МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

(ННГУ)

На правах рукописи

НАУМОВ ВЛАДИМИР СЕРГЕЕВИЧ

Растворение и диффузия хитозана в водной среде и его координация с инсулином. Молекулярно-динамическое исследование

Специальность 02.00.04 Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент, профессор кафедры физической химии химического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского Игнатов Станислав Константинович

Нижний Новгород – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	
1. Обзор литературы	9
1.1. Структура и свойства хитозана	9
1.2. Хитозан как перспективное фармацевтическое средство	
1.3. Компьютерное моделирование хитозана	17
2. Методика исследования	
2.1. Метод молекулярной динамики	
2.2. Алгоритмы интегрирования уравнений молекулярной динамик	си 24
2.3. Алгоритмы геометрических (структурных) ограничений	
2.4. Термодинамические ансамбли. Термостаты и баростаты	
2.5. Силовые поля GROMOS	
2.6. Потенциал средней силы, зонтичная выборка, метадинамика	
2.7. Критерии выбора модели в случае нелинейных зависимостей	
3. Результаты и обсуждение	
3.1. Модификация силового поля	
3.2. Конформация экзоциклических групп	59
3.3. Конформация пиранозного кольца	
3.4. Конформация гликозидной связи	
3.5. Моделирование растворения хитозана	68
3.6. Процесс растворения	
3.7. Вязкость растворов	
3.8. Количество водородных связей	
3.9. Оценка скорости растворения	80
3.10. Влияние непротонированных регионов полимера	

3.11. Координация хитозана на инсулине	
3.12. Прочность комплексов хитозан-инсулин	
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ АВТОРА	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	

введение

Актуальность. Одним из главных направлений разработки современных лекарственных средств является создание систем пероральной доставки белковых молекул, в том числе инсулина [1] 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 (поли-N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин-2), рассматриваются хитозан как перспективные инкапсулирующие средства и средства таргетированной доставки лекарств [2-6]. 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 интерпретация структуры вызывает полимера В растворе. исследованная методом электронной микроскопии. [7-9] 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.

<u>Целью работы</u> 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 <u>задачи</u>:

- 1. Параметризация силового поля для молекулярной динамики, конформационные особенности описывающего хитозана, И воспроизводящего физико-химические константы, наблюдаемые экспериментально.
- 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.
- 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 56A_{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 Определены экспериментального исследования. ограничивающие факторы комплексообразования, предложены оптимальные процесса условия для формирования интерполимерного комплекса.

Практическая и теоретическая ценность. Разработанное силовое поле **GROMOS 56A**CARBO CHT может быть использовано молекулярно-ДЛЯ 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 непротонированных данными 0 влиянии размеров регионов позволяют модификаций определить пути возможных для получения хитозана c контролируемыми свойствами растворимости. Варианты таких модификаций могут быть предварительно проверены молекулярно-динамическими расчетами модифицированного полимера с использованием силового поля GROMOS 56A_{CARBO CHT}. Установленная зависимость прочности комплексов хитозан-инсулин от кислотности среды позволяет определить оптимальную среду для формирования таких интерполимерных комплексов.

<u>Достоверность результатов</u> подтверждается использованием современных методов моделирования структур и процессов на атомистическом и молекулярном уровне, а также согласием теоретически рассчитанных физикохимических констант и геометрических характеристик с величинами, наблюдаемыми экспериментально.

Личны<u>й вклад</u> автора состоит В постановке задач, изучении литературных данных ПО обозначенной проблеме, выборе методов параметризации силового поля, непосредственном выполнении квантовохимических и молекулярно-динамических расчетов, анализе полученных данных, их обобщении и формулировании выводов.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

- 1. Разработанное силовое поле GROMOS 56A_{CARBO_CHT}, достоверность его параметризации и результатов расчетов с его использованием.
- 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 хитозанинсулин, а также об оптимальных условиях формирования таких интерполимерных комплексов.

Апробация работы. Результаты были представлены и обсуждены на конференциях международного и всероссийского уровня: ХХХ 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 ASFM2016 моделирование функциональных материалов (Москва, 2016). International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design may (Kazan, 2016), Х 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 форму «Бутлеровское наследие – 2015» (Казань,

2015), VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев — 2014» (Санкт-Петербург, 2014), «Математика и Всероссийская математическое моделирование» молодежная научноинновационной школа (Саров, 2014), Физические процессы в биологических системах. Всероссийская Интернет-конференция с международным участием XII конференция (2014),международная «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.

<u>Структура и объем диссертации.</u> 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 Köppen, Prof. Lucio Colombi Ciacchi и Prof. Thomas Frauenheim (Bremen Center for Computational Material Science, Германия) за организацию визитов в Бремен и предоставление вычислительных мощностей ВССМЅ. 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.

1. Обзор литературы

1.1. Структура и свойства хитозана

Хитозан – частично или полностью деацетилированное производное природного полисахарида хитина (поли-1-4-N-ацетил-2-амино-2-дезокси-β-D-глюкопиранозы). Хитозан представляет собой биополимер, макромолекулы которого представляют собой цепи, образованные звеньями ацетилированной либо деацетилированной аминопиранозы. Структура хитозана показана на рисунке 1.



Рисунок 1. (*a*) – структурная формула мономерных звеньев хитозана, ацетилированное (слева) и деацетилированое (справа) звенья могут чередоваться в произвольном порядке, их соотношение может быть различным. (*б*) – обозначения атомов в мономере деацетилированного хитозана.

Хитозан обладает уникальными физико-химическими и биологическими свойствами, среди которых можно выделить его биологическую совместимость, антимикробное действие, способность активизировать макрофаги. Хитозан способен образовывать нековалентные комплексы с полиэлектролитами, что представляет большой интерес для использования хитозана в медицине в качестве инкапсулятора лекарственных препаратов. [2, 6] На процесс образования комплексов большое влияние оказывают структурные характеристики полимера: конформация макромолекул, молекулярная масса $(M_w),$ степень полидисперсности, степень деацетилирования аминогрупп (DD, degree of deacetylation; часто используют другой показатель – степень ацетилирования аминогрупп – *DA*, degree of acetylation), протонирование аминогрупп, распределение амино- и ацетамино-групп вдоль полимерной цепи. [10, 11] Параметры *DA* и *DD* определяются по формулам:

$$DA = \frac{N_{ace}}{N},\tag{1.1}$$

$$DD = \frac{N - N_{ace}}{N} = 1 - DA$$
, (1.2)

где *N* – общее количество аминогрупп, *N_{ace}* – количество ацетилированных аминогрупп.

Внешне хитозан представляет собой чешуйки размером менее 10 мм или порошки. Цвет – от белого до кремового, часто с желтоватым, сероватым или розоватым оттенком, без запаха. По токсичности хитозан относится к 4-му классу и считается безопасным. Выделяют четыре типа кристаллических структур Ι (безводный, расширенная двойная хитозана: ТИП спираль), тип II (гидратированный, свободная двойная спираль), тип IIa (гидратированный, спираль 4/1), тип III (безводный, спираль 5/3). [12-14]. Наиболее существенным различием между структурами является наличие или отсутствие воды в кристаллической решетке. На рисунке 2 показаны типичные кристаллические структуры гидратированного и безводного хитозана.

Известно, что в твердых образцах хитозана велика доля кристаллических структур с развитой системой водородных связей. [14] В кристаллической решетке может быть вода, которая встраивается между цепями полимера и принимает участие в построении водородных связей. [13] Кристаллические области, скрепленные сетью водородных связей, обладают сравнительно высокой устойчивостью, такими областями будет определяться скорость растворения хитозана в водных средах. [15-18] Известны кристаллические структуры хитозановых солей-комплексов Chitosan·HI, Chitosan·HCI. [19, 20]



тип I (безводный)

тип II (гидратированный)

Рисунок 2. Кристаллические структуры хитозана. Тип I – изображение взято из [14], атомы водорода не показаны, водородные связи показаны пунктирными линиями. Тип II – изображение взято из [13], закрашенные атомы – атомы азота, атомы водорода не показаны, водородные связи показаны пунктирными линиями, атомы с пометкой W – кислород молекул воды.

Благодаря наличию аминогруппы, хитозан имеет более разнообразные химические свойства по сравнению с целлюлозой (его близким аналогом), что позволяет проводить модификацию полимера, придавая ему необходимые свойства, например, определенную биологическую активность. [21, 22] По аминогруппе может проходить ацилирование, реакции с альдегидами и кетонами, алкилирование, прививка к полимеру боковых групп, хелатирование металлов, образование четвертичных аммонийных солей и другие реакции. Таким образом, можно получить модифицированные хитозаны, обладающие набором полезных свойств (антибактериальные, антигрибковые, противовирусные), сочетающихся с

гипоаллергенностью, биологической совместимостью и способностью к биоразложению. [23] Кроме того, таким образом к хитозану могут быть привиты различные «сигнальные» молекулы, на которые реагируют рецепторы бактерий или клеток организма, что является основой для создания таргетированных лекарств. Помимо аминогруппы, хитозан имеет две гидроксильные группы при атомах C2 и C6. Благодаря этим группам, для хитозана, как и для целлюлозы, становится возможным целый ряд реакций: этерефикация, эстерефикация [24, 25], прививочная сополимеризация [26, 27], а так же О-ацилирование, образование водородных связей с полярными атомами и другие реакции. [23]

Хитозан, в отличие от хитина, растворим в водных средах. Однако, это растворение возможно только при кислотности раствора выше определенного порога, что объясняется наличием незамещенных аминогрупп. В кислой среде происходит протонирование аминогрупп, полимер приобретает положительный заряд – молекулы хитозана можно рассматривать как катионный полиэлектролит. При pH выше 6, аминогруппы переходят в депротонированное состояние, делая полимер нерастворимым в воде. Граница растворимости хитозана в водных системах находится в районе pH = 6.0-6.5 [23]. Растворимость, таким образом, будет зависеть от pH среды, степени деацетилирования аминогрупп (замещенные аминогруппы не могут быть протонированы и снижают растворимость) [16], распределения N-ацетилированных групп вдоль полимерной цепи [28], а также от молекулярной массы полимера [29]. В исследованиях, однако, отмечается, что для хитозана со степенью N-ацетилирования равной 50%, зависимость растворимости от молекулярной массы полимера не наблюдается [18], и растворение может наступать в нейтральных и слабощелочных средах [30].

Хитозан растворяется как в минеральных, так и в органических кислотах. [31-33] Образующиеся при растворении комплексные соли хитозана также растворимы в воде. Наилучшим образом хитозан растворяется в водных системах, содержащих 0.2-100% муравьиной кислоты. [34] Наиболее часто для растворения используют 1% раствор уксусной кислоты (pH = 4.0). Хитозан растворим в 1% соляной кислоте и в разбавленной азотной кислоте, однако не растворяется в

серной и фосфорной кислотах. [23] Концентрированная уксусная кислота при повышенных температурах может вызывать деполимеризацию. [31, 32]

Протонирование аминогруппы можно представить как реакцию диссоциации кислоты:

$$-NH_3^+ + H_2O \leftrightarrow -NH_2 + H_3O^+$$
(1.3)

Константа диссоциации (константа протонирования) для реакции (1.3):

$$K_a = \frac{[-\mathrm{NH}_2][\mathrm{H}_3\mathrm{O}^+]}{[-\mathrm{NH}_3^+]},$$
 (1.4)

$$pK_a = -\log K_a \tag{1.5}$$

Степень диссоциации:

$$\alpha = \frac{[-\mathrm{NH}_2]}{[-\mathrm{NH}_3^+] + [-\mathrm{NH}_2]}$$
(1.6)

Для полиэлектролитов значение pK_a не является постоянным. В случае хитозана эта константа зависит от степени N-ацетилирования и молекулярной массы полимера и колеблется в пределах от 6.17 до 6.51.[35] Поскольку процесс растворения непосредственно связан с протонированием аминогрупп, он будет зависеть от степени N-ацетилирования и кислотности среды. Связь константы протонирования, показателя кислотности среды и степени диссоциации аминогрупп выражается уравнением:

$$pK_a = pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \tag{1.7}$$

Уравнение (1.7) является одной из форм записи уравнения кислотнощелочного баланса Гендерсона–Хассельбаха. Зная константу протонирования и степень диссоциации, можно вычислить показатель кислотности среды:

$$pH = pK_a - \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \tag{1.8}$$

Уравнение (1.8) описывает идеальный раствор для неполимерного электролита. Поскольку хитозан является полимером, на практике используется модифицированное уравнение Гендерсона–Хассельбаха:

$$pH = pK_{1/2} - n\log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right),\tag{1.9}$$

где, n – эмпирический параметр, $pK_{1/2}$ – константа полупротонирования, равная значению pH при степени диссоциации $\alpha = 0.5$:

$$pK_{1/2} = pH + n \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \Big|_{\alpha=0.5} = pH|_{\alpha=0.5}$$
(1.10)

В литературе есть данные о значениях эмпирических констант $pK_{1/2}$ и *n* для хитозанов различной молекулярной массы и степени N-ацетилирования [35].

1.2. Хитозан как перспективное фармацевтическое средство

биологической Благодаря доступности, совместимости, низкой токсичности и возможности химической модификации за счет аминогруппы, хитозан рассматривается как перспективный компонент для создания новых лекарственных средств. Доставка лекарственных веществ в организме – одно из наиболее активно развивающихся направлений использования хитозана. Предполагается получение хитозановых микро- и наночастиц, содержащих в себе лекарственный препарат. Основными способами получения микро-И наноразмерных частиц хитозана являются: (1) эмульсионное сшивание [36-39], (2) коацервация/осаждение при изменении кислотности среды [40, 41], (3) ионотропное гелеобразование [11, 42, 43], (4) осушение спрея раствора хитозана [44, 45] и некоторые другие методы [46]. Введение активного лекарственного вещества в состав наночастицы хитозана может происходить как на стадии ее формирования, так и после этого. Хитозан может инкапсулировать как растворимые, так и нерастворимые в воде лекарства. [46] В случае воднорастворимых препаратов их вводят в раствор, содержащий хитозан и затем получают хитозановые наночастицы. Раствор подкисляют, что обеспечивает растворение хитозана. Для создания кислой среды, как правило, применяется уксусная кислота. Лекарства, нерастворимые в воде, либо выпадающие в осадок в кислой среде или в присутствии уксусной кислоты, вводят в хитозановые наночастицу после ее формирования. Для этого наночастицы помещают в концентрированный раствор лекарственного средства. Лекарство проникает в

частицу за счет адсорбции и диффузии. Также может быть применен метод многократной эмульсии (multiple emulsion technique). [46] Для повышения прочности лекарственных комплексов с участием водно-нерастворимых средств, в хитозан вводят гидрофобные группы. [47-49] Помимо инкапсулирования, возможен иной подход, при котором лекарственное средство пришивается к коротким цепям биополимера за счет химической реакции по гидроксильной или аминогруппе. [3] Хитозан производные И его могут участвовать В таргетированной доставке лекарств. Для этого к полимеру пришиваются группы, на которые реагируют рецепторы, находящиеся на поверхности мембран клеток или бактерий. Срабатывание рецептора может привести к присоединению системы доставки к нужной клетке или ее поглощение клеткой по механизму фагоцитоза. [3]

В качестве примера работ по использованию хитозана в доставке белковых лекарственных препаратов можно рассмотреть работы [39, 42, 43]. В данных публикациях исследованы вопросы транспортировки инсулина. Работа [39] посвящена методике создания микрофаз на основе хитозана. Для этого эмульсии использовать сшивку в вода/масло предлагается с помощью аскорбилпальмината или дигидроаскорбилпальмината. Инсулин внедряют в микрофазу. Авторы анализируют скорость высвобождения инсулина ИЗ микрофазы в зависимости от применяемого для сшивки реагента. В работе [42] исследуется улучшение назальной адсорбции инсулина благодаря наночастицам 300-400 нм, полученным хитозана размером ПО методу ионотропного гелеобразования. Авторы отмечают, что образование комплексов инсулинпреимущественно электростатическую хитозан имеет природу. Это подтверждается экспериментами, в которых лучшая адсорбция наблюдается в нейтральной среде (инсулин имеет отрицательный заряд). В кислом ацетатном буфере (инсулин положительно заряжен) адсорбируется лишь около 30% белка, в то время как в нейтральной среде этот показатель достигает 77%. Кроме того, в иллюстрируется различная динамика высвобождения инсулина статье В зависимости от кислотности среды и марки используемого хитозана. Некоторые

авторы указывают на нелинейную зависимость скорости высвобождения препарата с изменением показателя кислотности среды. В исследовании [43] инсулин включали В хитозановые наночастицы, полученные методом ионотропного гелеобразования. Оказалось, что высвобождение инсулина при рН 5.8 происходит медленнее, чем при pH 7.4 и pH 4.0, то есть зависимость носит нелинейный характер. Кроме того, авторами отмечается, что с увеличением размеров наночастиц их растворение в кислой среде затрудняется. Авторы делают вывод, хитозановые наночастицы использовать как pHчто можно чувствительные средства доставки лекарственных препаратов. Идею pHчувствительной доставки лекарств при помощи хитозановых наночастиц рассматривают в другой работе [2], где показано: (1) изменяя кислотность среды, можно влиять на размеры наночастиц хитозана, (2) в зависимости от кислотности, изменяется динамика высвобождения лекарственного препарата (зависимость нелинейная аналогично работе [43]). Вопросам влияния молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана на инкапсулирующие свойства внимание уделено в работе [11]. Авторы исследуют эффективность инкапсулирования и высвобождения бычьего сывороточного альбумина с использованием хитозанов разных марок, а также влияние введения в наночастицы полиэтиленгликоля. Некоторые работы указывают на возможность использования хитозановых наночастиц для переноса генов.[40]

Таким образом, хитозан является перспективным компонентом в создании комплексных лекарственных препаратов. Однако, вопросы образования и растворения хитозановых наночастиц и скорости высвобождения активного вещества препарата на молекулярном и атомистическом уровне остаются практически неисследованными. Выводы о структуре комплексов и природе связей между хитозаном и лекарственными средствами часто делаются на основании лишь экспериментальных данных, подверженных существенному влиянию технических факторов (например, качеству используемых реактивов). Исследование структуры комплексов на атомистическом уровне позволило бы глубже понять природу взаимодействия хитозана с тем или иным лекарством, предложить новые, более эффективные комплексы. Одним из решений проблемы исследования хитозана и комплексов с его участием на молекулярноатомистическом уровне может служить компьютерное моделирование, в частности – квантово-химические и молекулярно-динамические исследования.

1.3. Компьютерное моделирование хитозана

Известен ряд работ, в которых хитозан был исследован методами компьютерного моделирования. Однако, в данных работах упор делается преимущественно на изучение конформаций отдельных молекул полимера в растворе. В работе [50] авторы исследовали гибкость хитиновых и хитозановых цепей, и пришли к выводу, что гибкость молекулы в растворе зависит от устойчивости водородной связи между атомом H₀₃ и атомом О5 в следующем глюкопиранозном кольце цепи (см. Рисунок 1б). В свою очередь, на стабильность водородной связи влияет частота смены молекул воды в области близкой к водородной связи. В случае хитозанов с протонированными аминогруппами, увеличивается скорость обмена воды вблизи атома ОЗ, это дестабилизирует водородную связь H_{O3(n})...O5_(n+1), приводя к увеличению гибкости полимерных цепей. Исследование проводилось методами молекулярной динамики с явным растворителем. В качестве модели рассматривались хитозановые цепи длиной 10 мономерных звеньев и наночастица, состоящая из 9 таких цепей. В другой работе [51] исследуется связь между гибкостью хитозановых цепей, растворением наночастиц N-ацетилирования хитозана, степенью И положением ацетилированных аминогрупп в цепи. Как и в работе [50], исследование проводилось при помощи молекулярной динамики с явным растворителем, длина цепей составляла 10 звеньев, в наночастицы входило по 9 молекул хитозана. Авторами отмечено, что гибкость цепей и растворимость наночастиц хитозана уменьшаются с увеличением степени ацетилирования. В случае ацетилированных хитозанов наибольшую гибкость демонстрируют молекулы с равномерно распределенными N-ацетильными группами. Наночастицы co степенью ацетилирования более 40% ограниченно растворимы и формируют агрегаты в

случае неравномерного распределения N-ацетильных групп в цепях. Системы со степенью ацетилирования 60% и более нерастворимы, для них характерна одинаковая степень набухания вне зависимости от характера расположения ацетилированных групп. В качестве силового поля для проведения молекулярнодинамического расчета в описанных работах применялись силовые поля GROMOS различных версий. [52-57]

Исследование гибкости гликозидной связи межу глюкопиранозными кольцами хитозана проведено в работе [58], где комбинированным методом молекулярной динамики и Монте-Карло изучены ди-, три- и тетрамеры хитина и хитозана, имеющие различную степень N-ацетилирования и разное положение ацетильных остатков в цепи. Выявлено, что влияние на гибкость гликозидной связи оказывает кольцо на восстанавливающем конце молекулы. Причем, существенная гибкость сообщается в случае, если восстанавливающее кольцо содержит N-ацетильную аминогруппу. Наибольшая гибкость достигается, когда следующим после N-ацетилированного восстанавливающего концевого звена оказывается деацетилированное звено. В случаях деацетилированного концевого восстанавливающего звена гибкость гликозидной связи оказывается значительно меньше вне зависимости OT того, каким является следующее звено (ацетилированным либо деацетилированным). В данной работе было использовано силовое поле AMBER, дополнительно параметризованное для гексопираноз. [59]

В исследовании [60] авторы изучили влияние степени ацетилирования и распределения ацетилированных аминогрупп на гибкость хитозановых кристаллов. Показано, что гибкость увеличивается с уменьшением количества ацетилированных аминогрупп, за исключением некоторых случаев особого распределения ацетильных групп на молекуле полимера. В случае низкой степени ацетилирования у кристалла наблюдалось продольное скручивание. Исследование проводилось методом молекулярной динамики с использованием силового поля CHARMM36.[61]

В исследовании [62], посвященном молекулярно-динамическому изучению модифицированного карбоксиэтилхитозана (полиамфолитный полимер, содержащий в своем составе группы –NH₂⁺– и СОО⁻) с использованием силового поля PCFF [63] были изучены радиус гидратной оболочки и поверхность доступности для атомов углерода глюкопиранозного кольца в зависимости от различных условий: температуры, концентрации соли (хлорид натрия) и кислотности среды. Авторы установили, что в кислой или щелочной средах с увеличением температуры или концентрации соли радиус гидратной оболочки и доступность атомов углерода уменьшаются. Для нейтральной среды наблюдается обратная тенденция – исследуемые параметры возрастали при повышении концентрации соли или увеличении температуры.

Среди прочих, можно отметить исследования, в рамках которых хитин и хитозан моделировались в приближении крупных частиц (coarse-grained моделирование), к которым можно отнести [64-66]. Данное приближение предполагает замену групп атомов на крупные модельные частицы, связанные между собой в молекулы [67]. Такой подход позволяет существенно повысить скорость расчетов. Однако, поскольку потенциалы, действующие между себя большое крупными частицами включают В число межатомных взаимодействий различной природы, подобные модели нуждаются в тщательном подборе потенциальных функций, их верификации на основе атомистического моделирования и контроля за выполнением условий, для которых они были подобраны.

Наиболее современные работы посвящены моделированию комплексов хитозана с различными субстратами. В контексте данной работы интересны молекулярно-динамические исследования взаимодействия хитозана с инсулином, однако несмотря на множество экспериментальных работ, известно лишь два теоретических исследования [68, 69].

