

Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова
Національна академія наук України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БЛИЗНЮК ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 577.323

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕХАНІЗМИ АСОЦІАЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН
ТА ЇХ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ З ДНК**

Спеціальність 03.00.02 – «Біофізика»
(Фізико-математичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Ю.М. Близнюк

Науковий керівник Шестопалова Ганна Вікторівна, доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник

Харків 2017

АНОТАЦІЯ

Близнюк Ю. М. **Механізми асоціації біологічно активних речовин та їх комплексоутворення з ДНК.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (Фізико-математичні науки). – Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова Національної академії наук України; Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2017.

Дисертаційну роботу присвячено вирішенню однієї з актуальних проблем сучасної молекулярної біофізики – з'ясування ролі водневих зв'язків (Н-зв'язків) і молекул води в стабілізації самоасоціатів і гетероасоціатів ряду біологічно активних речовин (БАР) і при їх зв'язуванні з ДНК.

За допомогою методу ІЧ-спектроскопії було отримано та проаналізовано спектри поглинання плівок самоасоціату флавінмононуклеотиду (FMN), вирощених з нейтральних і слабокислих розчинів. Аналіз ІЧ-спектрів плівки FMN, отриманої зі слабокислого розчину ($\text{pH} \sim 6,0$), дозволив виявити високочастотне зміщення смуг поглинання коливань $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$ груп атомів. Для пояснення високочастотних зміщень карбонільних $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$ коливань було розглянуто динамічну (резонансну) взаємодію дипольних моментів переходів цих груп атомів у диполь-дипольному наближенні. Відповідність розрахункових зсувів частот карбонільних коливань до експериментальних значень спостерігалось для n -молекулярної структури самоасоціату FMN ($n \geq 3$). Стабільність таких самоасоціатів FMN визначається міжплощинними взаємодіями між кільцями ізоалоксазинового хромофору, які перекриваються. Дослідження сорбції води на плівках, вирощених зі слабокислих розчинів FMN ($\text{pH} \sim 6,0$), показали, що тільки на першому етапі зволоження вода практично не зв'язується з

гідратно-активними групами ізоалоксазинового кільця, а при збільшенні її активності (при зв'язуванні більше 6 молекул води на молекулу FMN, $N > 6$) гідратація істотно зростає. Вочевидь, молекули води також можуть впливати на стабільність n -молекулярних самоасоціатів FMN, що формуються в плівках, вирощених зі слабокислих розчинів. Також було досліджено ІЧ-спектроскопічний прояв протонування ізоалоксазинового кільця FMN. Детальний аналіз ІЧ-спектрів в області поглинання внутрішньокільцевих C–C і C–N коливань ізоалоксазинового кільця FMN у висушеній плівці (0% ОВ), вирощеній зі слабкислого розчину, показав, що протонування кільця відбувається по атомах азоту N_1 і N_5 . Квантово-хімічні розрахунки зарядів на атомах ізоалоксазинового кільця підтвердили цей висновок, оскільки на цих атомах знаходяться значні негативні заряди.

Методами ІЧ-спектроскопії та спектроскопії комбінаційного розсіювання (КР) світла було проведено дослідження нейтральних розчинів БАР: флавінмононуклеотиду (FMN), бромистого етидію (ЕВ), профлавіну (PRF), теофіліну (ТРН), кофеїну (CAF) та їх гетерокомплексів. Також виконано їх детальний аналіз за допомогою комп'ютерного моделювання.

Було проведено ІЧ-спектроскопічне дослідження нейтральних розчинів FMN, ТРН та їх комплексу в області карбонільних коливань ($1600-1750\text{ см}^{-1}$). Частоти смуг поглинання карбонільних груп FMN та ТРН зазнали високочастотних зміщень, а інтенсивність спектру поглинання гетерокомплексу значно зменшилася (інфрачервоний гіпохромізм). Такі зміни спектральних параметрів гетерокомплексу FMN-ТРН свідчать про те, що утворення стабільного асоціату може супроводжуватися резонансними взаємодіями моментів переходів карбонільних груп FMN і ТРН. Для підтвердження цього припущення і з'ясування механізму стабілізації гетероасоціату FMN-ТРН було проведено обчислення резонансних взаємодій коливань карбонільних груп FMN і ТРН. Цей розрахунок дозволив зробити висновок, що FMN і ТРН утворюють n -молекулярний агрегат ($n \geq 3$).

Було досліджено гетероасоціацію теофіліну та бромистого етидію. Аналіз коливальних спектрів нейтральних розчинів ТРН, ЕВ та їх комплексу показав низькочастотні зсуви карбонільних коливань ТРН в ІЧ-спектрі та високочастотні зсуви деформаційних коливань NH_2 -груп ЕВ у КР-спектрі. Це свідчить про формування Н-зв'язків між лігандами в гетерокомплексі. Однак, за літературними даними відстань між донорно-акцепторними групами ЕВ і ТРН занадто велика для того, щоб утворився Н-зв'язок. Цілком імовірно, що цю відстань міг перекрити ланцюжок з молекул води з Н-зв'язками типу $-C=O \cdots (H-O)_n \cdots (H-N-H)$. Це припущення може бути підтверджено або спростовано за допомогою результатів комп'ютерного моделювання системи «ТРН-ЕВ – вода».

Дослідження спектрів поглинання гетероасоціатів ТРН-PRF і CAF-ЕВ показали відсутність змін спектральних параметрів карбонільних коливань у сумішах. Це може бути ознакою того, що в цих умовах гетерокомплекси не сформувалися. Однак, згідно з літературними даними, ТРН і PRF, CAF і ЕВ утворюють гетероасоціати. Для з'ясування можливості утворення гетероасоціатів ТРН-PRF і CAF-ЕВ і механізмів стабілізації гетерокомплексів було проведено комп'ютерне моделювання цих систем у водному оточенні.

Згідно з даними моделювання методом Монте Карло (МС) міжмолекулярні Н-зв'язки не виявлено ні в одній зі структур гетерокомплексу FMN-ТРН. Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері (800 молекул води), а також миттєвих конфігурацій F-структур, дозволив встановити два водних містка навколо гетероасоціату FMN-ТРН. Однак, згідно з даними колиальної спектроскопії, більш вірогідною формою гетерокомплексу є *n*-молекулярний агрегат FMN-ТРН. Тому необхідно в подальшому виконати комп'ютерне моделювання *n*-молекулярного агрегату FMN-ТРН методом молекулярної динаміки.

Згідно з даними комп'ютерного моделювання в гетерокомплексі ТРН-ЕВ утворення міжмолекулярних Н-зв'язків між лігандами неможливе. Виконаний для гетерокомплексу ТРН-ЕВ аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері (800 молекул води) та F-структур дозволив визначити існування трьох водних містків, що сформувалися між донорно-акцепторними групами лігандів.

Міжмолекулярні Н-зв'язки не формуються ні в одній зі структур гетеродимерів ТРН-PRF і САФ-ЕВ. Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері та F-структур дозволив визначити два водних містки між мономерами в гетероасоціаті ТРН-PRF і три водних містки навколо гетеродимеру САФ-ЕВ.

Для з'ясування існування міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-ЕВ було отримано і проаналізовано ІЧ- і КР-спектри нейтральних розчинів FMN, ЕВ та їх суміші. Низькочастотне зміщення смуг поглинання $C=O$ груп FMN і високочастотне зміщення КР-смуг NH_2 -груп ЕВ однозначно свідчить про утворення міжмолекулярного Н-зв'язку в гетероасоціаті FMN-ЕВ.

Подібне дослідження було виконано для FMN, PRF та їх суміші. Як і у випадку системи FMN-ЕВ, для гетерокомплексу FMN-PRF спостерігався низькочастотний зсув смуг поглинання $C=O$ груп FMN і високочастотний зсув КР-смуг NH_2 -груп PRF. Такі спектральні зміни свідчать про формування міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-PRF.

Для інтерпретації експериментальних результатів коливальної спектроскопії та пояснення механізмів стабілізації гетероасоціатів FMN-ЕВ і FMN-PRF, а також побудови їх молекулярних моделей, було виконано комп'ютерне моделювання методом Монте Карло систем, що містять гетерокомплекси FMN-ЕВ, FMN-PRF і водні кластери. Згідно з результатами моделювання методом МС у гетеродимері FMN-ЕВ утворюються три

міжмолекулярні Н-зв'язки, тоді як у гетеродимері FMN-PRF утворюється один міжмолекулярний Н-зв'язок.

На підставі даних коливальної спектроскопії було оцінено внесок енергії Н-зв'язків у стабілізацію стопкових асоціатів. Так було знайдено, що енергія міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-EB становить $|\Delta H| = 8,4$ кДж/моль. Такі ж розрахунки для гетероасоціату FMN-PRF дозволили отримати ентальпію Н-зв'язку типу $C_4=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H (PRF)$, рівну $|\Delta H| = 7,3$ кДж/моль, а для Н-зв'язку типу $C_2=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H (PRF)$ – $|\Delta H| = 2,5$ кДж/моль. Міжмолекулярні водневі зв'язки в гетерокомплексах FMN-EB і FMN-PRF дають ~ 25-30% -ий внесок у загальну ентальпію стабілізації цих комплексів, а інша ентальпія здебільшого є внеском міжплощинних взаємодій між хромофорами молекул і гідратною водою навколо комплексів.

