



Наумов Владимир Сергеевич

**РАСТВОРЕНИЕ И ДИФФУЗИЯ ХИТОЗАНА В ВОДНОЙ
СРЕДЕ И ЕГО КООРДИНАЦИЯ С ИНСУЛИНОМ.
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2019

Работа выполнена на кафедре физической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель: **Игнатов Станислав Константинович**
доктор химических наук, доцент, профессор кафедры физической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Киселев Михаил Григорьевич**, доктор химических наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук»

Василевская Валентина Владимировна, доктор физико-математических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук»

Ведущая организация: Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»

Защита диссертации состоится _____ 2020 года в _____ на заседании диссертационного совета Д 212.166.08 на базе Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603959, Нижний Новгород, просп. Гагарина 23, корп. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/???>

Автореферат разослан _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Е.Н. Буланов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Одним из главных направлений разработки современных лекарственных средств является создание систем пероральной доставки белковых молекул, в том числе инсулина и других полипептидных гормонов. Для этого необходима разработка методов инкапсуляции белкового лекарственного соединения на молекулярном уровне, предохраняющей его от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта и обеспечивающей эффективный транспорт белка через защитные барьеры организма. Аминозамещенные полигликаны, в частности хитозан (поли-N-ацетил-1,4- β -D-глюкопиранозамин-2), рассматриваются как перспективные инкапсулирующие средства и средства таргетированной доставки лекарств. Однако создание комплексных препаратов, где инкапсулирующим веществом является хитозан, осложняется отсутствием надежных данных, характеризующих растворение полимера, его конформационных особенностей в растворах и взаимодействия с белками. Экспериментальное изучение хитозана и его комплексов часто затруднено, поскольку он представляет собой смесь полимеров различной молекулярной массы и степени ацетилирования (DA, degree of acetylation), получаемую из биологического сырья, физико-химические параметры хитозана не всегда могут быть надежно определены и стабильны. Кроме того, экспериментальные методы не позволяют изучить процессы на молекулярном уровне, давая усредненные и/или кажущиеся характеристики изучаемых систем, особенно в случае таких сложных систем как биологические полимеры различной природы и состава, находящиеся в растворе. Например, дискуссию вызывает интерпретация структуры полимера в растворе, исследованная методом электронной микроскопии. В связи с этим для изучения хитозана, его производных и комплексов с другими полимерами целесообразно использовать молекулярно-динамическое (МД) моделирование. Молекулярная динамика, в свою очередь, требует разработки силового поля (СП), количественно описывающего особенности хитозана. Параметризация силового поля для описания хитозана и его производных позволила бы проводить масштабные молекулярно-динамические исследования поведения комплексов хитозана в организме, а изучение процессов растворения и комплексообразования хитозана на атомистическом уровне позволило бы понять специфику этих процессов и возможные механизмы их контроля путем химической модификации полимеров и/или среды протекания процесса.

Целью работы является: : установление методом молекулярной динамики влияния молекулярной массы хитозана, его структуры и кислотности среды на кинетику растворения хитозана и образование комплексов хитозан-инсулин. В рамках заявленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Параметризация силового поля для молекулярной динамики, описывающего конформационные особенности хитозана, и воспроизводящего физико-химические константы, наблюдаемые экспериментально.
2. Верификация разработанного силового поля по доступным экспериментальным данным и данным квантово-химических исследований.

3. Реализация силового поля в виде, совместимом с программным комплексом для проведения молекулярно-динамических расчетов.

4. Установление зависимости скорости растворения хитозана от кислотности среды и молекулярной массы полимера, выявление структурных особенностей полимера, влияющих на растворимость.

5. Установление зависимости прочности комплексов хитозан-инсулин от кислотности среды в широком диапазоне показателей кислотности, определение оптимальных условий формирования интерполимерных комплексов хитозан-инсулин.

Научная новизна. Разработано силовое поле GROMOS 56_{CARBO_CHT}, учитывающее конформационные особенности хитозана, позволяющее проводить моделирование модифицированных хитозанов и хитозана с частично протонированными аминогруппами. Впервые определена математическая зависимость между скоростью растворения хитозанового нанокристалла, молекулярной массой составляющих его цепей и степенью протонирования аминогрупп полимера. Впервые проанализировано влияние протяженности непротонированных регионов молекулы хитозана на растворение и сформулирован критерий растворения на основе длины непротонированных участков. Установлена зависимость прочности комплексов хитозан-инсулин от показателя кислотности среды, в том числе в областях, недоступных для экспериментального исследования. Определены ограничивающие факторы процесса комплексообразования, предложены оптимальные условия для формирования интерполимерного комплекса.

Практическая и теоретическая ценность. Разработанное силовое поле GROMOS 56_{CARBO_CHT} может быть использовано для молекулярно-динамического моделирования хитозана и его производных. Силовое поле реализовано в формате, совместимом с одним из наиболее популярных и доступных программных пакетов для молекулярно-динамических расчетов – GROMACS – что существенным образом упрощает проведение МД-расчетов с использованием нового СП. Данные о связи растворимости хитозана в зависимости от кислотности среды и молекулярной массы полимера в сочетании с данными о влиянии размеров непротонированных регионов позволяют определить пути возможных модификаций для получения хитозана с контролируемыми свойствами растворимости. Варианты таких модификаций могут быть предварительно проверены молекулярно-динамическими расчетами модифицированного полимера с использованием силового поля GROMOS 56_{CARBO_CHT}. Установленная зависимость прочности комплексов хитозан-инсулин от кислотности среды позволяет определить оптимальную среду для формирования таких интерполимерных комплексов.

Достоверность результатов подтверждается использованием современных методов моделирования структур и процессов на атомистическом и молекулярном уровне, а также согласием теоретически рассчитанных физико-химических констант и геометрических характеристик с величинами, наблюдаемыми экспериментально.

Личный вклад автора состоит в постановке задач, изучении литературных данных по обозначенной проблеме, выборе методов параметризации силового поля,

непосредственном выполнении квантово-химических и молекулярно-динамических расчетов, анализе полученных данных, их обобщении и формулировании выводов.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Разработанное силовое поле GROMOS 56ACARBO_СНТ, достоверность его параметризации и результатов расчетов с его использованием.
2. Выводы о зависимости скорости растворения хитозана от молекулярной массы и доли протонированных аминогрупп, а также о влиянии протяженности непротонированных регионов на процесс растворения.
3. Данные и выводы о зависимости энергии взаимодействия между хитозаном и инсулином от показателя кислотности среды, об ограничивающих факторах процесса образования комплексов хитозан-инсулин, а также об оптимальных условиях формирования таких интерполимерных комплексов.

Апробация работы. Результаты были представлены и обсуждены на конференциях международного и всероссийского уровня: XXX Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2018), IX Всероссийская молодежная школа-конференция (Иваново, 2018), XXIX Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2017), 6-th School-Conference on Atomistic Simulation of Functional Materials (Moscow, 2017), Всероссийская конференция по квантовой и математической химии (Уфа, 2017), Школа-конференция Атомистическое моделирование функциональных материалов ASFM2016 (Москва, 2016), International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design may (Kazan, 2016), X Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование» (Саров, 2016), «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул» VII Всероссийская молодежная школа-конференция. Сборник статей. (Иваново, 2015), Международный научный форум «Бутлеровское наследие – 2015» (Казань, 2015), VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев — 2014» (Санкт-Петербург, 2014), «Математика и математическое моделирование» Всероссийская молодежная научно-инновационной школа (Саров, 2014), Физические процессы в биологических системах. Всероссийская Интернет-конференция с международным участием (2014), XII международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». (Пермь, 2014), International Conference «Molecular Complexity in Modern Chemistry MCMC-2014» (Moscow, 2014), «Атомистическое моделирование функциональных материалов ASFM2014» Школа-конференция (Москва, 2014).