В работе [68] были проведены масштабные МД расчеты для инсулина, окруженного обычным и холестерин-модифицированным хитозаном в слабокислой среде. Моделирование производили с использованием силовых

полей GROMOS. Авторами показано, что взаимодействие хитозана с инсулином человека не приводит к существенным искажениям структуры белка, которые могли бы нарушить его функциональные свойства. Кроме того, проведена взаимодействия обычного сравнительная оценка холестерин-И модифицированного хитозана с инсулином, выявлено, И что немодифицированный полимер лучше подходит для образования комплексов. Результаты исследования позволяют предположить, что основными факторами, контролирующими процесс инкапсуляции инсулина, являются ван-дер-ваальсовы, электростатические И СН-π-взаимодействия, отдельно отмечается роль ароматических и отрицательно заряженных групп. Несмотря на подробный анализ взаимодействий между биополимерами с детализацией до уровня отдельных химических групп, авторы не дают однозначную оценку устойчивости комплексов хитозан-инсулин в водной среде.

Исследование [69] посвящено исследованию потенциала хитина и хитозана как средств доставки инсулина и куркумина. По результатам молекулярного докинга комплекс инсулина с хитином имеет большую прочность, чем с хитозаном. Однако, результаты МД расчетов (силовое поле OPLS) и проведенные лабораторные эксперименты говорят о том, что хитозан имеет инкапсулирующую способность. Таким образом, большую результаты моделирования в данной работе противоречивы, однако молекулярная динамика показывает результаты, в большей степени соответствющие экспериментальным наблюдениям, чем результаты молекулярного докинга. Оценка энергий в интерполимерного комплекса в данной работе произведена только на основании докинга, авторы не провели МД расчетов, позволяющих оценить энергию взаимодействия хитозана с инсулином.

Приведенные литературные данные позволяют сделать вывод, что известные молекулярно-динамические исследования чистого хитозана, как правило, касаются вопросов гибкости цепей полимера и влияния количества ацетилированных аминогрупп на характеристики полимера. Ни в одном из исследований не рассматривалась кинетика процесса растворения, либо

ассоциации группы полимерных молекул с учетом влияния различных факторов (например, молекулярной массы и доли протонированных аминогрупп). Работы, посвященные комплексам хитозана с инсулином немногочисленны и детально рассматривают возникающие взаимодействия между биополимерами, однако которой происходит взаимодействие остается вопрос влияния среды, В неисследованным. Кроме того, авторы используют для МД расчетов совершенно разные силовые поля, которые, как правило, не специализированы для работы с полимерными углеводами, имеющими свои конформационные особенности. В то же время применимость известных силовых полей общего назначения часто недостаточно проанализирована относительно вопросов корректного воспроизведения конформационно-структурных характеристик хитозана. Это открывает широкую область как для разработки специализированных СП, так и для их применения к актуальным интерполимерным комплексам.

2. Методика исследования

2.1. Метод молекулярной динамики

Молекулярная динамика **(**МД**)** является одним наиболее ИЗ информативных области вычислительных методов, применяемых В моделирования сложных физических, химических и биологических систем, в том числе поли- и супрамолекулярных. В основе методов МД лежит идея описания движений атомов в соответствии с законами классической физики. Молекулярная динамика позволяет исследовать взаимодействия частиц в конденсированных системах на молекулярном уровне. Особенно эффективны методы молекулярной динамики при исследованиях крупных систем, в которых квантовые эффекты значительно менее существенны, чем электростатические взаимодействия. К таким системам, например, относятся биологические макромолекулы, их комплексы, мембранные структуры. В случаях, когда рассматриваются процессы, связанные с образованием или разрывом ковалентных связей, классическая молекулярная динамика на мезомасштабах используется совместно с квантовохимическим подходом на микромасштабах. [70-72] Современный уровень вычислительной техники позволяет проводить молекулярно-динамические расчеты для крупных систем (например, белковых молекул) на временах вплоть до миллисекунд. [73]

МД моделирование заключается в численном решении уравнений движения для системы из N взаимодействующих атомов:

$$\frac{\partial^2 \boldsymbol{r_i}}{\partial t^2} = \frac{\boldsymbol{F_i}}{m_i},\tag{2.1}$$

где i = 1...N – порядковый номер атома, силы F_i — это отрицательные производные функции потенциальной энергии U ($\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, ...\mathbf{r}_N$):

$$F_i = -\frac{\partial U}{\partial r_i} \tag{2.2}$$

Потенциальная энергия *U*, в свою очередь, складывается из энергии различных физических взаимодействий U_{phys} и эмпирической поправки U_{spec} :

$$U = U_{phys} + U_{spec} \tag{2.3}$$

Потенциал физических взаимодействий можно разделить на две составляющие: энергию связанных (bonded) взаимодействий U_{bon} для атомов, связанных ковалентно и энергию несвязанных (nonbonded) U_{nbon} взаимодействий для атомов не образующих ковалентную химическую связь:

$$U_{phys} = U_{bon} + U_{nbon} \tag{2.4}$$

Входящие в уравнение 2.4 энергии, выражаются через потенциалы отельных взаимодействий, связывающие некоторые константы и геометрические параметры (тот или иной угол или расстояние). Константы входящие в уравнения энергий зависят от свойств атомов, взаимодействие которых они описывают. В некоторых случаях с целью лучшего воспроизведения экспериментальных данных вводятся дополнительные эмпирические поправки (U_{spec}). Набор констант, формул для различных составляющих потенциальной энергии, эмпирических поправок и других правил расчета потенциальной энергии называют силовым Ниже будут подробно рассмотрены полем. потенциалы, описывающие взаимодействия в силовых полях GROMOS последних модификаций.

В общем случае молекулярно-динамический расчет строится из трех этапов: (1) минимизация энергии системы, (2) уравновешивание системы, (3) основной расчет. Минимизация энергии проводится с целью устранения геометрических напряжений в системе, которые могут приводить к нефизическим обрыву Уравновешивание необходимо явлениям и/или расчетов. для установления в системе термодинамических условий (температуры и давления), соответствующих тем, что должны быть в основном расчете. Необходимая продолжительность уравновешивания увеличивается с увеличением размеров моделируемой системы. Основной расчет моделирует изучаемый процесс. В ходе основного расчета на систему могут быть наложены дополнительные потенциалы, например для принудительного перемещения молекулы или изменения ее конформации. Обычно к наложению дополнительных потенциалов прибегают, если самопроизвольное протекание процессов занимает слишком длительное время, которое невозможно промоделировать.

2.2. Алгоритмы интегрирования уравнений молекулярной динамики

В ходе молекулярно-динамического моделирования в момент времени t для атомов системы известны координаты и скорости. По уравнению (2.2) для каждого *i*-того атома вычисляется действующая на него сила F_i . Предполагают, что эта сила не изменяется в течение времени Δt , называемого шагом интегрирования, величина шага интегрирования обычно не превышает 1-2 фс. Зная силу F_i действующую на атом в течение времени Δt можно рассчитать координаты и скорость атома для времени ($t+\Delta t$), для этого уравнение (2.2) раскладывают в ряд Тейлора:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \nu(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t) + \frac{1}{6} \Delta t^3 b(t) \dots, \qquad (2.5)$$

где *v*, *a*, *b* – некоторые коэффициенты.

Поскольку величина шага Δt мала, можно отбросить члены третьей и более высоких степеней и записать следующее уравнение для координаты атома в момент времени ($t+\Delta t$):

$$r(t + \Delta t) \approx r(t) + \Delta t \nu(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t), \qquad (2.6)$$

где *г* -координата атома, v – скорость, *a* – ускорение.

На практике для вычисления координат при интегрировании уравнений движения атомов часто пользуются алгоритмом Верле, идея которого заключается в разложении уравнения движения частицы на $r(t+\Delta t)$ и $r(t-\Delta t)$:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \nu(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t) , \qquad (2.7)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - \Delta t v(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 a(t), \qquad (2.8)$$

где *а* – ускорение:

$$a(t + \Delta t) = \frac{F(t + \Delta t)}{m}$$
(2.9)

Из уравнений (2.7) и (2.8) следует:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \Delta t^2 a(t)$$
(2.10)

Уравнение (2.10) – основное уравнение алгоритма Верле. Недостатком описанного алгоритма является то, что в нем отсутствует непосредственное определение скоростей частиц. Скорости можно рассчитать по уравнению:

$$v(t) = \frac{r(t + \Delta t) - r(t - \Delta t)}{2\Delta t}$$
(2.11)

Однако, такой метод увеличивает связанную с расчетом ошибку. Чтобы избежать этого, применяют скоростной алгоритм Верле, где скорость рассчитывается напрямую:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{\Delta t^2}{2}a(t), \qquad (2.12)$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{a(t) + a(t + \Delta t)}{2} \Delta t$$
 (2.13)

Еще один распространенный метод интегрирования – «алгоритм чередования» (другие названия «leap-frog», «чехарда») – часто применяется на стадии минимизации энергии перед проведением уравновешивания и основного расчета:

$$r(t + \Delta t) = r(t) - \Delta t v \left(t + \frac{1}{2} \Delta t \right), \qquad (2.14)$$

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + a(t)\Delta t, \qquad (2.15)$$

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v \left(t + \frac{1}{2} \Delta t \right) + v \left(t - \frac{1}{2} \Delta t \right) \right]$$
(2.16)

После вычисления координат и скоростей их новые значения принимаются за известные и происходит следующая итерация интегрирования от времени $(t+\Delta t) \kappa (t+2\Delta t)$. При необходимости параметры системы (координаты атомов, их скорости, энергия, температура и другие) выводятся в выходной файл. Зависимость координат и скоростей атомов от времени называется траекторией системы.

2.3. Алгоритмы геометрических (структурных) ограничений

В реальных системах между атомами присутствуют химические связи. Поэтому движение атомов должно быть ограничено таким образом, чтобы не нарушались длины связей при очередной итерации. Причиной таких нарушений, как правило, является разница между периодом колебаний атомов вдоль связи и шагом интегрирования *Дt*. В случае, если шаг интегрирования превышает период колебаний, при очередной итерации может происходить слишком сильный отскок атома. Наиболее правильным решением на первый взгляд может показаться выбор шага интегрирования, который значительно меньше с периода колебаний связей. Однако, в таком случае вычислительные мощности будут расходоваться на маловажные колебания атомов, не влияющие на общую траекторию молекулы. Одним из выходов является применение специальных алгоритмов геометрических (структурных) ограничений (geometry restrains algorithms). Эти алгоритмы не позволяют двум химически связанным атомам удалиться на расстояние, превышающее длину химической связи, фактически фиксируя расстояние между атомами. С математической точки зрения это означает решение уравнений движения (2.1) с дополнительными условиями:

$$g_i(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N, t) = 0,$$
 (2.17)

где i = 1, 2, ..., K, а K – количество связей в системе.

Существует несколько алгоритмов структурных ограничений. Наиболее распространенными алгоритмами являются SHAKE [74] и LINCS [75]. Идея первого состоит в том, что на каждый атом накладывается сила, возвращающая длину связи к нужной величине с заданной точностью. Можно записать математическое выражение для такой силы:

$$G_{ii} = \frac{\mu_{ij}(r_{ij}^2 - r_{ij}'^2)}{2\Delta t^2 (r_{ij}r_{ij}')^2} r_{ij}, \qquad (2.18)$$

где μ_{ij} – приведенная масса связанных атомов *i* и *j*, r_{ij} – начальный вектор связи, r'_{ij} – вектор связи после шага интегрирования Δt без учета наложенных ограничений.

В случае, когда в молекуле более двух атомов, восстановление длины одной связи может приводить к растяжению другой. Поэтому для молекул, состоящих из более чем двух атомов, применяется итерационный подход поочередного восстановления связей. Для второй и последующих связей изменения, вызванные восстановлением предыдущей связи рассматриваются как действие реальной силы. Очевидно, что алгоритму SHAKE будет сложно работать с такими крупными молекулами как белки и иные полимеры, потребуется множество итераций чтобы установить верную длину всех связей. Важной особенностью является неприменимость SHAKE к скоростному алгоритму интегрирования Верле. Дело в том, что в соответствии с уравнением (2.12) для получения новых координат требуются скорости, которые В SHAKE рассчитываются после определения новых координат.

Более современный и совершенный алгоритм – LINCS. Аналогично SHAKE сначала вычисляются координаты без учета ограничений, которые затем модифицируются в два шага: (1) длина проекции новой связи на направление старой связи устанавливается равной длине старой связи; (2) происходит поправка на вращение, корректирующая длину новой связи до нужной величины. Схематично алгоритм изображен на рисунке 3.



Рисунок 3. Схема алгоритма LINCS. Пунктирная линия – старая связь длиной d. Сплошная линия – новая связь. $l = d \cos \theta$, $p = \sqrt{2d^2 - l^2}$

С математической точки зрения на первом шаге LINCS представляет собой вычисления матрицы скорректированных координат r_{n+1} из матрицы координат без учета ограничений r'_{n+1} с использованием матриц масс атомов M, наложенных ограничений B_n и установленных длин связей d по следующей формуле:

$$\boldsymbol{r}_{n+1} = \boldsymbol{r}_{n+1}' - \boldsymbol{M}^{-1} \boldsymbol{B}_n (\boldsymbol{B}_n \boldsymbol{M}^{-1} \boldsymbol{B}_n^T)^{-1} (\boldsymbol{B}_n \boldsymbol{r}_{n+1}' - \boldsymbol{d}), \qquad (2.19)$$

где нижние индексы указывают на номер шага молекулярной динамики.

Первый шаг алгоритма не устанавливает длины связей в точности равные необходимым. Это происходит на втором шаге, где происходит поправка на вращение, а координаты преобразуются по формуле:

$$r_{n+1}^* = (I - T_n B_n) r_{n+1} + T_n p$$
, (2.20)

где *I* – единичная матрица, $\boldsymbol{T}_n = \boldsymbol{M}^{-1} \boldsymbol{B}_n^T (\boldsymbol{B}_n \boldsymbol{M}^{-1} \boldsymbol{B}_n^T)^{-1}, p_i = \sqrt{2d_i^2 - l_i^2}.$

Поправка на вращение - итерационный процесс, однако за исключением некоторых случаев минимизации энергии оказывается достаточно одной итерации, при этом ошибка не превышает 10^{-4} . Значительное вычислительное время затрачивается на инверсию матрицы $B_n M^{-1} B_n^T$, которую необходимо выполнять на каждом шаге. Размер данной матрицы $K \ge K$. Диагональные элементы представляют собой суммы $1/m_{i_1} + 1/m_{i_2}$. Недиагональные элементы не равны нулю только в случаях, когда две связи имеют общий атом, в таком случае их значения равняются $\cos \phi/m_c$, где m_c – масса общего для связей атома, а ϕ – угол между связями:

$$(\boldsymbol{B}_{n}\boldsymbol{M}^{-1}\boldsymbol{B}_{n}^{T})^{-1} = \boldsymbol{S}(\boldsymbol{I} - \boldsymbol{A}_{n})^{-1}\boldsymbol{S}, \qquad (2.21)$$

где $S = diag \left(\sqrt{\frac{1}{m_{1_1}} + \frac{1}{m_{1_2}}}, \dots, \sqrt{\frac{1}{m_{K_1}} + \frac{1}{m_{K_2}}} \right), A_n$ – матрица связности, в которой для связанных атомов *i* и *j* элементы A_{ij} равны единице, а для несвязанных равны нулю.

Для $(I - A_n)^{-1}$ можно провести разложение в ряд Тейлора:

$$(I - A_n)^{-1} = I + A_n + A_n^2 + \dots \approx I + A_n$$
 (2.22)

С учетом последнего выражения:

$$(\boldsymbol{B}_n \boldsymbol{M}^{-1} \boldsymbol{B}_n^T)^{-1} \approx \boldsymbol{S}(\boldsymbol{I} + \boldsymbol{A}_n) \boldsymbol{S}$$
(2.23)

Благодаря уравнению (2.23) можно избежать ресурсоемкой операции инверсии матрицы. Однако, такой метод применим только в случае, когда модули всех собственных значений матрицы связности A_n меньше единицы. Это условие выполняется в случае ограничений, наложенных на связи, но может нарушаться при наложении ограничений на углы в молекуле. Поэтому LINCS применяется только для связей. Тем не менее, на данный момент LINCS является основным алгоритмом структурных ограничений. В сравнении с SHAKE он показывает большую производительность и стабильность.

2.4. Термодинамические ансамбли. Термостаты и баростаты

Траектории атомов генерируются в заданном ансамбле, в соответствии с термодинамическими условиями, в которых изучается система. Установление ансамбля термодинамического подразумевает фиксацию определенных термодинамических параметров: число частиц, температура, давление, объем, химический потенциал, энергия. В классической молекулярной динамике применяют 3 вида термодинамических ансамблей: микроканонический (NVE), канонический (NVT) и изобарно-изотермический (NPT). Микроканонический ансамбль (NVE) характеризуется постоянными числом частиц, объемом и энергией системы. На практике NVE-ансамбль применяется исключительно редко, поскольку является полной идеализацией системы. Ансамбли NVT и NPT используются для моделирования реальных систем. Изобарно-изотермический ансамбль (NPT) сохраняет постоянное число частиц, давление и температуру в системе. Как правило, NPT-ансамбль используют в расчетах уравновешивания. Основной же расчет наиболее часто выполняют с использованием NVT-ансамбля, где фиксированы число частиц, объем системы и температура.

Для поддержания постоянных температуры и давления в системе используются специальные алгоритмы, называемы термостат и баростат соответственно. Температура системы представляет собой сумму кинетических энергий атомов и может быть рассчитана по уравнению:

$$T = \frac{1}{k_B N_f} \cdot \sum_{i=1}^N m_i \cdot v(t)_i^2, \qquad (2.24)$$

где T – температура системы, N – число атомов, N_f – число степеней свободы, v_i – скорость атома i, k_B – константа Больцмана, m_i – масса атома i, N – число атомов в системе, t – время.

Контролируя скорости частиц, можно поддерживать заданную температуру. Существует несколько алгоритмов контроля: (1) масштабирующий термостат, (2) термостат Берендсена, (3) масштабирование скоростей, (4) термостат Нозе-Гувера (5) термостат Андерсена. При самом простом подходе – масштабирующий термостат – на каждом шаге молекулярной динамики происходит умножение скоростей атомов на масштабирующий коэффициент, приводящий систему к нужной температуре. Изменение температуры в таком случае вычисляется по формуле:

$$\Delta T = \frac{1}{k_B N_f} \cdot \sum_{i=1}^N m_i \cdot (\lambda v_i)^2 - \frac{1}{k_B N_f} \cdot \sum_{i=1}^N m_i \cdot v_i^2 = (\lambda^2 - 1) \cdot T , \qquad (2.25)$$

где *λ* – поправка скорости, которая вычисляется как:

$$\lambda = \sqrt{\frac{T_{ref}}{T}},\tag{2.26}$$

где T_{ref} – необходимая температура, Т – текущая температура, N_f – число степеней свободы, k_B – константа Больцмана.

На практике метод простого масштабирование скоростей не используют, поскольку существуют более совершенные алгоритмы, позволяющие избежать резких скачков температуры и корректно воспроизводящие термодинамические ансамбли. Одним из наиболее часто используемых является термостат Берендсена. [76] Идея алгоритма состоит в том, что он имитирует теплообмен системы с крупным телом, имеющим необходимую (референсную) температуру T_{ref} . Масштабирующий скорость коэффициент вычисляется по формуле:

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \cdot \left(\frac{T_{ref}}{T} - 1\right)}, \qquad (2.27)$$

где Δt – шаг моделирования, а τ_T – характеристическое время термостата.

Преимуществом термостата Берендсена по сравнению с простым характеристического масштабированием является возможность контроля времени, благодаря которому приведение к нужной температуре происходит постепенно. Термостат можно использовать на разных этапах МД расчета, задавая соответствующее характеристическое время. Еще одним преимуществом является воспроизведение флуктуаций температуры системы. Однако, при использовании термостата Берендсена, подавляются флуктуации кинетической энергии, что ведет к не вполне корректному воспроизведению канонического ансамбля, что в свою очередь сказывается на корректности воспроизведения некоторых термодинамических свойств систем, зависящих от флуктуаций кинетической энергии (например, теплоемкости). Погрешность работы алгоритма Берендсена уменьшается с увеличением количества частиц в системе, а его реализация не требует большого количества вычислительных ресурсов. Поэтому термостат Берендсена часто применяется для крупных систем.

Аналогичным термостату Берендсена, является алгоритм масштабирования скоростей (не путать с масштабирующим термостатом!) [77]. Разница состоит в наличии в уравнении изменения кинетической энергии дополнительной поправки, гарантирующей корректное воспроизведение ансамбля:

$$dK = \left(K_{ref} - K\right)\frac{dt}{\tau_T} + 2\sqrt{\frac{K \cdot K_{ref}}{N_f}}\frac{dW}{\sqrt{\tau_T}},$$
(2.28)

где dt – шаг моделирования, а τ_T – характеристическое время термостата, dK – изменение кинетической энергии, K_{ref} – кинетическая энергия при температуре T_{ref} , dW – Винеровский случайный процесс.

Для максимально точных термодинамических расчетов используют алгоритм Нозе-Гувера [78], в приближении которого атомы в системе находятся в

постоянном взаимодействии с некоторой силой, влияющей на их скорость. Эта сила пропорциональна произведению скорости движения атома на некоторый коэффициент (ζ). Этот коэффициент является самостоятельной динамической величиной, обладающей собственным моментом (p_{ζ}), его производная по времени вычисляется как разность между текущей и референсной температурой. По физическому смыслу такую силу можно сравнить с силой трения при движении тела в среде. Математическое описание термостата Нозе-Гувера выглядит следующим образом:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}}{m} - \frac{p_{\xi}}{Q} \frac{d\mathbf{r}}{dt}, \qquad (2.29)$$

$$\frac{dp_{\xi}}{dt} = \left(T - T_{ref}\right),\tag{2.30}$$

$$\frac{d\xi}{dt} = \frac{N_f}{Q} \left(T - T_{ref} \right), \qquad (2.31)$$

где ξ – коэффициент термостатирующей силы, p_{ξ} – момент коэффициента ξ , N_f – число степеней свободы, Q – массовый параметр, характеризующий степень взаимодействия системы термостатирующей силой, который часто задается с помощью характеристического времени τ_T :

$$Q = \frac{\tau_T^2 T_{ref}}{4\pi^2} \tag{2.32}$$

Термостат Нозе-Гувера является вычислительно затратным, поэтому его использование, особенно для крупных систем, не всегда целесообразно. Термостат Андерсена [79] имитирует столкновения атомов с виртуальным газом, при которых частицам приписывается случайная скорость. При использовании этого термостата нарушается траектория атома. Это означает, что моделирование, проведенное с термостатом Андерсена, не может корректно воспроизвести процесс диффузии, что является существенным недостатком алгоритма.

Для подержания давления пользуются алгоритмами баростатов, наиболее важными являются баростат Берендсена и баростат Парринелло-Рамана. Баростат Берендсена действует аналогично термостату, умножая векторы координат атомов и размеров моделируемой ячейки на некоторый коэффициент *µ*:

$$\mu = 1 - \frac{\beta \Delta t}{3\tau_P} \cdot \left(P_{ref} - P \right), \qquad (2.33)$$

$$\mu = \sqrt[3]{1 - \frac{\Delta t}{\tau_P} \cdot \left(P_{ref} - P\right)}, \qquad (2.34)$$

где P_{ref} – необходимое (референсное) давление, P – текущее давление, τ_P – характеристическое время баростата, β – изотермическая сжимаемость системы

Уравнения (2.33) и (2.34) описывают случай изотропной системы. Для анизотропной системы величины становятся тензорными, а новые координаты и размеры ячейки вычисляются путем умножения на матрицу *µ*:

$$\boldsymbol{\mu} = 1 - \frac{\boldsymbol{\beta} \Delta t}{3\tau_T} \cdot (\boldsymbol{P_{ref}} - \boldsymbol{P}(t))$$
(2.35)

Аналогично термостату, баростат Берендсена не совсем точно воспроизводит NPT-ансамбль, особенно в случае маленьких систем. В связи с этим для более точных расчетов используют другой алгоритм – баростат Парринелло-Рамана.[80] В данном алгоритме векторы ячейки представляют собой матрицу **b**, которая подчиняется уравнениям движения:

$$\frac{d\mathbf{b}^2}{dt} = V W^{-1} \mathbf{b}'^{-1} \left(\boldsymbol{P}(t) - \boldsymbol{P}_{ref} \right), \qquad (2.36)$$

где V – объем ячейки, W^{1} – матрица параметров, характеризующая возможные деформации ячейки и скорость баростатирования, элемент матрицы рассчитывается по формуле:

$$W_{ij}^{-1} = \frac{4\pi^2 \beta_{ij}}{3\tau_P^2 L},\tag{2.37}$$

где *L* – наибольшая сторона расчетной ячейки.

