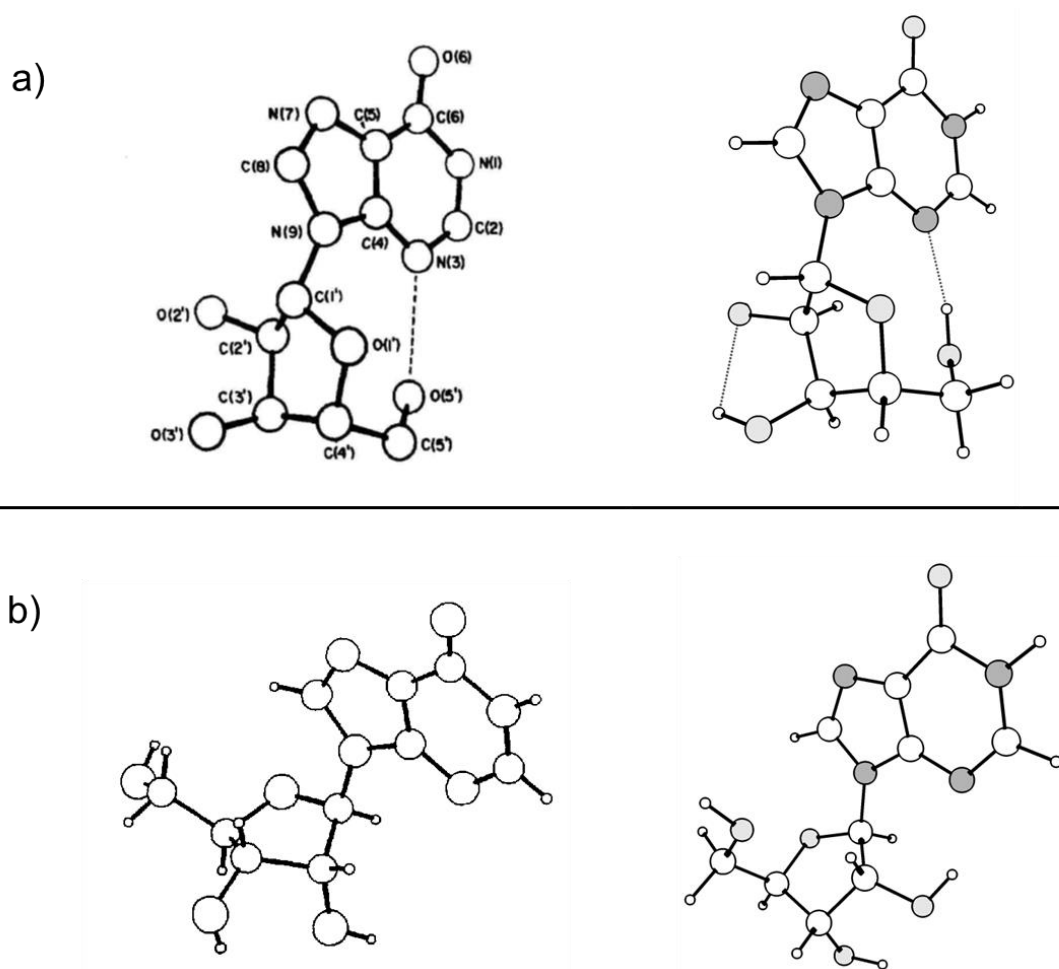
Подобно на други нуклеозиды (гуанозин, аденозин) в инозин са възможни няколко тавтомерни форми. Четири тавтомерни форми, три amino-оксо (A, C и D) и една imino-хидрокси (B), са показани на Фиг. 10. Тавтомерът B има два ротамера: B1 и B2. За пълното описание на конформацията на инозин трябва да се вземат предвид пет структурни параметъра. Структурата на тавтомер A е дефинирана, следвайки номерацията на Saenger (Фиг. 11). Основният параметър е гликозидният торзионен ъгъл,  $\chi(C4-N9-C1'-O1')$ , който определя позицията на нуклеобазата в равнината по отношение на рибозата.

Двете основни конформации, получени след ротация около този ъгъл, са *anti* и *syn*. Екзоцикличните торзионни ъгли  $\gamma(C3'-C4'-C5'-O5')$  и  $\beta(C4'-C5'-O5'-H5')$  описват ориентацията на групите C5'-O5' и O5'-H5' по отношение на фуранозния пръстен. Тавтомерите A, C и D и ротамерите B1 и B2 имат по два конформера. Тъй като инозин може да има различен брой конформации, нашите изходни геометрии са избрани въз основа на конформерите, наблюдавани в кристалните структури.

Относителните свободни енергии на Gibbs за *syn*- и *anti*-конформерите на тавтомерите на инозин бяха изчислени на ниво MP2/6-31+G(d,p). Проведени са допълнителни еднократни изчисления на ниво SCS-MP2/6-31+G(d,p).