Публикации. По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в список ВАК (индексированы в международных базах цитирования Web of Science и Scopus), 2 статьи в сборниках и 13 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методологической части, раздела с основными результатами и их обсуждением, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (148

источников). Работа изложена на 128 страницах печатного текста, включает 32 рисунка и 20 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность Александру Александровичу Авдошину (ННГУ им Н.И. Лобачевского) за помощь в организации расчетов, Dr. Susan Körppen, Prof. Lucio Colombi Ciacchi и Prof. Thomas Frauenheim (Bremen Center for Computational Material Science, Германия) за организацию визитов в Бремен и предоставление вычислительных мощностей BCCMS. Работа была выполнена с использованием СК Лобачевский (ННГУ) и кластера BCCMS (Bremen University). Работа поддержана грантами РФФИ 14-03-00585, 17-03-00912, 18-43-520012, 18-33-00721, программой DAAD-Ostpartnerschaftsprogramm.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обусловлена актуальность темы, определены цель и задачи исследования, обозначена научная новизна, а также достоверность полученных результатов.

1. Обзор литературы

Первый раздел посвящен обзору имеющейся литературы по теме диссертации. Рассмотрены работы, дающие характеристику хитозану как химическому веществу, возможностям применения хитозана в качестве агента доставки лекарственных препаратов, а также методам компьютерного моделирования хитозана. Несмотря на множество работ по экспериментальным исследованиям хитозана, отдельные физико-химические и структурные параметры остаются неясными или могут быть истолкованы различным образом. Хитозан, являющийся биологическим полимером, имеет хорошие перспективы как средство для транспорта лекарственных препаратов в организме, однако комплексы хитозана с лекарственными веществами зачастую остаются неизученными на молекулярном и атомистическом уровнях. Работы по моделированию хитозана, как правило, посвящены изучению конформаций отдельных молекул полимера, а не процессам, протекающим в растворах хитозана (растворение, комплексообразование, самоассоциация). Изучаемые в работах модели хитозана являются олигомерами со сравнительно малым количеством мономерных звеньев. Работы по моделированию выполняются с использованием различных силовых полей, среди которых нет полей специально параметризованных для работы с хитозаном и его производными.

2. Методика расчетов

В методологической части рассматривается метод молекулярной динамики и основные применяемые алгоритмы, в том числе различные методы интегрирования уравнений движения атомов, алгоритмы термо- и баростатов, методы оценки энергий протекающих в системе процессов и изменения конформаций. Также в методологической части рассмотрены силовые поля GROMOS 53A6 и 56A_{CARBO}, послужившие основой для параметризации силового поля для хитозана.

3. Результаты и обсуждение

Раздел результатов и обсуждения состоит из 11 частей, последовательно освещающих вопросы: (1) параметризация СП для хитозана и его производных; (2) верификация разработанного СП по данным квантово-химических расчетов и известным экспериментально наблюдаемым константам (константы ЯМР-расщепления, данные РСА, вискозиметрические константы, показатель кислотности начала растворения хитозана); (3) моделирование и оценка кинетики растворения хитозана, влияние структуры полимера на растворение; (4) моделирование и оценка термодинамических параметров образования интерполимерного комплекса хитозан-инсулин, влияние кислотности среды.

3.1. Модификация силового поля

Для проведения молекулярно-динамически расчетов с хитозаном было разработано силовое поле GROMOS 56A_{CARBO_CHT}. Основой для нового поля послужило СП GROMOS 56A_{CARBO} модифицированное на основании квантово-химических расчетов. В новом поле 56A_{CARBO_CHT} добавлены 5 структурных блоков («остатков») для моделирования хитозана: CHT, CHT0, CHTN, CHTP, CHTR – в том числе остатки для моделирования хитозана с протонированной (CHTP) и замещенной (CHTR) аминогруппой. Добавленные структурные блоки изображены на рисунке 1.

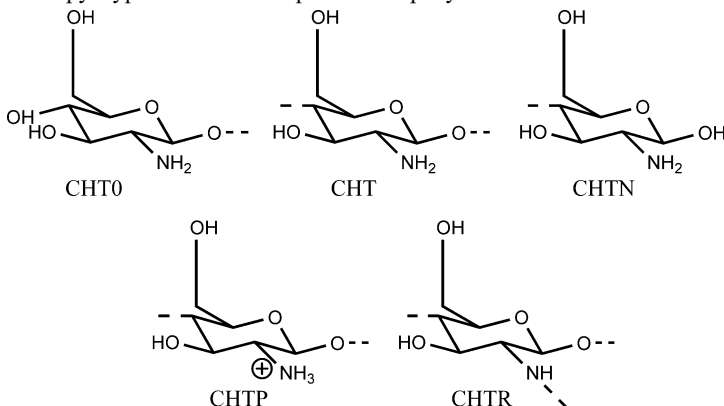


Рисунок 1. Остатки для моделирования хитозана с использованием силового поля GROMOS 56A_{CARBO_CHT}.

3.2. Конформация экзоциклических групп

Проанализировано положение экзоциклических групп: (1) заместитель, находящийся при аминогруппе (например, ацетильный); (2) группа –C6–O6–HO6 (вращение самой группы вокруг связи –C5–C6– и вращение концевой гидроксильного фрагмента –O6–HO6 вокруг связи –C6–O6–). Результаты представлены в таблице 1 в сравнении с экспериментальными (РСА, ЯМР) и теоретическими данным (МД для хитозана в растворе).

Таблица 1. Характеристика вращения экзоциклических групп.

Угол	MD-1	MD-2	MD-3	MD-4	Литература	
					значение	метод
Средние значения, °						
ω (C4–C5–C6–O6)	151.4	167.8	113.1	117.4	176.0 -170.9	PCA ^e PCA ^f
χ^6 (C5–C6–O6–HO6)	174.4	154.7	156.3	155.9	-	-
χ^2 ^a (H21–N2–C2–HC2)	-	-	-	-170.8 -168,4 ^d	180 ± 21	МД ^g
Распределение ротамеров g+ : t : g-, %						
ω (C4–C5–C6–O6)	30:66:4	17:81:2	60:37:3	56:42:2	53:45:2 37:60:3 ^c 35:60:4 ^c 32:45:23	МД ^g МД ^h МД ⁱ МД ^g
χ^6 (C5–C6–O6–HO6)	21:65:14	50:31:19	35:50:15	32:54:13	22:25:53 ^c 22:26:52 ^c	МД ^h МД ⁱ
χ^2 ^a (H21–N2–C2–HC2)	-	-	-	27:40:33 14:67:19 ^d	0:87:13	МД ^g
³ J _{HH} ЯМР константы, Hz						
³ J _{H5,H6R} / ³ J _{H5,H6S} ^b (Stenutz eq.)	6.93/2.45	7.84/2.14	4.49/2.24	4.75/2.16	5.57/1.85 5.95/2.27 ^c	ЯМР ^j ЯМР ^k
³ J _{H5,H6R} / ³ J _{H5,H6S} ^b (Tafazzoli eq.)	7.15/2.53	8.06/2.24	4.87/2.33	5.13/2.26	6.0/2.1 ^c	ЯМР ^l
³ J _{H2,H21} ^a	-	-	-	7.45 9.05 ^d	9.07 10.39	ЯМР ^g МД ^g

MD-1 – кристалл хитозана (все молекулы)

MD-2 – внутренняя цепь в кристалле хитозана

MD-3 – свободная молекула хитозана

MD-4 – свободная молекула хитина

^a – атом водорода H2 не присутствует в расчетах в явном виде, его положение было рассчитано на основании параметров Z-матрицы (отталкиваясь от атомов C3, C2, C1), полученных из квантово-химического расчета b-D-N-ацетил-глюкозамина-2

^b – атомы H6S и H6R не присутствуют в расчетах в явном виде, величина ³J_{HH} рассчитана по уравнениям предложенным Stenutz и Tafazzoli с использованием угла ω (O5–C5–C6–O6). Распределение угла ω – 67:4:30, 82:2:16, 40:3:57 и 43:2:55 для MD-1, MD-2, MD-3 и MD-4 соответственно.