2.5. Силовые поля GROMOS

Силовым полем называется набор констант, характеризующих атомы и взаимодействия между ними, а также формулы и иные правила расчетов, связывающие потенциальную энергию и константы силового поля. Существует множество силовых полей, среди которых наиболее популярными являются силовые поля GROMOS [52-57], AMBER [81-84], CHARMM [85-87], OPLS [88-91] - это далеко не исчерпывающий список. Технически разница между силовыми полями может заключаться в константах, методе их подбора, в формулах, описывающих потенциальную энергию того или иного взаимодействия, в правилах учета взаимодействий. Силовые поля часто специализированы и наиболее качественно описывают один или несколько классов соединений. Наиболее развитые семейства силовых полей (например, GROMOS или AMBER) могут описывать сразу несколько классов соединений. Распространена ситуация, когда силовое поле описывает один класс химических соединений лучше, чем другой. Например, силовые поля семейства GROMOS традиционно применяются для описания биомолекулярных систем, в частности углеводных полимеров и белков. С помощью современных версий GROMOS можно моделировать и нуклеиновые кислоты, но качество воспроизведения структурных характеристик ДНК и РНК оказывается ниже, чем для полей AMBER [92], которые в свою очередь не всегда корректно воспроизводят конформационные особенности углеводов. Поля типа CHARMM лучше параметризованы для описания белков. Поскольку основным объектом моделирования является углеводный биополимер работе модификация хитозан, В данной проведена силового поля GROMOS 56A_{CARBO}, которое является расширением поля GROMOS 53A6. Рассмотрим основные принципы построения силовых полей GROMOS.

Силовое поле GROMOS 53A6 относится к группе силовых полей с объединенными атомами и предусматривает моделирование растворителя в явном виде. При работе с данным силовым полем полимерные молекулы делятся на отдельные блоки, называемые «остатками», по аналогии с мономерами белков – остатками нуклеиновых кислот. Различным образом комбинируя остатки возможно получить разные молекулы. Между атомами внутри остатков, между атомами в разных остатках (но в одной молекуле) и между атомами в разных молекулах установлены потенциалы взаимодействия: внутри- и межмолекулярные. GROMOS 53A6 работает в приближении объединенных атомов (united atom approach), при котором некоторые атомы учитываются в

неявном виде. Это приближение, например, используется для атомов водорода ковалентно связанных с атомами углерода. Такие атомы водорода в явном виде не указываются, однако константы атома углерода изменены таким образом, чтобы в неявном виде учесть присутствие атомов водорода. Объединенный атом моделирует небольшую химическую группу с предсказуемыми свойствами (например, –CH₂–).

Потенциальная энергия атома в силовых полях GROMOS складывается из энергии связанных и несвязанных взаимодействий (формула 2.4). Потенциал связанных взаимодействий складывается из энергий четырех типов: энергия ковалентной связи между атомами U_{bond} , энергия валентного угла U_{angle} , энергия неправильных диэдральных углов U_{har} и энергия торсионных (правильных) диэдральных углов U_{trig} .

$$U_{bon} = U_{bond} + U_{angle} + U_{har} + U_{trig} , \qquad (2.38)$$

где U_{bond} – энергия ковалентных связей, U_{angle} – энергия ковалентных углов, U_{har} – энергия неправильных диэдральных углов, U_{trig} – энергия правильных диэдральных углов.

Потенциал несвязанных взаимодействий включает энергию ван-дерваальсовых U_{VdW} и электростатических взаимодействий $U_{elecctrostatic}$.

$$U_{nbon} = U_{VdW} + U_{electrostatic} \tag{2.39}$$

Таким образом, формулу потенциальной энергии можно записать следующим образом:

$$U = U_{bond} + U_{angle} + U_{har} + U_{trig} + U_{VdW} + U_{electrostatic} + U_{spec}$$
(2.40)

Рассмотрим подробнее каждый компонент уравнения (2.40). Потенциал валентной связи:

$$U_{bond} = \frac{1}{2}k_b(b-b_0)^2, \qquad (2.41)$$

где b_0 – равновесное значение длины связи, определенное экспериментально по данным РСА-анализа, k_b – ангармоническая константа жесткости связи, определенная спектроскопическими методами и связанная с гармонической константой k_b^{harm} по уравнению:

$$k_b^{harm} = 2k_b b_0^2 \tag{2.42}$$

Потенциал валентного угла:

$$U_{angle} = \frac{1}{2} k_{\theta} [\cos(\theta) - \cos(\theta_0)]^2, \qquad (2.43)$$

где θ_0 – равновесное значение угла, определенное экспериментально по данным РСА-анализа, k_{θ} – ангармоническая константа жесткости угла, определенная спектроскопическими методами и связанная с гармонической константой k_{θ}^{habm} по уравнению:

$$k_{\theta} = \frac{2k_{B}T}{\left[\cos\left(\theta_{0} + \sqrt{k_{B}T/k_{\theta}^{habm}}\right) - \cos\theta_{0}\right]^{2} + \left[\cos\left(\theta_{0} - \sqrt{k_{B}T/k_{\theta}^{habm}}\right) - \cos\theta_{0}\right]^{2}}$$
(2.44)

Потенциал неправильных диэдральных углов:

$$U_{har} = \frac{1}{2} k_{\xi} (\xi - \xi_0)^2, \qquad (2.45)$$

где k_{ξ} – константа жесткости неправильного диэдрального угла, ξ_0 – равновесное значение угла.

Потенциал правильных диэдральных углов:

$$U_{trig} = k_{\varphi} [1 + \cos(\delta) \cos(m\varphi)], \qquad (2.46)$$

где k_{φ} – константа жесткости правильного диэдрального угла, δ – фазовый сдвиг (угол от 0 до π), *m* – мультиплетность.

Потенциал ван-дер-ваальсовых взаимодействий представляется в виде потенциала Леннарда-Джонса:

$$U_{VdW} = \frac{C12_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C6_{ij}}{r_{ij}^6},$$
(2.47)

где r_{ij} – расстояние между атомами *i* и *j*, а величины $C12_{ij}$ и $C6_{ij}$ зависят от свойств атомов и в общем случае определяются по формулам:

$$C12_{ij} = \sqrt{C12_i C12_j}$$
 $C6_{ij} = \sqrt{C6_i C6_j}$ (2.48)

Параметры *C12_i*, *C12_j*, *C6_i*, *C6_j* определяются для атомов і и ј и зависят от типа взаимодействия между атомами. В стандартной реализации силового поля для атома возможно выбрать одно из значений константы отталкивания *C12*: *C12*(I), *C12*(II), *C12*(III). Эти значения используются для разных типов
взаимодействий между атомами. Например, полярные или ионные взаимодействия требуют увеличенной константы отталкивания. Часто специальные параметры используются для описания взаимодействий атомов, способных образовывать водородную связь.

взаимодействия В силовых полей GROMOS с рамках атомом, находящимся на расстоянии трех ковалентных связей, учитываются специальным 1-4 взаимодействия. Особый учет 1-4 образом – это так называемые взаимодействий необходим для корректной работы с торсионными углами. Для 1-4 взаимодействий имеется отдельный набор параметров С6 и С12. В наиболее современных модификациях GROMOS, в частности в 56А_{САRBO}, дополнительно учитываются специальные 1-5 взаимодействия, что позволяет точнее описать конформационные свойства глюкопиранозных колец, приближая ИХ К экспериментальным данным и результатам полуэмпирическиз расчетов. [93-96] В силовом поле 56A_{CARBO} константы заданы в формате $[C_6]_i^{1/2}$ и $[C_{12}]_i^{1/2}$, а формулы (2.48) выглядят иначе:

$$C6_{i'j'} = \sqrt{([C_6]_{i'}^{1/2})^2 \cdot ([C_6]_{j'}^{1/2})^2},$$

$$C12_{i'j'} = \sqrt{([C_{12}]_{i'}^{1/2})^2 \cdot ([C_{12}]_{j'}^{1/2})^2},$$
(2.49)

где индексы *i*' и *j*' характеризуют не только тип атомов, но и способ их взаимодействия (например, полярное или неполярное).

Еще одной важной особенностью силового поля 56A_{CARBO} является прямая параметризация коэффициентов *C12* и *C6* для некоторых 1-4 и 1-5 внутримолекулярных взаимодействий. Для таких взаимодействий константы табулированы и не рассчитываются по формулам (2.49).

Электростатические взаимодействия в силовом поле GROMOS 53A6 складываются из трех составляющих:

$$U_{electrostatic} = U_C + U_{RF} + U_{RFc} , \qquad (2.50)$$

где U_C – потенциал кулоновского взаимодействия, U_{RF} – вклад взаимодействия атома с электрическим полем, создаваемым другим атомом за пределами радиуса

отсечки учета кулоновских взаимодействий (R_{rf}), U_{RFc} – постоянный потенциал, не зависящий от расстояния между атомами. Эти потенциалы описываются по уравнениям:

$$U_C = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_1\varepsilon_0} \cdot \frac{1}{r_{ij}},\tag{2.51}$$

$$U_{RF} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_1 \varepsilon_0 r_{ij}} \cdot \frac{-\frac{1}{2}C_{rf} r_{ij}^2}{R_{rf}^3}, \qquad (2.52)$$

$$U_{RFc} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_1 \varepsilon_0 r_{ij}} \cdot \frac{-(1 - C_{rf})}{R_{rf}}, \qquad (2.53)$$

$$C_{rf} = \frac{(2\varepsilon_1 - 2\varepsilon_2) \cdot (1 + \kappa R_{rf}) - \varepsilon_2 (\kappa R_{rf})^2}{(\varepsilon_1 + 2\varepsilon_2) \cdot (1 + \kappa R_{rf}) + \varepsilon_2 (\kappa R_{rf})^2}, \qquad (2.54)$$

где q_i и q_j – заряды взаимодействующих атомов, r_{ij} – расстояние между атомами, ε_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума, ε_1 – диэлектрическая относительная проницаемость среды (как правило, $\varepsilon_1 = 1$), R_{rf} – радиус отсечки учета кулоновских взаимодействий, ε_2 – диэлектрическая проницаемость среды за пределами радиуса отсечки, κ – величина, обратная Дебаевской длине для среды за пределами радиуса отсечки.

Потенциал U_{RFc} не зависит от расстояния, а значит, не вносит вклад в силы, действующие на атомы. Он сводит к нулю энергию электростатического взаимодействия с атомами, находящимися на расстоянии отсечки, тем самым уменьшая вклад шума отсечки в энергию. Несмотря на кажущуюся сложность уравнений (2.45 – 2.47), контролируются они всего тремя параметрами – двумя зарядами атомов, задаваемых силовым полем и радиусом отсечки, который обычно указывают в параметрах МД расчета. Заряды атомов определяются на основании подхода вклада связи (bond-increment approach) [97, 98], при котором соседние атомы влияют на заряд рассматриваемого центрального атома. Этот подход применяется к связям с участием атома кислорода. Так называемые «зарядовые группы» включают в себя сам атом кислорода и связанные с ним химически атомы. Как правило, зарядовая группа электронейтральна. На рисунке

4 изображена молекула глюкозы, в которой зарядовые группы определены в соответствии с правилами 56A_{CARBO}.



Рисунок 4. Зарядовые группы в молекуле глюкозы, определенные в соответствии с правилами GROMOS 56A_{CARBO}.

Поскольку кулоновский потенциал является дальнодействующим, для расчета энергии электростатического взаимодействия частиц используются специальные алгоритмы, например техника эвальдовского суммирования [99] либо алгоритмы типа быстрого мультипольного разложения (Fast Multipole Method) [100, 101] или метода SPME (Smooth Particle Mesh Ewald)[102].

2.6. Потенциал средней силы, зонтичная выборка, метадинамика

Некоторые моделируемые процессы требуют больших времен расчета, недоступных в рамках существующих вычислительных мощностей. Однако, такие процессы можно моделировать, используя управляемую молекулярную динамику (stirred molecular dynamics), которая может быть реализована различными способами, в частности методом потенциала средней силы (potential of mean force, PMF) и метадинамикой (metadynamics, MTD, METAD, MetaD).

В ходе управляемого расчета РМF на некоторый параметр системы накладывается действие дополнительного потенциала. Параметр обычно

называют координатой реакции. Часто в качестве координаты реакции выступают геометрические параметры, например, расстояние между центрами масс двух молекул или константа характеризующая конформацию молекулы. Координатой может параметр, характеризующий систему реакции также целиком или взаимодействия отдельную часть. например, степень молекулы ee c растворителем. Чаще всего PMF применяют совместно с методом зонтичной выборки (umbrella sampling).[103] В рамках метода зонтичной выборки траекторию системы вдоль координаты реакции делят на равные по величине промежутки, получая набор состояний системы вдоль координаты реакции. Чтобы зафиксировать систему В заданном состоянии, на координату накладываются ограничивающие потенциалы. Таким образом, для каждого из состояний образуется «окно», то есть интервал координаты реакции, в рамках молекулярно-динамический которого проводится расчет необходимых параметров. В рамках такого подхода возможно достоверно восстановить вид профиля изучаемого параметра только в небольшой окрестности вокруг состояния системы. Поэтому, для получения качественных профилей необходимо использовать множество состояний вдоль координаты реакции, чтобы функции потенциалов, наложенных для удержания системы возле нужной точки, пересекались друг с другом, а сами расчеты в окнах должны иметь достаточную продолжительность. Схематично метод зонтичной выборки изображен на Рисунке 5 на примере диссоциации бинарного комплекса двух молекул А-В.

Метод зонтичной выборки последовательно сканирует потенциальную энергию системы вдоль координаты реакции. Такой подход удобно применять при оценке взаимодействия молекул друг с другом, когда сравнительно легко выделить четкую траекторию системы, например, последовательно удаляя одну молекулу от другой.



Рисунок 5. Схема метода зонтичной выборки.

Для изучения конформационных особенностей удобно использовать иной подход – метадинамику. [104] При метадинамическом расчете на систему, минимуме энергии, накладывают небольшой потенциал, находящуюся В позволяющий немного приподняться от минимума и обследовать состояния системы вокруг него. Потенциал постепенно увеличивается, происходит поверхности потенциальной энергии исследование слой за слоем. При обнаружении нового минимума система помещается в него, вновь накладывается небольшой который потенциал, постепенно увеличивается, так же последовательно исследуя новый минимум слой за слоем. Схематично процесс метадинамики изображен на рисунке 6. Метадинамика позволяет восстановить профиль энергии без предварительного построения траектории системы вдоль координаты реакции.



Рисунок 6. Схема метода метадинамики.

2.7. Критерии выбора модели в случае нелинейных зависимостей

Результаты, полученные В ходе молекулярно-динамического моделирования, обычно представляют собой траектории большого количества частиц во времени и для получения информации о системе требуется рационализация большого объема этого данных на основе различных При этом необходимо оценить, насколько хорошо та математических моделей. или иная выбранная модель процесса подходит для описания исследуемой зависимости. Выбор модели обычно выполняется на основе регрессионного анализа. Для линейных моделей надежным и простым критерием оценки качества $(R^{2}),$ является коэффициент детерминации а также скорректированный коэффициент детерминации (R_{adi}), учитывающий количество параметров модели (то есть ее сложность) и количество данных:

$$R^{2} = 1 - \frac{\sum (y - \hat{y})^{2}}{\sum (y - \bar{y})^{2}},$$
(2.55)

$$R_{adj} = 1 - \frac{n-1}{n-p} (1 - R^2) \le R^2, \qquad (2.56)$$

где y – фактические значения, \hat{y} – расчетные значения, \bar{y} – среднее значение, n – количество точек в наборе данных, p – количество параметров.

 R^2 принимает значения от 0 до 1, где 0 соответствует отсутствию корреляции, а 1 – точной функциональной зависимости. R_{adj} может быть меньше нуля в случае плохой корреляции и большого количества параметров модели, используемой для описания зависимости. В случае нелинейных функций оказывается, что R^2 и R_{adj} не всегда надежно определяют применимость модели. [105] С этой задачей лучше справляются информационный критерий Акаике (Akaike Information Criterion, *AIC*) [106] и его модификация – байесовский информационный критерий (Bayesian information criterion, *BIC*) [107]:

$$AIC = 2p - 2\ln(L)$$
, (2.57)

$$BIC = p \ln(n) - 2 \ln(L)$$
, (2.58)

$$\ln(L) = \frac{1}{2} \left(-n \cdot \left(\ln(2\pi) + 1 - \ln(n) + \ln \sum_{i=1}^{n} (y - \hat{y})_{i}^{2} \right) \right), \quad (2.59)$$

где $\ln(L)$ – логарифмическая функция правдоподобия.

Оба критерия учитывают как количество данных, так и сложность модели. *BIC* учитывает сложность в большей степени, чем *AIC*. Значения критериев могут колебаться в широком диапазоне, наименьшая величина критерия соответствует наилучшей модели обработки данных.

Поскольку большинство процессов, исследуемых в данной работе, описываются сложными нелинейными зависимостями, эти критерии будут применяться совместно.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Модификация силового поля

Силовое поле 56A_{CARBO} содержит три остатка β–D–глюкопиранозы: GLC, GLCN, GLC0 (мономеры с GLCN и GLC0 являются терминальными). Для параметризации этих остатков было использовано квантово-химическое исследование, проведенное на уровне теории B3LYP/6-311+G(d,p).[54] Главный структурный элемент хитозана – В–D–глкопиранозамин–2 является аналогом В– D-глюкопиранозы, послужившей основой для параметризации 56A_{CARBO}. Для описания хитозана с помощью силового поля 56A_{CARBO} достаточно заменить гидроксильную группу, входящую в зарядовую группу С2, на аминогруппу. Аминогруппа более химически активна, поэтому необходимо моделировать различные ее состояния: свободная, протонированная, замещенная (например, ацетилированная). Таким образом, силовое поле должно быть дополнено следующими остатками: CHT0, CHTN, CHT, CHTP, CHTR (рисунок 7). Остатки СНТО и СНТМ по аналогии с GLC0 и GLCN являются терминальными.



Рисунок 7. Остатки для моделирования хитозана с использованием силового поля GROMOS.



Рисунок 8. Оптимизированные структуры для непротонированного (слева) и протонированного (справа) β–D–глюкопиранозамина-2. Уровень теории: B3PW91/6-31G++(d,p)

Модификация силового поля предполагает следующие изменения: (1) изменение зарядов атомов, (2) определение новых зарядовых групп для случаев N-замещенного хитозана, (3) выбор новых параметров для связей, валентных, правильных и неправильных диэдральных углов. Рассмотрим зарядовую группу C2 (рисунок 9).



Рисунок 9. Зарядовая группа С2 для целлюлозы и хитозана. ∆q_{i→j} – направления смещения электронной плотности в рамках подхода вклада связи.

Распределение зарядов в зарядовой группе C2 определено описанным выше (раздел 2.5) подходом вклада связи. В случае замены гидроксильной группы на аминогруппу, должны быть заданы параметры смещения заряда между водородом и азотом ($\Delta q_{H\to N}$) и углеродом и азотом ($\Delta q_{C\to N}$). Однако, в литературе данных о таких параметрах найти не удалось, поэтому заряды были выбраны на основании квантово-химических расчетов. Для выбора метода квантово-химического расчета проведено отдельное исследование, в рамках которого изучили мономеры глюкопиранозы. Критериями выбора метода являлись: (а) пропорциональность зарядов, полученных в квантово-химическом расчете зарядам в силовом поле 56A_{CARBO}, (б) электронейтиральность зарядовых групп, соответствующих группам исходного силового поля. Чтобы найти наиболее подходящую схему расчетов были проверены несколько способов расчета заряда и уровней теории: расчет зарядов по Малликену (уровни теории Hartree-Fock, BLYP, B3LYP, PBE0, M06 функционалы) и ESP-заряды вычисленные методами Merz-Kollman (MK) [108] и CHelpG [109]. В таблице 1 приведены результаты расчетов.

Геометрия	Заряд	qC ^a	qO^a	qH ^a	Q_{sum}	Coef	\mathbb{R}^2
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken hf/sto-3g	0.1160	-0.3190	0.2030	-0.0010	2.013	1.0000
b3pw91/6-31++G(d,p)	CHelpG hf/sto-3g	0.1540	-0.5975	0.3185	-0.1251	1.289	0.9999
b3pw91/6-31++G(d,p)	CHelpG p3lyp/6-311+G(d,p)	0.2372	-0.7099	0.4496	-0.0231	0.931	0.9998
b3pw91/6-31++G(d,p)	CHelpG b3pw91/6-31++G(d,p)	0.2279	-0.7014	0.4544	-0.0191	0.945	0.9993
b3lyp/6-311+G(d,p)	CHelpG b3lyp/6-311+G(d,p)	0.2233	-0.7077	0.4488	-0.0356	0.953	0.9993
hf/sto-3g	CHelpG hf/sto-3g	0.1540	-0.5075	0.3185	-0.0351	1.353	0.9991
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken pbe1pbe/cc-pVTZ	0.1420	-0.3580	0.2160	0.0000	1.775	0.9983
b3pw91/6-31++G(d,p)	MK p3lyp/6-311+G(d,p)	0.2105	-0.7032	0.4570	-0.0357	0.971	0.9980
b3pw91/6-31++G(d,p)	MK hf/sto-3g	0.1480	-0.5306	0.3342	-0.0484	1.335	0.9978
hf/sto-3g	MK hf/sto-3g	0.1429	-0.4993	0.3198	-0.0367	1.397	0.9977
b3lyp/6-311+G(d,p)	MK b3lyp/6-311+G(d,p)	0.2054	-0.7021	0.4576	-0.0391	0.980	0.9976
b3pw91/6-31++G(d,p)	MK b3pw91/6-31++G(d,p)	0.2023	-0.6943	0.4610	-0.0310	0.987	0.9968
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken pbe1pbe/6-31G(d,p)	0.2350	-0.5800	0.3360	-0.0080	1.105	0.9967
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken b3lyp/STO-3G	0.0880	-0.2980	0.2060	-0.0030	2.260	0.9956

Таблица 1. Результаты расчетов атомных зарядов с использованием различных методов определения заряда и уровней теории.

b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken m06/6-31G(d,p)	0.2530	-0.6020	0.3460	-0.0020	1.056	0.9951
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken blyp/cc-pVTZ	0.1480	-0.3450	0.1990	0.0030	1.830	0.9945
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken m06/STO-3G	0.0940	-0.3240	0.2260	-0.0040	2.088	0.9947
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken b3lyp/cc-pVTZ	0.1590	-0.3670	0.2120	0.0030	1.714	0.9943
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken pbe1pbe/STO-3G	0.0860	-0.2980	0.2100	-0.0030	2.268	0.9940
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken blyp/6-31G(d,p)	0.2300	-0.5340	0.3030	-0.0020	1.188	0.9937
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken b3lyp/6-31G(d.p)	0.2460	-0.5710	0.3210	-0.0040	1.115	0.9932
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken blyp/STO-3G	0.0790	-0.2860	0.2020	-0.0050	2.404	0.9926
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken hf/cc-pVTZ	0.2060	-0.4430	0.2420	0.0050	1.423	0.9876
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken hf/6-31G(d,p)	0.3130	-0.6880	0.3630	-0.0110	0.935	0.9865
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken m06/cc-pVTZ	0.1730	-0.3610	0.1980	0.0100	1.730	0.9861
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken blyp/6-311G(2d,2p)	0.2510	-0.5110	0.2510	-0.0090	1.271	0.9748
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken m06/6-311G(2d,2p)	0.2920	-0.5850	0.2880	-0.0040	1.105	0.9738
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken b3lyp/6-311G(2d,2p)	0.2780	-0.5470	0.2600	-0.0090	1.195	0.9688
b3pw91/6-31++G(d,p)	pbe1pbe/6-311G(2d,2p)	0.2800	-0.5470	0.2580	-0.0090	1.197	0.9673
b3pw91/6-31++G(d,p)	hf/6-311G(2d,2p)	0.3820	-0.6660	0.2770	-0.0070	1.017	0.9387
b3pw91/6-31++G(d,p)	b3lyp/6-311G(3df,3pd)	0.4570	-0.6910	0.2500	0.0170	1.026	0.8958
b3pw91/6-31++G(d,p)	pbe1pbe/6-	0.4600	-0.7150	0.2460	-0.0090	1.023	0.8944
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken blyp/6-311G(3df,3pd)	0.4350	-0.6390	0.2350	0.0310	1.094	0.8917
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken m06/6-311G(3df,3pd)	0.4200	-0.5990	0.2130	0.0350	1.183	0.8809
b3pw91/6-31++G(d,p)	Mulliken hf/6-311G(3df,3pd)	0.5740	-0.8620	0.2740	-0.0140	0.882	0.8770

^а – заряды атомов внутри зарядовой группы C2 (рисунок 9). Заряд атома углерода рассчитан с учетом зарядов связанных с ним атомов водорода (в соответствии с приближением «объединенных атомов, используемом в силовом поле).