Получените стойности за енергиите на тавтомерите на инозин в газовата фаза показват, че *syn*-конформерът на тавтомер A е най-стабилен, последван от неговия *anti*-конформер (енергетичната разлика между двата конформатора е 1.11 kcal mol<sup>-1</sup>) и тавтомер *syn*-B1 (2.07 kcal mol<sup>-1</sup>). Разликата в енергиите между ротамери *syn*-B1 и *syn*-B2 е 1.12 kcal mol<sup>-1</sup>. Количеството на тези структури според изчислената им относителна стабилност възлиза на 83,97% за *syn*-A, 12.86% *anti*-A, 2.54% *syn*-B1, 0.38% *syn*-B2, 0.35% *anti*-B1 и 0.08% *anti*-B2. Изчислената енергетична бариера на ротация на фуранозния пръстен около гликозидната връзка N9-C1 е ниска: 4.89 kcal mol<sup>-1</sup>. Вероятна паралелна реакция, вътрешномолекулен протонен пренос *syn*-A → *syn*-B1 не би трябвало да протече, тъй като изчислената енергетична бариера е твърде висока: 36.08 kcal mol<sup>-1</sup>. Изчисленията на ниво SCS-MP2/6-31+G(d,p) показват сходни в качествено отношение резултати.





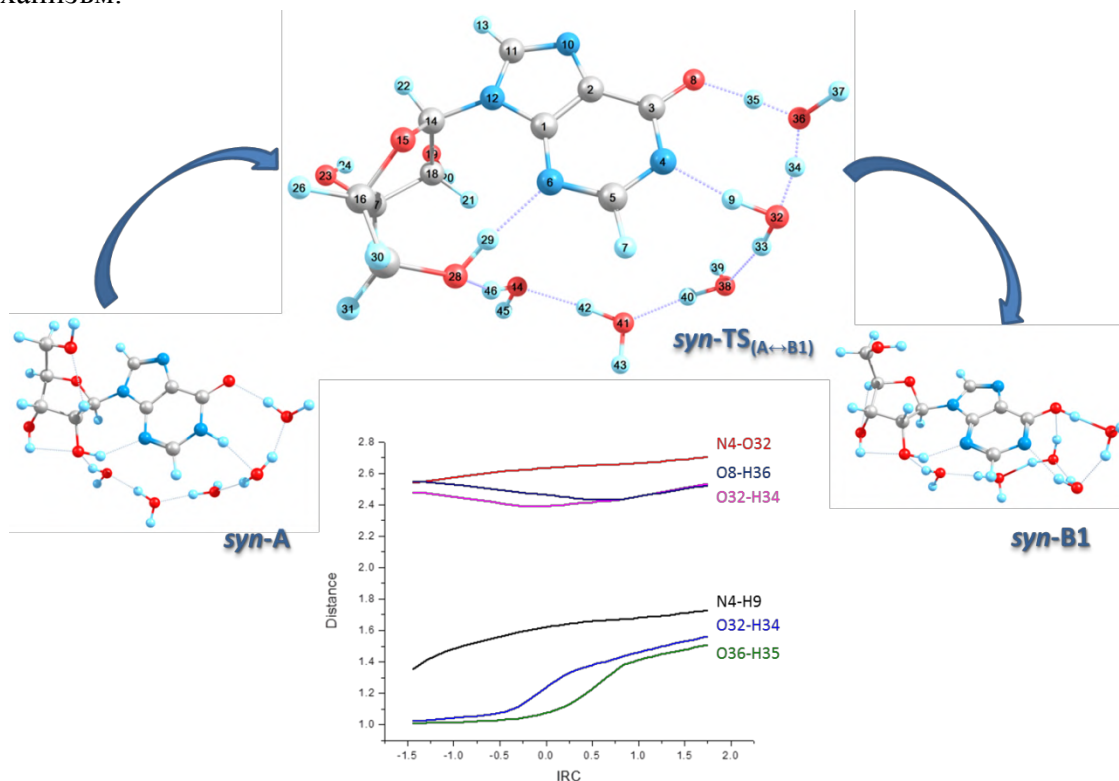
Фигура 11. Структура на тавтомерната форма А на инозин: (а) *syn*-конформер и (б) *anti*-конформер. Структурите на двата конформера (*syn*-форма по [74] и *anti*-форма по [75]) са получени от рентгеново-структурен анализ и са представени вляво. Оптимизираниите от нас на ниво MP2 структури са показани вдясно. Пунктираните линии изобразяват вътрешномолекулните Н-връзки.

*Syn*- и *anti*-коформерите на amino-оксо тавтомера А са изолирани в кристална форма из воден разтвор [74, 75]. Изчислените дължини на връзките са в съответствие с наличните експериментални данни и за двата конформера на А.

Изчислени са относителните свободни енергии на Gibbs на тавтомерите на инозин във воден разтвор, като разтворителят се разглежда като непрекъсната среда, характеризираща се с макроскопичната си диелектрична проникваемост. Разликата в енергиите на двата конформера на тавтомер А нараства до  $5.75 \text{ kcal mol}^{-1}$ , а разликата между *syn*-конформерите на тавтомери А и В1 е изчислена да бъде  $6.37 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Количествата на тези три структури възлизат на 99.99% *syn*-А,  $6.1 \times 10^{-3}\%$  *anti*-А и  $2.1 \times 10^{-3}\%$  *syn*-В1. Изчислената енергетична бариера на ротация *syn*-А  $\rightarrow$  *anti*-А се увеличава до  $8.60 \text{ kcal mol}^{-1}$ , т.е. тя е с 57% по-висока, в сравнение с тази в газова фаза. Практически идентични резултати се получават, когато се вземе предвид енергията, получена на ниво C-PCM/SCS-MP2/6-31+G(d,p).