^c – значения для b-D-глюкопиранозы или ее производных

^d – учтены данные только для 12-19 не моделирования

^e – Yui, Imada et al. 1994

^f – Okuyama, Noguchi et al. 1997

^g – Mobli & Almond 2007

^h – Hansen & Hunenberger 2011

ⁱ – Plazinski, Lonardi & Hünenberger 2016

^j – Roslund, Tähtinen et al. 2008

^k – Blundell, Roberts et al. 2009

^l – Nishida & Meguro 1984

Полученные результаты с одной стороны соответствуют известным экспериментальным данным для целлюлозы, с другой – отражают разницу в строении β -D-глюкопиранозы и β -D-глюкопиранозамина-2.

3.3. Конформация пиранозного кольца

Несмотря на отсутствие прямых изменений параметров, затрагивающих конформацию глюкопиранозных колец, изменения в типах и зарядах атомов могли повлиять на конформационные особенности неявным образом. Проведено сканирование поверхности потенциальной энергии (ППЭ) конформационного перехода кольца ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$. Профили ППЭ для разных остатков хитозана показаны на рисунке 2.

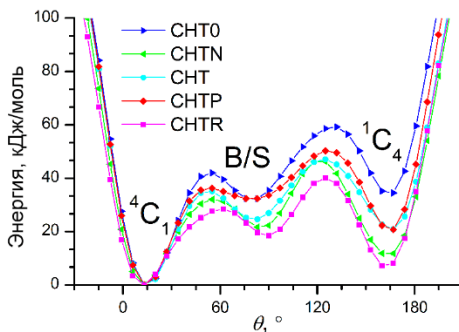


Рисунок 2. Профиль поверхности потенциальной энергии вдоль координаты θ для разных остатков хитозана.

Конформация 1C_4 менее выгодна по энергии на 10-30 кДж/моль в зависимости от типа остатка. Высота барьера перехода ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$ составляет 40-60 кДж/моль. В проведенных молекулярно-динамических расчетах среднее значение угла θ для молекул в кристалле составляет $9.5^\circ \pm 5.2^\circ$, а для молекул в растворе $10.7^\circ \pm 6.0^\circ$, что соответствует конформации 4C_1 . Это хорошо согласуется с результатами, полученными с использованием силового поля 56A_{CARBO} (для целлюлозы, Hansen & Hunenberger 2011), а также с экспериментальными данными (Sattelle & Almond 2011).

3.4. Конформация гликозидной связи

Проанализированы углы, характеризующие конформацию гликозидной связи между кольцами глюкопиранозы: O5-C1-O1-C4' (φ) и C1-O1-C4'-C3' (ψ), C1-O1-C4'-C5' (ψ') (иногда используют вместо ψ). Результаты совпадают с данными PCA для кристаллической структуры и картами ППЭ для молекул в растворе. Результаты расчетов в таблице 2 и на рисунке 3.

Хорошее согласование результатов молекулярно-динамических расчетов с имеющимися экспериментальными и теоретическими данными позволяет сделать вывод, что конформационные особенности гликозидной связи правильно воспроизводятся новым силовым полем 56A_{CARBO_CHT}.

Таблица 2. Характеристика углов гликозидной связи

Угол	56A _{CARBO_CHT} Кристалл хитозана	56A _{CARBO_CHT} Молекула хитозана	56A _{CARBO_CHT} Молекула хитина	Экспериментальные данные (PCA) ^a
φ	-83.4	-69.5	-70.7	-98.3 ... -92.0
ψ	102.5	110.5	110.5	92.0 ... 96.2
ψ'	-140.0	-127.1	-129.5	-146.6 ... -148.0

φ – O5–C1–O1–C4', ψ – C1–O1–C4'–C3', ψ' – C1–O1–C4'–C5'

^a – Yui, Imada et al. 1994; Okuyama, Noguchi et al. 1997; Yui, Taki et al. 2007; Gardner &

Blackwell 1975

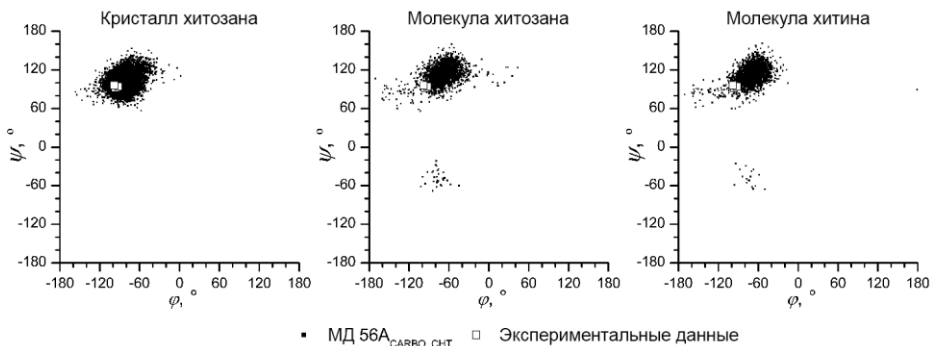


Рисунок 3. Распределение торсионных углов φ и ψ для кристалла хитозана в воде

(а), свободной молекулы хитозана в воде (b) и для свободной молекулы хитина в воде (с).

3.5. Моделирование растворения хитозана

В качестве модели кристаллического хитозана был использован нанокристалл, состоящий из 18 полимерных цепей. Для оценки влияния молекулярной массы (M_w) проведены расчеты кристаллов, состоящих из полимерных молекул массами: 1.6, 3.2, 6.4, 9.6 и 12.8 кДа (10, 20, 40, 60 и 80 мономерных единиц соответственно). Все полимерные цепи в кристалле были одной длины. Были промоделированы различные степени протонирования (PD): 0, 30, 50, 70 и 90%. Для цепей массой 1.6 кДа невозможно провести моделирование $PD = 80\%$ вместо $PD = 90\%$ в связи с ограничениями СП, для цепей массой 12.8 кДа промоделированы только $PD = 0, 50$ и 90% . в связи с большими вычислительными затратами для крупных систем.

Таблица 3. Связь показателя кислотности среды pH и степени протонирования PD с использованием разных эмпирических констант $pK_{1/2}$ и n

$PD, \%$	0	30	50	70	80	90
$pK_{1/2} = 6.17, n = 1.20$ (Wang, Chen et al. 2006) (высоко-деацетилированный хитозан)	-	6.6	6.2	5.7	5.4	5.4
$pK_{1/2} = 6.39, n = 1.09$ (Wang, Chen et al. 2006) (хитозан с низкой молекулярной массой)	-	6.8	6.4	6.0	5.7	5.7

3.6. Процесс растворения

Визуальная оценка моделируемого процесса растворения позволяет установить, что распад кристалла не происходит при отсутствии протонирования ($PD = 0\%$) для всех систем и при слабом протонировании ($PD = 30\%$) для систем, где $M_w = 9.6$ и 12.2 кДа. Спиральное продольное скручивание кристаллов, начинает проявляться практически мгновенно после начала расчета и отчетливо видно к 150 пс времени расчета (рисунок 4).

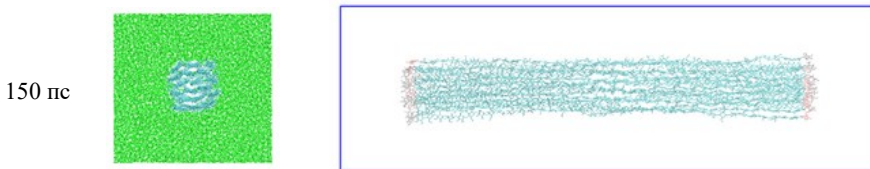


Рисунок 4. Продольное спиральное скручивание кристалла хитозана.