 $Q_{\rm sum}$ – общий заряд зарядовой группы C2 (должен быть нулевым в соответствии с правилами поля 56A_{CARBO}).

Coef – коэффициент пропорциональности между зарядами, рассчитанными квантовохимически и зарядами в силовом поле.

 R^2 – коэффициент детерминации между рассчитанными зарядами и зарядами в силовом поле 56 A_{CARBO} .

47

При расчете зарядов методом HF/STO-3G коэффициент детерминации близок к единице, что говорит о высокой степени пропорциональности между зарядами, полученными квантово-химическим методом, и зарядами в силовом поле. Коэффициент пропорциональности в данном случае составляет 2.013. Общий заряд зарядовой группы близок к нулю, что подтверждает корреляцию HF/STO-3G И параметрами Таким образом, между силового поля. Малликеновские заряды, рассчитанные методом HF/STO-3G наилучшим образом подходят для параметризации силового поля в части зарядов. Интересно, что сравнительно скромный уровень теории наилучшим образом подходит для параметризации по сравнению с более продвинутыми методами и базисами (в том *df*-поляризационные числе учитывающими И функции). Возможным объяснением ЭТОГО является значительная локализация заряда случае В использования HF/STO-3G, которая важна для определения точечных зарядов на атомах. Следует отметить, что исходное силовое поле было параметризовано с более B3LYP/6-311G+(d,p)использованием высокого уровня теории С дополнительными «ручными» корректировками. ЕSP-заряды, рассчитанные по МК и CHelpG схемам, демонстрируют хорошее, но не идеальное совпадение с силовым полем. Они тоже требуют дополнительной обработки в виде умножения коэффициент пропорциональности, а величина самого коэффициента на пропорциональности мало отличается от более простой схемы расчета зарядов по Малликену. Зарядовые группы случае ESP-зарядов оказываются В не нейтральными. Таким образом, использование MK и CHelpG схем для параметризации требует более значительных ручных корректировок, чем Малликеновские заряды, рассчитанные на уровне теории HF/STO-3G.

Таблица 2. Заряды атомов β–D–глюкопиранозы, полученные из квантовохимического расчета (геометрия B3PW91/6–31++G(d,p), заряды атомов HF/STO-3G) в сравнении с зарядами атомов в силовом поле GROMOS 56A_{CARBO}.

Зарядовая	Атом	Заряд	Атом в	Заряд	Заряд HF/STO-3G
группа	AIUM	HF/STO-3G	$56A_{CARBO}^{a}$	56A _{CARBO}	(united atom)
	C1	0.188	C1	0 464	0 467
	H_{C1}	0.044	CI	0.404	0.407
	O1	-0.319	O1	-0.642	-0.642
C1–C5	H_{O1}	0.206	HO1	0.410	0.415
	05	-0.276	O5	-0.464	-0.556
	C5	0.076	C 5	0.222	0.200
	H_{C5}	0.063	CS	0.232	0.280
	C2	0.052	C^{2}	0.222	0.224
C^{2}	H_{C2}	0.064	C2	0.232	0.234
C2	O2	-0.319	O2	-0.642	-0.642
	H_{O2}	0.203	HO2	0.410	0.409
	C3	0.060	C2	0.222	0.220
C^{2}	H_{C3}	0.054	C3	0.232	0.229
0.5	O3	-0.321	O3	-0.642	-0.646
	H _{O3}	0.203	HO3	0.410	0.409
	C4	0.065	C_{1}	0.222	0.242
C4	H_{C4}	0.055	C4	0.232	0.242
C4	O4	-0.315	O4	-0.642	-0.643
	H_{O4}	0.203	HO4	0.410	0.409
	C6	0.009			
	$H1_{C6}$	0.056	C6	0.232	0.266
C6	$H2_{C6}$	0.067			
-	06	-0.307	O6	-0.642	-0.618
	H_{O6}	0.189	HO6	0.410	0.380

^а – атомы углерода в 56A_{CARBO} в приближении «объединенных атомов» включают в себя связанные атомы водорода.

В таблице 2 приведены заряды атомов β–D–глюкопиранозы полученные методом квантовой химии (HF/STO–3G) и заряды силового поля 56A_{CARBO}. При этом учтено, что СП работает в приближении объединенных атомов, в котором атомы водорода, связанные с углеродом ковалентными связами учтены в неявном виде. Как можно видеть из таблицы, рассчитанные квантово-химически заряды

близки к тем, что присутствуют в силовом поле. Это подтверждает достоверность предложенного метода расчета зарядов для параметризации силового поля.

Оптимизация геометрии β–D–глкопиранозамина–2 была проведена на B3PW91/6-31++G(d,p)уровне (такой же уровень теории, как для β–D–глюкопиранозы). Затем для оптимизированной молекулы выполнили расчет зарядов по Малликену с использованием HF/STO-3G. Квантово-химический расчет был выполнен для молекулы в вакууме, что соответствует методу, предложенному авторами силового поля 56A_{CARBO}. Рассчитанные заряды атомов водорода в аминогруппе оказались различны: +0.158 и +0.174 е. Однако, эти атомы должны быть эквиваленты в соответствии с правилами построения силовых полей GROMOS. Поэтому, заряды атомов водорода были усреднены между собой. Заряд объединенного атома С2 был рассчитан как сумма зарядов атома углерода и ковалентно связанного с ним атома водорода. Зарядовая группа С2 оказалась незначительно положительно заряжена (+0.02 е). Чтобы исключить положительный заряд группы, модули величин положительных и отрицательных зарядов были равномерно уменьшены и увеличены соответственно. Рассчитанные квантово-химически заряды по Малликену и заряды, полученные с помощью описанных выше корректировок приведены в таблице 3.

	Заряд по		
Атом	Малликену	Атом в остатке СНТ	Заряд в силовом поле
	(HF/STO–3G)		
	Остатки СНТ,	СНТО, СНТN (свободная а	миногруппа)
C2	0.027	C^{2}	0 107
H_{C2}	0.076	C2	0.197
N2	-0.415	N2	-0.845
H21	0.158	H21	0.324
H22	0.174	H22	0.324
	Остаток СІ	НТР (протонированная ами	ногруппа)
C2	0.054	C^{2}	0.227
H_{C2}	0.129	C2	0.227
N2	-0.361	N2	-0.448
H21	0.315	H21	0.407

Таблица 3. Заряды атомов в зарядовой группе С2.

H22	0.333	H22	0.407
H23	0.337	H23	0.407
	Остаток СНТК (зам	иещенная аминогруппа)	
C2	0.044	C^{2}	0.250
H_{C2}	0.073	C2	0.230
N2	-0.373	N2	-0.709
H21	0.214	H21	0.459

Структуры N-протонированных N-ацетилированных β-D-И глюкопиранозаминов-2 были оптимизированы на уровне теории B3PW91/6-31G(d,p). Малликеновские заряды, рассчитанные методом HF/STO-3G практически не зависят от использования диффузных функций при оптимизации геометрии (типичная разница в зарядах не более 0.002 е). Однако, в случае протонированной структуры использование диффузных функций для ведет к взаимодействию между группами –CH₂OH и –NH₃⁺ и дополнительным искажениям геометрии. В случае N-протонированного β–D–глюкопиранозамина– 2 общий рассчитанный заряд группы С2 составил +0.806 е, оставшаяся часть положительного заряда распределилась между остальными зарядовыми группами. Чтобы избежать дополнительной параметризации остальных зарядовых групп, было решено использовать приближение, в рамках которого весь положительный заряд сконцентрирован на зарядовой группе С2, а заряды атомов других зарядовых групп не меняются. Рассчитанные малликеновские заряды внутри группы С2 были изменены таким образом, чтобы суммарный заряд группы составил +1. Итоговое распределение зарядов для случая протонированной аминогруппы приведено в таблице 3 (остаток СНТР).

Возможны две стратегии выбора зарядовых групп в случае N-замещенных производных. В частности, для ацетильных производных вида C2–NH–CO–CH₂X: (1) разделение на зарядовые группы C2–NH–CO и CH₂X, или (2) C2–NH и CO–CH₂X. Первый подход больше соответствует политике выбора зарядовых групп, принятой в силовых полях GROMOS. Однако, второй подход позволяет в большей степени универсализировать силовое поле, упростив дальнейшую параметризацию и моделирование N-замещенных производных хитозана без

необходимости дополнительной параметризации зарядовой группы C2 для каждого нового заместителя. В таком случае N-производное будет состоять из двух остатков: глюкопиранозамин с открытой связью у атома азота и сам N-заместитель (рисунок 10). Итоговая структура остатков CHT0, CHTN, CHT, CHTP, CHTR схематично изображена на рисунке 11.



Рисунок 10. Выбор зарядовых групп в случае амино-замещенного производного.



Рисунок 11. Состав атомов в остатках СНТО, СНТN, СНТ, СНТР, СНТR в силовом поле 56A_{CARBO_CHT}.

Для параметризации ван-дер-ваальсовых взаимодействий между атомами, связей, валентных, правильных и неправильных диэдральных углов в остатках хитозана были использованы стандартные константы, входящие в состав силовых полей GROMOS 53A6 и 56A_{CARBO}. В ходе параметризации силового поля для полимерных углеводов GROMOS 56A_{CARBO} особое внимание было уделено константам диэдральных углов глюкопиранозных колец. При замене атома кислорода O2 на атом азота N2 должны быть параметризованы константы трех торсионных углов: T3 для угла C1–C2–N2–H, T12 для углов O1–C1–C2–N2 и N2–C2–C3–O3, T13 для угла N2–C2–C1–O5. Эти углы показаны на рисунке 12.



Рисунок 12. Торсионные углы, связанные с атомом N2 в остатках для моделирования хитозана.

Для параметризации торсионных углов Т3, Т12, Т13 было выполнено жёсткое и релаксированное сканирования вращений советующих фрагментов молекул с использованием квантово-химической теории уровня B3LYP/6-31++G(d,p). На рисунке 13 показано изменение потенциальной энергии в ходе жесткого сканирования вращения боковых групп вокруг глюкопиранозного кольца для димеров целлюлозы и хитозана. Как можно видеть из рисунка, замена атома кислорода на атом азота не меняет форму кривой в области минимума потенциальной энергии, кривые для хитозановых колец лишь незначительно отличаются от кривых потенциальной энергии для глюкопиранозы, а положение самого минимума изменилось не более чем на 5-10°. На основании этого факта можно сделать вывод, что константы T12 и T13 для хитозана и для целлюлозы

очень близки, а значит можно оставить их без изменения при переходе от целлюлозы к хитозану.



Рисунок 13. Сравнение энергий диэдральных углов X-C2-C1-O5 и X-C2-C1-O5 (X = O, N) расчитанных при жестском сканировании методом B3PW91/6-31++G(d,p) для димеров целлюлозы и хитозана.

Для проверки уточнения параметров торсионных И углов вила C1-C2-X-H (X = O, N), описывающих вращение амингруппы вокруг C-N связи, были использованы расчеты упрощенных модельных соединений – этиламина и циклогексиламина. Выбор модельных соединений обусловлен тем, что на основании аналогичных соединений проводилась параметризация GROMOS модифицируемого поля 56A_{CARBO}. Соответвующие профили релаксированного сканирования представлены на рисунке 14. Интересно, что комбинированное вращение двух атомов водорода вокруг C-N связи показывает результаты очень близкие к вращению единственного атома водорода в составе В гидроксильной группы вокруг C-O связи. случае протонированной аминогруппы параметр высоты потенциального барьера был понижен с 2.4 до 1.8 кДж/моль для лучшего воспроизведения вращения NH₃⁺-группы (рисунок 14 и таблица 8).

Рисунок 14. Энергии вращения боковых групп NH₂ или NH₃⁺ для этиламина и циклогексиламина, рассчитанные релаксированным квантовохимическим сканированием с использванием уровня теории B3PW91/6-31++G(d,p), и соответствующие профили энергий для параметров 56A_{CARBO} и 56A_{CARBO_CHT}.

Как ранее упоминалось в разделе 2.5, в силовом поле GROMOS 56A_{CARBO} для лучшего воспроизведения конформационных особенностей глюкопиранозного кольца используется прямая параметризация коэффициентов Сб и С12 в уравнении Леннарда-Джонса, описывающего ван-дер-ваальсовы взаимодействия. При параметризации силового поля 56A_{CARBO CHT} для 1-5 H_{N2}...О5 были взаимодействий использованы параметры взаимодействия H₀₂...О5 из 56A_{CARBO}. Это является приближенным допущением, поскольку изначально параметры H₀₂...О5 в 56А_{САRBO} выработаны как способ описания

отталкивания именно гидроксильной группы. Однако, такое допущение возможно с учетом следующих фактов: (1) как было показано выше, замена гидроксильной группы на аминогруппу не влияет кардинальным образом на параметры связанных с кислородом/азотом торсионных углов, включающих в себя атомы водорода; (2) основное влияние на ван-дер-ваальсовы взаимодействия оказывает природа взаимодействующих атомов, а именно кислорода и водорода, которая в данном случае не меняется (тут же следует отметить, что в исходном силовом поле 56A_{CARBO} одинаковые параметры используются для взаимодействий H₀₂...O5 и, например, Н₀₁...С3, что является более серьезным допущением, поскольку не делается различия между кислородом и углеродом); (3) как будет показано далее, такое допущение не нарушает известных конформационных особенностей углеводного полимерных молекул хитозана И кольца. В случае 1-4 взаимодействий N2...C4 были использованы параметры из силового поля GROMOS 53A6 (являющегося базовым для 56A_{CARBO} И 56A_{CARBO CHT}), взаимодействия вида N(T)-Xr-Xr-CHr, то описывающие есть параметры специально разработанные для описания взаимодействия атома азота с атомом углерода в углеводном кольце.

Таким образом, силовое поле 56A_{CARBO} было дополнено несколькими новыми остатками β–D–глюкопиранозамина–2 для моделирования хитозана и различных его производных. Полный набор параметров для новых остатков приведен в таблицах 4-10.

Новое силовое поле реализовано в формате, совместимом с одним из наиболее популярных и доступных программных комплексов для молекулярнодинамического моделирования – GROMACS. Так же как исходное СП, новое поле 56A_{CARBO CHT} учитывает нестандартные 1-4 и 1-5 ван-дер-ваальсовы взаимодействия что предусмотрено между атомами, не стандартными процедурами генерации топологий при использовании комплекса GROMACS. Ранее для автоматизации построения топологии W. Plazinski и M. Drach написали скрипт на языке Python, дополняющий стандартный генератор топологий GROMACS [110]. Этот скрипт был модифицирован для работы с новым силовым

полем. Моделирование хитозанов, содержащих ацетильную группу (стандартный остаток ACE) на практике приводит к конфликту названий атомов в стандартном остатке ACE с названиями атомов в добавленных CHT-остатках для хитозана. Чтобы исключить ошибки, вызванные этим конфликтом, в силовое поле дополнительно был добавлен остаток ACE2, отличающийся от стандартного остатка ACE именами атомов диэдрального угла C2_{CHTR}–N2_{CHTR}–C_{ACE2}–CA_{ACE2}. Для параметризации ACE2 были использованы стандартные константы исходного силового поля. Файлы силового поля, модифицированный скрипт обработки топологии и необходимые инструкции размещены в интернете по адресу http://www.qchem.unn.ru/md-simulations-and-force-field-development/

Таблица 4. Типы атомов в зарядовой группе С2.

Остаток	C2	N2	H21	H22	H23
CHT, CHT0, CHTN	CH1R	NT	Н	Н	_
CHTP	CH1R	NT	Н	Н	Н
CHTR	CH1R	Ν	Н	_	_

Таблица 5. Заряды атомов в зарядовой группе С2.

Остаток	C2	N2	H21	H22	H23
CHT, CHT0, CHTN	0.197	-0.845	0.324	0.324	-
CHTP	0.227	-0.448	0.407	0.407	0.407
CHTR	0.250	-0.709	0.459	_	_

	1	-			~	U		α
апина	6 11	anametr	ны кова	пентных	связеи в	заряловои	группе	(2)
л авглица	0.11	apamer	DI RODU			зарядовон	rpyme	\mathcal{L}

Остаток	Связь	<i>Кь</i> (10 ⁶ ∙кДж∙ моль ⁻¹ ∙нм ⁻⁴)	<i>b</i> ₀ (нм)	56А _{САКВО} обозначение	56А _{САКВО} комментарий
CHT,	C2-N2	8.7100	0.1470	gb_21	CHn–[N, NT, NL, NZ, NE]
CHT0, CHTN	N2–H21, N2–H21	1.8700	0.1000	gb_2	H–N(all)
	C2-N2	8.7100	0.1470	gb_21	CHn–[N, NT, NL, NZ, NE]
СНТР	N2–H21, N2–H22, N2–H23	1.8700	0.1000	gb_2	H–N(all)

	C2–N2	8.7100	0.1470	gb_21	CHn–[N, NT, NL, NZ, NE]
CHTR	N2-H21	1.8700	0.1000	gb_2	H–N(all)
	N2-C _{ACE2}	1.0500	0.1340	gb_11	C–[N, NZ, NE]

Таблица 7. Параметры валентных углов для атомов зарядовой группы С2.

Остаток	Угол	<i>К</i> _θ , кДж/моль	$ heta_{0,°}$	56А _{САКВО} обозначение	56A _{CARBO} комментарий
	C3–C2–N2, N2–C2–C1	530.00	111.00	ga_15	CHn–CHn–[C,CHn,OA,NR,NT,NL]
CHT, CHT0,	C2–N2–H21, C2–N2–H22	425.00	109.50	ga_11	H–NL–[C, CHn], H–NT–CHn
	H22-N2-H21	380.00	109.50	ga_10	H–NL, NT–H, CHn–OA–CHn(sugar)
	C3–C2–N2, N2–C2–C1	530.00	111.00	ga_15	CHn–CHn–[C, CHn, OA, NR, NT, NL]
CHTP	C2–N2–H21, C2–N2–H22, C2–N2–H23	425.00	109.50	ga_11	H–NL–[C, CHn], H–NT–[CHn]
	H22–N2–H21, H23–N2–H21, H23–N2–H22	380.00	109.50	ga_10	H–[NL, NT]–H, CHn–OA–CHn(sugar)
	C3–C2–N2, N2–C2–C1	520.00	109.50	ga_13	[CHn, C]–[CHn]– [C,CHn,OA,OM,N,NE]
CHTR	C2-N2-H21	460.00	115.00	ga_18	H–N–CHn
	C2-N2-CACE2	700.00	122.00	ga_31	[CH1, CH2]–N–C
	H21–N2– C _{ACE2}	415.00	123.00	ga_32	H–N–C

Таблица 8. Параметры диэдральных углов для атомов зарядовой группы С2.

Остаток	Угол	K_{arphi} кДж/моль	$\xi_{arphi 0}$,°	m_{arphi}	56А _{САКВО} обозначение	56A _{CARBO} комментарий
CHT,	C1–C2–N2–H21, C1–C2–N2–H22	0.0	2.400	3	gdc_t3	Generic hydroxyl torsion (one per bond)
CHT0, CHTN, CHTR	N2-C2-C3-O3, N2-C2-C1-O1	180.0	4.500	1	gdc_t12	Oxygen–oxygen gauche torsion
	N2-C2-C1-O5	180.0	1.000	1	gdc_t13	Oxygen–oxygen intracyclic torsion
CHTP	C1–C2–N2–H21, C1–C2–N2–H22, C1–C2–N2–H23	0.0	1.800	3	no	no

Неправильные диэдральные углы							
Остаток	Угол	<i>К</i> _{ζ́} , кДж/(моль ^{.°2})	$\xi_{0,°}$	-	56А _{САКВО} обозначение	56А _{САКВО} комментарий	
CHT, CHT0, CHTN, CHTP, CHTR	C2-C3-C1-N2	0.102	35.26439	-	gi_2	tetrahedral centres	

Таблица 9. Параметры Леннард-Джонсовских взаимодействий.

Тип атома	$[C_6]^{1/2}$	$[C_{12}]^{1/2}$ (nonpolar)	$[C_{12}]^{1/2}$ (polar)	$[C_{12}]^{1/2}$ (neighbor)	$[C_{12}]^{1/2}$ (neighbor)		
	(кДж/моль·нм ⁶) ^{1/2}	(кДж/моль∙нм ⁶) ^{1/2}	(кДж/моль·нм ⁶) ^{1/2}	(кДж/моль·нм ⁶) ^{1/2}	(кДж/моль∙нм ⁶) ^{1/2}		
Ν	4.936·10 ⁻²	$1.523 \cdot 10^{-3}$	$1.943 \cdot 10^{-3}$	4.936·10 ⁻²	1.301.10-3		
NT	4.936·10 ⁻²	$1.523 \cdot 10^{-3}$	$2.250 \cdot 10^{-3}$	4.936·10 ⁻²	$1.301 \cdot 10^{-3}$		

Таблица 10. Специализированные параметры Леннард-Джонсовских взаимодействий.