Далі на прикладі біологічно активної речовини бромистого етидію було показано роль Н-зв'язку в стабілізації комплексу EB-ДНК. Було проведено КР-спектроскопічне дослідження EB та його сумішей з ДНК. Аналіз КР-спектрів дозволив встановити, що при високих значеннях P/D , коли концентрація бромистого етидію в розчині мала, стабілізація комплексу EB-ДНК здійснюється не тільки за рахунок міжплощинних взаємодій інтеркальованого хромофору, але й шляхом утворення міжмолекулярних Н-зв'язків між аміногрупами EB та атомами O_4' та O_5' дезоксирибози. У цьому випадку ДНК зберігається в В-формі. При низьких значеннях P/D формування комплексу EB-ДНК супроводжується структурним переходом ДНК з В- до А-подібної конформації, а аміногрупи EB взаємодіють з цукрофосфатним остовом полінуклеотидної матриці, стабілізуючи зовнішню «посадку» хромофору на поверхні молекули ДНК.

Ключові слова: біологічно активна речовина, водневий зв'язок, ІЧ-спектроскопія, КР-спектроскопія, самоасоціат, гетероасоціат, міжплощинні взаємодії, стабільність само- і гетероасоціатів, комп'ютерне моделювання.

ABSTRACT

Blyzniuk Iu. M. **Mechanisms of the association of biologically active compounds and their complexation with DNA.** – Qualification scientific paper, manuscript.

Dissertation for a Candidate of Science Degree in Physics and Mathematics (PhD) by speciality – biophysics (Physics and mathematics). – O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine; V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2017.

The dissertation is devoted to the solution of one of the main problems in modern molecular biophysics – clarifying the role of hydrogen bonds (H-bonds) and water molecules in the stabilization of self-associates and hetero-associates of a number of biologically active compounds (BAC) and their binding to DNA.

Using the IR spectroscopy method the absorption spectra of flavin-mononucleotide (FMN) self-associate films grown from neutral and weakly acidic solutions were obtained and analyzed. Analysis of the IR spectra of the FMN film obtained from a weakly acid solution (pH ~ 6.0) has allowed to determine a high-frequency shift of the absorption bands of the C₄=O and C₂=O atom groups. To explain the high-frequency shifts of C₄=O and C₂=O carbonyl vibrations the dynamic (resonant) interaction of the dipole moments of these atomic groups transitions in the dipole-dipole approximation was considered. The correspondence of the calculated shifts of the frequencies of carbonyl vibrations to the experimental values was observed for the *n*-molecular structure of the self-associate FMN (*n* ≥ 3). The stability of such FMN self-associates is determined by interplanar interactions between overlapping isoalloxazine chromophore rings. The studies of water sorption by films grown from weakly acidic solutions (pH ~ 6.0) showed that only at the first stage of wetting the water practically does not bind to the hydrated-active groups of the isoalloxazine ring, but with an increase of its

activity (when more than 6 water molecules are bound to the FMN molecule, $N > 6$), hydration significantly increases. Obviously, water molecules can also affect the stability of FMN n -molecular self-associates, which are formed in films grown from weakly acidic solutions. IR spectroscopic manifestation of the FMN isoalloxazine ring protonation was also studied. IR spectra were also analyzed in the absorption region of intraring C–C and C–N vibrations of the FMN isoalloxazine ring of a dry film (0% RH) grown from a weakly acidic solution. This analysis showed that the protonation of the ring occurs by the nitrogen atoms N_1 and N_5 . Quantum-chemical calculations of isoalloxazine ring atom charges confirmed this conclusion since there are significant negative charges on N_1 and N_5 atoms.

Neutral solutions of BAC: flavin mononucleotide (FMN), ethidium bromide (EB), proflavine (PRF), theophylline (TPH), caffeine (CAF) and their hetero-complexes were studied by IR spectroscopy and Raman spectroscopy. Also, their detailed analysis was performed using computer simulation.

IR spectroscopic study of neutral solutions of FMN, TPH and their complex in the region of carbonyl vibrations $1600\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ was carried out. The frequencies of the absorption bands of the FMN and TPH carbonyl groups underwent high-frequency shifts, and the intensity of the absorption spectrum of the hetero-complex significantly decreased (infrared hypochromism). Such changes of the spectral parameters of the FMN-TPH hetero-complex indicate that the formation of a stable associate may be accompanied by resonant interactions of the transition moments of the FMN and TPH carbonyl groups. To confirm this hypothesis and determine the stabilization mechanism of the hetero-associate FMN-TPH, the resonance interactions of the vibrations of the FMN and TPH carbonyl groups were calculated. This calculation allowed us to conclude that FMN and TPH form an n -molecular aggregate ($n \geq 3$).

The hetero-association of theophylline and ethidium bromide was investigated. Analysis of the vibrational spectra of neutral solutions of TPH, EB

and their complex showed the low-frequency shifts of the TPH carbonyl vibrations in the IR spectrum and the high-frequency shifts of NH_2 deformation vibrations of the EB in the Raman spectrum. It indicates the formation of H-bonds between the ligands in the hetero-complex. However, the distance between the donor-acceptor groups of EB and TPH is too large to form an H-bond according to the literature data. It is quite likely that a chain of water molecules with H-bonds of the type $-C=O \cdots (H-\underset{|}{O})_n \cdots (H-\underset{|}{N}-H)$ could cover this distance. This hypothesis can be confirmed or refuted by means of computer simulation results of the “TPH-EB – water” system.

Studies of the absorption spectra of the hetero-associates TPH-PRF and CAF-EB showed no changes in the spectral parameters of the carbonyl vibrations in the mixtures. It may indicate that hetero-complexes did not form under these conditions. However, TPH and PRF, CAF and EB form hetero-associates according to the literature data. Computer simulation of hetero-associates TPH-PRF and CAF-EB was carried out to determine the possibility of hetero-complex formation and mechanisms of stabilization of these systems in the water environment.

According to Monte Carlo simulation (MC), intermolecular H-bonds are not detected in any structure of the FMN-TPH hetero-complex. The analysis of instantaneous configurations in water cluster (800 water molecules) and instantaneous configurations of F-structures allows us to determine two water bridges around TPH-FMN hetero-dimer. However, according to vibrational spectroscopy, the most probable form of the hetero-complex is the n -molecular aggregate FMN-TPH. It is necessary to perform computer simulation of the FMN-TPH n -molecular aggregate by the molecular dynamics method in the future.

According to computer simulation data in the TPH-EB hetero-complex, the formation of intermolecular H-bonds between ligands is impossible. The performed analysis of instant configurations for the TPH-EB hetero-complex in

water cluster (800 water molecules) and of F-structures allowed us to determine the existence of three water bridges formed between donor-acceptor groups of ligands.

Intermolecular H-bonds are not formed in any of the structures of the heterodimers TPH-PRF and CAF-EB. The analysis of instant configurations in water cluster and of F-structures allowed us to determine two water bridges between the monomers in the TPH-PRF hetero-associate and three water bridges around the CAF-EB hetero-dimer.

IR and Raman spectra of neutral FMN, EB solutions, and their mixtures were obtained and analyzed to determine the existence of an intermolecular H-bond in the FMN-EB hetero-complex. The low-frequency shift of the absorption bands of the C=O FMN groups and the high-frequency shift of the Raman bands of the NH₂-groups EB unambiguously indicate the formation of an intermolecular H-bond in the FMN-EB hetero-associate.

A similar study was performed for FMN, PRF and their mixtures. Similar to the case of the FMN-EB system for FMN-PRF hetero-complex a low-frequency shift of the absorption bands of the FMN C=O groups and a high-frequency shift of the Raman bands of PRF NH₂-groups were observed. Such spectral changes indicate the formation of an intermolecular H-bond in the FMN-PRF hetero-complex.

Computer modeling using the Monte Carlo method of systems containing hetero-complexes FMN-EB, FMN-PRF and water clusters was performed to interpret the experimental results of vibrational spectroscopy and explain mechanisms of stabilization of hetero-associates FMN-EB and FMN-PRF, as well as to construct their molecular models.

According to the results of the MC simulation, three intermolecular H-bonds are formed in FMN-EB hetero-dimer, whereas one intermolecular H-bond is formed in the FMN-PRF hetero-associate.

The contribution of the H-bond energy to the stabilization of the stack associates was estimated based on the data of vibrational spectroscopy. It was found that the energy of the intermolecular H-bond in the FMN-EB hetero-complex is $|\Delta H| = 8.4$ kJ/mol. The same calculations for the hetero-associate FMN-PRF allowed us to obtain the enthalpy of the H-bond of the type $C_4=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H$ (PRF) equal to $|\Delta H| = 7.3$ kJ/mol, and for the H-bond of the type $C_2=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H$ (PRF) – equal to $|\Delta H| = 2.5$ kJ/mol. Intermolecular hydrogen bonds in the heterocomplexes FMN-EB and FMN-PRF give a 25-30% contribution to the overall enthalpy of stabilization of these complexes, and the remaining enthalpy is mainly a contribution of interplanar interactions between the chromophores of molecules and hydrated water around the complexes.