При $PD \geq 50\%$, происходит растворение кристалла, скорость которого зависит от M_w и PD . Общая картина растворения показана на рисунке 5.

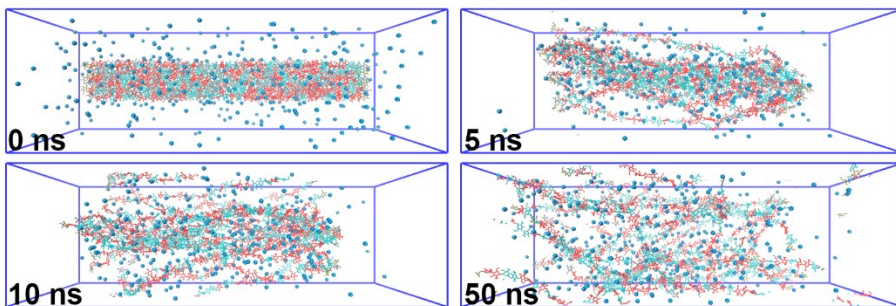


Рисунок 5. Процесс растворения хитозана. Кристалл из 18 цепей полимера (каждая по 40 мономерных единиц), $PD = 50\%$. Красные – протонированные мономерные единицы. Зеленый, Серый, Коричневый – непротонированные мономерные единицы, Серый и Коричневый – терминальные мономерные единицы, Синие шарики – анионы хлора.

3.7. Вязкость растворов

Вязкость системы была рассчитана методом автокорреляционных функций. Для систем, где наступило растворение были рассчитаны константы уравнения Марка-Куна-Хаувинка. Результаты расчетов констант в сравнение с экспериментальными данными представлены в таблице 4. Расчетные величины хорошо совпадают с экспериментальными данными для хитозанов с низкой молекулярной массой и степенью ацетилирования менее 10% , то есть, для экспериментов, в которых образцы хитозана были близки по структурным свойствам к изучаемым модельным системам.

Таблица 4. Оценка вискозиметрических параметров

$PD, \%$	$C, \text{ г/дл}$	$M_w \cdot 10^3, \text{ Да}$	$\eta, \text{ сР}$	$[\eta], \text{ дл/г}$	$K \cdot 10^5, \text{ дл/г}$	α
water	-	-	0.444	-	-	-
0	5.63	1.6	0.514	2.664	-	-
	7.75	3.2	0.596	3.984		
	9.60	6.4	0.719	5.450		
	10.47	9.6	0.777	5.881		
	10.87	12.8	0.800	6.004		
30	5.63	1.6	0.550	3.921	-	-
	7.75	3.2	0.658	5.421		
	9.60	6.4	0.769	6.298		
	10.47	9.6	0.838	6.774		
	5.63	1.6	0.562	4.342		
50	7.75	3.2	0.667	5.631	613	0.27
	9.60	6.4	0.811	6.972		
	10.47	9.6	0.884	7.426		
	10.87	12.8	0.911	7.506		
	5.63	1.6	0.569	4.601		
70	7.75	3.2	0.679	5.887	626	0.27
	9.60	6.4	0.822	7.148		
	10.47	9.6	0.884	7.425		
80	5.63	1.6	0.573	4.726	1080	0.21
	7.75	3.2	0.691	6.145		
90	9.60	6.4	0.826	7.203		
	10.47	9.6	0.858	7.053		
	10.87	12.8	0.905	7.419		
Экспериментальные данные						
Ссылка	$M_w \cdot 10^3, \text{ Да}$	$DA, \%$	$[\eta], \text{ дл/г}$	$K \cdot 10^5, \text{ дл/г}$	α	
Berkovich, Timofeyeva et al. 1980	1.6 – 15	≤ 10	3.4 – 7.0	1115	0.147	
Anthonsen, Vårum et al. 1993	15 – 310	0	1.46 – 9.31	559.0	0.58	
Anthonsen, Vårum et al. 1993	35 – 245	15	1.46 – 9.31	58.5	0.78	
Gamzazade, Šlimak et al. 1985	61 – 150	15 ± 3	1.07 – 3.50	13.8	0.85	
Rinaudo, Milas et al. 1993	100 – 600	2	7.50	82.0	0.76	
Rinaudo, Milas et al. 1993	100 – 600	11.5	9.80	76.0	0.76	
Wang, Bo et al. 1991	194 – 937	0	4.60 – 15.30	16.8	0.81	
Wang, Bo et al. 1991	211 – 1260	9	2.90 – 14.60	6.59	0.88	
Wang, Bo et al. 1991	536 – 1850	16	3.30 – 12.00	1.42	0.96	

3.8. Количество водородных связей

Изменение количества водородных связей между молекулами полимера может являться характеристикой наступления растворения в системе. Количество водородных связей, приведенное к общему количеству мономерных звеньев, в зависимости от времени моделирования показано на рисунке 6. Можно выделить 3 области на этих графиках: 0-0.3 водородные связи – отдельные молекулы в растворе, 0.3-0.7 – агрегаты молекул полимера в растворе, больше 0.7 водородных связей на мономерную единицу соответствует отсутствию растворения. Для структур без протонирования наблюдается увеличение количества водородных связей, связанное с продольным спиральным скручиванием кристаллов.

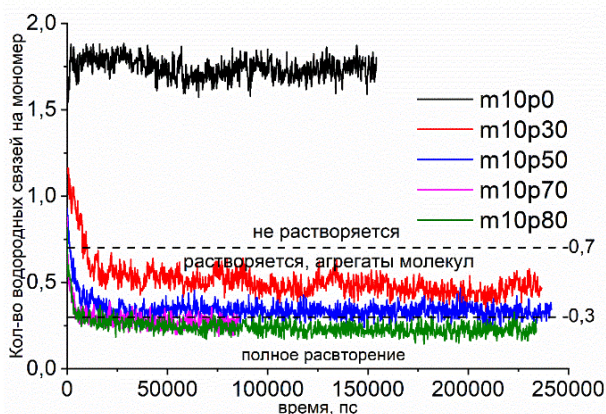


Рисунок 6. Изменение количества водородных связей в ходе моделирования для $M_w = 6.4$ кДа. Линии названы в соответствии с количеством мономерных звеньев (m) и степенью протонирования (p).

3.9. Оценка скорости растворения

Для математической оценки скорости растворения хитозановых кристаллов рассчитано среднеквадратичное смещение центров масс цепей, усредненное по всем цепям (MSD_{CM}), рисунок 7. Методом линейной регрессии определены коэффициенты диффузии центров масс цепей (D_{CM}), пропорциональные тангенсу угла наклона зависимости MSD_{CM} от времени моделирования. Данные приведены в таблице 5.

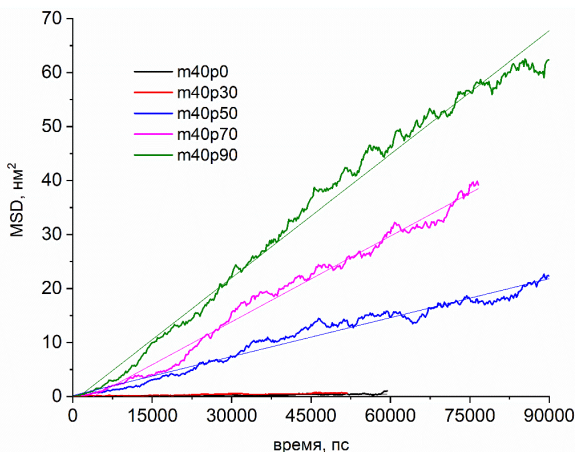


Рисунок 7. Зависимости MSD_{CM} от времени моделирования (до 90 нс). Линии названы в соответствии с количеством мономерных звеньев (m) и степенью протонирования (p).