Шаблон	C_6 ,	C ₁₂ ,	Provise reversive		
взаимодействия	кДж∕моль∙нм ⁶	кДж∕моль∙нм ⁶	Взаимодеиствие		
H-N-Xr-Xr-Xr	0.0	0.25.10-6	H21-O5, H22-O5, H23-O5		
H-NT-Xr-Xr-Xr	0.0	0.55*10	H21-C4, H22-C4, H23-C4		
N-Xr-Xr-CHr	2 202512.10-3	2 5.10-6	N2 C4		
NT-Xr-Xr-CHr	5.592515.10	2.3.10	112-04		

3.2. Конформация экзоциклических групп

Положение в пространстве заместителя, находящегося при аминогруппе (например, ацетильного), связано с величиной торсионного угла H21–N2–C2–H_{C2} (χ_2) , который в свою очередь можно охарактеризовать по константе расщепления (MMR) $^{3}J_{\rm HH},$ ядерно-магнитного резонанса которой известны для экспериментальные значения. Другая важная экзоциклическая группа -С6-О6-НО6, в ней можно выделить вращение самой группы вокруг связи -С5-С6- и вращение концевого гидроксильного фрагмента -Об-НОб вокруг связи -Сб-Об-. Вращение гидроксиметильной группы, как правило, описывается торсионным углом C4–C5–C6–O6 (*ω*). Однако, другой торсионный угол O5–C5–C6–O6 (*ώ*) можно связать с экспериментальными значениями ЯМР-констант ³J_{HH} по

уравнениям предложенным Stenutz [111] и Tafazzoli [112]. Вращение гидроксильной группы можно охарактеризовать углом C5–C6–O6–HO6 (χ_6).

Рисунок 15. Торсионные углы, связанные с ЯМР-константами.

Выделяют три ротамера g^+ , t и g^- , соответствующие интервалам торсионных углов 0-120°, 120-240° и 240-360°, соответственно. В таблице 11 показаны средние величины торсионных углов, их распределение между различными ротамерами и рассчитанные величины ${}^{3}J_{\rm HH}$, полученные из тестовых молекулярно-динамических расчетов с использованием нового силового поля 56A_{CARBO CHT} в сравнении с экспериментальными и расчетными данными, опубликованными ранее. Средние значения угла ω хорошо согласуются с имеющимися кристаллографическими данными, особенно в случае цепи, находящейся внутри кристалла, а не на его поверхности. Экзоциклические группы находящихся на поверхности кристалла, не молекул, удерживаются кристаллическим окружением, в связи с чем их конформации отличаются. Распределение между ротамерами и среднее значение угла χ_2 для молекул в согласуются с проведенными растворе хорошо ранее молекулярнодинамическими исследованиями [113], в которых было использовано силовое поле MMX [117] в сочетании с экспериментальными данными ЯМР и DFTрасчетами. С другой стороны, результаты отличаются от величин ω и χ₆ для β-D-

глюкопиранозных полимеров, полученных с использованием силовых полей 56A_{CARBO} и 56A_{CARBO_R} [57]. Это может отражать разницу в конформационных свойствах β-D-глюкопиранозы и β-D-глюкопиранозамина-2 и их полимерных производных.

VEOT	MD-1	MD-2	MD-3	MD_4	Литература			
51011	IVID-1	IVID-2	IVID-5	IVID-4	значение	метод	ссылка	
Средние значения, °								
ω (C4–C5–C6–O6)	151.4	167.8	113.1	117.4	176.0 -170.9	PCA PCA	[14] [13]	
χ ⁶ (C5–C6–O6–HO6)	174.4	154.7	156.3	155.9	-	-	-	
χ_2^a (H21–N2–C2–H _{C2})	-	-	-	-170.8 -168,4 ^d	180 ± 21	МД	[113]	
	Распре	деление ро	тамеров g+	-: t: g-, %				
					53:45:2	ΜД	[113]	
ω (C4–C5–C6–O6)	30:66:4	17:81:2	60:37:3	56:42:2	37:60:3°	ΜД	[54]	
					35:60:4°	ΜД	[57]	
					32:45:23	Литература 1ение метод ссылка 6.0 РСА [14] 70.9 РСА [13] ± 21 МД [113] 45:2 МД [113] 50:3° МД [54] 50:4° МД [57] 15:23 МД [113] 5:53° МД [54] 6:52° МД [57] 7:13 МД [113] /1.85 ЯМР [114] /2.27° ЯМР [115] /2.1° ЯМР [113] .39 МЛ [113]		
χ^{6} (C5–C6–O6–HO6)	21:65:14	50:31:19	35:50:15	32:54:13	22:25:53°	ΜД	[54]	
			67.8113.1117.4176.0PCA[14]54.7156.3155.9170.8180 \pm 21МД[11]168,4 ^d 180 \pm 21МД[11]сние ротамеров $g^+: t: g^-, \%$ 53:45:2МД[11]:81:260:37:356:42:237:60:3 ^c МД[54]31:1935:50:1532:54:1322:25:53 ^c МД[54]21:1935:50:1532:54:1322:25:53 ^c МД[54]27:40:3314:67:19 ^d 0:87:13МД[11]ЯМР константы, Нz4/2.144.49/2.244.75/2.165.57/1.85ЯМР[11]6/2.244.87/2.335.13/2.266.0/2.1 ^c ЯМР[11]-7.459.07ЯМР[11]	[57]				
χ ₂ ^a (H21–N2–C2–HC2)	-	-	-	27:40:33 14:67:19 ^d	0:87:13	ΜД	[113]	
$^{3}J_{\rm HH}$ ЯМР константы, Нz								
${}^{3}J_{\text{H5,H6R}}/{}^{3}J_{\text{H5,H6S}}^{\text{b}}$ (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°	ЯМР ЯМР	[114] [115]	
(Tafazzoli eq.)	7.15/2.53	8.06/2.24	4.87/2.33	5.13/2.26	6.0/2.1 ^c	ЯМР	[116]	
³ J _{H2,H21} ^a	-	-	-	7.45 9.05^{d}	9.07 10.39	ЯМР МЛ	[113]	

Таблица 11. Характеристика вращения экзоциклических групп.

MD-1 – кристалл хитозана (все молекулы)

MD-2 – внутренняя цепь в кристалле хитозана

MD-3 – свободная молекула хитозана

MD-4 – свободная молекула хитина

^а – 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 ώ (O5-C5-C6-O6). Распределение угла ώ – 67:4:30, 82:2:16, 40:3:57 и 43:2:55 для MD-1, MD-2, MD-3 и MD-4 соответственно.

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

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

3.3. Конформация пиранозного кольца

Конформации шестиатомных колец описываются тремя параметрами сферических координат Кремера-Попла [118]: меридианный угол φ , азимутный угол θ и радиус Q. Данная система позволяет однозначно охарактеризовать глюкопиранозное кольцо. Угол θ отвечает за положение описываемой конформации на координатной сфере: значения $\theta = 0^\circ$ и $\theta = 180^\circ$ соответствуют двум полюсным конформациям (кресло), $\theta = 90^\circ$ соответствует экваториальным конформациям (лодки и псевдолодки), промежуточные значения θ соответствуют полукреслам. Угол φ определяет тип искривления кольца для неполюсных конформаций, он различен у разных типов лодок, псевдолодок и полукресел. Q характеризует степень искривления кольца по сравнению с теоретической плоской конформацией.

В соответствии с номенклатурой IUPAC каждая конформация может быть названа с использованием одной заглавной буквы и цифр-индексов. [119] Действуют следующие правила наименований структур шестичленных колец:

- Буква выбирается в соответствии с формой кольца: С (chair) для кресла, В (boat) для лодки, S (skew) для псевдолодки, Н (half-chair) для полукресла.
- 2. Цифры показывают номера атомов, лежащих вне референсной плоскости. Номера атомов кольца, которые лежат на той стороне плоскости отсчета, с которой начинается нумерация (это «верхняя» сторона плоскости в проекции Хеуорса), пишутся в виде верхних индексов и предшествуют букве; те из атомов кольца, которые лежат на другой стороне референсной плоскости, пишутся как индексы и следуют за буквой. В случае, если вне плоскости лежит гетероатом, вместо цифры используют его символ.
- 3. Для кресел референсная плоскость выбирается параллельными сторонами кольца. Для лодок – двумя «сторонами» лодки. Каждая псевдолодка имеет две потенциальные плоскости отсчета, содержащие три соседних атома и оставшийся несмежный атом. Плоскость отсчета

62

выбирается таким образом, чтобы атом углерода с наименьшим номером в кольце или атом, находящийся рядом с ним, оказались вне плоскости. Для полукресел референесная плоскость определяется четырьмя соседними атомами, лежащими в одной плоскости.

На рисунке 16 схематично показаны сферические координаты Кремера-Попла и конформации, названные по правилами IUPAC.

Рисунок 16. Параметры Кремера-Попла и обозначения конформаций шестичленных углеводных колец. Источник: [120]. На рисунке для наглядности также присутствуют Е-конформации (envelope, конверт), определенные правилами IUPAC для пятичленных углеводов.

Глюкопиранозные кольца при молекулярно-динамическом моделировании исключительно чувствительны к параметрам внутримолекулярного взаимодействия [57, 121, 122]. Несмотря на отсутствие изменений этих параметрах в ходе модификации силового поля, изменения в типах и зарядах атомов могли повлиять на конформационные особенности неявным образом. Наиболее чувствительным является конформационный переход ${}^{4}C_{1} \rightarrow {}^{1}C_{4}$:

Переход ${}^{4}C_{1} \rightarrow {}^{1}C_{4}$ соответствует изменению угла θ от 0° до 180° (идеальные значения для конформаций ⁴C₁ и ¹C₄, соответственно). У хитина и хитозана, как и у глюкозы, основной конформацией является ⁴C₁, и равновесие в уравнении (3.1) должно быть смещено влево. Для оценки правильности воспроизведения новым силовым полем конформации кольца, был исследован профиль поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вдоль координаты θ . Расчеты были проведены в GROMACS с использованием метадинамики, реализованной в плагине PLUMED [123]. Длина МД траектории составила 10 нс, время уравновешивания 500 пс, шаг 1 фс, температура 300К. Полученные профили поверхностей потенциальной энергии для конформационного перехода ${}^{4}C_{1} \rightarrow {}^{1}C_{4}$ для различных остатков хитозана представлены на рисунке 17. Как видно из профилей ППЭ, для всех хитозановых остатков наиболее выгодной является конформация ⁴C₁, что полностью совпадает с экспериментальными данными. Конформация ¹C₄ менее выгодна по энергии на 10-30 кДж/моль в зависимости от типа остатка. Высота барьера перехода ${}^{4}C_{1} \rightarrow {}^{1}C_{4}$ 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 ${}^{4}C_{1}$. Это хорошо согласуется с результатами, полученными с использованием силового поля $56A_{CARBO}$ (для целлюлозы), а также с экспериментальными данными. [124] Таким образом, модификации силового поля не нарушают описание конформационных свойств глюкопиранозного кольца.

Рисунок 17. Профиль поверхности потенциальной энергии вдоль координаты *θ* для разных остатков хитозана.

3.4. Конформация гликозидной связи

Важной структурной характеристикой полимерных углеводов являются углы, характеризующие гликозидную связь между кольцами глюкопиранозы: O5– C1–O1–C4' (φ) и C1–O1–C4'–C3' (ψ). Некоторые авторы [125] используют торсионный угол C1–O1–C4'–C5' (ψ ') вместо C1–O1–C4'–C3' (ψ), поэтому угол ψ ' будет также рассмотрен. Эти углы характеризуют форму и гибкость полимерной цепи. Типовые значения углов для кристаллической фазы по данным PCA: $\varphi \approx -95^\circ, \psi \approx 95^\circ, \psi' \approx -145^\circ$. [13, 14, 125, 126]

Экспериментальные значения таких углов могут быть определены из исследований кристаллической структуры. [13, 14, 125, 126] Для молекул в растворах доступны данные других молекулярно-динамических исследований. [50, 51] С целью оценки достоверности параметров нового силового поля были рассчитаны углы φ , ψ , и ψ ' для нанокристаллов помещенных в водную среду, а также для отдельных молекул хитина и хитозана в водных растворах.

Рисунок 18. Торсионные углы, описывающие гликозидную связь.

Результаты расчетов представлены в таблице 12 в сравнении с доступными экспериментальными данными и результатами проведенных ранее МД расчетов хитозана (с использованием других силовых полей). В случае нанокристаллов отклонения от средних величин данных кристаллографии составляет около 15%. Как можно видеть из рисунка 19, экспериментальные значения находятся в области значений, получаемых в молекулярной динамике. Следует заметить, что эти отклонения могут являться следствием реального физического эффекта – искажения кристаллической структуры в водных растворах, представляющим из себя продольное скручивание кристаллов. Такие искажения появляются сразу после уравновешивания и отмечались ранее для нанокристаллов целлюлозы [127] и хитозана [60].

Для свободных молекул полимера в растворе средние значения углов φ и ψ отличаются от кристаллографических данных более существенно в связи с большей гибкостью отдельных молекул по сравнению с молекулами в кристалле. Рассчитанные значения углов для отдельных молекул в растворе хорошо совпадают с имеющимися в литературе данными. [50, 51] (рисунок 19b и 19c). Для хитиновых и хитозановых молекул в растворе дополнительно возникают значения углов в области $\varphi \approx 50^\circ$, $\psi \approx -50^\circ$. Такой результат хорошо совпадает с картами поверхностей потенциальной энергии для целлюлозы. [57] 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}.

Рисунок 19. 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 (c), полученные с помощью разработанного силового поля в сравнении с экспериментальными данными.

Угол	56А _{САКВО_СНТ} Кристалл хитозана	56А _{САКВО_СНТ} Молекула хитозана	56А _{САКВО_СНТ} Молекула хитина	Экспериментальные данные (РСА)
φ	-83.4	-69.5	-70.7	-96.3 [14] -92.1 [13] -92.0 [125]
ψ	102.5	110.5	110.5	92.0 [126] 92.0 [14] 94.0 [13] 96.2 [126]
ψ'	-140.0	-127.1	-129.5	-146.6 [14] -147.0 [13] -148.0 [125] -143.0 [126]
	a = 05 - C1 - 01 - C4	$y'' = C_{1} = C_{1} = C_{4} = C_{3}^{2}$	'-C1-O1-C4'-C5'	L J

Таблица 12. Характеристика углов гликозидной связи

3.5. Моделирование растворения хитозана

качестве хитозана В модели кристаллического был рассмотрен дегидратированный нанокристалл [14], состоящий из 18 полимерных цепей. Выбор кристаллической структуры основан на предположении, что внутри существует устойчивая система водородных связей, кристалла которая удерживает полимерные цепи вместе. В случае аморфного хитозана водородные столь упорядочены, что ведет к меньшей сопротивляемости связи не растворению. Кроме того, кристаллическая модель позволяет максимально исключить явление запутывания длинных молекул полимера (рептации), характерное для аморфных фаз. Для оценки влияния молекулярной массы (*M_w*) на скорость растворения проведены расчеты кристаллов, состоящих из полимерных молекул массой: 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. Ввиду различий в кинетике растворения, которые будут пояснены далее, расчеты можно разделить на две группы: системы с кристаллами, состоящими из молекул с $M_w = 1.6$ и 3.2 кДа (группа А), и системы с кристаллами из цепей $M_w = 6.4, 9.6$ и 12.8кДа (группа Б). В моделируемых кристаллах все аминогруппы были деацетилированы (DA = 0%).Кристаллы были полностью помещены В прямоугольные ячейки, заполненные молекулами растворителя (SPC-модель воды), с наложенными периодическими граничными условиями. Размеры ячеек варьировались от 20.8 x 12.4 x 11.7 до 41.7 x 12.4 x 11.7 нм в зависимости от длины полимерных цепей.

Для МД расчетов растворения нанокристаллов использовали программу GROMACS 5.1 [128] и ранее параметризованное силовое поле 56A_{CARBO_CHT} [129]. Перед проведением основного расчета были выполнены предварительная минимизация энергии системы и NPT-уравновешивание в течение 100 пс с использованием термостата и баростата Берендсена, референсная температура 300К, референсное давление 1 бар, характеристическое время термостата 0.1 пс, характеристическое время баростата 2.0 пс. Параметры основного МД расчета: NVT-ансамбль, температура 300К, термостат Берендсена с характеристическим временем 0.1 пс, время моделирования от 40 до 240 нс, шаг 1 фс. Были использованы LINCS-алгоритм ограничения геометрии и РМЕ-схема расчета электростатических взаимодействий. Для анализа траекторий использовали плагин PLUMED [123].

Кислотность раствора моделировалась путем изменения степени протонирования аминогрупп в нанокристаллах (*PD*, protonation degree), то есть отношением количества протонированных групп к общему количеству аминогрупп:

$$PD = \frac{N_p}{N},\tag{3.2}$$

где N_p - количество NH₃⁺-групп, N – общее количество аминогрупп (равное количеству мономерных звеньев).

Степень протонирования *PD* можно связать со степенью диссоциации *α* и показателем кислотности среды pH по уравнению (1.7):

$$PD = 1 - \alpha , \qquad (3.3)$$

$$pH = pK_{1/2} - n\log\left(\frac{PD}{1 - PD}\right),$$
 (3.4)

где $pK_{1/2}$ и n – эмпирические константы.

Поскольку рН и РД связаны, оба параметра могут являться характеристикой, описывающей кислотность раствора. Степень протонирования *PD* представляет собой величину, напрямую связанную со структурой полимера и поддающуюся прямому контролю при построении системы для молекулярнодинамического расчета. В реальных системах эта связь выглядит обратным образом: диссоциировавшая кислота протонирует аминогруппы, задавая степень протонирования PD концентрацией протонов. Однако, метод молекулярной расчетов химической реакции, линамики не предполагает поэтому В моделируемой системе показатель кислотности рН определяется исходя из заданной степени протонирования аминогрупп хитозана. Для расчета рН в соответствии с уравнением (3.4) требуются дополнительные константы $pK_{1/2}$ и *n*. константы определяются экспериментально и могут отличаться Эти В зависимости от образцов хитозана и условий эксперимента. Поэтому, В

дальнейшем в качестве характеристики кислотности среды будет рассматриваться величина степени протонирования. Пересчет из *PD* в pH с использованием различных наборов $pK_{1/2}$ и *n* приведен в таблице 13.

Таблица 13. Связь показателя кислотности среды pH и степени протонирования PD с использованием разных эмпирических констант $pK_{1/2}$ и n

Экспериментальные константы		<i>PD</i> , %				
	0	30	50	70	80	90
<i>pK</i> _{1/2} = 6.17, <i>n</i> = 1.20 [35] (высокодеацетилированный хитозан)	-	6.6	6.2	5.7	5.4	5.4
<i>pK</i> _{1/2} = 6.39, <i>n</i> = 1.09 [35] (хитозан с низкой молекулярной массой)	-	6.8	6.4	6.0	5.7	5.7

Моделирование проводилось для степеней протонирования 0, 30, 50, 70 и 90% для кристаллов из полимеров массой 3.2, 6.4 и 9.6 кДа. Для цепей массой 1.6 кДа (10 мономерных единиц) невозможно провести моделирование PD = 90% поскольку терминальные остатки не могут быть протонированы в связи с ограничениями силового поля. Поэтому, для системы с кристаллом из цепей массой 1.6 кДа максимальная степень протонирования составила 80%. Моделирование полимеров с молекулярной массой 12.8 кДа требует больших размеров ячеек, которые должны быть заполнены водой (~340 000 атомов). Ввиду больших вычислительных затрат, необходимых для столь масштабных расчетов, проведены расчеты только для PD = 0, 50 и 90%. Во всех случаях протонирование происходило случайным образом равномерно по кристаллу. Для обеспечения электронейтральности моделируемой ячейки соответствующее количество молекул воды заменялось на анионы хлора, нейтрализуя заряд протонированного полимера

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 группы Б. Спиральное продольное скручивание кристаллов, упоминавшееся в разделе 1.3, начинает проявляться практически мгновенно после начала расчета и отчетливо видно к 150 пс времени расчета. Как отмечалось выше, подобный эффект ранее был обнаружен при моделировании кристаллов целлюлозы в воде [127] И недавно был обнаружен для хитозанов различной степени деацетилирования [60]. Продольное спиральное скручивание непротонированных кристаллов хитозана представлено на рисунке 20.

При высоких степенях протонирования, например, при $PD \ge 50\%$ (точное значение этой границы зависит от нескольких факторов и будет обсуждено в следующих разделах) происходит растворение кристалла, скорость которого зависит от молекулярной массы полимерных цепей и степени протонирования. Растворение начинается с набухания кристаллической структуры, в ходе которого молекулы растворителя и анионы хлора проникают в структуру кристалла. Затем, в течение 10-50 нс, происходит отделение полимерных молекул или небольших групп полимерных молекул с поверхности кристалла. В некоторых случаях происходит распад кристалла на более мелкие фрагменты. Отделившиеся молекулы (или группы молекул) диффундируют в раствор. В системах, где наступило растворение, за исключением случаев высоких степеней протонирования, могут присутствовать агрегаты, состоящие из нескольких полимерных цепей.

0 пс 40 пс 150 пс 400 пс 2 нс 10 нс

Общая картина растворения показана на рисунке 21 для случая кристалла из цепей длиной 40 мономерных звеньев и степени протонирования 50%. Общая картина согласуется с данными [130].


Рисунок 21. 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. Вода не показана.

Для систем группы А при высоких степенях протонирования (80 и 90% для 10- и 20-мономерных цепей, соответственно), происходит быстрый распад кристалла на фрагменты. Кристалл распадается на несколько небольших фрагментов в течение первых десятков пикосекунд моделирования, затем эти фрагменты распадаются на отдельные молекулы. В случае систем группы Б и высоких степеней протонирования первая стадия растворения выглядит в большей степени как набухание кристалла, а не как распад на фрагменты.

Кинетика растворения кристаллов хитозана может определяться следующими факторами: (1) количество протонированных аминогрупп, (2) распределение протонированных аминогрупп на молекулах полимера, (3) водородные связи между молекулами полимера, (4) коэффициент диффузии молекулы в раствор, (5) стерические затруднения, рептация. Поскольку рассматривается кристаллическая модель, можно предположить, что стерические будут минимальны, а фактором, сдерживающим затруднения основным будет прочных водородных связей растворение, являться система кристаллической структуры. Известно, что кристаллические фрагменты часто включены в аморфную фазу, и растворение кристаллических участков в таких системах происходит медленнее, чем растворение окружающей их аморфной фазы [17, 18]. Таким образом, скорость растворения кристаллов можно рассматривать как нижнюю границу скорости растворения аморфной фазы.

3.7. Вязкость растворов

Вязкость растворов является параметром, чувствительным к межмолекулярным потенциалам и внутри- и межмолекулярным моделям, используемым для описания молекул. Поэтому данные о вязкости раствора могут являться верификацией правильности описания раствора. Вязкость также может быть одним из критериев описания растворения крупных систем, поскольку прямое МД моделирование таких систем требует большого вычислительного времени. Вязкость в данном случае может описать поведение системы в условиях гелеобразного состояния с использованием сравнительно коротких расчетов.

Вязкость системы была рассчитана методом автокорреляционных функций [131], который дает динамическую вязкость η . Динамическая вязкость может быть конвертирована в относительную (η_{rel}), специфическую (η_{sp}) и характеристическую ([η]) вязкости по формулам:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0},\tag{3.5}$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1 , \qquad (3.6)$$

$$[\eta] = \frac{2 \cdot (\eta_{sp} - \ln(\eta_{sp}))^{0.5}}{C}, \qquad (3.7)$$

где η_0 – динамическая вязкость чистого растворителя (воды), *С* – массовая доля полимера в растворе.

Формула (3.7) применима для растворов с низкой концентрацией полимера [132]. В случае расчетов, рассматриваемых в данной работе, эта формула имеет ограниченную применимость в связи со сравнительно высокой концентрацией хитозана в системе. Характеристическая вязкость связана с молекулярной массой полимера по эмпирическому уравнению Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = K M_w^{\alpha} , \qquad (3.8)$$

где *К* и *а* – вискозиметрические константы.

Известны экспериментальные работы по оценке вискозиметрических констант хитозана [133-137], в которых сообщается весьма широкий диапазон значений: 1.42 - 1115 для K и 0.147 - 0.96 для α . Было показано, что эти константы зависят от кислотности среды, ионной силы раствора и степени деацетилирования хитозана. [138] Константы K и α были рассчитаны для систем, где в ходе моделирования (70-240 нс) произошло растворение хитозана. Оценки вязкости и вискозиметрических констант представлены в таблице 14 в сравнении с наиболее релевантными экспериментальными данными.