Подпомогнатият от вода пренос на протон в инозин е изследван с помощта на *ab initio* MP2 и SCS-MP2 квантово химични подходи. Изследвани са клъстери, съдържащи молекула инозин и пет водни молекули, поставени в среда от разтворител, разглеждана

като поляризуема непрекъсната среда (CPCM/MP2/6-31+G(d,p)). Установено е, че енергетичната бариера на подпомогнатата от водни молекули реакция с пренос на протон за инозин е  $12.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  и скоростната константа ( $k = 6.68 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ ) е достатъчно голяма, за да генерира 6-енол тавтомер. Анализът на реакционния профил показва (Фиг. 12), че процесът на пренос на протон протича по асинхронен съгласуван механизъм.



Фигура 12. Структури на петхидратираните тавтомерни форми *syn-A* и *syn-B1* на инозин и съответната преходна структура, изчислени на ниво CPCM/MP2/6-31+G(d,p) и изменения на избрани междуатомни разстояния (в Å) по хода на реакционната координата (в  $\text{amu}^{1/2} \text{ bohr}$ )

Спектроскопските методи за изследване на тавтомерия на структурните компоненти на ДНК и РНК във воден разтвор имат някои ограничения. Вибрационните спектроскопии (IR и Raman) са чувствителни към идентифициране на тавтомерни форми на нуклеобазы и нуклеозиди във водни разтвори. Приложението на инфрачервената спектроскопия във воден разтвор обаче е ограничено, поради абсорбция на разтворителя в областта от  $1800$  до  $1500 \text{ cm}^{-1}$ . По-информативни вибрационни спектри на инозин във вода биха могли да бъдат получени чрез Раманова спектроскопия [76], тъй като водата показва много слабо раманово разсейване в областта  $2000\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$ .

Изчислени са ИЧ честоти, интензивностите и рамановата активност на конформерите на инозин (*syn* и *anti*) за тавтомери А и В в газова фаза и вода. Разгледан е ефектът на хидратацията върху IR и Рамановите спектри на инозин. Изчисленията са направени на ниво CPCM/MP2/6-31+G(d,p) с помощта на подход, при който клъстерът, включващ молекули вода и инозин, е вграден в полярна среда (вода). Клъстери, включващ пет водни молекули, образуващи верига между C=O групата от хипоксантиновата част и OH групата от рибозния пръстен, са прикрепени към тавтомерите А и В на *syn*- и *anti*-конформерите на инозин. Според нашите резултати има добро съвпадение между теоретични и експериментални данни. Не е намерена

ивица  $\nu_{\text{O-H}}$  за енолна форма В в експерименталните инфрачервени и раманови спектри на инозин във вода. Според теоретичните спектри на *syn*- и *anti*-конформерите на тавтомер В във воден разтвор тази линия се предвижда да бъде отместена (поради образуване на водородна връзка с молекули на водата) при  $2920\text{ cm}^{-1}$ .  $\nu_{\text{C-H}}$  на рибозния пръстен беше изчислена да бъде около  $2930\text{ cm}^{-1}$  и се припокрива с  $\nu_{\text{O-H}}$ , но интензивността на тези ивици е различна. Следователно, в експерименталните ИЧ и Раманови спектри на инозин във вода липсват данни за присъствие на хидроксиден тавтомер, но според нашите теоретични прогнози по отношение на кинетиката на тавтомерното превръщане на инозин във вода, енолната форма В би трябвало да бъде представена в разтвора.

Покажахме [33, 39, 50, 77], че ако изчислените енергетични бариери на подпомогнатите от вода реакции на протонен пренос са в диапазон  $12\text{--}17\text{ kcal mol}^{-1}$ , то тавтомерните превръщания са кинетично осъществими процеси. Откриването на редките тавтомерни форми на структурни единици на НК чрез спектроскопски методи не е възможно, като вероятно изключение би могла да бъде флуоресцентната спектроскопия [77].

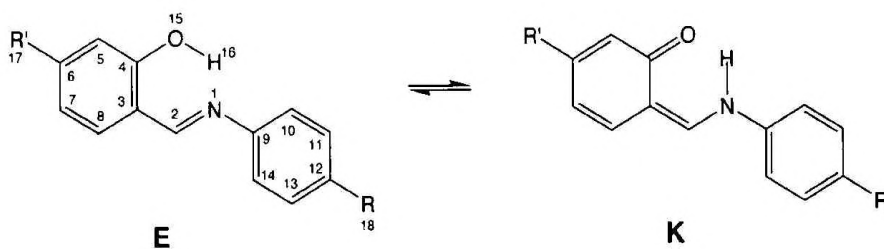
### III. Кето-енолна тавтомерия при салицилиденанилини [78]

Разгледаните досега случаи са примери за междумолекулни тавтомерни превръщания, в които молекулите на разтворителя (вода) участват не само като среда, но и в ролята си на катализатор. В тази част ще бъде разгледан случай на вътрешномолекулен пренос на протон, при който разтворителят ще бъде отчетен само като непрекъсната среда.