Using the example of the biologically active compound of ethidium bromide was demonstrated the role of the H-bond in the stabilization of the EB-DNA complex. Raman spectroscopic study of EB and its mixtures with DNA was carried out. The analysis of Raman spectra allowed to determine that at high P/D values, when the concentration of ethidium bromide in the solution is low, stabilization of the EB-DNA complex occurs not only due to interplanar interactions of the intercalated chromophore, but also by formation of intermolecular H-bonds between the amino groups of EB and O_4' and O_5' deoxyribose. In this case the DNA stays in the B-form. At low P/D values, the formation of the EB-DNA complex is accompanied by a structural transition of DNA from B- to the A-like conformation, and the amino groups of EB interact with the sugar-phosphate backbone of the polynucleotide matrix, stabilizing the external "landing" of the chromophore on the surface of the DNA molecule.

Keywords: biologically active compound, hydrogen bond, IR spectroscopy, Raman spectroscopy, self-associate, hetero-associate, interplanar interactions, stability of self- and hetero-associates, computer modeling.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Близнюк Ю. Н.,** Больбух Т. В., Круглова Е. Б., Семенов М. А., Малеев В. Я. Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК методом спектроскопии комбинационного рассеяния света // Биополимеры и клетка. 2009. № 25(2). С. 126–132.
2. **Близнюк Ю. Н.,** Семёнов М. А., Больбух Т. В., Шестопалова А. В., Малеев В. Я. Проявление межмолекулярных водородных связей в гетерокомплексах биологически активных веществ по данным колебательной спектроскопии // Біофізичний вісник. 2011. Вип. 27(2). С. 5–16.
3. **Близнюк Ю. Н.,** Глибицкий Д. М., Семёнов М. А., Шестопалова А. В., Малеев В. Я. Самоассоциация и гидратация флавин-моноклеотида в растворах и плёнках // Біофізичний вісник. 2014. Вип. 31(1). С. 5–22.
4. **Близнюк Ю. Н.,** Песина Д. А., Глибицкий Д. М., Семёнов М. А., Шестопалова А. В. ИК спектроскопическое и квантово-химическое проявление протонирования изоаллоксазинового кольца флавин-моноклеотида // Біофізичний вісник. 2015. Вип. 34(2). С. 16–23.
5. Semenov M.A., **Blyzniuk Iu. N.,** Bolbukh T. V., Shestopalova A. V., Evstigneev M. P., Maleev V. Ya. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic molecules probed by the methods of vibrational spectroscopy // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2012. Vol. 95. P. 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.05.003>
6. **Blyzniuk J.N.,** Semenov M. A., Shestopalova A. V. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic ligands: Monte Carlo simulations results // Structural Chemistry. 2016. Vol. 27(1). P. 77–89. DOI 10.1007/s11224-015-0696-3

7. Будько Л. В., **Близнюк Ю. Н.** Применение Раман спектроскопии для исследования комплексообразования этидиума бромида с ДНК // Радиофизика и СВЧ электроника : тезисы докл. V Харьковская конференция молодых ученых, 14–16 декаб. 2005 г. Харьков, 2005. С. 47.
8. **Близнюк Ю. Н.**, Круглова Е. Б. Раман исследование В→А структурного перехода ДНК в присутствии этидия бромида // Радиофизика и Электроника : тезисы докл. VI Харьковская конференция молодых ученых, 13–14 декаб. 2006 г. Харьков, 2006. С. 33–34.
9. **Близнюк Ю. Н.**, Больбух Т. В. Структурные изменения ДНК при взаимодействии с ЭБ по данным Раман спектроскопии // УБФТ-2006 : тези доп. IV З'їзд Українського біофізичного товариства, 19–21 груд. 2006 р. Донецьк, 2006. С. 274-275.
10. **Близнюк Ю. Н.**, Семенов М. А., Шестопалова А. В. Исследование гетероассоциации флавин монопнуклеотида, бромистого этидия и теофиллина в водных растворах методами ИК и Раман спектроскопии // УБФТ-2011 : тези доп. V З'їзд Українського біофізичного товариства, 22–25 черв. 2011 р. Луцьк, 2011. С. 24–25.
11. **Blyzniuk Iu. N.** Study of heteroassociation of biologically active compounds by IR and Raman spectroscopy [Электронный ресурс] // Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics : abstr. 11th Kharkiv Young Scientists Conf., 29 Nov.–1 Dec. 2011. Kharkiv, 2011.
12. **Blyzniuk Iu. N.** Formation of intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active compounds probed by vibrational spectroscopy // Modern Problems of Theoretical Physics : abstr. III Young Scientist Conference, 21–23 Dec. 2011. Kyiv, 2011. P. 93.
13. **Близнюк Ю. Н.** Образование межмолекулярных водородных связей в гетероассоциатах биологически активных веществ по данным колебательной спектроскопии // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2012 : тезисы докл. VIII Международная

науочно-технічна конференція, 23–27 апр. 2012 г. Севастополь, 2012. С. 128–129.

14. **Blyzniuk Iu. N.**, Semenov M. A., Shestopalova A. V. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic ligands: Monte Carlo simulations // Methods and Applications of Computational Chemistry : abstr. 5th International Symposium, 1–5 July 2013. Kharkiv, 2013. P. 107.
15. **Blyzniuk Iu. N.** pH-dependent self-association of flavin-monomonucleotide. [Електронний ресурс] // Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics : abstr. 13th Kharkiv Young Scientists Conference, 2–6 Dec. 2013. Kharkiv, 2013.
16. **Blyzniuk Iu. N.**, Glibitskiy D. M. Self-association and hydration of flavin-monomonucleotide in films // Problems of Theoretical Physics : abstr. V Young scientists conference, 24–27 December 2013. Kyiv, 2013. P. 72.
17. **Близнюк Ю. М.**, Песіна Д. О., Глибицький Д. М., Семенов М. О., Шестопалова Г. В. Самоасоціація ізоаллоксазинових кілець флавін-мономонуклеотида у вологих плівках, вирощених з нейтральних і слабокислих розчинів // УБФТ-2015 : тези доп. VI З'їзд Українського біофізичного товариства, 28–30 трав. 2015 р. Луцьк-Світязь, 2015. С. 40.

Особистий внесок здобувача у роботах № 1, 2, 3, 4, 5 – пошук і критичний аналіз літературних даних, отримання коливальних спектрів, аналіз та інтерпретація отриманих експериментальних даних, написання статей; у роботах № 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 – аналіз літературних даних, експериментальне отримання коливальних спектрів, аналіз та інтерпретація отриманих даних, написання тез; у роботах № 6, 14 – аналіз і обговорення отриманих результатів, написання статті і тез.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 АСОЦІАЦІЯ АРОМАТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ	27
1.1 Ароматичні біологічно активні речовини	28
1.1.1 Загальні відомості про біологічно активні речовини.....	28
1.1.2 Мутагени профлавін і бромистий етидій	30
1.1.3 Метилксантини кофеїн і теофілін	32
1.1.4 Флавінмононуклеотид	33
1.2 Самоасоціація і гетероасоціація біологічно активних речовин	35
1.2.1 Самоасоціація ароматичних лігандів.....	36
1.2.2 Гетероасоціація ароматичних лігандів	40
1.3 Методи дослідження само- і гетероасоціації БАР. Роль води та Н-зв'язків у стабілізації асоціатів БАР і при комплексотворенні з ДНК.....	42
1.3.1 Спектроскопічні методи дослідження само- і гетероасоціації ароматичних БАР.....	42
1.3.2 Визначення міжмолекулярних Н-зв'язків у асоціатах ароматичних БАР	45
1.4 Інтерцепторні властивості та біологічно важливі комбінації ароматичних БАР	48
1.5 Особливості само- і гетероасоціації флавінмононуклеотиду.....	51
Висновки до розділу 1	55
РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ТА РОЗРАХУНКОВІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ	56
2.1 Коливальна спектроскопія: ІЧ- і КР-спектри. Прояв Н-зв'язків	56
2.1.1 Спектральні параметри ІЧ-смуг поглинання	56
2.1.2 Техніка отримання ІЧ-спектрів	62