Таблица 5. Коэффициенты диффузии D_{CM}

M_w , кДа	D_{CM} , 10^{10} м ² /с				
	$PD = 0 \%$	$PD = 30 \%$	$PD = 50 \%$	$PD = 70 \%$	$PD = 90 \%$
1.6	0.0224 ^a	1.2346	1.8333	1.9833	2.6833 ^b
3.2	0.0767 ^a	0.3455	1.0124	0.8643	1.2675
6.4	0.0141 ^a	0.0188 ^a	0.4006	0.8822	1.1217
9.6	0.0159 ^a	0.0320 ^a	0.1635	0.3458	0.8671
12.8	0.0171 ^a	—	0.1226	—	0.6227

^a – растворение не происходит; ^b – $PD = 80\%$

Коэффициент диффузии растет с увеличением степени протонирования и уменьшается при увеличении молекулярной массы. В упрощенном виде эти зависимости можно сформулировать в виде уравнения:

$$D_{CM} = a \cdot PD + b \cdot \frac{1}{M_w} + c \quad (1)$$

где a , b , c – некоторые константы, их величины для разных наборов данных представлены в таблице 6.

В приближении длинных полимерных цепей уравнение (2) становится полностью линейным:

$$D_{CM} \approx a \cdot PD + c ; (M_w \rightarrow \infty) \quad (2)$$

Из уравнения (2) можно получить величину степени протонирования, при которой начинается растворение (PD_{start}):

$$PD_{start} = \frac{-c}{a} ; (D_{CM} = 0) \quad (3)$$

От этой величины используя уравнение Гендерсона-Хессельбаха можно перейти к показателю кислотности среды, при котором начинается растворение (pH_{start}).

Величина молекулярной массы полимера, при которой растворение начинается вне зависимости от степени протонирования ($M_{w,start}$):

$$M_{w,start} = \frac{b}{-c} ; (D_{CM} = 0 ; PD = 0) \quad (4)$$

Рассчитанные значения коэффициентов a , b и c , PD_{start} , pH_{start} и $M_{w,start}$ приведены в таблице 6. На рисунке 8 показана модель поверхности зависимости коэффициента диффузии от молекулярной массы и степени протонирования.

Таблица 6. Регрессионный анализ коэффициентов уравнения (1) a , b , c , коэффициент корреляции, границы начала растворения для PD , pH , M_w .

Набор данных	a	b	c	Коеф. корр.	PD_{start} , %	pH_{start} ^a	pH_{start} ^b	$M_{w,start}$ кДа
Полный	0.015	2.3	-0.6	0.807	43.5	6.3	6.5	3.8
Без $PD = 0\%$	0.017	3.0	-1.0	0.925	57.5	6.0	6.2	3.1
Только растворение	0.018	3.1	-1.1	0.914	60.5	5.9	6.2	2.8
Эксперимент ^c	6.0 – 6.5							

^a – $pK_{1/2} = 6.17$, $n = 1.20$ (высоко деацетилированный хитозан)

^b – $pK_{1/2} = 6.39$, $n = 1.09$ (хитозан с низкой молекулярной массой)

^c – Kumar, Muzzarelli et al. 2004, Qin, Li et al. 2006, Pillai, Paul et al. 2009

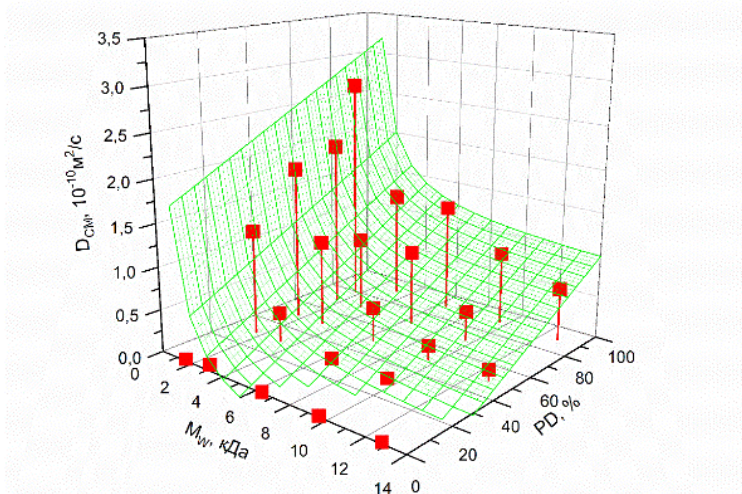


Рисунок 8. Поверхность, характеризующая зависимость коэффициента диффузии от степени протонирования и молекулярной массы полимера.

Полученная модель позволяет напрямую сопоставить коэффициенты диффузии, определенные методом молекулярной динамики с имеющимися экспериментальными данными о границах растворимости хитозана. Экспериментально определенные значения pH_{start} находятся в диапазоне 6.0-6.5, что хорошо согласуется с результатами МД исследования.

3.10. Влияние непротонированных регионов полимера

Проведен анализ длины непротонированных регионов и их влияния на растворимость кристаллов хитозана. Установлено, что для систем, где не происходит растворение, в несколько раз меньше количество непротонированных участков длиной 7 и 8 мономерных единиц и совсем отсутствуют более длинные непротонированные регионы (рисунок 9). Образование стабильных межмолекулярных связей между молекулами хитозана, существенным образом препятствующих растворению, возможно в случае наличия достаточно длинных непротонированных регионов на молекулах полимера. Такие регионы в значительной степени контролируют процесс растворения хитозана.

3.11. Координация хитозана на инсулине

В качестве модели белка использовали инсулин человека, состоящий из двух субъединиц, координированных на хлориде цинка II. Инсулин находился в окружении 8 полностью деацелированных молекул хитозана $M_w = 1.6$ кДа. Аминогруппы хитозановых цепей и ионогенные группы инсулина были приведены к состоянию, соответствующему моделируемой кислотности среды. Поскольку система имеет нано-размеры, возможно лишь ступенчатое моделирование кислотности среды. Промоделированы шесть различных

систем $pH=2.6, 4.2, 6.0, 7.5, 9.3$ и 10.0 – исследован широкий диапазон показателей кислотности от кислой до щелочной среды. Наименьшая степень взаимодействия наблюдается в кислой среде, наибольшая – в среде, близкой к нейтральной.

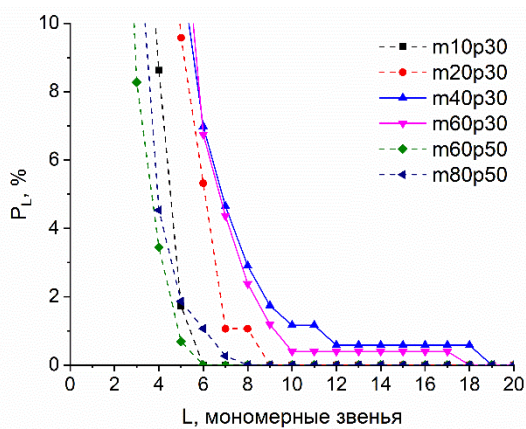


Рисунок 9. Зависимость доли фракций P_L от длины непротонированного региона L . Названия линий соответствуют количеству мономерных единиц (m) и степени протонирования (p). Пунктирные линии для систем, где происходит растворение, сплошные – для нерастворимых систем.

3.12. Прочность комплексов хитозан-инсулин

Энергия координации хитозана на инсулине была оценена с помощью метода потенциала средней силы (PMF) и алгоритма зонтичной выборки вдоль координаты расстояния между хитозаном и инсулином. Концентрация хитозана в расчетном ящике была существенно понижена по сравнению с расчётами для координации хитозана на инсулине, в том числе для исключения эффектов переоценки энергии комплекса в связи с энергией кулоновского взаимодействия между молекулами хитозана. На рисунке 10 показано изменение энергии системы в зависимости от расстояния между хитозаном и инсулином. Характерная дистанция начала взаимодействия между инсулином и хитозаном 1-5 нм. Данные об энергии координации приведены в таблице 7.