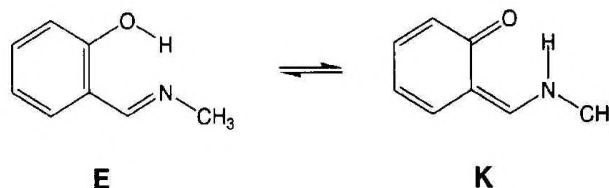
Шифовите бази са основна тема на фундаментални изследвания, които към днешна дата имат важно място в органичната химия и попадат в различни области на изследване. Те имат различни биологични приложения като противотуморни средства, за укрепване на имунния отговор при рак, при левкемия, при ХИВ, като антиконвулсанти, антибактериални, противогъбични, противовъзпалителни средства, като предлекарства и като модели за изследване във вътрешномолекулна водородна връзка. Те представляват интерес също поради своите солватохромни, термохромни и фотохромни свойства с приложения в технологиите за оптично записване, молекулярната електроника и фотониката [79].

Шифовите бази, производни на ароматните *o*-хидроксиалдехиди, са клас съединения, които са получили внимание благодарение на интересните си линейни и нелинейни оптични свойства, биологична активност и технологични приложения. При салицилиденанилините и сродни Шифови бази, обикновено наричани анили, реакция на вътрешномолекулен пренос на протон между енол-имин (Е) и кето-амин (енаминон) (К) може да протече както в разтвор, така и в кристално състояние (Фиг. 13а). Тази реакция може да бъде предизвикана или от светлина, или от топлина и дори може да протече в биологична среда. Свързаните фото- и термохромизми правят салицилиденанилиновите съединения интелигентни материали, които могат да се използват като молекулни превключватели.

(a) 4,4'-substituted *N*-salicylideneanilines



(b) salicylidenemethylamine



Фигура 13. Енол (Е) и кето (К) тавтомерни форми на Шифови бази с вътрешномолекулна водородна връзка: (а) *N*-салицилиденианилин ( $R = H$ ,  $R' = H$ ), **1**; *N*-салицилиден-4-бромоанилин ( $R = Br$ ,  $R' = H$ ), **2**; 4'-амино-*N*-салицилиден-4-бромоанилин ( $R = Br$ ,  $R' = NH_2$ ), **3**; 4'-амино-*N*-салицилиден-анилин ( $R = H$ ,  $R' = NH_2$ ), **4**; 4'-амино-*N*-салицилиден-4-нитроанилин ( $R = NO_2$ ,  $R' = NH_2$ ), **5**; 4'-циано-*N*-салицилиден-анилин ( $R = H$ ,  $R' = CN$ ), **6**; *N*-салицилиден-4-формил-анилин ( $R = CHO$ ,  $R' = H$ ), **7**; 4'-хидрокси-*N*-салицилиден-анилин ( $R = H$ ,  $R' = OH$ ), **8**; *N*-салицилиден-4-аминоанилин ( $R = NH_2$ ,  $R' = H$ ), **9** (b) салицилиденметиламин, **10**.

При Шифови бази с вътрешномолекулни Н-връзки, производни на ароматни *o*-хидроксикарбонилни алдехиди, кондензирани с първични амини (Фиг. 13), формата Е обикновено е най-стабилната. Термодинамичните характеристики и промяната на заместителите оказват влияние върху другите молекулни свойства на съединенията: абсорбционни и емисионни спектри, вибрационни характеристики, както и върху линейни и нелинейни оптични (НЛО) свойства. Изследвани бяха няколко групи НЛО свойства на заместените салицилиденианилини и по-специално техните вариации при преминаване от една в друга тавтомерна форма. Кето-енолното тавтомерно равновесие и по-специално кето-аминното/енол-иминното равновесие е изследвано при серия от заместени салицилиденианилини с оглед създаването на съединения с голям контраст на хиперполяризуемостите от първи порядък  $\beta$ .

Равновесието  $E \leftrightarrow K$  за съединения 1-9, както и моделното съединение 10, салицилиденметиламин е изследвано подробно на различни изчислителни нива: HF, B3LYP, MP2 и MP4//MP2 с базисни набори 6-31G(d,p) и 6-31+G(d,p). На всички теоретични нива тавтомер Е е най-стабилната форма. Като се има предвид съединение 10, използвайки стойността MP4//MP2 като референтна, подходът B3LYP подценява  $\Delta G_{298}$  с повече от 50%, докато методите HF и MP2 я подценяват с около 1 kcal mol<sup>-1</sup>. Според нашите резултати, Е формата е по-стабилна от К със съответно 8.11 kcal mol<sup>-1</sup> и 7.15 kcal mol<sup>-1</sup> на нива MP2/6-31G(d,p) и MP2/6-31+G(d,p). След еднократни изчисления на теоретични нива MP4/6-31G(d,p)//MP2/6-31G(d,p) и MP4/6-31+G(d,p)//MP2/6-31+G(d,p) енергетичните разлики се увеличават слабо, съответно: 8.19 kcal mol<sup>-1</sup> и 9.35 kcal mol<sup>-1</sup>. Когато се отчете влиянието на разтворителя (вода), като непрекъсната диелектрична среда и се вземат предвид далечните взаимодействия с молекулите на разтворителя, енергетичните разлики между Е и К формите намаляват драстично – 3.09

kcal mol<sup>-1</sup> и 2.17 kcal mol<sup>-1</sup> съответно на нива PCM/MP4/6-31G(d,p)//MP2/6-31G(d,p) и PCM/MP4/6-31+G(d,p)//MP2 /6-31+G(d,p).