2.1.3 Спектроскопія комбінаційного розсіювання	64
2.1.4 Техніка отримання спектрів КР.....	67
2.2 Метод п'єзогравіметрії для отримання ізотерм гідратації.....	68
2.3 Моделювання методом Монте Карло та оптимізація геометрії і розрахунок атомних зарядів БАР	69
2.4 Приготування зразків для дослідження.....	73
Висновки до розділу 2	75
РОЗДІЛ 3 САМОАСОЦІАЦІЯ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ В	
РОЗЧИНАХ І ПЛІВКАХ	76
3.1 ІЧ-спектроскопічний прояв самоасоціації FMN у плівках.....	77
3.2 Резонансні взаємодії карбонільних коливань у стопках FMN. Побудова <i>n</i> -молекулярної структури самоасоціату FMN.....	81
3.3 Протонування FMN за даними ІЧ-спектроскопії та квантово- хімічних розрахунків зарядів на атомах ізоалоксазинового кільця і порядку їх зв'язків	86
3.3.1 ІЧ-спектроскопічний прояв протонування ізоалоксазинового кільця FMN.....	86
3.3.2 Квантово-хімічний розрахунок зарядів на атомах і порядку зв'язків ізоалоксазинового кільця FMN	89
3.4 Роль води в стабілізації самоасоціатів FMN	92
Висновки до розділу 3	96
РОЗДІЛ 4 МІЖПЛОЩИННІ ВЗАЄМОДІЇ ПРИ ФОРМУВАННІ	
ГЕТЕРОКОМПЛЕКСІВ FMN-ТРН, ТРН-ЕВ, ТРН-PRF ТА ЕВ-CAF	98
4.1 Інфрачервоні спектри поглинання FMN, ТРН та їх гетерокомплексу.....	98
4.2 Резонансні взаємодії карбонільних коливань у гетерокомплексі FMN-ТРН.....	101
4.2.1 Спектральні параметри карбонільних коливань FMN і ТРН у розчинах D ₂ O	101

4.2.2 Розрахунок резонансних взаємодій карбонільних коливань у комплексі FMN-TRH і побудова моделі гетероасоціату.....	103
4.3 Гетероасоціація TRH-EB	107
4.4 Гетероасоціація TRH-PRF і CAF-EB	109
4.5 Комп'ютерне моделювання гетероасоціатів.....	111
4.5.1 Гетеродимер FMN-TRH.....	115
4.5.2 Гетеродимер TRH-EB	118
4.5.3 Гетеродимер TRH-PRF	120
4.5.4 Гетеродимер CAF-EB	122
Висновки до розділу 4	125
РОЗДІЛ 5 ПРОЯВ ВОДНЕВОГО ЗВ'ЯЗКУ В КОЛИВАЛЬНИХ СПЕКТРАХ ГЕТЕРОАСОЦІАТИВ І ПРИ ЗВ'ЯЗУВАННІ БАР З ДНК.....	126
5.1 Гетероасоціація флавінмононуклеотиду і бромистого етидію	126
5.2 Гетероасоціація флавінмононуклеотиду і профлавіну	129
5.3 Комп'ютерне моделювання методом Монте-Карло гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF у водних кластерах.....	133
5.3.1 Гетеродимер FMN-EB	133
5.3.2 Гетеродимер FMN-PRF	135
5.4 Внесок енергії Н-зв'язків у загальну енергію стабілізації комплексів FMN з EB і PRF	137
5.5 Вплив водневого зв'язку на комплексоутворення EB з ДНК.....	139
Висновки до розділу 5	146
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	148
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	150
ДОДАТОК А Список публікацій здобувача за темою дисертації	174
ДОДАТОК В Нумерація атомів і заряди на атомах відповідних лігандів, що використовувались в моделюванні методом Монте Карло	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР	біологічно активна речовина
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЯМР-спектроскопія	ядерна магнітно-резонансна спектроскопія
ІЧ-спектроскопія	інфрачервона спектроскопія
КР-спектроскопія	спектроскопія комбінаційного розсіювання
ЛП	лікарський препарат
УФ-спектроскопія	ультрафіолетова спектроскопія
ВВ	відносна вологість
АО	акридиновий помаранчевий (acridine orange)
PRF	профлавін (proflavine)
ЕВ	бромистий етидій (ethidium bromide)
PI	пропідію йодид (propidium iodide)
DAU	дауноміцин (daunomycin)
DOX	доксорубіцин (doxorubicin)
NOG	ногаламіцин (nogalamycin)
NOV	новантрон (novatron)
NOR	норфлоксацин (norfloxacin)
RBF	рибофлавін (riboflavin)
NMD	нікотинамід (nicotinamide)
FMN	флавінмононуклеотид (flavin mononucleotide)
CAF	кофеїн (caffeine)
TPH	теофілін (theophylline)
THB	теобромін (theobromine)
FAD	флавінаденіндинуклеотид (flavin adenine dinucleotide)
Н-зв'язок	водневий зв'язок (hydrogen bond)
ΔH	ентальпія асоціації

ΔG	вільна енергія асоціації
ΔS	ентропія асоціації
K_C	константа асоціації
DFT	теорія функціоналу густини
ν	валентне коливання
δ	деформаційне коливання
метод MC	метод Монте Карло (Monte Carlo)
F-структура	«заморожена – frozen» структура
D ₂ O розчин	розчин важкої води
C=O	карбонільне коливання
P/D	співвідношення мольних концентрацій ДНК та ліганду
E_{total}	повна потенційна енергія систем
E_{MEAN}	середнє значення загальної потенційної енергії систем
$E_{\text{WW-MEAN}}$	середнє значення потенційної енергії вода-вода (на одну молекулу води)
$E_{\text{W-BAC-MEAN}}$	середнє значення потенційної енергії вода-Ліганд
$E_{\text{L1-L2}}$	середнє значення потенційної енергії Ліганд1-Ліганд2 у гетероасоціати
$E_{\text{el-st}}$	електростатичні взаємодії
E_{vdw}	ван-дер-ваальсові взаємодії
SASA	площі поверхні, яка доступна розчиннику (Solvent Accessible Surface Area)

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Міжмолекулярні взаємодії біологічно важливих молекул є ключовим моментом протікання більшості клітинних процесів і складають один з найважливіших об'єктів дослідження молекулярної біофізики. Не менш важливими з точки зору функціонування живої клітини є нековалентні взаємодії біополімерів (білків та нуклеїнових кислот) з біологічно активними речовинами (БАР, лігандами). Зокрема, молекулами-мішенями для дії багатьох БАР є молекули нуклеїнових кислот (НК). Разом з тим нековалентні взаємодії – це основний тип взаємодій, які визначають механізми утворення стабільних комплексів ароматичних БАР, молекули яких здатні формувати у водних розчинах вертикальні стекінг-агрегати.

Результати досліджень механізмів асоціації ароматичних молекул представляють значний інтерес з огляду на роль міжмолекулярних взаємодій у формуванні супрамолекулярних структур, які знаходять застосування в сучасних нанотехнологіях. Утворення асоціатів ароматичних БАР важливе з огляду молекулярної фармакології, тому що величезний клас ароматичних сполук є основою для медичних препаратів, насамперед, протипухлинних антибіотиків. Оскільки їх клінічне застосування супроводжується небажаними побічними ефектами, зокрема, високою токсичністю, одним з поширених способів зниження негативної дії та посилення медико-біологічного ефекту є спільне використання БАР, яке становить основу сучасної стратегії комбінованої хіміотерапії. Однією з причин зміни біологічної активності визначених БАР в присутності інших є гетероасоціація або інтерцепторний механізм. Тому коректний аналіз впливу одного ліганду на зв'язування іншого з біомолекулярною матрицею-мішенню треба виконувати з урахуванням таких факторів як самоасоціація і/або гетероасоціація молекул ароматичних лігандів в розчині. Тобто для розуміння молекулярних механізмів клінічної ефективності

комбінованої хіміотерапії необхідно всебічне вивчення як комплексів біомолекула-ліганд, зокрема, ДНК-ліганд, так і відносно простих систем, що містять асоціати ароматичних молекул.

Останнім часом було досягнуто значного прогресу в розумінні структурних та динамічних властивостей комплексів ліганд-ДНК. Ця інформація забезпечила вагомий внесок в створення більш ефективних хіміотерапевтичних препаратів другого і третього покоління для успішного лікування багатьох видів онкологічних захворювань. Однак, питання про зв'язок фізико-хімічних властивостей комплексів ліганд-ДНК з їх медико-біологічною ефективністю залишається практично нез'ясованим.

Дотепер відсутня детальна інформація про можливість утворення водневих зв'язків і впливу розчинника, а також про оцінку вкладу різних видів взаємодій в утворення стійких агрегатів ароматичних сполук. Відомо, що саме водневі зв'язки відіграють суттєву роль у формуванні стабільних просторових структур біополімерів та їх комплексів з лігандами, а також у додатковій стабілізації вертикальних стекінг-асоціатів ароматичних молекул у водних розчинах. Більшість експериментальних методів надають лише непряму інформацію щодо можливості формування та енергії водневих зв'язків. Поєднання результатів експериментальних методів з даними комп'ютерного моделювання є перспективними для встановлення і детального аналізу різних типів взаємодій у процесах асоціації ароматичних БАР та їх комплексоутворенні з ДНК. Отримана завдяки таким дослідженням інформація дозволить будувати молекулярні моделі і прогнозувати стан ароматичних сполук та їх комплексів з молекулами-мішенями в умовах, близьких до фізіологічних. Цей етап є важливим для успішного синтезу нових БАР з визначеною направленістю їх впливу на стан та функціонування біологічних молекул.