Таблица 7. Энергия комплекса E_c , определенная с использованием различных математических моделей. Величины указаны с учетом оцененного стандартного отклонения E_c как регрессионного коэффициента.

Модель	$pH=2.6$	$pH=4.2$	$pH=6.0$	$pH=7.5$	$pH=9.3$	$pH=10.1$
E_c	-0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.0	5.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	7.0 ± 0.3	13.1 ± 0.2

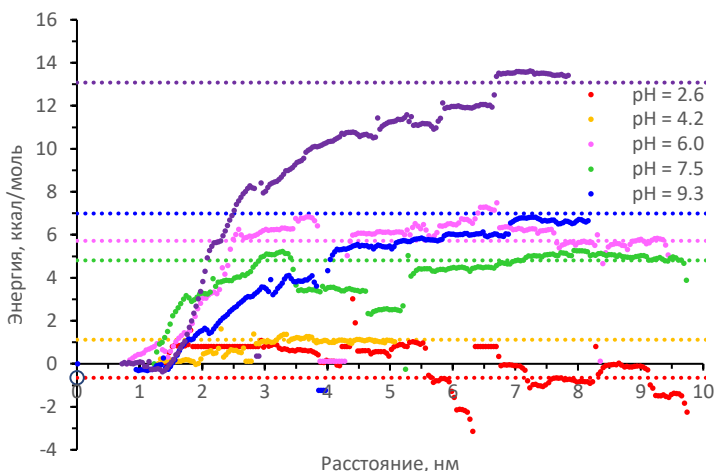


Рисунок 10. Зависимость энергии взаимодействия молекул инсулина и хитозана от расстояния между центрами масс молекул при разных pH. Пунктирные горизонтальные линии – высота энергетического плато, характеризующего прочность комплекса хитозан-инсулин.

Для случая $pH = 2.6$ расчет показал отрицательную величину энергии взаимодействия хитозана с инсулином. Это означает, что образование интерполимерного между хитозаном и инсулином является невыгодным. Возможно, что появлению связи между хитозаном и белком в данном случае способствовало действие кулоновских сил отталкивания между молекулами хитозана. Такая связь оказалась неустойчивой и невыгодной в условиях меньшей концентрации хитозана.

Наиболее простая линейная модель (модель Л) зависимости энергии комплекса от показателя кислотности среды может быть описана уравнением:

$$\Delta E = b + k \cdot pH, \quad (5)$$

где k и b – некоторые константы, регрессионные коэффициенты.

Анализ данных по уравнению (5) дает следующие результаты (значения указаны с учетом оцененных стандартных отклонений регрессионных коэффициентов): $k = 1.5 \pm 0.3$ ккал/моль, $b = -4.9 \pm 2.7$ ккал/моль, $R^2 = 0.8519$, $R_{adj} = 0.8148$, $AIC = 27.37$, $BIC = 26.95$. Однако, простая линейная модель не обеспечивает понимания физического смысла полученных регрессионных коэффициентов. С физической точки зрения, энергия комплекса может быть представлена как сумма ван-дер-ваальсовых взаимодействий V (слабо зависят от pH) и электростатических взаимодействий, линейно зависящих от зарядов инсулина и хитозана Q_{cht} и Q_{ins} :

$$\Delta E = V + c \cdot Q_{cht} Q_{ins}, \quad (6)$$

где c – некоторая константа, Q_{ins} – заряд инсулина, Q_{cht} – заряд хитозана.

Заряды молекул Q_{cht} и Q_{ins} будут зависеть от pH, в то же время ван-дер-ваальсовы взаимодействия мало зависят от pH, поэтому при сравнении уравнений (5) и (6) можно допустить, что:

$$k \cdot pH \approx c \cdot Q_{cht} Q_{ins} \quad (7)$$

$$V \approx b = -4.9 \pm 2.7 \text{ ккал/моль} \quad (8)$$

Оказывается, что при использовании линейной модели энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий, определенная по формуле (8) отрицательна ($V \approx -4.9 \pm 2.7$ ккал/моль), то есть уменьшает прочность комплекса, что противоречит физическому смыслу. Таким образом, для физически обоснованного описания процесса координации требуется использовать иную (нелинейную) модель, которая может быть получена из уравнения (6) при выражении зарядов хитозана и инсулина через показатель кислотности и советующие константы протонирования:

$$\Delta E = V + c \cdot \left[N_{cht} \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_{cht}-pH} + 1} \right) \right] \cdot \left[N_+^{ins} \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_+^{ins}-pH} + 1} \right) - N_-^{ins} \cdot \left(\frac{1}{10^{pK_-^{ins}-pH} + 1} \right) \right], \quad (9)$$

где N_i – коэффициенты, учитывающие количество диссоциирующих групп типа i и их доступность для взаимодействия друг с другом. Значения величин N_{cht} , $N_{NH_2}^{ins}$, N_{COOH}^{ins} изначально установить трудно, поскольку они сильно зависят от конформационной специфики взаимодействия хитозана и инсулина. Уравнение (9) содержит 8 параметров: V , c , N_{cht} , pK_{cht} , N_+^{ins} , pK_+^{ins} , N_-^{ins} , pK_-^{ins} . Для точного определения такого количества параметров необходимо большое количество точек зависимости энергии координации от pH, что требует значительного вычислительного времени. С целью упрощения математической модели можно исключить N_{cht} , N_+^{ins} , N_-^{ins} , заменив константы pK_{cht} , pK_+^{ins} , pK_-^{ins} и c на эффективные величины pK'_{cht} , $pK_+^{ins'}$, $pK_-^{ins'}$ и C' соответственно. В таком случае уравнение (9) принимает вид (модель М-1):

$$\Delta E = V + C' \cdot \left[\left(1 - \frac{1}{10^{pK'_{cht}-pH} + 1} \right) \right] \cdot \left[\left(1 - \frac{1}{10^{pK_+^{ins'}-pH} + 1} \right) - \left(\frac{1}{10^{pK_-^{ins'}-pH} + 1} \right) \right], \quad (10)$$

Для анализа влияния pK'_{cht} на модель прочности комплексов хитозан-инсулин были дополнительно выполнены расчеты при различных фиксированных значениях pK'_{cht} (модели М-2, М-3, М-4 и М-5). pK'_{cht} контролирует прочность комплекса в щелочной среде, в случаях $pK'_{cht} \geq 12$, практически не оказывает влияния на другие параметры, входящие в модель.

Альтернативным подходом к упрощению уравнения (9) может являться принятие фиксированных значений $N_{cht} = 8$, $N_+^{ins} = 14$, $N_-^{ins} = 10$ (модель М-6). В данном случае коэффициенты N_i определены как максимальное количество ионогенных групп, у которых можно изменить заряд в рамках проведенных молекулярно-динамических расчетов. Уравнение (9) в таком случае примет вид:

$$\Delta E = V + c \cdot \left[8 \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_{cht}-pH} + 1} \right) \right] \cdot \left[14 \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_+^{ins}-pH} + 1} \right) - 10 \cdot \left(\frac{1}{10^{pK_-^{ins}-pH} + 1} \right) \right], \quad (11)$$

Результаты обработки данных по всем предложенным моделям в сравнении с экспериментальными данными приведены в таблице 8. Модель М-2 показывает наилучшие значения R^2 , R_{adj} , AIC и BIC , стандартные отклонения определения констант в данной модели наименьшие среди нелинейных моделей. М-3 дает близкие результаты, однако немного уступает М-2 по величинам коэффициентов детерминации и информационных критериев. Несмотря на то, что ни одна из моделей не достигает идеального описания полученных данных, статистические критерии свидетельствуют в пользу предпочтительности модели М-2. Следует также отметить, что для М-1, М-5 и М-6 характерны стандартные отклонения, на порядки превышающие определенные значения регрессионных коэффициентов моделей. Это говорит о ненадежности данных моделей. Тем не менее, во всех случаях вычисленные значения параметров уравнений близки между собой. Рисунок 11 показывает, что при любой модели обработки данных, сохраняются общие тенденции: (1) в кислой среде комплекс хитозан-инсулин не является устойчивым; (2) в области нейтральных pH находится плато, высота которого определяется энергией ван-дер-ваальсовых взаимодействий V ; (3) прочность комплекса в щелочной среде определяется (эффективной) константой pK_{cht} .