Подобни изводи могат да бъдат направени и за енергетичната бариера на реакцията на тавтомерно превръщане [ $\Delta G_{298}^{\#}$  (права реакция)]. Бариерата на вътрешномолекулен протонен пренос намалява значително във воден разтвор на същите теоретични нива. Най-същественото намаление се наблюдава на ниво MP4 - повече от два пъти. Изключение прави методът HF, който го надценява с около 50%. Това надценяване не е изненадващо поради факта, че отчитането на електронната корелация е необходимо за прогнозиране на енергиите на активиране и че приносът на корелационната енергия обикновено е по-голям за преходните структури, отколкото за равновесните структури. Бариерата на обратната реакция е с отрицателна стойност на нива MP2 и B3LYP ако не се отчита ефектът на разтворителя. Ниската енергия на активиране за обратната реакция прави тавтомера К нестабилен и лесно би могъл да премине в Е форма. В този случай разтворителят не само стабилизира (относително) тавтомер К, но и намалява енергетичната бариера както на правата, така и на обратната реакция. Резултатите, получени за съединения 1-9 са подобни на тези за салицилиденметиламин.

Кето-енолното тавтомерно равновесие и по-специално кето-аминно/енол-иминно равновесие е изследвано за серия от заместени салицилиденанилини с оглед откриването на съединения с голям контраст на първите хиперполяризуемости. Различните съединения представят достатъчно голям контраст на хиперполяризуемостите от първи порядък  $\beta$  между тавтомерните форми Е и К, за да позволят тяхното определяне чрез измервания на НЛО от втори порядък (EFISH или HRS). Най-високи стойности са получени за тавтомер Е на структури, съдържащи донорен заместител в пара положение на салицилиденовия пръстен и акцепторен заместител в другия пръстен.

### **Заклучение:**

Ролята на водата не само като разтворител, но и като катализатор в подпомогнатите от нея тавтомерни превръщания на структурни единици на нуклеиновите киселини е съществена. При директния пренос на протон в молекулите на различни салицилиденанилини влиянието на водата като среда е също много силно. В първия случай енергетичните бариери на реакциите с пренос на протон намаляват драстично когато се отчитат близките взаимодействия на разтвореното вещество с молекулите на водата. Това се наблюдава и когато се приложи комбиниран подход за изследване на влиянието на разтворителя - моделирани са клъстери, образувани от молекула разтворено вещество и водни молекули, поставени в среда от разтворител, разглеждана като поляризуема непрекъсната среда. Този подход най-пълно описва всички взаимодействия с разтворителя – както близките, така и далечните. Когато се отчете влиянието на разтворителя (вода), като непрекъсната диелектрична среда при вътрешномолекулен пренос на протон в молекулите на различни салицилиденанилини, енергетичните разлики между двете тавтомерни форми, както и бариерите на протонен пренос намаляват драстично.

Анализът на реакционния профил на всички подпомогнати от вода тавтомерни превръщания показва, че процесът на пренос на протон в молекулите на нуклеобазы и нуклеозиди протича по асинхронен съгласуван механизъм, в един етап и без интермедиати.

## Перспективи

Моите научни изследвания ще продължат в няколко направления:

1. Реакционни механизми в органични системи
2. Изясняване на молекулна структура с помощта на квантово-химични методи
3. Тавтомерия в органичните съединения
4. Моделиране на процеси на образуване на пребиотични съединения

Следните изследователски интереси са свързани с проекти, на които съм ръководител:

1. „Разработване на халкони със силни антипаразитни свойства“, DNTS / Индия 01/5, 24.06.2013 г., BNSF

През третия етап на проекта, чрез квантово-химични и статистически изчисления за SAR анализ ще се извърши изследване на връзката между структурата и активността на халкони със силни антипаразитни свойства срещу *P. falciparum* (причиняващ малария).

2. „Изследване на химичния състав, антивирусната и антибактериална активност на екстракти от растението *Graptopetalum paraguayense* E. Walther (*Crassulaceae*)“, DN 19/16, 20.12.2017 г., BNSF

През последните години научните ми интереси са в една нова научна област - квантово-химични и докинг методи във фитохимията. Усилията ще бъдат насочени към определяне на активните компоненти от растението *Graptopetalum paraguayense* E. Walther и изследване на възможността за тяхното свързване към активните центрове на вирусни ензими.

В допълнение съм участник в Център за високи постижения „Национален център по мехатроника и чисти технологии“ BG05M2OP001-1.001-0008-C03, 2018-2023, WP1, раздел 1.2.1. Моделиране и разработване на материали за нелинейна оптика и оптоелектроника, оптични сензори.