Как было показано в одном из исследований [131], метод, используемый для оценки вязкости на основе молекулярно-динамических траекторий, как правило, занижает величину динамический вязкости воды примерно в 2 раза относительно экспериментальных величин (экспериментально определенная динамическая вязкость воды составляет 8.903 Па.с [139]). Аналогичная недооценка величины динамической вязкости должна присутствовать в случае водных растворов хитозана. Однако, при оценке внутренней вязкости по (3.7) используется относительная уравнению вязкость. Поэтому, кратное занижение величины динамической вязкости, связанное с особенностями используемого метода расчета, не должно сказаться на оценке относительной вязкости и расчетных значений вискозиметрических констант.

Полученные из МД расчета константы K и α хорошо согласуются с одними экспериментальными данными [133, 134], но заметно отличаются от других экспериментальных результатов [134-137]. Такие отличия, вероятно, являются следствием различий в экспериментально изученных образцах хитозана (разные молекулярные массы и степени ацетилирования аминогрупп). 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. Таким образом, МД расчет с использованием разработанного силового поля правильно воспроизводит экспериментально измеренную вязкость растворов хитозана, имеющих сходную структуру и молекулярную массу. Этот факт является дополнительным подтверждением правильности силового поля и надежности данных, получаемых на его основе.

<i>PD</i> , %	<i>С</i> , г/дл	<i>M</i> _w ·10 ³ , Да	<i>η</i> ·10 ⁴ , Па∙с	[η], дл/г	<i>К</i> ·10 ⁵ , дл/г	α
вода	-	-	4.44	-	-	-
	5.63	1.6	5.14	2.664		
	7.75	3.2	5.96	3.984		
0	9.60	6.4	7.19	5.450	-	-
	10.47	9.6	7.77	5.881		
	10.87	12.8	8.00	6.004		
	5.63	1.6	5.50	3.921		
20	7.75	3.2	6.58	5.421		
50	9.60	6.4	7.69	6.298	-	-
	10.47	9.6	8.38	6.774		
	5.63	1.6	5.62	4.342		
	7.75	3.2	6.67	5.631		
50	9.60	6.4	8.11	6.972	613	0.27
	10.47	9.6	8.84	7.426		
	10.87	12.8	9.11	7.506		
	5.63	1.6	5.69	4.601		
70	7.75	3.2	6.79	5.887	()(0.27
/0	9.60	6.4	8.22	7.148	626	0.27
	10.47	9.6	8.84	7.425		
80	5.63	1.6	5.73	4.726		
	7.75	3.2	6.91	6.145		
00	9.60	6.4	8.26	7.203	1080	0.21
90	10.47	9.6	8.58	7.053		
	10.87	12.8	9.05	$[\eta], \underline{\pi} \underline{n} \underline{r} K \cdot 10^5, \underline{\pi} \underline{n} \underline{r} \alpha$ 2.664 3.984 5.450 - 5.881 6.004 3.921 5.421 6.298 6.774 4.342 5.631 6.972 613 0.27 7.426 7.506 4.601 5.887 626 0.27 7.426 7.506 4.601 5.887 626 0.27 7.425 4.726 6.145 7.203 1080 0.21 7.053 7.419 ie <u>Janhie</u> [\eta], <u>$\pi \underline{n} \underline{r} K \cdot 10^5, \underline{\pi} \underline{n} \underline{r} \alpha$ 3.4 - 7.0 1115 0.147 1.46 - 9.31 58.5 0.78 1.07 - 3.50 13.8 0.85 7.50 82.0 0.76 9.80 76.0 0.76 4.60 - 15.30 16.8 0.81 2.90 - 14.60 6.59 0.88 3.30 - 12.00 1.42 0.96</u>		
		Экс	периментальные	е данные		
Ссылка		<i>M</i> _w ·10 ³ , Да	DA, %	[η], дл/г	<i>К</i> ·10 ⁵ , дл/г	α
[133]		1.6 - 15	≤ 10	3.4 - 7.0	1115	0.147
[134]		15 - 310	0	1.46 - 9.31	559.0	0.58
[134]		35 - 245	15	1.46 - 9.31	58.5	0.78
[135]		61 - 150	15 ± 3	1.07 - 3.50	13.8	0.85
[136]		100 - 600	2	7.50	82.0	0.76
[136]		100 - 600	11.5	9.80	76.0	0.76
[137]		194 - 937	0	4.60 - 15.30	16.8	0.81
[137]		211 - 1260	9	2.90 - 14.60	6.59	0.88
[137]		536 - 1850	16	3.30 - 12.00	1.42	0.96

Таблица 14. Оценка вискозиметрических параметров

3.8. Количество водородных связей

Изменение количества водородных связей между молекулами полимера может являться характеристикой наступления растворения в системе. Поскольку были проведены расчеты для кристаллов, состоящих из цепей разной длины, необходимо унифицировать эту характеристику, приведя число водородных связей к количеству мономерных звеньев. Количество водородных связей, приведенное к общему количеству мономерных звеньев, в зависимости от времени моделирования показано на рисунке 22. Наличие водородной связи определялось на основании геометрического критерия. Радиус и угол отсечки для определения присутствия водородной связи 0.35 нм и 30° соответственно. Учитывались как внутри- и межмолекулярные водородные связи. Водородные являются короткодействующими, поэтому в ходе растворения их связи количество должно уменьшаться. Как видно из рисунка для систем с PD = 0%количество водородных связей не только не уменьшается, но даже увеличивается. Это объясняется продольным спиральным скручиванием кристаллов, описанным выше. Можно провести условные границы, характеризующие состояние системы. Показатель менее 0.3 водородных связей на мономерную единицу соответствует полному растворению. Водородные связи в такой системе главным образом внутримолекулярные за исключением редко возникающих и непрочных связей полимерных участками между непротонированными молекул. Граница растворения находится в области 0.7 водородных связей на мономерную единицу. Область между 0.3 и 0.7 водородными связями на мономерную единицу соответствует состоянию системы, когда в ней присутствуют отдельные агрегаты полимерных цепей. В случаях, когда на мономерную единицу приходится больше, чем 0.7 водородных связей, растворение не происходит, однако могут наблюдаться искажения структуры кристалла, приводящие к уменьшению количества водородных связей (например, для $M_w = 6.4$ и 9.6 кДа при PD = 30%).









Рисунок 22. Изменение количества водородных связей в ходе моделирования. 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 (MSD, mean squared displacement) центров масс цепей, усредненное по всем цепям (MSD_{CM}). При расчетах учтено движение общего центра масс, характеризующего трансляцию системы в пространстве, но не расхождение полимерных цепей в ходе моделирования. Установлено, что среднеквадратичное смещение центров масс мономерных единиц или отдельных атомов не подходят для описания процесса растворения, поскольку на эти величины в значительной степени оказывает влияние изменение формы самих полимерных цепей. На графиках зависимости таких параметров от времени моделирования присутствуют непредсказуемые осцилляции, которые затрудняют анализ. Пример таких осцилляций можно видеть на рисунке 23. На рисунке показаны MSD по центрам масс полимеров

(синяя линия) и MSD по по отдельным атомам (красная линия) для системы, где растворение не происходит ($M_w = 6.4$ кДа, PD = 0%).

Величина, рассчитанная по центрам масс атомов, скачкообразно возрастает с ростом времени моделирования, что можно ошибочно принять за растворение кристалла. MSD по центрам масс цепей (MSD_{CM}) практически не меняется, четко отражая отсутствие растворения. Поэтому MSD_{CM} используется в дальнейшем для оценки кинетики растворения. Зависимости MSD_{CM} от времени приведены на рисунке 24.



Рисунок 23. Среднеквадратичное смещение в зависимости от времени моделирования для центров масс молекул (синяя линия) и атомов (красная линия). Система $M_w = 6.4$ кДа, PD = 0%, растворение не происходит.







Рисунок 24. Зависимости MSD_{CM} от времени моделирования (до 90 нс). Линии названы в соответствии с количеством мономерных звеньев (m) и степенью протонирования (p).

Небольшой рост MSD_{CM} для систем, в которых растворение не наступает, происходит в результате продольного скручивания кристаллов, которое ведет к смещению центров масс полимерных цепей относительно начальных позиций и увеличению MSD_{CM} . Коэффициент диффузии центров масс цепей (D_{CM}) можно рассчитать, как первую производную MSD_{CM} по времени моделирования:

$$D_{CM} = \frac{1}{6} \cdot \frac{\partial MSD_{CM}}{\partial t}$$
(3.9)

Для расчета D_{CM} был использован метод линейной регрессии. При обработке были учтены траектории МД расчета только до 90 нс моделирования. Это связано с тем, что в системах с небольшими полимерами, для которых траектории достигали 240 нс, растворение и гомогенизация наступали сравнительно быстро и в анализе полной траектории необходимости нет. В то же время для систем с полимерами большой молекулярной массы траектории не превышают 90 нс. Ограничение траекторий позволило сгладить различия в объеме анализируемых данных для различных систем. Вычисленные линейной регрессией коэффициенты диффузии центров масс цепей *D*_{CM} представлены в таблице 15.

<i>М</i> _{<i>W</i>} , кДа	PD = 0 %	PD = 30 %	<i>PD</i> = 50 %	<i>PD</i> = 70 %	<i>PD</i> = 90 %
	_		$D_{CM},10^{10}~{ m m}^2/{ m c}$		
1.6	0.022 ^a	1.235	1.833	2.317	2.6833 ^b
3.2	0.077 ^a	0.345	1.012	0.864	1.268
6.4	0.014 ^a	0.019 ^a	0.401	0.882	1.272
9.6	0.016 ^a	0.032 ^a	0.163	0.346	0.867
12.8	0.017 ^a	_	0.123	_	0.623
	O	цененное стан	ндартное отклог	нение, 10 ¹⁰ м ²	² /c
1.6	0.002 ^a	0.019	0.020	0.019	0.024 ^b
3.2	0.003 a	0.004	0.016	0.019	0.010
6.4	0.001 ^a	0.000 ^a	0.003	0.005	0.007
9.6	0.001 ^a	0.001 ^a	0.001	0.003	0.006
12.8	0.000 ^a	_	0.001	—	0.006
^а – раствор	ение не про	исходит; ^b – <i>P</i>	D = 80%		

Таблица 15. Коэффициенты диффузии молекул хитозана оцененные методом линейной регрессии как зависимость *MSD_{CM}* от времени моделирования.

Из таблицы видно, что коэффициент диффузии растет с увеличением степени протонирования и уменьшается при увеличении молекулярной массы. В общем виде эти зависимости можно сформулировать в виде уравнения:

$$D_{CM} = a \cdot PD^k + b \cdot \frac{1}{M_w^l} + c , \qquad (3.10)$$

где *a*, *b*, *c*, *k*, *l* – постоянные коэффициенты.

В случае PD = 0% растворение не наступает. В случае PD = 30% растворение происходит только для кристаллов, состоящих из коротких цепей (группа А). Поэтому были использованы три разных набора данных для анализа коэффициентов уравнения (3.10): (1) все данные, (2) данные без учета расчетов с PD = 0%, (3) данные только для расчетов, в которых происходило растворение кристалла. Оказалось, что ввиду сравнительно малого количества доступных точек для регрессии, вычисленные величины *a*, *b*, *c*, *k* и *l* нельзя считать точными.

Было установлено, что наибольший вклад в неопределенность вносят степенные коэффициенты k и l. В то же время, если принять k = 1 и l = 1, значения a, b и c остаются практически неизменными, а оцененное стандартное отклонение их определения уменьшается на порядок. В пользу упрощения модели обработки данных с фиксацией k и l говорят также информационные критерии AIC и BIC. В таблице 16 показано сравнение результатов обработки по уравнению (3.10) и по его упрощенной версии с фиксированными k = 1 и l = 1 (уравнение (3.11)) для набора данных без учета расчетов PD = 0%. Величины оцененных стандартных отклонений линейных моделей рассчитаны, согласно рекомендациям IUPAC [140]. Оцененные стандартные отклонения регрессионных коэффициентов нелинейных моделей определены как диагональные элементы матрицы вариации, возникающей в стандартном нелинейном методе наименьших квадратов, соответствующие точные выражения могут быть найдены в [141]. Регрессионный анализ проводился с помощью программ MS Excel, Wolfram Mathematica и Origin.

Упрощенная формула зависимости коэффициента диффузии от степени протонирования и молекулярной массы:

$$D_{CM} = a \cdot PD + b \cdot \frac{1}{M_w} + c \tag{3.11}$$

Таблица 16. Сравнение обработки данных по уравнениям (3.10) и (3.11). Значения указаны с учетом оцененного стандартного отклонения регрессионных коэффициентов.

Параметр	По уравнению (3.10)	По уравнению (3.11), <i>k</i> и <i>l</i> зафиксированы
a	0.1 ± 0.4	0.017 ± 0.002
b	3.2 ± 0.4	3.0 ± 0.2
С	-1.2 ± 1.6	-1.0 ± 0.2
k	0.7 ± 0.9	1
l	1.2 ± 0.4	1
R^2	0.9352	0.9334
R_{adj}	0.9153	0.9245
AIC	-0.18	-3.68
BIC	4.27	-1.01

В приближении блинных полимерных цепей уравнение (3.11) становится полностью линейным:

$$D_{CM} \approx a \cdot PD + c \; ; \; (M_w \to \infty)$$
 (3.12)

Из уравнения (3.11) можно получить величину степени протонирования, при которой начинается растворение полимеров большой молекулярной массы (*PD*_{start}):

$$PD_{start} = \frac{-c}{a}$$
; $(D_{CM} = 0)$ (3.13)

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

$$pH_{start} = pK_{1/2} - n\log\left(\frac{PD_{start}}{1 - PD_{start}}\right)$$
(3.14)

Величина молекулярной массы полимера, при которой растворение начинается вне зависимости от степени протонирования ($M_{w,start}$) получается из условий $D_{CM} = 0$; PD = 0:

$$M_{w,start} = \frac{b}{-c} \tag{3.14}$$

Рассчитанные значения коэффициентов a, b и c, PD_{start} , pH_{start} и $M_{w,start}$ таблице 17. Величины pH_{start} приведены В могут быть вычислены с использованием различных экспериментальных значений $pK_{1/2}$ и *n*: (a) для хитозанов с высокой степенью деацетилирования ($DD \approx 94\%$), (б) для хитозанов со сравнительно небольшой молекулярной массой ($M_w \approx 60$ кДа). [35]. На рисунке 25 показана зависимость D_{CM} от PD и M_w для полного набора данных из таблицы Полученная модель позволяет напрямую сопоставить коэффициенты 17. диффузии, определенные методом молекулярной динамики с имеющимися экспериментальными данными 0 границах растворимости хитозана. Экспериментально определенные значения pH_{start} находятся в диапазоне 6.0-6.5 [23, 142, 143], что хорошо согласуется с результатами МД исследования.

Таблица 17. Регрессионный анализ коэффициентов уравнения (3.12) *а, b, с,* коэффициент корреляции, границы начала растворения для *PD*, pH, *M_w*. Значения регрессионных коэффициентов *а, b, с* указаны с учетом их оцененного стандартного отклонения.

Набор	a	h	C	D .	PD %	ъЦ a	лU b	$M_{w,start}$,
данных	u	υ	ι	Radj	I Dstart, 70	pristart	PI Istart	кДа
Полный	0.015 ± 0.002	2.3 ± 0.3	$\textbf{-0.6}\pm0.2$	0.807	43.5	6.3	6.5	3.8
Без PD = 0%	0.017 ± 0.002	3.0 ± 0.2	-1.0 ± 0.2	0.925	57.5	6.0	6.2	3.1
Только	0.018 ± 0.002	3.1 ± 0.3	-1.1 ± 0.2	0.914	60.2	6.0	6.2	2.8
растворение Эксперимент ^с						60.	- 6 5	
Skenephileni						0.0	0.0	

^a – $pK_{1/2}$ = 6.17, n = 1.20 (высокодеацетилированный хитозан) ^b – $pK_{1/2}$ = 6.39, n = 1.09 (хитозан с низкой молекулярной массой)

^c – [23, 142, 143]



Рисунок 25. Поверхность, характеризующая зависимость коэффициента диффузии от степени протонирования и молекулярной массы полимера.

3.10. Влияние непротонированных регионов полимера

Данные, приведенные в таблицах 15 и 17 показывают, что системы группы $(M_w = 1.6$ и 3.2 кДа) растворяются даже случаях А низких степеней протонирования аминогрупп, что соответствует экспериментальным наблюдениям [142, 144]. Визуальная оценка процесса растворения и данные на рисунке 22 показывают, что полимерные цепи в течение длительного времени могут оставаться связанными друг с другом за счет водородных связей. Устойчивые водородные связи формируются между непротонированными участками полимерных цепей, если такие участки имеют достаточную длину. В случаях образовавшиеся связи быстро остальных разрываются В силу доминирующих сил кулоновского отталкивания между положительно заряженными аминогруппами разных молекул. Таким образом, можно растворение предположить, что хитозана зависит не только OT доли протонированных аминогрупп, как показано выше, но и от их распределения на полимерных цепях. Для математической оценки этого эффекта были рассчитаны доли фракций непротонированных регионов различной длины:

$$P_L = 1 - \frac{1}{N_{np}} \sum_{i=1}^{L} n_i , \qquad (3.16)$$

где *L* – количество непротонированных мономерных звеньев в регионе, *N_{np}* – общее количество непротонированных регионов, *n_i* – количество регионов с длиной *i* мономерных единиц.

Гистограммы длин непротонированных регионов для PD = 30%(растворение происходит только для систем группы A) и PD = 50% (растворение происходит во всех случаях) показаны на рисунке 26. Зависимость доли фракции P_L (в процентах) от длины непротонированного региона L для систем с PD = 30%и наиболее крупных систем с PD = 50% (эти два типа систем находятся ближе всего к границе растворимости) показаны на рисунке 27.

Системы, где происходит растворение на рисунке 27 обозначены пунктирными линиями, сплошными линиями обозначены системы, где растворение не наступило. Из рисунков видно, что в системах, где растворение не

89

наступило, присутствуют непротонированные регионы длиной до 20 мономерных единиц, в то время как для растворившихся нанокристаллов протяженность таких регионов не более 8-9 звеньев. Интересно, что линия для случая $M_w = 3.6$ кДа, PD = 30%, где растворение происходит, визуально находится ближе к группе линий для нерастворимых систем. Однако для $M_w = 20$, PD = 30% по сравнению с нерастворимыми системами в несколько раз меньше количество непротонированных участков длиной 7 и 8 мономерных единиц и совсем отсутствуют более длинные непротонированные регионы.

Анализ распределения протонированных регионов показывает, что растворение хитозана зависит не только от молекулярной массы и средней степени протонирования полимера, как было показано в разделе 3.9, но и от наличия протяженных непротонированных регионов. Для предотвращения растворения достаточно чтобы в кристалле более 4% непротонированных регионов имели длину 7 или более мономерных звеньев и присутствовали 9 длиной Роль непротонированные регионы мономерных звеньев. непротонированных участков длиной 6 и менее мономерных звеньев в препятствовании растворению не столь велика. Приведенный вывод ранее не был представлен в литературе. Возможно, использование этого вывода будет важным для синтеза полимеров, перспективных с точки инкапсуляции лекарственных средств.



Рисунок 26. Гистограммы распределения длин непротонированных регионов. Названия даны в соответствии с количеством мономерных единиц (*m*) и степенью протонирования (*p*). Заштрихованные столбцы – для систем, где не происходило растворение.



Рисунок 27. 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.

3.11. Координация хитозана на инсулине

Для изучения процесса координации хитозана на инсулине был проведен расчет с использованием силового поля GROMOS 56A_{CARBO CHT}. В качестве модели белка использовали инсулин человека, состоящий из двух субъединиц, координированных на хлориде цинка II. Данные о структуре белка были взяты из базы данных RSCB [145]. Инсулин находился в окружении восьми полностью деацтилированных молекул хитозана $M_w = 1.6$ кДа (10 мономерных звеньев). Система находилась в заполненном SPC-водой кубической расчетной ячейке 10 x 10 x 10 периодическими размером HM наложенными граничными С Аминогруппы цепей условиями. хитозановых И ионогенные группы (карбоксильные и аминогруппы) инсулина были приведены к состоянию, моделируемой кислотности соответствующему среды. Для поддержания

электронейтральности системы соответствующее количество молекул воды было заменено анионами хлора или катионами натрия. Общий вид системы представлен на рисунке 28.

Поскольку система имеет нано-размеры, возможно лишь ступенчатое моделирование кислотности среды. Было проведено моделирование шести различных систем, pH в которых составлял 2.6, 4.2, 6.0, 7.5, 9.3 и 10.0. Таким образом, исследован широкий диапазон показателей кислотности от кислой до целочной среды. Моделирование проводилось со следующими параметрами: NVT-ансамбль, T = 300K, термостат Берендсена с характеристическим временем 1 пс, LINCS-алгоритм геометрических ограничений связей, время моделирования 30 нс, шаг моделирования 1 фс. Конечные состояния систем с различным pH после моделирования показаны на рисунке 29.

Из рисунка 29 видно, что степень взаимодействия хитозана с инсулином изменяется с изменением кислотности среды. Для pH = 2.6 с инсулином была координирована лишь одна цепь полимера. При pH = 4.2 и pH = 6.0 на инсулине координировалось 2-3 молекулы полимера. При более высоких показателях конце моделирования инсулине кислотности среды В на оказывались координированы более половины молекул хитозана. Максимальное количество хитозановых цепей (все 8 молекул) оказались координированы на инсулине в среде, близкой к нейтральной (pH = 7.5), в то время как в щелочной среде были координированы лишь 5-7 молекул. Как будет показано далее, такой результат можно объяснить возникновением в щелочной среде процесса самоассоциации хитозана. конкурирующего с образованием интерполимерного комплекса хитозан-инсулин. Нужно отметить, что с учетом периодических граничных условий молекулы хитозана могут взаимно влиять на положение друг друга в пространстве за счет сил кулоновского отталкивания, особенно в случаях сильного протонирования в кислой среде.



Рисунок 28. Моделирование образования интерполимерного комплекса хитозан-инсулин. Зеленые цепи – хитозан, фиолетовая глобула – инсулин. Вода и ионы хлора не показаны.



Рисунок 29. Взаимодействие хитозана с инсулином в условиях различной кислотности среды. Зеленые цепи – хитозан, фиолетовая глобула – инсулин.

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 инулином. В качестве начальных были использованы геометрии, полученные в результате моделирования координации хитозана на инсулине. Оценка производилась лишь для одной наиболее координированной хитозановой цепи, остальные 7 цепей в расчетах прочности комплексов были удалены. Размеры ячейки были увеличены до 10 x 10 x 20 нм в связи с особенностями программной реализации PMF расчетов в GROMACS. С учетом увеличения размеров ячейки и удаления из системы 7 из 8 концентрация хитозана в растворе, хитозановых цепей, выраженная В концентрации мономерных звеньев, составила 8.3 · 10-3 моль/л, если пренебречь молярным объемом инсулина. Это исключает взаимное влияние хитозановых цепей друг на друга и переоценку энергии взаимодействия между хитозаном и кулоновскими действующими инсулином, вызванную силами, между положительно заряженными молекулами хитозана. Зонтичный потенциал представлял собой 30 гауссовых функций с высотой пика 60 ккал/моль и полушириной 1.4 Å расположенных на расстоянии 0.5 Å друг от друга. Величина силы отрыва, приложенная к молекуле хитозана, составляла 1000 кДж/(моль·нм²). Положение инсулина было зафиксировано.