Таблица 8. Параметры моделей обработки PMF расчетов.

Модель	Л	М-1	М-2	М-3	М-4	М-5	М-6	Эксперимент
k , ккал/моль	1.5	-	-	-	-	-	-	
b , ккал/моль	-4.9	-	-	-	-	-	-	
V , ккал/моль	-	5.9	5.9	5.9	7.4	8.3	8.4	
c , ккал/моль	-	-7.4	-7.4	-7.5	-7.9	-8.2	-0.2	
pK_{cht}	-	17.6	14.0	12.0	9.5	6.5	5.8	6.17 ... 6.51 ^a
pK_+^{ins}	-	9.6	9.6	9.5	9.9	11.5	13.6	8.80 ... 12.1 ^b
pK_-^{ins}	-	4.4	4.4	4.4	5.5	5.8	1.6	0.5 ... 6.1 ^b
R^2	0.8519	0.9470	0.9470	0.9451	0.7306	0.6754	0.6931	
R_{adj}	0.8148	0.7349	0.8674	0.8629	0.3265	0.1886	-0.5343	
AIC	27.37	27.21	25.21	25.41	34.96	36.08	37.74	
BIC	26.95	26.16	24.37	24.58	34.13	35.24	36.70	
ΔE (pH=5.3), ккал/моль	3.1	5.0	5.0	5.0	2.8	2.3	2.7	3.03 ^c

Оцененные стандартные отклонения регрессионных коэффициентов

$s(k)$, ккал/моль	0.3	-	-	-	-	-	-	
$s(b)$, ккал/моль	2.7	-	-	-	-	-	-	

$s(V)$, ккал/моль	-	1.9	1.3	1.3	3.7	71.1	$1.3 \cdot 10^4$
$s(c)$, ккал/моль	-	3.2	2.0	2.0	4.5	70.0	$4.0 \cdot 10^2$
$s(pK_{cht})$	-	$1.2 \cdot 10^7$	-	-	-	-	2.2
$s(pK_+^{ins})$	-	1.0	0.7	0.7	3.3	$4.0 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^{10}$
$s(pK_-^{ins})$	-	0.8	0.6	0.6	1.5	9.2	$7.9 \cdot 10^2$
$s(\Delta E)$ (pH=5.3), ккал/моль	2.8	3.7	2.4	2.4	5.8	99.8	$1.3 \cdot 10^4$

М-1, М-2, М-3, М-4, М-5 – значения эффективных констант C' , pK'_{cht} , $pK_+^{ins'}$, $pK_-^{ins'}$

Л – линейная модель (5), М-1, М-2, М-3, М-4, М-5 – уравнение (10), М-6 – уравнение (11)

М-2, М-3, М-4, М-5 – эффективные константы pK'_{cht} заданы вручную

^a – Wang, Chen et al. 2006, ^b – Grimsley, Scholtz & Pace 2009, ^c – Emmanuel, Josué et al. 2014

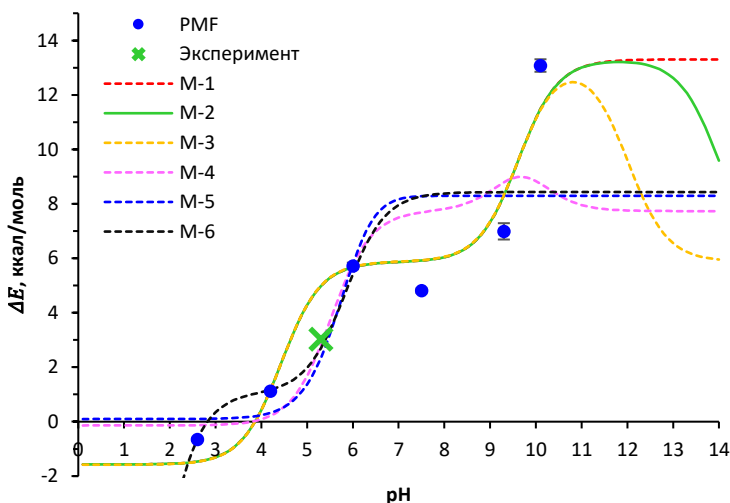


Рисунок 11. Различные нелинейные модели зависимости энергии комплекса инсулин-хитозан от показателя кислотности среды. М-1, М-2, М-3, М-4, М-5 – обработка данных по уравнению (10). М-6 – обработка по уравнению данных по уравнению (11). М-2, М-3, М-4, М-5 – константы pK'_{cht} задана вручную (см. таблицу 8).

В сравнении с линейным уравнением (5) рассмотренные нелинейные модели имеют более четкий физический смысл, а входящие в них константы можно сопоставить с экспериментально наблюдаемыми значениями. Нелинейные модели М-1, М-2, М-3 превосходят линейное уравнение с точки зрения статистических критериев. Все предложенные модели хорошо воспроизводят доступные в литературе экспериментальные данные о прочности комплексов. Образование комплексов в щелочной среде маловероятно, поскольку происходит самоассоциация хитозана. При больших значениях показателя кислотности на инсулине оказывались координированы 5-7 молекул хитозана. Остальные молекулы углевода связывались между собой, либо с хитозаном,

координированным на инсулине, не контактируя с белком. В недавних публикациях было показано, что энергия связи хитозановой молекулы длиной 20 мономеров с кристаллом хитозана в щелочной среде составляет около 44 ккал/моль, что кратно превышает энергию наиболее прочного интерполимерного комплекса хитозан-инсулин.

Таким образом, лимитирующим фактором формирования комплексов хитозан-инсулин в кислой среде является их неустойчивость, а в щелочной – самоассоциация молекул хитозана. Оптимальной для образования интерполимерных комплексов является слабокислая среда $pH = 5.5 - 6.5$, в которой комплекс будет иметь достаточную прочность, а хитозан окажется растворим. Предел прочности комплексов хитозан-инсулин в растворе определяется энергией ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которая оценивается в 5.9 ± 1.9 ккал/моль.

ВЫВОДЫ

1. Разработано силовое поле GROMOS 56A_{CARBO_CHT}, позволяющее проводить молекулярно-динамическое моделирование хитозана и его amino-замещенных производных, а также хитозанов с протонированной аминогруппой. Силовое поле реализовано в формате, совместимом с программным пакетом GROMACS.

2. Проведена верификация силового поля по экспериментальным данным и результатам предыдущих теоретических исследований. Расчеты с использованием нового силового поля хорошо воспроизводят экспериментальные структурные и конформационные особенности хитозана (данные PCA-исследований, константы ЯМР), а также экспериментальные физико-химические параметры, характеризующие растворы полимера (вискозиметрические константы K и α уравнения Марка-Куна-Хаувинка, pH начала растворения хитозана).