## Използвана литература:

- [1] Raczynska, E.D., Kosińska, W., Ośmiałowski, B., Gawinecki, R. Tautomeric equilibria in relation to Pi-electron delocalization. Chemical Reviews. 2005, 105, 3561-612.
- [2] Srivastava, R. The Role of Proton Transfer on Mutations. Frontiers in Chemistry. 2019, 7.
- [3] Brovarets, O.O., Hovorun, D.M. How many tautomerization pathways connect Watson-Crick-like G\*·T DNA base mispair and wobble mismatches? J. Biomol. Struct. Dynam. 2015, 33, 2297-315.
- [4] Brovarets, O.O., Hovorun, D.M. Tautomeric transition between wobble A·C DNA base mispair and Watson-Crick-like A·C\* mismatch: Microstructural mechanism and biological significance. Phys. Chem. Chem. Phys. 2015, 17, 15103-10.
- [5] Martin, Y.C. "Let's not forget tautomers". J. Comput. Aided. Mol. Des. 2009, 23, 693–704.
- [6] Elguero, J. Tautomerism. In: Brenner's Encyclopedia of Genetics, Maloy, S., Hughes, K. Eds., Elsevier Inc., 2013, Vol. 7, pp. 18–22.
- [7] Katritzky, A.R., Hall, C.D., El-Gendy, B.E.-D.M., Draghici, B. Tautomerism in drug discovery. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2010, 24, 475–84.
- [8] Lin, Y.-I., Gao, J. Internal proton transfer in the external pyridoxal 5'-phosphate Schiff base in dopa decarboxylase. Biochemistry. 2010, 49, 84–94.
- [9] Singh, V., Fedeles, B.I., Essigmann, J.M. Role of tautomerism in RNA biochemistry. RNA. 2015, 21, 1-13.

- [10] Watson, J.D., Crick, F.H.C. Genetical Implications of the structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* 1953, 171, 964-7.
- [11] Topal, M.D., Fresco, J.R. Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature* 1976, 263, 285.
- [12] Tomasi, J., Persico, M. Molecular interactions in solution: An overview of methods based on continuous distributions of the solvent. *Chem. Rev.* 1994, 94, 2027-94.
- [13] J, C.C., G., T.D. Understanding chemical reactivity. In: *Solvent effects and chemical reactivity*, Tapia, O., Bertrán, J. Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1996, Vol. 17, pp. 1-80.
- [14] Cramer, C.J., Truhlar, D.G. Implicit Solvation Models: Equilibria, Structure, Spectra, and Dynamics. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2161-200.
- [15] Tomasi, J., Mennucci, B., Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 2005, 105, 2999-3093.
- [16] Onsager, L. Electric Moments of Molecules in Liquids. *Journal of the American Chemical Society.* 1936, 58, 1486-93.
- [17] Miertuš, S., Tomasi, J. Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes. *Chem. Phys.* 1982, 65, 239-45.
- [18] González, L., Mó, O., Yáñez, M. High-Level ab Initio Calculations on the Intramolecular Hydrogen Bond in Thiomalonaldehyde. *The Journal of Physical Chemistry A.* 1997, 101, 9710-9.
- [19] Raczynska, E.D., Darowska, M., Cyrański, M.K., Makowski, M., Rudka, T., Gal, J.-F., et al. Ab initio study of tautomerism and of basicity center preference in histamine, from gas phase to solution—comparison with experimental data (gas phase, solution, solid state). *Journal of Physical Organic Chemistry.* 2003, 16, 783-96.
- [20] Enchev, V., Ivanova, G., Stoyanov, N. Tautomeric and conformational equilibrium of 2-nitrosophenol and 9,10-phenanthrenequinonemonooxime: Ab initio and NMR study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM.* 2003, 640, 149-62.
- [21] Angelova, S., Enchev, V., Markova, N., Denkova, P., Kostova, K. Ab initio study of 2,4-substituted azolidines. I. Tautomerism. *Journal of Molecular Structure-Theochem.* 2004, 711, 201-7.
- [22] Alparone, A., Millefiori, A., Millefiori, S. Non-planarity and solvent effects on structural and polarizability properties of cytosine tautomers. *Chemical Physics.* 2005, 312, 261-74.
- [23] Blas, J.R., Luque, F.J., Orozco, M. Unique Tautomeric Properties of Isoguanine. *Journal of the American Chemical Society.* 2004, 126, 154-64.
- [24] Lledós, A., Bertrán, J. Lactam/lactim tautomeric interconversion mechanism of 2-pyridone in aqueous solution. *Tetrahedron Letters.* 1981, 22, 775-8.
- [25] Voth, G.A. Computer Simulation of Proton Solvation and Transport in Aqueous and Biomolecular Systems. *Accounts of Chemical Research.* 2006, 39, 143-50.
- [26] Wang, X.C., Nichols, J., Feyereisen, M., Gutowski, M., Boatz, J., Haymet, A.D.J., et al. Ab initio quantum chemistry study of formamide-formamidic acid tautomerization. *The Journal of Physical Chemistry.* 1991, 95, 10419-24.
- [27] Kim, N.-J. 2006, 27.
- [28] Ren, Y., Li, M., Wong, N.B. Prototropic tautomerism of imidazolone in aqueous solution: A density functional approach using the combined discrete/self-consistent reaction field (SCRf) models. *Journal of Molecular Modeling.* 2005, 11, 167-73.
- [29] Shchavlev, A.E., Pankratov, A.N., Shalabay, A.V. Theoretical studies on the intramolecular hydrogen bond and tautomerism of 8-mercaptoquinoline in the gaseous phase and in solution using modern DFT methods. *Journal of Physical Chemistry A.* 2005, 109, 4137-48.
- [30] Antonczak, S., Ruiz-Lopez, M.F., Rivail, J.L. Ab initio analysis of water-assisted reaction mechanisms in amide hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 3912-21.
- [31] Adamo, C., Barone, V. Intrinsic and Environmental Effects on Protomeric Equilibria in the Ground and Excited Electronic States of Biological Systems. In: *Properties and Chemistry of Biomolecular Systems*, Russo, N., Anastassopoulou, J., Barone, G. Eds., Springer Netherlands, Dordrecht, 1994, pp. 1-18.
- [32] Barone, V., Adamo, C. Density Functional Study of Intrinsic and Environmental Effects in the Tautomeric Equilibrium of 2-Pyridone. *The Journal of Physical Chemistry.* 1995, 99, 15062-8.