Мета і задачі дослідження. Встановити структурні особливості само- і гетероасоціатів біологічно активних речовин та їх комплексів з ДНК, а також

з'ясувати роль водневих зв'язків і молекул води в стабілізації комплексів, які необхідні для визначення інтерцепторного механізму дії біологічно активних речовин на ДНК.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити *такі задачі*:

1. За допомогою метода ІЧ-спектроскопії провести дослідження самоасоціації флавінмононуклеотиду в плівках, вирощених з нейтральних і слабо кислих розчинів, рН яких впливає на заряди атомів хромофору (ізоалоксазинового кільця) і фосфатних груп.
2. Для встановлення центрів зв'язування протонів провести порівняльний аналіз у нейтральній і протонованій формах флавінмононуклеотиду полос поглинання, пов'язаних з внутрішньокільцевими коливаннями атомів С–С, С–N₁ і С–N₅ ізоалоксазинового кільця.
3. Для виявлення водневих зв'язків (Н-зв'язків) та їх вкладу до загальної енергії стабілізації гетерокомплексів отримати і проаналізувати коливальні спектри функціональних груп атомів (C=O і NH₂) досліджуваних БАР: флавінмононуклеотиду (FMN), бромистого етидію (EB), профлавіну (PRF), кофеїну (CAF) і теофіліну (ТРН) та їх сумішей в умовах, наближених до фізіологічних.
4. За допомогою моделювання методом Монте Карло визначити міжмолекулярні Н-зв'язки в системах, які містять гетеродимери ароматичних біологічно активних лігандів FMN-EB, FMN-PRF, ТРН-EB, EB-CAF, FMN-ТРН, PRF-ТРН з явним урахуванням молекул води.
5. Методом спектроскопії комбінаційного розсіювання (КР) дослідити зв'язування EB з тимусною ДНК при низьких і високих значеннях співвідношень концентрацій ліганд/ДНК; визначити вплив Н-зв'язків на молекулярні механізми зв'язування EB з ДНК при утворенні комплексів за типом інтеркаляції та зовнішнього зв'язування, а також виявити структурний стан ДНК при щільному її заповненні лігандом.

Об'єкт дослідження. Процеси само- і гетероасоціації ароматичних біологічно активних речовин та їх комплексоутворення з ДНК.

Предмет дослідження. Структурні особливості асоціатів біологічно активних речовин і комплексів ДНК-БАР та внесок різних видів міжмолекулярних взаємодій і молекул води в їх стабілізацію.

Методи дослідження. Інфрачервона спектроскопія та спектроскопія комбінаційного розсіювання світла, які дозволили встановити атомні групи, що беруть участь у взаємодії, утворення водневих зв'язків, резонансні взаємодії карбонільних груп. Метод п'єзограметрії для отримання ізотерм гідратації. Квантово-хімічний розрахунок та моделювання методом Монте Карло, за допомогою яких було побудовано моделі асоціатів, встановлено вклади різних видів міжмолекулярних взаємодій та молекул води в стабілізацію асоціатів та обчислено енергетичні характеристики комплексів, що утворюються.

Наукова новизна одержаних результатів.

1. За допомогою методів коливальної спектроскопії вперше було отримано прямий доказ утворення Н-зв'язків між донорними (NH_2) і акцепторними (C=O) групами при формуванні гетерокомплексів ароматичних біологічно активних речовин (FMN-EB, FMN-PRF, TRH-EB). Проведено оцінку ентальпії утворення міжмолекулярних Н-зв'язків у гетероасоціатах FMN-EB і FMN-PRF.
2. Вперше на підставі ІЧ-спектроскопічних даних виявлено високочастотне зміщення смуг поглинання коливань $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$ груп атомів для плівки FMN, отриманої зі слабнокислого розчину ($\text{pH} \sim 6,0$). За допомогою розрахунків резонансної взаємодії карбонільних коливань $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$ груп у диполь-дипольному наближенні була побудована модель *n*-молекулярної самоасоціації флавінмононуклеотиду.
3. Аналіз ІЧ-спектрів сухих плівок FMN, вирощених з розчинів з $\text{pH} \sim 6,0$, показав, що протонування ізоалоксазинового кільця відбувається по атомах азоту N_1 і N_5 . Квантово-хімічні розрахунки зарядів на атомах

ізоалоксазинового кільця підтвердили цей висновок, оскільки на атомах N_1 і N_5 знаходяться значні негативні заряди.

4. На підставі даних ІЧ-спектроскопії вперше встановлено, що у гетероасоціатах FMN-TPH, TPH-PRF і CAF-EB водневі зв'язки не утворюються, а стабілізація цих комплексів визначається міжплощинними взаємодіями. Виявлені високочастотні зсуви карбонільних коливань у гетерокомплексі FMN-TPH було пояснено резонансними взаємодіями карбонільних груп, що дозволило побудувати *n*-молекулярну структуру гетероасоціату.
5. З аналізу даних комп'ютерного моделювання методом Монте Карло встановлено, що у гетерокомплексах FMN-EB і FMN-PRF утворюються Н-зв'язки, які додатково стабілізують їх структури. Для гетероасоціатів FMN-TPH, TPH-EB, TPH-PRF і CAF-EB встановлений факт додаткової стабілізації цих гетерокомплексів у результаті утворення водних містків між донорно-акцепторними групами лігандів. Таким чином, на підставі експериментальних даних та результатів комп'ютерного моделювання доведено, що FMN, CAF і TPH є інтерцепторами, які здатні зменшувати концентрацію мутагенів EB та PRF.
6. Вперше методом спектроскопії КР показано, що комплекси EB-ДНК (за типом інтеркаляції та зовнішнього зв'язування) додатково стабілізуються водневими зв'язками, які утворюються між NH_2 -групами бромистого етидію та донорно-акцепторними групами полінуклеотидної матриці.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз наукової літератури, отримано результати експериментальних досліджень і проведено їх обробку. Автором особисто виконаний первинний аналіз результатів і сформульовані попередні висновки. Разом з науковим керівником, д.ф.-м.н. Шестопаловой Г.В., були визначені мета, задачі роботи і способи їх вирішення, здійснено інтерпретацію отриманих результатів і зроблені остаточні висновки. В

опублікованих спільно зі співавторами працях особистий внесок здобувача полягає: [1,2,3,4,5] – пошук і критичний аналіз літературних даних, отримання коливальних спектрів, аналіз та інтерпретація отриманих експериментальних даних, написання статей; [7,8,9,10,11,12,13,15,16,17] – аналіз літературних даних, експериментальне отримання коливальних спектрів, аналіз та інтерпретація отриманих даних, написання тез; у роботах [6,14] – аналіз і обговорення отриманих результатів, написання статті і тез.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на міжнародних та вітчизняних конференціях: V Харьковская конференция молодых ученых «Радиофизика и СВЧ электроника». – Харьков (Украина), 2005; VI Харьковская конференция молодых ученых «Радиофизика и Электроника». – Харьков (Украина), 2006; IV З'їзд Українського біофізичного товариства. – Донецьк (Україна), 2006; V і VI З'їзд Українського біофізичного товариства. – Луцьк (Україна), 2011, 2015.; 11th і 13th Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics. – Kharkiv (Ukraine), 2011, 2013; III і V Young Scientist Conference «Modern Problems of Theoretical Physics». – Kyiv (Ukraine), 2011, 2013; VIII Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2012». – Севастополь (Украина), 2012; 5th International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry». – Kharkiv (Ukraine), 2013.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проводились згідно з планом науково-дослідних робіт відділу біофізики Інституту радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України в рамках фундаментальних держбюджетних НДР: «Молекулярні моделі комплексів біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами за умовами мультимодального та конкурентного зв'язування» (шифр «Модель», номер держреєстрації 0107U001079); «Механізми впливу біологічно-активних речовин і електромагнітних полів

гіга- та терагерцевого діапазонів на біоб'єкти різного рівню організації (біополімери, біомембрани, клітини)» (шифр «Модель-2», номер держреєстрації 0111U010475).

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати та висновки роботи дають внесок у розуміння міжмолекулярних механізмів взаємодії ароматичних біологічно активних речовин. Запропоновані методики визначення вкладу водневих зв'язків і міжплощинних взаємодій у стабільність само- і гетероасоціатів у подальшому можуть бути використані при прогнозуванні терапевтичної ефективності комбінованої хіміотерапії.

В цілому результати досліджень можуть застосовуватися в галузі молекулярної біофізики (дослідження процесів утворення комплексів), молекулярної біології (модуляція біологічного ефекту різноманітними комбінаціями БАР), біотехнології та фармакології (розробка нових ефективних препаратів для лікування та профілактики онкологічних захворювань).

Публікації. Основні результати дисертації опубліковано в 17 наукових працях; з них: 6 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах та 11 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 8,3 а.а. (182 стор.), з них основного тексту 6,1 а.а. (137 стор.). Робота ілюстрована 14 таблицями та 45 рисунками. Список використаних джерел містить 255 найменувань та складає 24 сторінки.