Рисунок 30. Зависимость энергии взаимодействия молекул инсулина и хитозана от расстояния между центрами масс молекул при разных pH. Пунктирные горизонтальные линии – высота энергетического плато, определенная по уравнению (3.19).

На рисунке 30 показано изменение энергии системы в зависимости от расстояния между хитозаном и инсулином. Характерная дистанция начала взаимодействия между инсулином и хитозаном составляет 3-5 нм. Оценка энергии координации определяется как высота энергетического плато. Были протестированы несколько математических моделей, подходящих для описания кривых зависимости энергии от расстояния:

$$E = E_c - ae^{-kr} , \qquad (3.17)$$

$$E = E_c \cdot \frac{1}{1 + ae^{-kr}},\tag{3.18}$$

$$E = E_c + \frac{a - E_c}{1 + e^{k(r - r_0)}},$$
(3.19)

где E_c – высота плато, энергия комплекса, r – расстояние между инсулином и хитозаном, k, p, r_0 – константы.

Уравнения (3.18) и (3.19) описывают S-образные кривые с индукционным периодом в начале, последующим ростом и выходом на плато. Уравнение (3.17) описывает рост и выход на плато без индукционного периода. Поскольку целью использования предложенных моделей является определение энергии комплекса (высоты плато) Е_c, наиболее важным будет являться именно этот параметр, а также критерии качества модели (см. раздел 2.7.) Из таблицы 18 видно, что модель (3.17) является наименее применимой. В случаях pH = 4.5 и pH = 6.0 уравнение (3.18) описывает зависимость лучше, чем (3.19), однако оценка энергии комплекса (таблица 19) оказывается одинаковой для (3.18) и (3.19). Уравнение (3.19),правило, показывает наибольшие значения как коэффициентов детерминации R^2 и R_{adj} и наименьшие значения информационных критериев AIC и ВІС. Энергия комплекса хитозан-инсулин, в большинстве случаев мало отличается от модели к модели. Наибольшее различие обнаруживается при pH = 2.6, но в данном случае четко выделяется наиболее качественная модель – уравнение (3.19). Учитывая все описанное выше, уравнение (3.19) было принято в качестве основной модели для определения энергии комплекса хитозан-инсулин на основе результатов расчетов PMF.

	-					
Модель	pH = 2.6	pH = 4.2	pH = 6.0	pH = 7.5	pH = 9.3	pH = 10.1
			R^2			
(3.17)	0.4486	0.7064	0.5388	0.4191	0.8626	0.9418
(3.18)	0.3086	0.7500	0.5767	0.4127	0.8543	0.9276
(3.19)	0.5468	0.7508	0.5797	0.4415	0.8685	0.9457
			R_{adj}			
(3.17)	0.4430	0.7001	0.5341	0.4132	0.8612	0.9412
(3.18)	0.3016	0.7446	0.5724	0.4067	0.8528	0.9268
(3.19)	0.5398	0.7426	0.5732	0.4329	0.8664	0.9449

Таблица 18. Оценка качества моделей (3.17), (3.18) и (3.19) для обработки данных РМF расчетов.

(3.19)	-157.59	-271.53	169.66	-62.44	-40.26	25.33
(3.18)	-78.42	-275.78	165.77	-57.69	-25.13	97.83
(3.17)	-123.26	-260.52	182.91	-59.87	-36.88	53.95
			BIC			
(3.19)	-174.09	-283.62	135.17	-78.94	-56.75	28.84
(3.18)	-91.62	-285.55	152.57	-70.89	-38.32	84.63
(3.17)	-136.89	-270.29	169.72	-73.07	-50.08	40.76
			AIC			

Таблица 19. 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
(3.17)	3.4 ± 3.3	1.2 ± 0.1	6.0 ± 0.2	5.7 ± 0.7	8.5 ± 0.5	14.5 ± 0.3
(3.18)	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.0	5.7 ± 0.1	5.9 ± 0.8	6.6 ± 0.2	12.3 ± 0.1
(3.19)	$\textbf{-0.7}\pm0.1$	1.1 ± 0.0	5.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	7.0 ± 0.3	13.1 ± 0.2

Для случая pH = 2.6 расчет показал отрицательную величину энергии взаимодействия хитозана с инсулином, примерно –0.7 ккал/моль. Это означает, что образование интерполимерного между хитозаном и инсулином в кислом растворе является невыгодным. Возможно, что появлению связи между хитозаном и белком способствовало действие кулоновских сил отталкивания между присутствовавшими в первом расчете молекулами хитозана. Такая связь оказалась неустойчивой и невыгодной в условиях меньшей концентрации хитозана (когда были удалены остальные цепи и увеличен размер ячейки). Зависимость энергии образования комплекса хитозан-инсулин для различных pH показана на рисунке 31.

98

110



Рисунок 31. Зависимость энергии комплекса хитозан-инсулин от рН.

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

$$\Delta E = b + k \cdot pH \,, \tag{3.20}$$

где k и b – некоторые константы, регрессионные коэффициенты.

Анализ данных по уравнению (3.20) 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} :

$$\Delta E = V + c \cdot Q_{cht} Q_{ins} , \qquad (3.21)$$

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-дерваальсовы взаимодействия мало зависят от pH, поэтому при сравнении уравнений (3.20) и (3.21) можно допустить, что:

$$k \cdot pH \approx c \cdot Q_{cht} Q_{ins} \tag{3.22}$$

$$V \approx b = -4.9 \pm 2.7$$
 ккал/моль (3.23)

Оказывается, что при использовании линейной модели энергия ван-дерваальсовых взаимодействий, определенная по формуле (3.20) 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.

Заряды *Q_{cht}* и *Q_{ins}* в (3.21) определяются общим количеством ионогенных групп и их степенью диссоциации:

$$Q_{cht} = N_{cht} \cdot (1 - \alpha_{cht}) \cdot q_{NH_3^+}, \qquad (3.24)$$

$$Q_{ins} = N_{+}^{ins} \cdot \left(1 - \alpha_{+}^{ins}\right) \cdot q_{+} + N_{-}^{ins} \cdot \alpha_{-}^{ins} \cdot q_{-}, \qquad (3.25)$$

где N_i – коэффициенты, учитывающие количество диссоциирующих групп типа *i* и их доступность для взаимодействия друг с другом, α_i – степень диссоциации, q_i – заряд ($q_+ = +1$, $q_- = -1$). Степени диссоциации могут быть выражены через закон действующих масс. Тогда (3.21) принимает вид:

$$\Delta E = V + c \cdot \left[N_{cht} \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_{cht} - pH} + 1} \right) \right] \\ \cdot \left[N_{+}^{ins} \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_{+}^{ins} - pH} + 1} \right) - N_{-}^{ins} \cdot \left(\frac{1}{10^{pK_{-}^{ins} - pH} + 1} \right) \right]$$
(3.26)

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 (3.26) 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 *с* на эффективные величины pK'_{cht} , $pK_{+}^{ins'}$, $pK_{-}^{ins'}$ и *С*' соответственно. В таком случае уравнение (3.26) принимает вид:

$$\Delta E = V + C' \cdot \left[\left(1 - \frac{1}{10^{pK_{ht}' - pH} + 1} \right) \right] \\ \cdot \left[\left(1 - \frac{1}{10^{pK_{+}^{ins'} - pH} + 1} \right) - \left(\frac{1}{10^{pK_{-}^{ins'} - pH} + 1} \right) \right]$$
(3.27)

Математический анализ результатов МД расчетов энергии комплексов по уравнению (3.27) с ограничениями 7 $< pK_{+}^{ins'} < 14$, 0 $< pK_{-}^{ins'} < 7$ (модель M-1) дает следующие значения констант (регрессионных коэффициентов): V = 5.9 ккал/моль, C' = -7.4 ккал/моль, $pK_{cht}' = 17.6$, $pK_{+}^{ins'} = 9.6$, $pK_{-}^{ins'} = 4.4$, $R^2 = 0.9470$, $R_{adj} = 0.7349$, AIC = 27.21, BIC = 26.16. Стандартные отклонения регрессионных коэффициентов: s(V) = 1.9 ккал/моль, s(C') = -3.2 ккал/моль, $s(pK_{cht}') = 1 \cdot 10^7$, $s(pK_{+}^{ins'}) = 1.0$, $s(pK_{-}^{ins'}) = 0.8$.

Коэффициенты детерминации и информационные критерии, описывающие качество модели, оказываются близки к показателям линейной модели Л. Величины эффективных констант диссоциации для инсулина близки к константам аминокислот [146], экспериментальным для a константа протонирования аминогрупп хитозана *pK*[']_{cht} значительно выше известных величин [35]. Последний факт можно объяснить принятыми упрощениями которых константы протонирования модели, В результате являются эффективными величинами. Анализ оцененных стандартных отклонений найденных констант показывает, что pK'_{cht} как регрессионный коэффициент может быть признан малозначимым для модели, поскольку его стандартное отклонение оказывается на несколько порядков больше найденного значения.

Для анализа влияния pK'_{cht} на модель прочности комплексов хитозанинсулин были дополнительно выполнены расчеты при различных фиксированных значениях pK'_{cht} (модели М-2, М-3, М-4 и М-5) – полные результаты представлены в таблице 20 и на рисунке 32. Константа pK'_{cht} контролирует прочность комплекса в щелочной среде, в случаях $pK'_{cht} \ge 12$, практически не оказывает влияния на другие параметры, входящие в модель. Модель М-2, в которой $pK'_{cht} = 14$, показывает наилучшие значения R^2 , R_{adj} , AIC и BIC, стандартные отклонения определения констант в данной модели наименьшие среди нелинейных моделей. Модель М-З ($pK'_{cht} = 12$) дает близкие результаты, однако немного уступает модели М-2 по величинам коэффициентов детерминации и информационных критериев.

Альтернативным подходом к упрощению уравнения (3.26) 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 (3.26) в таком случае примет вид:

$$\Delta E = V + c \cdot \left[8 \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_{cht} - pH} + 1} \right) \right] \\ \cdot \left[14 \cdot \left(1 - \frac{1}{10^{pK_{+}^{ins} - pH} + 1} \right) - 10 \cdot \left(\frac{1}{10^{pK_{-}^{ins} - pH} + 1} \right) \right]$$
(3.28)

При обработке данных по уравнению (3.28), с учетом ограничений 7 < $pK_{+}^{ins} < 14$, $0 < pK_{-}^{ins} < 7$, величины констант диссоциации ионогенных групп получаются более приближенным к экспериментально наблюдаемым значениям: $pK_{cht} = 5.8$, $pK_{ins}^{+} = 13.6$, $pK_{ins}^{-} = 1.6$. Очевидными недостатками модели M-6 являются большие величины стандартных отклонений параметров уравнения: $s(pK_{cht}) = 2.2$, $s(pK_{ins}^{+}) = 1 \cdot 10^{10}$, $s(pK_{ins}^{-}) = 7.9 \cdot 10^2$, – низкие значения коэффициентов детерминации: $R^2 = 0.6931$, $R_{adj} = -0.5343$, – и наихудшие показатели информационных критериев: AIC = 37.74 и BIC = 36.70. На рисунке 32 профиль энергии комплекса, соответствующий уравнению (3.28) показан черной линией. В таблице 20 приведены полные результаты обработки данных PMF расчетов с использованием разных подходов.

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 32 показывает, что при любой модели обработки данных, сохраняются общие тенденции: (1) в кислой среде комплекс хитозан-инсулин не является устойчивым; (2) в области нейтральных рН находится плато, высота которого определяется энергией вандер-ваальсовых взаимодействий V; (3) прочность комплекса в щелочной среде определяется (эффективной) константой pK_{cht} .

Модель	Л	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	Эксперимент
<i>k</i> , ккал/моль	1.5	-	-	-	-	-	-	
<i>b</i> , ккал/моль	-4.9	-	-	-	-	-	-	
<i>V</i> , ккал/моль	-	5.9	5.9	5.9	7.4	8.3	8.4	
с, 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 6.51ª
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	
<i>R_{adj}</i>	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°
Оцененные	е стандарт	гные отк	лонения	регресс	ионных	коэффиц	иентов	
<i>s(k)</i> , ккал/моль	0.3	-	-	-	-	-	-	
<i>s(b)</i> , ккал/моль	2.7	-	-	-	-	-	-	
<i>s(V),</i> ккал/моль	-	1.9	1.3	1.3	3.7	71.1	$1.3 \cdot 10^{4}$	
<i>s(c)</i> , 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	$7.9 \cdot 10^2$	
<i>s(ΔE</i>) (рН=5.3), ккал/моль	2.8	3.7	2.4	2.4	5.8	99.8	$1.3 \cdot 10^4$	
Лля M-1, M-2, М	M-3 M-4	4 и М-	5 прив	елены	значени	и эффе	ктивных	констант C' .

Таблица 20. Параметры моделей обработки РМF расчетов.

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

Л – линейная модель (3.20)

М-1, М-2, М-3, М-4, М-5 – уравнение (3.27)

М-2, М-3, М-4, М-5 – эффективные константы *рК*[']_{cht} заданы вручную

М-6 – уравнение (3.28)

^a – [35], ^b – [146], ^c – [147]



Рисунок 32. 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 (3.27). М-6 – обработка по уравнению данных по уравнению (3.28). М-2, М-3, М-4, М-5 – константы pK'_{cht} задана вручную (см. таблицу 20).

В одной из недавних работ [147] были измерены термодинамические параметры взаимодействия хитозана с инсулином при pH = 5.3, энергия взаимодействия биополимеров составила 3.03 ккал/моль. Как ВИДНО ИЗ рисунка 32, оценки энергии по предложенным моделям согласуются с этим экспериментальным наблюдением. Наиболее близки к экспериментальным оказываются результаты М-5 с фиксированной эффективной значениям константой $pK'_{cht} = 6.5$ и М-6, где которой обработка данных происходила по уравнению (3.28). Сравнивая все подходы к анализу данных, следует выделить М-1, М-2 и М-6. В моделях М-1 и М-6 ни одна из констант не задается вручную. Преимуществом М-2 являются высокие показатели надежности модели. М-1 и M-2 показывают одинаковые константы, отличаясь лишь в оценке погрешностей определения этих констант. Однако, следует помнить, что значения констант

протонирования в этих моделях – эффективные и возможно лишь приближенное их сопоставление с экспериментальными данными. М-6 достаточно точно воспроизводит экспериментально определенную энергию комплекса хитозанинсулин и константы диссоциации ионогенных групп для обоих полимеров. С другой стороны, эта модель показывает низкую степень корреляции и ненадежные со статистической точки зрения результаты. В сравнении с линейным уравнением (3.20) 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 (3.20) с точки зрения всех использованных статистических критериев - коэффициентов детерминации R^2 и R_{adj} и информационных критериев *AIC* и *BIC*.

Образование комплексов в щелочной среде маловероятно, поскольку самоассоциация хитозана. Максимальное количество происходит координированных на инсулине молекул (все 8 молекул) обнаружено в слабощелочной среде pH = 7.5. При больших значениях показателя кислотности на инсулине оказывались координированы 5-7 молекул хитозана. Остальные собой, либо молекулы углевода связывались между с хитозаном, координированным на инсулине, не контактируя при этом с самим белком. В работе [148] было показано, что энергия связи хитозановой молекулы длиной 20 мономеров с кристаллом хитозана в щелочной среде составляет около 44 ккал/моль, наиболее что кратно превышает энергию прочного интерполимерного комплекса хитозан-инсулин. В исследовании [148] использовались молекулы хитозана длиной 20 мономерных звеньев, для которых, как было показано в разделе 3.10, характерна повышенная растворимость в связи с низкой молекулярной массой. Для хитозанов больших молекулярных масс будет характерна более сильная ассоциация в связи с наличием протяженных непротонированных регионов.

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 ± 1.3 ккал/моль.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработано силовое поле GROMOS 56A_{CARBO_CHT}, позволяющее проводить молекулярно-динамическое моделирование хитозана и его аминозамещенных 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 конформационные особенности хитозана (данные PCAструктурные И исследований, константы ЯМР), а также экспериментальные физико-химические характеризующие растворы полимера (вискозиметрические параметры, константы К и а уравнения Марка-Куна-Хаувинка, рН 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 OT кислотности среды. Коэффициент диффузии, характеризующий скорость растворения, прямо пропорционален степени протонирования и обратно пропорционален молекулярной массе полимера:

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

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 нестабильность кислой комплексов, являются комплексов В 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. - T. 23. - C. 244.

2. **Naumov, V.S.**, Ignatov, S. K. Dissolution of chitosan nanocrystals in aqueous media of different acidity. Molecular dynamic study // Carbohydrate Polymers. -2018. - T. 207. - C. 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 insulinchitosan complexes // Supramolecular Chemistry. -2019. - T. 31, No 6. - C. 412-423.

Статьи в сборниках:

Наумов В.С., Игнатов С.К., Разуваев А.Г., Мочалова А.Е., Глазова 4. Смирнова Структура растворимость нанокристаллов И.А., Л.А. И Молекулярно-динамическое полиаминогликанов исследование воде. // В 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. Молекулярнодинамическое 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 // Х 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. Молекулярнодинамическое исследование систем хитозана с инсулином // Х Всероссийская молодежная научно-инновационная школа «Математика и математическое моделирование» 12–14 апреля 2016, Саров / Сборник материалов. – Саров, 2016. – С. 117–118.

13. Наумов **B.C.**, Игнатов С.К. Растворение нанокристаллов Молекулярно-динамическое полиаминогликанов В водных растворах. 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 аминозамещенных 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. Молекулярнодинамическое 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МД – молекулярно-динамический

СП – силовое поле

ППЭ – поверхность потенциальной энергии

MSD – среднеквадратичное смещение (mean squared displacement)

PD – степень протонирования (protonation degree)

DD – степень деацетилирования (degree of deacetylation)

DA – степень ацетилирования (degree of acetylation)

M_w – молекулярная масса

РСА – рентген-структурный анализ

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

111

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin Y.-J., Mi F.-L., Lin P.-Y., Miao Y.-B., Huang T., Chen K.-H., Chen C.-T., Chang Y., Sung H.-W. Strategies for improving diabetic therapy via alternative administration routes that involve stimuli-responsive insulin-delivering systems // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2019. – T. 139. – C. 71-82.

2. Aydın R. S. T., Pulat M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics // Journal of Nanomaterials. – 2012. – T. 2012. – C. 10.

3. Patel M. P., Patel R. R., Patel J. K. Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. // J Pharm Pharmaceut Sci. – 2010. – T. 13, № 4. – C. 536-557.

4. Li J., Ma F.-K., Dang Q.-F., Liang X.-G., Chen X.-G. Glucose-conjugated chitosan nanoparticles for targeted drug delivery and their specific interaction with tumor cells // Frontiers of Materials Science. -2014. - T. 8, No 4. -C. 363-372.

5. Application of Chitosan-Based Nanocarriers in Tumor-Targeted Drug Delivery. / Ghaz-jahanian M. A., Abbaspour-Aghdam F., Anarjan N., Berenjian A., Jafarizadeh H., 2014.

6. Riva R., Ragelle H., des Rieux A., Duhem N., Jérôme C., Préat V. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering // Chitosan for Biomaterials II / Jayakumar R. и др.Springer Berlin Heidelberg, 2011. – С. 19-44.

7. Pedroni V. I., Schulz P. C., Gschaider M. E., Andreucetti N. Chitosan structure in aqueous solution // Colloid and Polymer Science. – 2003. – T. 282, № 1. – C. 100-102.

 8. Pedroni V. I., Gschaider M. E., Schulz P. C. UV Spectrophotometry: Improvements in the Study of the Degree of Acetylation of Chitosan // Macromolecular Bioscience. – 2003. – T. 3, № 10. – C. 531-534.

9. Li Q.-x., Song B.-z., Yang Z.-q., Fan H.-l. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions // Carbohydrate Polymers. – 2006. – T. 63, № 2. – C. 272-282.

10. Krayukhina M. A., Samoilova N. A., Yamskov I. A. Polyelectrolyte complexes of chitosan: formation, properties and applications // Russian Chemical Reviews. – 2008. – T. 77, № 9. – C. 799.

11. Xu Y., Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles // International Journal of Pharmaceutics. – 2003. – T. 250, № 1. – C. 215-226.

12. Ogawa K., Yui T., Okuyama K. Three D structures of chitosan // Int J Biol Macromol. – 2004. – T. 34, № 1-2. – C. 1-8.

13. Okuyama K., Noguchi K., Miyazawa T., Yui T., Ogawa K. Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan // Macromolecules. – 1997. – T. 30, № 19. – C. 5849-5855.

14. Yui T., Imada K., Okuyama K., Obata Y., Suzuki K., Ogawa K. Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan // Macromolecules. – 1994. – T. 27, № 26. – C. 7601-7605.

15. Wentao W., Zhu J., Wang X.-L., Huang Y., Wang Y.-Z. Dissolution Behavior of Chitin in Ionic Liquids // Journal of Macromolecular Science, Part B. – 2010. – T. 49. – C. 528-541.

16. Cho Y.-W., Jang J., Park C. R., Ko S.-W. Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins // Biomacromolecules. – 2000. – T. 1, № 4. – C. 609-614.

17. Sogias Ioannis A., Khutoryanskiy Vitaliy V., Williams Adrian C. Exploring the Factors Affecting the Solubility of Chitosan in Water // Macromolecular Chemistry and Physics. -2009. - T. 211, No 4. - C. 426-433.

18. Lu S., Song X., Cao D., Chen Y., Yao K. Preparation of water-soluble chitosan // Journal of Applied Polymer Science. – 2004. – T. 91, № 6. – C. 3497-3503.

19. Lertworasirikul A., Tsue S.-i., Noguchi K., Okuyama K., Ogawa K. Two different molecular conformations found in chitosan type II salts // Carbohydrate Research. – 2003. – T. 338, № 11. – C. 1229-1233.

20. Lertworasirikul A., Yokoyama S., Noguchi K., Ogawa K., Okuyama K. Molecular and crystal structures of chitosan/HI type I salt determined by X-ray fiber diffraction // Carbohydrate Research. – 2004. – T. 339, № 4. – C. 825-833.

21. Zhang J., Xia W., Liu P., Cheng Q., Tahi T., Gu W., Li B. Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications // Marine Drugs. – 2010. – T. 8, № 7. – C. 1962.

22. Tharanathan R. N., Kittur F. S. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2003. – T. 43, № 1. – C. 61-87.

23. Pillai C. K. S., Paul W., Sharma C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // Progress in Polymer Science. – 2009. – T.
34, № 7. – C. 641-678.

24. Kurita K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin // Progress in Polymer Science. – 2001. – T. 26, № 9. – C. 1921-1971.

25. Gorochovceva N., Makuška R. Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly(ethylene glycol) graft copolymers // European Polymer Journal. – 2004. – T. 40, № 4. – C. 685-691.

26. Jenkins D. W., Hudson S. M. Review of Vinyl Graft Copolymerization Featuring Recent Advances toward Controlled Radical-Based Reactions and Illustrated with Chitin/Chitosan Trunk Polymers // Chemical Reviews. – 2001. – T. 101, № 11. – C. 3245-3274.

27. Jayakumar R., Prabaharan M., Reis R. L., Mano J. F. Graft copolymerized chitosan—present status and applications // Carbohydrate Polymers. – 2005. – T. 62, № 2. – C. 142-158.

28. Brugnerotto J., Desbrières J., Heux L., Mazeau K., Rinaudo M. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution // Macromolecular Symposia. – 2001. – T. 168, N_{2} 1. – C. 1-20.

29. Kubota N., Eguchi Y. Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility // Polym J. – 1997.
– T. 29, № 2. – C. 123-127.

30. Zhang Y., Xue C., Li Z., Zhang Y., Fu X. Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties // Carbohydrate Polymers. – 2006. – T. 65, № 3. – C. 229-234.

31. Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan // Polymer. – 1999. – T. 40, № 25. – C. 7029-7032.

32. Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium // International Journal of Polymer Analysis and Characterization. – 1999. – T. 5, № 3. – C. 267-276.

33. Kim K. M., Son J. H., Kim S.-K., Weller C. L., Hanna M. A. Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type // Journal of Food Science. – 2006. – T. 71, № 3. – C. E119-E124.

34. Kienzle-Sterzer C., Rodriguez-Sanchez D., Rha C. Dilute solution behavior of a cationic polyelectrolyte // Journal of Applied Polymer Science. – 1982. – T. 27, № 11. – C. 4467-4470.

35. Wang Q. Z., Chen X. G., Liu N., Wang S. X., Liu C. S., Meng X. H., Liu C.
G. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation // Carbohydrate Polymers. – 2006. – T. 65, № 2. – C. 194-201.

36. Akbuğa J., Durmaz G. Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide // International Journal of Pharmaceutics. – 1994. – T. 111, № 3. – C. 217-222.

37. Al-Helw A. A., Al-Angary A. A., Mahrous G. M., Al-Dardari M. M. Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone // Journal of Microencapsulation. – 1998. – T. 15, No 3. – C. 373-382.

38. Jameela S. R., Kumary T. V., Lal A. V., Jayakrishnan A. Progesteroneloaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system // Journal of Controlled Release. – 1998. – T. 52, № 1–2. – C. 17-24.

39. Bugamelli F., Raggi M. A., Orienti I., Zecchi V. Controlled Insulin Release from Chitosan Microparticles // Archiv der Pharmazie. – 1998. – T. 331, № 4. – C. 133-138.

40. Mao H.-Q., Roy K., Troung-Le V. L., Janes K. A., Lin K. Y., Wang Y., August J. T., Leong K. W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency // Journal of Controlled Release. – 2001. – T. 70, N_{2} 3. – C. 399-421.

41. Özbaş-Turan S., Akbuğa J., Aral C. Controlled release of interleukin-2 from chitosan microspheres // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2002. – T. 91, № 5. – C. 1245-1251.

42. Fernández-Urrusuno R., Calvo P., Remuñán-López C., Vila-Jato J., José
Alonso M. Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles
// Pharmaceutical Research. – 1999. – T. 16, № 10. – C. 1576-1581.

43. Pan Y., Li Y.-j., Zhao H.-y., Zheng J.-m., Xu H., Wei G., Hao J.-s., Cui F.-d. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo // International Journal of Pharmaceutics. – 2002. – T. 249, № 1–2. – C. 139-147.

44. He P., Davis S. S., Illum L. Chitosan microspheres prepared by spray drying // International Journal of Pharmaceutics. – 1999. – T. 187, № 1. – C. 53-65.

45. Huang Y. C., Yeh M. K., Chiang C. H. Formulation factors in preparing BTM–chitosan microspheres by spray drying method // International Journal of Pharmaceutics. -2002. - T. 242, No 1-2. - C. 239-242.

46. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery // Journal of Controlled Release. – 2004. – T. 100, № 1. – C. 5-28.

47. Kim J.-H., Kim Y.-S., Kim S., Park J. H., Kim K., Choi K., Chung H., Jeong S. Y., Park R.-W., Kim I.-S., Kwon I. C. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel // Journal of Controlled Release. -2006. - T. 111, No 1–2. – C. 228-234.

48. Zhang J., Chen X. G., Li Y. Y., Liu C. S. Self-assembled nanoparticles based on hydrophobically modified chitosan as carriers for doxorubicin // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine – T. 3, N_{2} 4. – C. 258-265.

49. Jiang G.-B., Quan D., Liao K., Wang H. Novel Polymer Micelles Prepared from Chitosan Grafted Hydrophobic Palmitoyl Groups for Drug Delivery // Molecular Pharmaceutics. – 2006. – T. 3, № 2. – C. 152-160.

50. Franca E. F., Lins R. D., Freitas L. C. G., Straatsma T. P. Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2008. – T. 4, № 12. – C. 2141-2149.

51. Franca E. F., Freitas L. C. G., Lins R. D. Chitosan Molecular Structure as a Function of N-Acetylation // Biopolymers. – 2011. – T. 95, № 7. – C. 448-460.

52. Lins R. D., Hunenberger P. H. A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates // J Comput Chem. – 2005. – T. 26, № 13. – C. 1400-12.

53. Oostenbrink C., Villa A., Mark A. E., Van Gunsteren W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6 // Journal of Computational Chemistry. -2004. - T. 25, No 13. - C. 1656-1676.

54. Hansen H. S., Hunenberger P. H. A reoptimized GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates accounting for the relative free energies of ring conformers, anomers, epimers, hydroxymethyl rotamers, and glycosidic linkage conformers // J Comput Chem. – 2011. – T. 32, No 6. – C. 998-1032.

55. Foley B. L., Tessier M. B., Woods R. J. Carbohydrate force fields // Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci. – 2012. – T. 2, № 4. – C. 652-697.

56. Schmid N., Eichenberger A. P., Choutko A., Riniker S., Winger M., Mark A. E., Gunsteren W. F. v. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7 // European Biophysics Journal With Biophysics Letters. – 2011. – T. 40, N_{2} 7. – C. 843-856.

57. Plazinski W., Lonardi A., Hünenberger P. H. Revision of the GROMOS 56A6CARBO force field: Improving the description of ring-conformational equilibria in hexopyranose-based carbohydrates chains // Journal of Computational Chemistry. – 2016. – T. 37, N_{2} 3. – C. 354-365.

58. Skovstrup S., Hansen S. G., Skrydstrup T., Schiott B. Conformational flexibility of chitosan: a molecular modeling study // Biomacromolecules. – 2010. – T. 11, № 11. – C. 3196-207.

59. Senderowitz H., Still W. C. A Quantum Mechanically Derived All-Atom Force Field for Pyranose Oligosaccharides. AMBER* Parameters and Free Energy Simulations // The Journal of Organic Chemistry. – 1997. – T. 62, № 5. – C. 1427-1438.

60. Yu Z., Lau D. Flexibility of backbone fibrils in α -chitin crystals with different degree of acetylation // Carbohydrate Polymers. – 2017. – T. 174. – C. 941-947.

61. Guvench O., Mallajosyula S. S., Raman E. P., Hatcher E., Vanommeslaeghe K., Foster T. J., Jamison F. W., MacKerell A. D. CHARMM Additive All-Atom Force Field for Carbohydrate Derivatives and Its Utility in Polysaccharide and Carbohydrate– Protein Modeling // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2011. – T. 7, № 10. – C. 3162-3180.

62. YIN Q., ZHOU G., LIU Y.-Y., YIN Q.-J., LUO J.-H., JIANG B. MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION OF CARBOXYETHYL CHITOSAN: EFFECT OF TEMPERATURE, SALT CONCENTRATION AND pH // Journal of Theoretical and Computational Chemistry. -2010. - T. 09, No supp01. - C. 167-176.

63. Sun H., Mumby S. J., Maple J. R., Hagler A. T. An ab Initio CFF93 All-Atom Force Field for Polycarbonates // Journal of the American Chemical Society. – 1994. – T. 116, № 7. – C. 2978-2987.

64. Glukhova O. E., Kolesnikova A. S., Grishina O. A., Slepchenkov M. M. Structure and properties of composites based chitosan and carbon nanostructures: atomistic and coarse-grained simulation. – T. 9339 –, 2015. – C. 933911-933911-6.

65. Kossovich E., Kirillova I., Kossovich L., Safonov R., Ukrainskiy D., Apshtein S. Hybrid coarse-grained/atomistic model of "chitosan + carbon nanostructures" composites // Journal of Molecular Modeling. – 2014. – T. 20, $N_{\rm D}$ 10. – C. 1-7.

66. Pigaleva M. A., Portnov I. V., Rudov A. A., Blagodatskikh I. V., Grigoriev T. E., Gallyamov M. O., Potemkin I. I. Stabilization of Chitosan Aggregates at the

Nanoscale in Solutions in Carbonic Acid // Macromolecules. – 2014. – T. 47, № 16. – C. 5749-5758.

67. Noid W. G. Perspective: Coarse-grained models for biomolecular systems // J Chem Phys. – 2013. – T. 139, № 9. – C. 090901.

68. Salar S., Jafari M., Kaboli S. F., Mehrnejad F. The role of intermolecular interactions on the encapsulation of human insulin into the chitosan and cholesterol-grafted chitosan polymers // Carbohydrate Polymers. – 2019. – T. 208. – C. 345-355.

69. Solairaj D., Palanivel R., Suryanarayanan V., Singh S., Vijayan S. R. In Vitro and In Silico Studies of Chitin and Chitosan Based Nanocarriers for Curcumin and Insulin Delivery // Journal of Polymers and the Environment. – 2018.10.1007/s10924-018-1282-8.

70. Ferrer S., Ruiz-Pernía J., Martí S., Moliner V., Tuñón I., Bertrán J., Andrés J. Chpater 3 - Hybrid Schemes Based on Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Simulations: Goals to Success, Problems, and Perspectives // Advances in Protein Chemistry and Structural Biology / Christo C.Academic Press, 2011. – C. 81-142.

71. Mompeán M., González C., Lomba E., Laurents D. V. Combining Classical MD and QM Calculations to Elucidate Complex System Nucleation: A Twisted, Three-Stranded, Parallel β -Sheet Seeds Amyloid Fibril Conception // The Journal of Physical Chemistry B. – 2014. – T. 118, No 26. – C. 7312-7316.

72. Sobieraj M., Krzyśko K. A., Jarmuła A., Kalinowski M. W., Lesyng B., Prokopowicz M., Cieśla J., Gojdź A., Kierdaszuk B. A QM-MD simulation approach to the analysis of FRET processes in (bio)molecular systems. A case study: complexes of E. coli purine nucleoside phosphorylase and its mutants with formycin A // Journal of Molecular Modeling. -2015. - T. 21, No 4. - C. 1-14.

73. Voelz V. A., Bowman G. R., Beauchamp K., Pande V. S. Molecular Simulation of ab Initio Protein Folding for a Millisecond Folder NTL9(1–39) // Journal of the American Chemical Society. – 2010. – T. 132, No 5. – C. 1526-1528.

74. Ryckaert J.-P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes // Journal of Computational Physics. – 1977. – T. 23, N_{2} 3. – C. 327-341.

75. Hess B., Bekker H., Berendsen H. J. C., Fraaije J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations // Journal of Computational Chemistry. – 1997. – T. 18, № 12. – C. 1463-1472.

76. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., Gunsteren W. F. v., DiNola A., Haak J.
R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // The Journal of Chemical Physics. – 1984. – T. 81, № 8. – C. 3684-3690.

77. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // The Journal of Chemical Physics. – 2007. – T. 126, № 1. – C. 014101.

78. Hoover W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions // Physical Review A. – 1985. – T. 31, № 3. – C. 1695-1697.

79. Andersen H. C. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature // The Journal of Chemical Physics. – 1980. – T. 72, № 4. – C. 2384-2393.

80. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method // Journal of Applied Physics. – 1981. – T. 52, № 12. – C. 7182-7190.

81. Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A. Development and testing of a general amber force field // Journal of Computational Chemistry. -2004. - T. 25, No 9. - C. 1157-1174.

82. Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules // Journal of the American Chemical Society. – 1995. – T. 117, № 19. – C. 5179-5197.

83. Maier J. A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2015. – T. 11, N_{2} 8. – C. 3696-3713.

84. Dickson C. J., Madej B. D., Skjevik Å. A., Betz R. M., Teigen K., Gould I. R., Walker R. C. Lipid14: The Amber Lipid Force Field // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2014. – T. 10, № 2. – C. 865-879.

85. MacKerell A. D., Wiorkiewicz-Kuczera J., Karplus M. An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic acids // Journal of the American Chemical Society. – 1995. – T. 117, № 48. – C. 11946-11975.

86. Foloppe N., MacKerell J., Alexander D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data // Journal of Computational Chemistry. – 2000. – T. 21, No 2. – C. 86-104.

87. MacKerell Jr. A. D., Banavali N. K. All-atom empirical force field for nucleic acids: II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution // Journal of Computational Chemistry. – 2000. – T. 21, No 2. – C. 105-120.

88. Jorgensen W. L., Maxwell D. S., Tirado-Rives J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids // Journal of the American Chemical Society. – 1996. – T. 118, № 45. – C. 11225-11236.

89. Jorgensen W. L., Tirado-Rives J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin // Journal of the American Chemical Society. – 1988. – T. 110, \mathbb{N}_{2} 6. – C. 1657-1666.

90. Robertson M. J., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L. Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field // Journal of Chemical Theory and Computation. -2015. - T. 11, No 7. - C. 3499-3509.

91. Robertson M. J., Qian Y., Robinson M. C., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L. Development and Testing of the OPLS-AA/M Force Field for RNA // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2019. – T. 15, N_{2} 4. – C. 2734-2742.

92. Ricci C. G., de Andrade A. S. C., Mottin M., Netz P. A. Molecular Dynamics of DNA: Comparison of Force Fields and Terminal Nucleotide Definitions // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – T. 114, № 30. – C. 9882-9893.

93. Angyal S. J. Conformational analysis in carbohydrate chemistry. I. Conformational free energies. The conformations and α : β ratios of

aldopyranoses in aqueous solution // Australian Journal of Chemistry. – 1968. – T. 21, No 11. – C. 2737-2746.

94. Angyal S. J. The Composition and Conformation of Sugars in Solution // Angewandte Chemie International Edition in English. – 1969. – T. 8, № 3. – C. 157-166.

95. Angyal S. J. The Composition of Reducing Sugars in Solution // Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. – 1984. – T. 42. – C. 15-68.

96. Vijayalakshmi K. S., Rao V. S. R. Theoretical studies on the conformation of aldopyranoses // Carbohydrate Research. – 1972. – T. 22, № 2. – C. 413-424.

97. Gasteiger J., Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges // Tetrahedron. – 1980. – T. 36, № 22. – C. 3219-3228.

98. Mayo S. L., Olafson B. D., Goddard W. A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations // The Journal of Physical Chemistry. – 1990. – T. 94, № 26. – C. 8897-8909.

99. Simulating the physical world : hierarchical modeling from quantum mechanics to fluid dynamics. / Berendsen H. J. C. – Cambridge ; New York: Cambridge University Press, 2007. – xxvii, 596 p. c.

100. White C. A., Head-Gordon M. Derivation and efficient implementation of the fast multipole method // The Journal of Chemical Physics. – 1994. – T. 101, N_{2} 8. – C. 6593-6605.

101. Rokhlin V. Rapid solution of integral equations of classical potential theory // Journal of Computational Physics. – 1985. – T. 60, № 2. – C. 187-207.

102. Essmann U., Perera L., Berkowitz M. L., Darden T., Lee H., Pedersen L. G. A smooth particle mesh Ewald method // The Journal of Chemical Physics. – 1995. – T. 103, № 19. – C. 8577-8593.

103. Torrie G. M., Valleau J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling // Journal of Computational Physics. – 1977. – T. 23, № 2. – C. 187-199.

104. Laio A., Parrinello M. Escaping free-energy minima // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99, № 20. – C. 12562.

105. Spiess A.-N., Neumeyer N. An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach // BMC pharmacology. -2010. - T. 10. - C. 6-6.

106. Akaike H. A new look at the statistical model identification // IEEE Transactions on Automatic Control. – 1974. – T. 19, № 6. – C. 716-723.

107. Schwarz G. Estimating the Dimension of a Model // Ann. Statist. – 1978. – T. 6, № 2. – C. 461-464.

108. Singh U. C., Kollman P. A. An approach to computing electrostatic charges for molecules // Journal of Computational Chemistry. – 1984. – T. 5, № 2. – C. 129-145.

109. Breneman C. M., Wiberg K. B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis // Journal of Computational Chemistry. – 1990. – T. 11, N_{2} 3. – C. 361-373.

110.56A_CARBO4GROMACS.-.-URL:http://www.gromacs.org/@api/deki/files/200/=56aCARBO4GROMACS.rar.

111. Stenutz R., Carmichael I., Widmalm G., Serianni A. S. Hydroxymethyl Group Conformation in Saccharides: Structural Dependencies of 2JHH, 3JHH, and 1JCH Spin–Spin Coupling Constants // The Journal of Organic Chemistry. – 2002. – T. 67, N_{2} 3. – C. 949-958.

112. Tafazzoli M., Ghiasi M. New Karplus equations for 2JHH, 3JHH, 2JCH, 3JCH, 3JCOCH, 3JCSCH, and 3JCCCH in some aldohexopyranoside derivatives as determined using NMR spectroscopy and density functional theory calculations // Carbohydrate Research. – 2007. – T. 342, No 14. – C. 2086-2096.

113. Mobli M., Almond A. N-Acetylated amino sugars: the dependence of NMR
3J(HNH2)-couplings on conformation, dynamics and solvent // Organic &
Biomolecular Chemistry. – 2007. – T. 5, № 14. – C. 2243-2251.

114. Roslund M. U., Tähtinen P., Niemitz M., Sjöholm R. Complete assignments of the (1)H and (13)C chemical shifts and J(H,H) coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides // Carbohydrate research. – 2008. – T. 343, $N_{\rm P}$ 1. – C. 101-112.

115. Blundell C. D., Roberts I. S., Sheehan J. K., Almond A. Investigating the Molecular Basis for the Virulence of $\langle i \rangle$ Escherichia coli $\langle i \rangle$ K5 by Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Capsule Polysaccharide // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2009. – T. 17, No 2. – C. 71-82.

116. Yoshihiro Nishida H. O., Hiroshi Meguro. 1H-NMR studies of (6r)- and (6s)-deuterated D-hexoses: assignment of the preferred rotamers about C5C6 bond of D-glucose and D-galactose derivatives in solutions // Tetrahedron Letters. – 1984. – T. 25, N_{2} 15. – C. 1575–1578.

117. Halgren T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94 // Journal of Computational Chemistry.
– 1996. – T. 17, № 5-6. – C. 490-519.

118. Cremer D., Pople J. A. General definition of ring puckering coordinates // Journal of the American Chemical Society. – 1975. – T. 97, № 6. – C. 1354-1358.

119. Conformational Nomenclature for Five and Six-Membered Ring Forms of Monosaccharides and Their Derivatives // European Journal of Biochemistry. – 1980. –
 T. 111, № 2. – C. 295-298.

120. Fushinobu S. Cremer-Pople parameter calculator. –. – URL: <u>http://enzyme13.bt.a.u-tokyo.ac.jp/CP/</u>.

121. Plazinski W., Drach M. The dynamics of the conformational changes in the hexopyranose ring: a transition path sampling approach // RSC Advances. – 2014. – T.
4, № 48. – C. 25028-25039.

122. Plazinski W., Drach M. The influence of the hexopyranose ring geometry on the conformation of glycosidic linkages investigated using molecular dynamics simulations // Carbohydrate Research. – 2015. – T. 415. – C. 17-27.

123. Bonomi M., Branduardi D., Bussi G., Camilloni C., Provasi D., Raiteri P., Donadio D., Marinelli F., Pietrucci F., Broglia R. A., Parrinello M. PLUMED: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics // Computer Physics Communications. -2009. - T. 180, No 10. - C. 1961-1972.

124. Sattelle B. M., Almond A. Is N-acetyl-d-glucosamine a rigid 4C1 chair? // Glycobiology. – 2011. – T. 21, № 12. – C. 1651-1662.

125. Yui T., Taki N., Sugiyama J., Hayashi S. Exhaustive crystal structure search and crystal modeling of beta-chitin // International journal of biological macromolecules. – 2007. – T. 40, № 4. – C. 336-344.

126. Gardner K. H., Blackwell J. Refinement of the structure of β -chitin // Biopolymers. – 1975. – T. 14, No 8. – C. 1581-1595.

127. Paavilainen S., Rog T., Vattulainen I. Analysis of twisting of cellulose nanofibrils in atomistic molecular dynamics simulations // J Phys Chem B. – 2011. – T. 115, № 14. – C. 3747-55.

128. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // SoftwareX. – 2015. – T. 1-2. – C. 19-25.

129. 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. – T. 23, № 8. – C. 244.

130. Thevarajah J. J., Bulanadi J. C., Wagner M., Gaborieau M., Castignolles P.
Towards a less biased dissolution of chitosan // Analytica Chimica Acta. – 2016. – T.
935. – C. 258-268.

131. Palmer B. J. Transverse-current autocorrelation-function calculations of the shear viscosity for molecular liquids // Physical Review E. – 1994. – T. 49, N_{2} 1. – C. 359-366.

132. Solomon O. F., Ciută I. Z. Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité // Journal of Applied Polymer Science. – 1962. – T. 6, № 24. – C. 683-686.

133. Berkovich L. A., Timofeyeva G. I., Tsyurupa M. P., Davankov V. A.
Hydrodynamic and conformational parameters of chitosane // Polymer Science U.S.S.R.
– 1980. – T. 22, № 8. – C. 2009-2018.

134. Anthonsen M. W., Vårum K. M., Smidsrød O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation // Carbohydrate Polymers. – 1993. – T. 22, № 3. – C. 193-201.

135. Gamzazade A. I., Šlimak V. M., Skljar A. M., Štykova E. V., Pavlova S. S.
A., Rogožin S. V. Investigation of the hydrodynamic properties of chitosan solutions // Acta Polymerica. – 1985. – T. 36, № 8. – C. 420-424.

136. Rinaudo M., Milas M., Dung P. L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion // International Journal of Biological Macromolecules. – 1993. – T. 15, No 5. – C. 281-285.

137. Wang W., Bo S., Li S., Qin W. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation // International Journal of Biological Macromolecules. – 1991. – T. 13, No 5. – C. 281-285.

138. Kasaai M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data // Carbohydrate Polymers. – 2007. – T. 68, N_{2} 3. – C. 477-488.

139. Korson L., Drost-Hansen W., Millero F. J. Viscosity of water at various temperatures // The Journal of Physical Chemistry. – 1969. – T. 73, № 1. – C. 34-39.

140. Olivieri Alejandro C., Faber Nicolaas M., Ferré J., Boqué R., Kalivas John H., Mark H. Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report) // Book Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report) / Editor, 2006. – C. 633.

141. Applied Linear Regression, Third Edition. / Weisberg S.: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

142. Qin C., Li H., Xiao Q., Liu Y., Zhu J., Du Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity // Carbohydrate Polymers. – 2006. – T. 63, № 3. – C. 367-374.

143. Kumar M. N. V. R., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb
A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives // Chemical Reviews. –
2004. – T. 104, № 12. – C. 6017-6084.

144. Kubota N., Tatsumoto N., Sano T., Toya K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents // Carbohydrate Research. -2000. - T. 324, No 4. - C. 268-274.

145. Favero-Retto M. P., Palmieri L. C., Souza T. A., Almeida F. C., Lima L.
M. Structural meta-analysis of regular human insulin in pharmaceutical formulations //
Eur J Pharm Biopharm. – 2013. – T. 85, № 3 Pt B. – C. 1112-21.

146. Grimsley G. R., Scholtz J. M., Pace C. N. A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins // Protein science : a publication of the Protein Society. -2009. - T. 18, No 1. - C. 247-251.

147. Emmanuel R., Josué J., G. B. M., E. G. L., Pablo T., Víctor M., A. V. M. Properties of insulin–chitosan complexes obtained by an alkylation reaction on chitosan // Journal of Applied Polymer Science. – 2014. – T. 131, No 6.

148. А.А. Авдошин, В. С. Наумов, С.К. Игнатов. Определение термодинамических и кинетических характеристик координации олигомеров хитозана с инсулином методами молекулярной динамики // Всероссийская конференция по квантовой и математический химии. – 2017. – С. 27.