- [33] Markova, N., Enchev, V., Ivanova, G. Tautomeric equilibria of 5-fluorouracil anionic species in water. *J Phys Chem A*. 2010, 114, 13154–62.
- [34] Maynard, R.L. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. Occup Environ Med. 1997, 54, 69-.
- [35] Purser, S., Moore, P.R., Swallow, S., Gouverneur, V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society Reviews*. 2008, 37, 320-30.
- [36] Schmidt, M.W., Baldridge, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J.H., et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem*. 1993, 14, 1347-63.
- [37] Pavel, I., Cota, S., Cîntă-Pînzaru, S., Kiefer, W. Raman, surface enhanced raman spectroscopy, and DFT calculations: A powerful approach for the identification and characterization of 5-fluorouracil anticarcinogenic drug species. *Journal of Physical Chemistry A*. 2005, 109, 9945-52.
- [38] Sardo, M., Ruano, C., Castro, J.L., López-Tocón, I., Soto, J., Ribeiro-Claro, P., et al. Surface-enhanced Raman scattering of 5-fluorouracil adsorbed on silver nanostructures. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2009, 11, 7437-43.
- [39] Markova, N., Pejov, L., Enchev, V. A hybrid statistical mechanics - Quantum chemical model for proton transfer in 5-azauracil and 6-azauracil in water solution. *Int. J. Quant. Chem*. 2015, 115, 477-85.
- [40] Lakner, F.J., Xia, H., Pervin, A., Hammaker, J.R., Jahangiri, K.G., Dalton, M.K., et al. *Tetrahedron Lett*. 2005, 46, 5325-8.
- [41] Jonas, J., Horak, M., Piskala, A., Gut, J. *Coil. Czech. Chem. Comm.* . 1962, 27, 2754.
- [42] Pike, R.K. *Org. Magn. Res.* . 1976, 8, 224
- [43] Potter, B.S., Palmer, R.A., Withnall, R., Chowdhry, B.Z. *New J. Chem*. 1999, 1, 117-22.
- [44] Ajò, D., Casarin, M., Granozzi, G., Fragala, I. *Chem. Phys. Lett.* . 1981, 80, 188-91.
- [45] Al-Awadi, N.A., Ibrahim, Y.A., Dib, H.H., Ibrahim, M.R., George, B.J., Abdallah, M.R. *Tetrahedron* 2006, 62, 6214–21.
- [46] Habibi-Khorassani, M., Maghsoudlou, M.T., Ebrahimi, A., Kazemian, M.A., Zakarianejad, M. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* . 2009, 184, 2959–79.
- [47] Fulara, J., Nowak, M.J., Lapinski, L., Les, A., Adamowicz, L. *Spectrochim. Acta, Part A* 1991, 47, 595–613.
- [48] Wittine, K., Babić, M.S., Košutić, M., Cetina, M., Rissanen, K., Pavelić, S.K., et al. The new 5- or 6-azapyrimidine and cyanuric acid derivatives of l-ascorbic acid bearing the free C-5 hydroxy or C-4 amino group at the ethylenic spacer: CD-spectral absolute configuration determination and biological activity evaluations. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, 46, 2770-85.
- [49] Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G., Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem*. 2003, 24, 669-81.
- [50] Markova, N., Pejov, L., Stoyanova, N., Enchev, V. Hybrid MC/QC simulations of water-assisted proton transfer in nucleosides. Guanosine and its analog acyclovir. *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2017, 35, 1168-88.
- [51] Gorb, L., Leszczynski, J. Ab initio prediction of the geometry and IR frequencies of the mono- and dihydrated complexes of the oxo-amino-tautomers of guanine. *Int. J. Quant. Chem*. 1997, 65, 759-65.
- [52] Gorb, L., Leszczynski, J. Intramolecular proton transfer in mono- and dihydrated tautomers of guanine: An ab initio post Hartree-Fock study. *J. Am. Chem. Soc*. 1998, 120, 5024-32.
- [53] Guo, Z., Xue, J., Ke, Z., Phillips, D.L., Zhao, C. Influence of water hydrogen bonding on the reactions of arylnitrenium ions with guanosine: Hydrogen-bonding effects can favor reaction at the C8 site. *J. Phys. Chem. B*. 2009, 113, 6528-32.
- [54] Thewalt, U., Bugg, C.E., Marsh, R.E. The crystal structure of guanosine dihydrate and inosine dihydrate. *Acta Crystallogr B*. 1970, 26, 1089-101.
- [55] Kochina, O.S., Zhurakivsky, R.O., Hovorun, D.M. Impact of the tautomerisation of the nucleotide bases on the conformational properties of the nucleosides: Quantum-mechanical study using density functional method. *Rep. Nat. Acad. Sci. Ukraine*. 2008, 181-6.
- [56] Saigusa, H., Mizuno, N., Asami, H., Takahashi, K., Tachikawa, M. Ultraviolet spectroscopy and theoretical calculations of mono- and dihydrated clusters of the guanine nucleosides: Possibility of different hydration structures for guanosine and 2'-deoxyguanosine. *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 2008, 81, 1274-81.