3. Методом молекулярной динамики оценена зависимость скорости растворения хитозановых нанокристаллов (D_{CM}) от молекулярной массы молекул хитозана (M_w), составляющих кристалл, и степени протонирования аминогрупп (PD), зависящей от кислотности среды. Коэффициент диффузии, характеризующий скорость растворения, прямо пропорционален степени протонирования и обратно пропорционален молекулярной массе полимера:

$$D_{CM} = a \cdot PD + b \cdot \frac{1}{M_w} + c,$$

6. где $a = (0.015 \pm 0.002) \cdot 10^{-10}$ м²/с, $b = (2.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-10}$ кДа·м²/с, $c = (-0.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-10}$ м²/с – значения параметров уравнения указаны с учетом стандартного отклонения величина как регрессионных коэффициентов.

4. Обнаружена важная роль непротонированных участков полимерных молекул в процессе растворения нанокристаллов хитозана. Установлено, что растворению

существенным образом препятствуют области полимера, где 7 и более аминогрупп подряд не являются протонированными.

5. Установленная методом молекулярной динамики энергия координации хитозана с инсулином (ΔE) в водной среде как функция кислотности (pH) выражается формулой:

$$\Delta E = V + c \cdot \left[1 - \frac{1}{10^{14.0-pH} + 1} \right] \cdot \left[\left(1 - \frac{1}{10^{9.6-pH} + 1} \right) - \left(\frac{1}{10^{4.4-pH} + 1} \right) \right],$$

где $V = 5.9 \pm 1.3$ ккал/моль, $c = -7.4 \pm 2.0$ ккал/моль – значения указаны с учетом стандартного отклонения величин как регрессионных коэффициентов. Энергия координации, предсказываемая этой формулой при pH = 5.3, составляет 5.0 ± 2.4 ккал/моль, что согласуется с экспериментальным значением 3.03 ккал/моль.

6. Основными факторами, препятствующими формированию комплексов, являются нестабильность комплексов в кислой среде и самоассоциация хитозана при переходе к нейтральной и щелочной среде. Оптимальной для образования комплексов хитозан-инсулин является слабокислая среда с pH = 5.5 – 6.5. Прочность комплексов в этом диапазоне pH ограничена энергией ван-дер-ваальсовых взаимодействий между молекулами инсулина и хитозана, которая составляет 5.9 ± 1.3 ккал/моль.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ АВТОРА

Статьи в журналах и сборниках:

1. **Naumov, V.S.** & Ignatov, S.K. Modification of 56ACARBO force field for molecular dynamic calculations of chitosan and its derivatives // Journal of Molecular Modeling. –2017. – Т. 23. – С. 244.
2. **Naumov, V.S.**, Ignatov, S. K. Dissolution of chitosan nanocrystals in aqueous media of different acidity. Molecular dynamic study // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Т. 207. – С. 619–627.
3. Glazova I.A., Smirnova L.A., Zamyshlyayeva O.G., Zaitsev S.D., Avdoshin A.A., **Naumov V.S.**, Ignatov S.K. Interpolymer interaction in insulin-chitosan complexes // Supramolecular Chemistry. – 2019. – Т. 31, № 6. – С. 412-423.

Статьи в сборниках:

4. Наумов В.С., Игнатов С.К., Разуваев А.Г., Мочалова А.Е., Глазова И.А., Смирнова Л.А. Структура и растворимость нанокристаллов полиаминогликанов в воде. Молекулярно-динамическое исследование // Материалы XII международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». – Пермь, 2014 – С. 260–265.
5. Авдошин А.А., Наумов В.С., Игнатов С.К. Определение термодинамических и кинетических характеристик координации олигомеров хитозана с

инсулином методами молекулярной динамики. Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул. // IX Всероссийская молодежная школа-конференция, Иваново, 19–23 ноября 2018 / Сборник научных статей. – Иваново, 2018. – С. 21–24.

Тезисы конференций:

6. **Наумов В.С.**, Игнатов С.К. Растворение полиаминогликанов в водных средах. Влияние кислотности среды и молекулярной массы полимера на кинетику растворения. Молекулярно-динамическое исследование // Современная химическая физика XXIX Симпозиум, 16–27 сентября 2018 года, г. Туапсе / Сборник тезисов. – Туапсе, 2018. – С. 103

7. **Наумов В.С.**, Игнатов С.К., Авдошин А.А. Растворение и ассоциация биологических полимеров в водных средах различной кислотности. Молекулярно-динамическое исследование // Современная химическая физика XXIX Симпозиум, 17–28 сентября 2017 года, г. Туапсе / Сборник тезисов. – Туапсе, 2017. – С. 220

8. Авдошин А.А., **Наумов В.С.**, Игнатов С.К. Определение термодинамических и кинетических характеристик координации олигомеров хитозана с инсулином методами молекулярной динамики // Всероссийская конференция по квантовой и математической химии (Уфа, 13–17 ноября 2017 г.): сб. тез. докл. / под ред. С.Л. Хурсана. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 2017. – С. 27.

9. **Наумов В.С.**, Авдошин А.А., Игнатов С.К. Растворение и ассоциация хитозана и его комплексообразование с белковым субстратом. Молекулярно-динамическое исследование // Школа-конференция Атомистическое моделирование функциональных материалов ASFM2016, 24–25 мая, Москва / Тезисы докладов летней сессии (ASFM2016-1). – Москва, 2016. – С. 17.

10. **Naumov V.S.**, Avdoshin A.A., Ignatov S.K. Dissolution and association of chitosan and its complexation with protein substrate. Molecular dynamics study // International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design may 18–20, 2016 Kazan, Russia / Book of Abstracts and Scientific Program — Москва, 2016. – С. 47.

11. **Наумов В.С.**, Игнатов С.К. Молекулярно-динамическое моделирование растворения кристалла хитозана: влияние кислотности среды и размеров полимера на кинетику растворения // X Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование» 12–14 апреля 2016, Саров / Сборник материалов – Саров, 2016. – С. 121–122

12. Авдошин А.А., **Наумов В.С.**, Игнатов С.К. Молекулярно-динамическое исследование систем хитозана с инсулином // X Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование» 12–14 апреля 2016, Саров / Сборник материалов. – Саров, 2016. – С. 117–118.

13. **Наумов В.С.**, Игнатов С.К. Растворение нанокристаллов полиаминогликанов в водных растворах. Молекулярно-динамическое исследование // «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и

неорганических молекул» VII Всероссийская молодежная школа-конференция. Сборник статей. – Иваново, 2015. – С. 206–207.

14. **В.С. Наумов**, С.К. Игнатов, А.Г. Разуваев, И.А. Глазова, А.Е. Мочалова Структура и растворимость аминзамещенных полигликанов в воде. Молекулярно-динамическое исследование // VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев — 2014» Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 69–70.

15. **Наумов В.С.**, Игнатов С.К., Разуваев А.Г. Молекулярно-динамическое моделирование процесса растворения нанокристалла хитозана в воде // Математика и математическое моделирование Сборник материалов VIII Всероссийской молодежной научно-инновационной школы. – Саров, 2014. – С. 90.

16. **В.С. Наумов**, С.К. Игнатов, А.Г. Разуваев Растворение нанокристалла хитозана в водных средах различной кислотности // Физические процессы в биологических системах. Всероссийская Интернет-конференция с международным участием. Материалы конференции. – 2014. – С. 45–47.

17. **Naumov V.S.**, Ignatov S.K., Razuvaev A.G., Mochalova, Glazova I.A., Smirnova L.A. Solubility and structure of chitosan in aqueous media of various acidity. Molecular dynamic study // International Conference «Molecular Complexity in Modern Chemistry MCMC-2014» Book of Abstracts. – Москва, 2014. – С. 220.

18. **Наумов В.С.**, Игнатов С.К. Растворение нанокристаллического хитозана в водной среде: молекулярно-динамическое исследование // «Атомистическое моделирование функциональных материалов ASFM2014» Школа-конференция Тезисы докладов. – Москва, 2014. – С. 29.