РОЗДІЛ 1

АСОЦІАЦІЯ АРОМАТИЧНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

Біологічно активні речовини (БАР) включають у себе величезний клас ароматичних сполук (лігандів), які є основою для медичних препаратів. Медико-біологічна дія деяких з них обумовлена здатністю утворювати нековалентні комплекси з молекулами-мішенями, зокрема, з ДНК [1]. На даний час одним з перспективних напрямків розвитку медикаментозного лікування різних захворювань є комбіноване використання різних лікарських препаратів, що послаблюють або підсилюють ефект один одного. Для розуміння молекулярних механізмів терапевтичної ефективності комбінованої хіміотерапії необхідно всебічне вивчення як комплексів ДНК-ліганд, так і відносно простих систем, що містять асоціати ароматичних молекул. Утворення таких асоціатів може істотно змінювати медико-біологічну ефективність лігандів, що зв'язуються з ДНК. При розгляді комплексоутворення (асоціації) ароматичних молекул лігандів, що зв'язуються з ДНК, розрізняють процеси само- і гетероасоціації. Взаємодію однакових молекул *Ліганд1-Ліганд1* називають самоасоціацією, а утворення комплексів різних молекул *Ліганд1-Ліганд2*, відповідно, гетероасоціацією (рис. 1.1) [2, 3].



Рисунок 1.1 Самоасоціація (а) та гетероасоціація (б) ароматичних молекул

Крім застосування в якості фармацевтичних препаратів, ароматичні сполуки протягом більш ніж півстоліття використовуються як модельні системи для дослідження механізмів фізичних взаємодій, які відіграють істотну роль у стабілізації нуклеїнових кислот, білків та інших молекулярно-біологічних систем [4, 5]. Крім того, на даний час результати досліджень механізмів агрегації ароматичних молекул становлять великий інтерес завдяки ролі міжмолекулярних взаємодій у формуванні супрамолекулярних структур, які знаходять застосування в сучасних нанотехнологіях [6, 7].

Останнім часом було досягнуто значного прогресу в розумінні структурних і динамічних властивостей багатьох комплексів ліганд-ДНК [8-12]. Ця інформація забезпечила основне уявлення про проектування та розробку більш ефективних хіміотерапевтичних препаратів другого і третього покоління для успішного лікування багатьох видів раку [13]. Проте, питання про зв'язок фізико-хімічних властивостей цих комплексів з їх медико-біологічною ефективністю залишається нез'ясованим.

1.1 Ароматичні біологічно активні речовини

1.1.1 Загальні відомості про біологічно активні речовини

Специфічною особливістю групи ароматичних біологічно активних речовин є наявність в їх структурі плоского хромофору, утвореного сполученням декількох ароматичних гетероциклів. Така будова молекули виявляється геометрично подібною парам основ, що утворюють первинну структуру нуклеїнових кислот. Це дозволяє ароматичним БАР ефективно взаємодіяти з ДНК, утворюючи нековалентно зв'язані комплекси ДНК-ліганд.

На основі взаємодії ДНК з ароматичними БАР здійснюється багато біологічних процесів: від усіх етапів біосинтезу та його регуляції в клітині до молекулярних ефектів різних фармакологічних препаратів [1, 14]. Крім того

зв'язування ароматичних лігандів з ДНК порушує її біологічні функції, головним чином, у результаті зміни конформації ДНК або стеричного екранування цих макромолекул при важливих метаболічних процесах [15-19].

До ароматичних БАР відносяться мутагенні та канцерогенні речовини, деякі протипухлинні антибіотики, вітаміни, компоненти продуктів харчування. Усі вони широко застосовуються в молекулярно-біологічних і фармакологічних дослідженнях та у клінічній практиці [20].

Акридинові – акридиновий помаранчевий (АО) і профлавін (PRF) – і фенантридинові – бромистий етидій (EB) і пропідію йодид (PI) – барвники відносяться до типових мутагенних агентів (канцерогенів), дія яких заснована на їх здатності взаємодіяти з ДНК у результаті вбудовування (інтеркаляції) хромофорів між площинами основ ДНК (інтеркаляційний тип зв'язування).

Антрациклінові антибіотики дауноміцин (DAU), доксорубіцин (DOX), ногаламіцин (NOG), новантрон (NOV) і топотекан є ефективними проти пухлин і лейкозів. Хіолонові антибіотики – норфлуксацин (NOR) та офлуксацин, проявляють широкий спектр антибактеріальної активності. Вважають, що взаємодія з ДНК є основною причиною протипухлинної активності, яку проявляють ці антибіотики, що зумовило широке використання їх для хіміотерапії багатьох видів ракових захворювань [18, 21, 22]. Протипухлинні антибіотики в клітині вбудовуються до ядерної ДНК і викликають хромосомні аберації [23, 24].

Ароматичні вітаміни рибофлавін (RBF), нікотинамід (NMD) і флавінмононуклеотид (FMN) використовуються в якості антиоксидантів у хіміотерапії. Метилксантини кофеїн (CAF), теофілін (ТРН) і теобромін (ТНВ), які присутні у високих концентраціях у продуктах харчування, також є представниками ароматичних БАР і мають певні медико-біологічні властивості [18, 24].

1.1.2 Мутагени профлавін і бромистий етидій

Акридинові барвники мають бактериостатичні і мутагенні властивості внаслідок їх здатності зв'язуватися з нуклеїновими кислотами. Комплекси акридинових барвників можуть бути використані як модельні системи для дослідження ролі ван-дер-ваальсових і гідрофобних взаємодій ароматичних молекул (стекинг-взаємодії), а також електростатичних взаємодій їх заряджених бічних груп у формуванні стабільних міжмолекулярних комплексів з біологічними макромолекулами в розчині.

Профлавін (PRF, 3,6-діаміноакридин, рис. 1.2 а) використовується в формі солей дигідрохлориду і гемісульфата як дезинфікуючий бактериостатичний препарат [25], має антибактеріальні властивості відносно різних штамів грампозитивних бактерій, а також проявляє протималарійну та антивірусну активність [26, 27]. Для пояснення перелічених властивостей профлавіну було висловлено припущення про його безпосереднє зв'язування з нуклеїновими кислотами, яке викликає порушення синтезу ДНК і появу великої кількості делеційних мутацій [28].

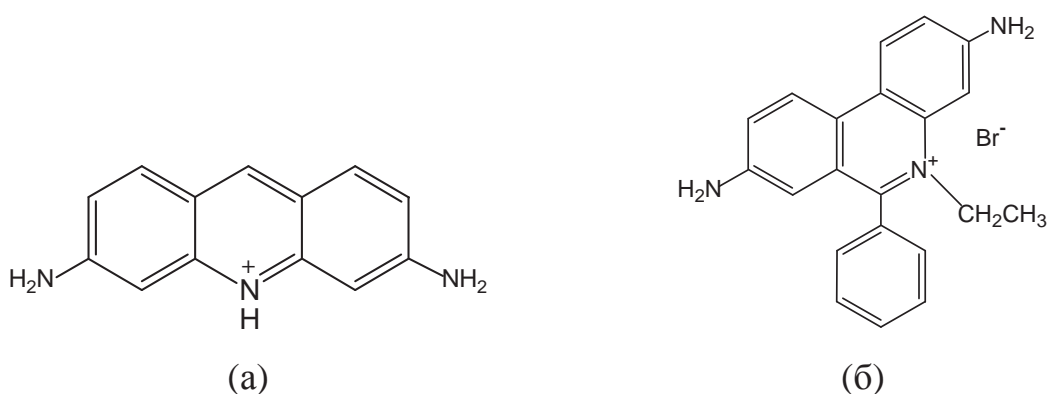


Рисунок 1.2 Структурні формули молекул профлавіну (а) та бромистого етидію (б)

У роботі [29] при дослідженні систем, які містять ДНК та різні концентрації PRF було зроблено наступні висновки. Залежно від

співвідношення концентрацій PRF/ДНК існують два типи зв'язування: «сильне зв'язування» ліганду (рівноважна константа зв'язування $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) при низьких концентраціях PRF і «слабке зв'язування» асоціатів PRF при високих концентраціях ліганду.

Для опису «сильного зв'язування» PRF з ДНК вперше Лерманом була запропонована інтеркаляційна модель [30]. Відповідно до цієї моделі молекула PRF вбудовується між площинами пар основ до подвійної спіралі ДНК з боку великого жолобка [31-33], що призводить до подовження і розкручування ДНК. При цьому площина інтеркальованого хромофору PRF орієнтована перпендикулярно до осі подвійної спіралі ДНК, а його подовжня вісь паралельна довгій осі пари основ.

Фенантридиновий препарат бромистий етидій (ЕВ, 3,8-діаміно-5-етил-6-фенілфенантридинум бромид, рис. 1.2 б) також зв'язується з ДНК за допомогою інтеркаляції [8, 34]. Молекула ЕВ вбудовується своїм хромофором до подвійної спіралі з боку малого жолобка, в якому розміщується її фенольне кільце [35]. Завдяки цим властивостям, ЕВ знайшов широке застосування в біохімічних та фізичних дослідженнях нуклеїнових кислот. Він також широко використовується в лабораторній практиці в якості флуоресцентного маркера двоспіральної ДНК та як модельна система для дослідження поведінки ароматичних лігандів у водному розчині [36].