- [57] Jiang, Y.-C., Feng, H., Lin, Y.-C., Guo, X.-R. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int. J. Oral. Sci.* 2016, 8, 1-6.
- [58] Avcioglu, M.V., Golcu, A. Synthesis of acyclovir metal complexes: Spectral, electrochemical, thermal, and DNA binding studies. *Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem.* 2015, 45, 581-90.
- [59] Plass, M., Kristl, A., Abraham, M.H. Spectroscopic investigation of the tautomeric equilibria in the guanine derivatives of acyclovir. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1999, 2641-6.
- [60] Alvarez-Ros, M.C., Alcolea Palafox, M. Conformational analysis, molecular structure and solid state simulation of the antiviral drug acyclovir (Zovirax) using density functional theory methods. *Pharmaceuticals.* 2014, 7, 695-722.
- [61] Faller, B., Ertl, P. Computational approaches to determine drug solubility. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2007, 59, 533-45.
- [62] Zhurakivsky, R.O., Hovorun, D.M. Guanosine conformational possibilities: the DFT quantum chemical investigation. *Physics of the Alife.* 2007, 15, 24-34.
- [63] Birnbaum, G.I., Cygler, M., Shugar, D. Conformational features of acylclonucleosides: Structure of acyclovir, an antiherpes agent. *Can. J. Chem.* 1984, 62, 2646-52.
- [64] Markova, N., Enchev, V. Tautomerism of Inosine in Water: Is It Possible? *The Journal of Physical Chemistry B.* 2019, 123, 622-30.
- [65] Miles, H.T. Tautomeric forms in a polynucleotide helix and their bearing on the structure of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1961, 47, 791-802.
- [66] Medeiros, G.C., Thomas Jr, G.J. On the tautomeric structure of inosine. *Biochim. Biophys. Acta* 1971, 238, 1-4.
- [67] Evans, F.E., Sarma, R.H. The tautomeric form of inosine in aqueous solution. *J. Mol. Biol.* 1974, 89, 249-53.
- [68] Subramanian, E. Inosine (hypoxanthine riboside) C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>. *Cryst. Struct. Commun.* 1979, 8, 777-85.
- [69] Brovarets, O.O., Hovorun, D.M. Prototropic tautomerism and basic molecular principles of hypoxanthine mutagenicity: An exhaustive quantum-chemical analysis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2013, 31, 913-26.
- [70] Yurenko, Y.P., Zhurakivsky, R.O., Samijlenko, S.P., Ghomi, M., Hovorun, D.M. The whole of intramolecular H-bonding in the isolated DNA nucleoside thymidine. AIM electron density topological study. *Chem. Phys. Lett.* . 2007, 447, 140-6.
- [71] Mejía-Mazariegos, L., Robles, J., García-Revilla, M.A. Tautomerism in some pyrimidine nucleoside analogues used in the treatment of cancer: an ab initio study. *Theor. Chem. Acc.* 2016, 135.
- [72] Alvarez-Ros, M.C., Palafox, M.A. Molecular structure of the nucleoside analogue inosine using DFT methods: Conformational analysis, crystal simulations and possible behaviour. *J. Mol. Struct.* 2013, 1047, 358-71.
- [73] Nir, E., Plützer, C., Kleinermanns, K., de Vries, M. Properties of isolated DNA bases, base pairs and nucleosides examined by laser spectroscopy. *Eur. Phys. J. D* 2002, 20, 317-29.
- [74] Subramanian, E., Madden, J.J., Bugg, C.E. A syn conformation for inosine, the wobble nucleoside in some tRNA's. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973, 50, 691-6.
- [75] Munns, A.R.I., Tollin, P. Crystal and molecular structure of inosine. *Acta Crystallogr B.* 1970, 26, 1101-&.
- [76] Lord, R.C., Thomas Jr, G.J. Raman spectral studies of nucleic acids and related molecules-I Ribonucleic acid derivatives. *Spectrochim. Acta A* 1967, 23, 2551-91.
- [77] Markova, N., Enchev, V., Timcheva, I. Oxo-hydroxy tautomerism of 5-fluorouracil: water-assisted proton transfer. *J Phys Chem A.* 2005, 109, 1981-8.
- [78] Guillaume, M., Champagne, B., Markova, N., Enchev, V., Castet, F. Ab initio investigation on the second-order nonlinear optical responses in keto-enol equilibria of salicylideneanilines. *J Phys Chem A.* 2007, 111, 9914-23.
- [79] Ortégón-Reyna, D., Garcías-Morales, C., Padilla-Martínez, I., García-Báez, E., Ariza-Castolo, A., Peraza-Campos, A., et al. NMR structural study of the prototropic equilibrium in solution of Schiff bases as model compounds. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2013, 19, 459-81.