Нещодавні експериментальні дослідження [37, 38] взаємодії ЕВ з ДНК показали, що цей ліганд може зв'язуватися з полінуклеотидами декількома способами. Теоретичні дослідження кривих плавлення комплексів ДНК-ЕВ [37] дозволили встановити, що, крім утворення інтеркаляційних комплексів ДНК з ЕВ, за певних умов можливе формування комплексів за типом зовнішнього зв'язування. Крім того за допомогою диференціальної імпульсної вольтамперометрії [38] авторами зроблено висновок, що проявляються як мінімум два способи взаємодії ЕВ з ДНК: 1) інтеркаляція та

електростатична взаємодія при низькій іонній силі, та 2) напівінтеркаляція та електростатична взаємодія при більш високій іонній силі розчину.

1.1.3 Метилксантини кофеїн і теофілін

Метилксантини є важливими представниками класу біологічно активних ароматичних речовин, які присутні у великій кількості в рослинних джерелах і відрізняються за хімічною структурою тільки кількістю і положенням метильних груп у ксантиновому хромофорі.

Кофеїн (CAF, 1,3,7-триметилксантин, рис. 1.3 а) – це алкалоїд, що міститься в листі чаю (близько 2%), насінні кави (1-2%), горіхах кола, а також це один з найбільш поширених лікарських препаратів. За будовою та фармакологічними властивостями кофеїн близький до теоброміну та теофіліну. Усі три алкалоїди є похідними пурину і відносяться до групи метилксантинів. З цих алкалоїдів найсильніший збуджуючий вплив на центральну нервову систему (ЦНС) надає CAF [39].

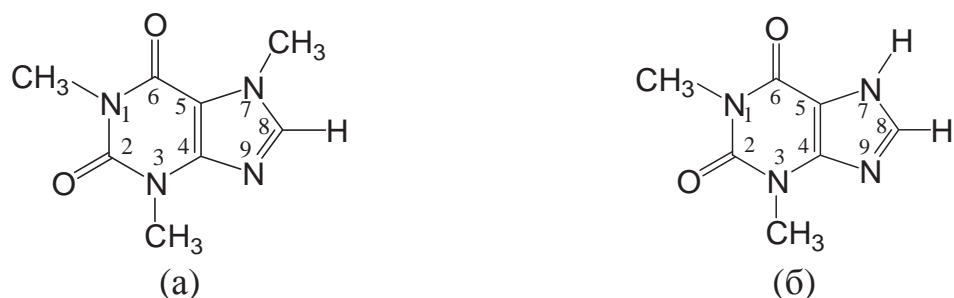


Рисунок 1.3 Структурні формули молекул кофеїну (а) і теофіліну (б)

Кофеїн впливає на багато процесів, що проходять на рівні клітин і організму. До таких процесів відносяться: швидкість проведення нервового імпульсу [40-42], фосфорилювання і дефосфорилювання рецепторів [43], проходження клітинами повного клітинного циклу і процеси репарації ДНК [44, 45], а також апоптоз [46, 47]. Такий широкий спектр впливу кофеїну на найважливіші біологічні процеси викликає постійний інтерес до вивчення

молекулярних механізмів його дії. Висловлювалися припущення про пряму взаємодію кофеїну з біополімерами – протеїнами і ДНК, чим можна було пояснити його вплив на репараційні процеси в клітині [48-50].

Теофілін (ТРН, 1,3-діметилксантин, рис. 1.3 б) впливає на різні функції організму, найбільш важливою з яких є його здатність викликати бронхорозширюючий ефект. Він має стимулюючу дію на центральну нервову систему, хоча і менш виражену, ніж у кофеїну; підсилює скорочувальну діяльність міокарду; дещо розширює периферичні, коронарні, легеневі та ниркові судини; виявляє помірну діуретичну дію; пригнічує агрегацію тромбоцитів; підвищує еластичність еритроцитів; гальмує вивільнення опасистими клітинами медіаторів алергії (проявляє антиалергічну дію) [39].

У механізмі дії теофіліну, як і інших метилксантинів, певну роль відіграють інгібування фосфодіестерази і накопичення в тканинах циклічного 3',5'-аденозинмонофосфату. Серед метилксантинів теофілін є одним з найбільш сильних інгібіторів фосфодіестерази. Виявлена останнім часом здатність теофіліну блокувати аденозинові (пуринергічні) рецептори має особливе значення в його молекулярному механізмі дії. У терапії теофілін застосовують як бронхолітичний засіб при оборотних бронхообструктивних захворюваннях [39]. Усі перераховані метилксантини є унікальним класом лікарських засобів, що використовуються при лікуванні астми [51].

1.1.4 Флавінмононуклеотид

Флавінмононуклеотид (FMN, рибофлавін-5'-фосфат, рис. 1.4) – аналог вітаміну В₂ (рибофлавіну, RBF), який виконує каталітичну функцію в клітинах у складі багатьох окисно-відновних ферментів, таких як оксидоредуктази, і зокрема, аеробні дегідрогенази. Флавінмононуклеотид входить до простетичної групи флавопротеїнів, бере участь у регулюванні окислювально-відновних процесів і в перенесенні водню.

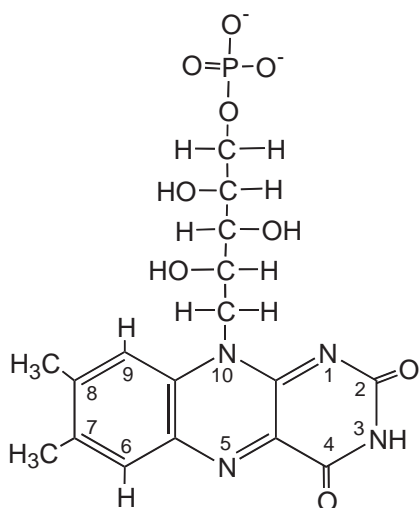


Рисунок 1.4. Структурна формула окисленої форми флавінмононуклеотиду

Рибофлавін широко розповсюджений у природі в мікроорганізмах та в рослинних і тваринних клітинах. Живі організми отримують рибофлавін з їжею або в результаті діяльності мікрофлори шлунково-кишкового тракту. У тваринних тканинах рибофлавін знаходиться переважно у вигляді флавінмононуклеотиду, флавінаденіндинуклеотиду (FAD) і 8- α -похідних FAD, та міститься в різних органах і тканинах, майже в усіх аеробних клітинах [52].

На відміну від RBF, флавінмононуклеотид краще розчинний у воді, тому FMN часто використовують як модель вітаміну B₂ в біофізичних дослідженнях [53-56].

Флавінмононуклеотид забезпечує перенесення двох атомів водню в окисно-відновних реакціях. Окислювально-відновні процеси, пов'язані з переносом протонів та електронів від субстрату, є рН-залежними. Тому вивчення структурного стану флавінмононуклеотиду при фізіологічних значеннях кислотності середовища (нейтральні та слабокислі рН ~ 6,0-7,0) мають важливе значення в біофізичних дослідженнях. У літературних джерелах є інформація, що приєднання атомів водню здійснюється по атомах азоту ізоалоксазинового кільця флавінмононуклеотиду [57, 58], але за даними експериментальних досліджень не сформульовано однозначного висновку щодо місць протонування ізоалоксазинового кільця FMN.

Необхідно також відзначити, що важливими для молекулярної біофізики є дослідження, результати яких дозволять визначити структурний стан FMN, характерний для живих систем: мономерна або асоційована форма. У роботах [55, 59] показано, що в нейтральному середовищі FMN знаходиться в димерній формі. Однак у концентрованому стані та в слабкокислих середовищах, що є більш характерним для живих організмів, агрегатний стан флавінмононуклеотиду не досліджувався.

1.2 Самоасоціація і гетероасоціація біологічно активних речовин

Вивчення самоасоціації та гетероасоціації ароматичних лігандів та їх конкурентне зв'язування з мішенями – молекулами ДНК, є важливим аспектом проблеми молекулярних взаємодій [8]. Ці дослідження становлять інтерес не тільки з точки зору вивчення фізико-хімічних властивостей ароматичних лігандів і впливу структури хромофоров та їх бічних радикалів на вибірковість взаємодії лігандів і ДНК [3], але і з точки зору фармакологічної активності, яка може змінюватися в результаті само- і гетероасоціації ароматичних лігандів.

Два найбільш поширених приклади такої проблеми – взаємодії лікарських препаратів з ароматичними молекулами, що входять до складу продуктів харчування (наприклад, кофеїн, поліфеноли та ін.) [60], і використання лікарських препаратів у комбінованій хіміотерапії [61]. Тому важливо знати кількісні характеристики само- і гетероасоціації БАР і вклади різних взаємодій в їх стабілізацію для того, щоб оцінити вплив конкурентного зв'язування різних препаратів на їх взаємодію з молекулами ДНК [9, 14] або протеїнами [62].

Ароматичні молекули мають плоскі гетероциклічні структури, хромофор яких містить системи зв'язаних подвійних $C=C$ зв'язків з делокалізованими на них π -електронами. Численні дослідження поведінки

ароматичних молекул у водному розчині вказують на те, що для таких сполук переважними є нековалентні взаємодії типу вертикальних стекінг-взаємодій хромофорів, які призводять до формування стопок або агрегатів з числом мономерів у агрегаті два та більше [2]. Енергетичний ефект нековалентних взаємодій, які визначають утворення стопкових асоціатів, можна порівняти з енергетикою теплового руху, тому комплексоутворення ароматичних молекул у розчині носить динамічний характер, який проявляється в швидкому утворенні та руйнуванні комплексів молекул.

1.2.1 Самоасоціація ароматичних лігандів

Дослідження процесів самоасоціації ароматичних молекул проводилися для пояснення вертикальної стабілізації нуклеїнових кислот (самоасоціації похідних нуклеїнових основ) і для уточнення параметрів, отриманих у результаті різних експериментальних досліджень за участю цих сполук [11]. Зокрема, було показано, що коректний термодинамічний аналіз взаємодій антрациклінових антибіотиків з ДНК потребує врахування самоасоціації ліганду, якщо експериментальні концентрації, які використовуються, потрапляють у діапазон десятків μM і вище [63, 64]. Разом з тим самоасоціація ароматичних молекул може мати самостійне біологічне значення (див. огляди [11, 65]).

Результати дослідження агрегації ароматичних лігандів, проведені різними експериментальними методами [64, 66-68] показали, що параметри їх самоасоціації в значній мірі визначаються будовою хромофору і характером бічних груп і ланцюгів хромофорів. Так, рівноважна константа асоціації K_C однозначно пов'язана з числом ароматичних кілець у хромофорі ліганду. Найменшою спорідненістю до агрегації у водному розчині мають ліганди, що містять одне ароматичне кільце у хромофорі, наприклад, піримідин і його похідні. Дані експериментальних досліджень свідчать про те, що рівноважна

константа асоціації піримідинів не перевищує 1 M^{-1} при $T = 298 \text{ K}$ [69]. Молекули, хромофори яких містять два ароматичних кільця, наприклад, пурини та їх похідні, характеризуються на порядок більшими константами самоасоціації у водному розчині, ніж піримідини, і вони можуть утворити не тільки димери, але й асоціати більш високого порядку [68, 69].

Молекули, що містять три ароматичних кільця у хромофорі, мають значення констант самоасоціації на два-три порядки вище, ніж у пуринів. Застосування для аналізу експериментальних даних, отриманих під час вивчення процесу самоасоціації адитивної нескінченновимірної моделі асоціації [70], дозволяє враховувати утворення n -молекулярних агрегатів і тим самим виконувати більш коректний розрахунок структурних і термодинамічних параметрів реакції самоасоціації ароматичних молекул.

Результати одновимірної та двовимірної ЯМР-спектроскопії [71, 72] показали також, що параметри самоасоціації та характер стекінг-взаємодій ароматичних молекул істотно залежать від структури хромофору: найбільше значення рівноважної константи асоціації мають акридинові барвники з лінійним розташуванням кілець хромофору, тоді як менше значення константи для ЕВ може бути обумовлено меншим перекриттям кілець фенантридинового хромофору при утворенні агрегатів у вигляді стопок. У табл. 1.1 наведено рівноважні константи само- і гетероасоціації для деяких ароматичних БАР, отримані з експериментальних ЯМР даних.

Метилування ароматичних молекул збільшує спорідненість молекул до агрегації у водних розчинах. Рівноважна константа самоасоціації САФ, що містить три метильні групи у пуриновому гетероциклі, становить 11 M^{-1} [9], тоді як для ТРН, в якого лише дві метильні групи, константа дорівнює 7 M^{-1} [88]. Константа рівноваги АО ($\approx 6100 \text{ M}^{-1}$), що має чотири метильні групи приблизно на порядок вища, ніж для PRF ($\approx 700 \text{ M}^{-1}$) [71] (табл. 1.1). Це може пояснюватися додатковим стабілізуючим внеском гідрофобних взаємодій метильних груп при агрегації молекул у водному розчині.

Таблиця 1.1

Рівноважні константи самоасоціації та гетероасоціації (M^{-1}) для різних ароматичних БАР

	CAF	DAU	TPH	FMN	AO	PRF	EB	NOV	NOG
CAF	11,8 [9]	72±4 [9]		161±26 [81]	264±21 [9]	160±17 [9]	62±4 [9]	256±30 [76, 77] 324 [85]	180±40 [87] 210 [85]
DAU		720 [73]	190±30 [88, 89]	453±28 [82,83]	2470±4 40 [33]	1650±120 [33] 2080 [90]	2700±440 [10, 78] 3850 [90]	3333±350 [80] 15000 [85]	2700±1200 [11] 3400 [85]
TPH			7,4±0,4 [88]	180±4 [88]	157 [79]	180±20 [88, 89]	102±6 [88, 89]	100±10 [88, 89]	
FMN				265 [55]		920±80 [86]	640±75 [86]	33700±100 [84] 49000 [85]	790±50 [11] 965 [85]
AO					6100 ±700 [71]				
PRF						700 [71]	690±60 [74,75]		
EB							305 [71]		
NOV								28600 [76]	5200±2500 [11] 12000 [85]
NOG									7400 [73]

Наявність заряджених атомів і груп у бокових ланцюгах ароматичних з'єднань також істотно впливає на параметри агрегації молекул і характер їх стекінг-взаємодій. Наприклад, отримані при однакових експериментальних умовах константи самоасоціації фенантридинового барвника PI ($63 \pm 6 M^{-1}$),

у бічному ланцюзі якого міститься заряджений атом азоту, та ЕВ ($305 \pm 14 \text{ М}^{-1}$) відрізняються майже в п'ять разів [72, 91].

На підставі експериментальних даних (ЯМР спектроскопії, спектроскопії в УФ- і видимій областях) було побудовано моделі самоасоціатів і показано, що при утворенні стекінг-асоціатів має місце антипаралельна орієнтація хромофорів ароматичних молекул – димерів профлавіну, акридинового помаранчевого, бромистого етидію, актиноміцину D [70, 71, 92, 93]. За допомогою перелічених експериментальних методів було визначено термодинамічні параметри самоасоціації та вид комплексоутворення – вертикальний стекінг хромофорів. Також було запропоновано найбільш імовірні просторові структури димерів та встановлено якісний взаємозв'язок параметрів реакцій самоасоціації молекул з розміром і характером бічних груп і ланцюгів [65].

За допомогою комп'ютерного моделювання отримано структури як димерів самоасоціатів, так і агрегатів більш високого порядку [94]. Молекулярно-динамічне моделювання показало, що коли система містить вісім молекул кофеїну в осередку з 4067 молекулами води при 300 К і відповідає межі розчинності кофеїну при кімнатній температурі, то можливе утворення стекінг-асоціатів з 2, 3, 5 і 6 молекул кофеїну. Найбільш стійким виявився октамер, який зберігався протягом 1 нс. Стабілізація асоціатів здійснювалась за рахунок міжплощинних і гідрофобних взаємодій.

У цілому аналіз літературних даних свідчить про те, що для всіх вивчених ароматичних систем, без винятку і незалежно від типу бічних груп, для реакції самоасоціації є характерним негативна зміна ентальпії та ентропії самоасоціації; величина рівноважної константи самоасоціації змінюється в діапазоні від часток М^{-1} (нікотинамід і піримідини) до десятків тисяч М^{-1} (новатрон) і корелюють з типом бічних груп хромофору та кількістю ароматичних кілець досліджуваної сполуки. Зроблено висновок про стопкову орієнтацію хромофорів, що утворюють агрегати ароматичних молекул у

водно-сольовому розчині (вертикальний стекінг), і значний внесок в їх стабілізацію гідрофобних взаємодій і водневих зв'язків (Н-зв'язків), що залежать від типу бічних груп і структури ароматичного хромофору, яка визначає інтенсивність дисперсійних взаємодій. Тобто, здатність до самоасоціації ароматичних молекул у водному розчині проявляється специфічно і для кожної конкретної сполуки.

Найбільш дискутованим на даний час питанням є порядок асоціатив, які можуть утворити в розчині ароматичні молекули: димери або агрегати більш високого порядку, та які чинники впливають на порядок самоасоціації.

1.2.2 Гетероасоціація ароматичних лігандів

Перспектива регулювання фармакологічної активності та зниження токсичності протипухлинних ароматичних інтеркаляторів у присутності САФ, вітамінів FMN/RBF, а також в їх поєднанні стимулювали численні дослідження гетероасоціації як потенційного фізичного механізму, що лежить в основі спостережуваних явищ. Дослідження гетероасоціації ароматичних БАР, виконані за допомогою ЯМР, спектроскопії в УФ- та видимій області та флюоресценції (див. огляд [2, 11]), показали, що в розчинах в умовах, близьких до фізіологічних, молекули БАР утворюють гетерокомплекси в формі стопок з паралельним розташуванням хромофорів (π -стекінг).

Аналіз результатів досліджень показав, що у водних розчинах, які містять молекули двох різних ароматичних сполук *Ліганд1-Ліганд2*, подібно до систем, що містять молекули одного типу *Ліганд1-Ліганд1*, відбуваються реакції асоціації з утворенням агрегатів у формі стопок.

Основні закономірності гетероасоціації ароматичних молекул зводяться до наступного:

1. Гетероасоціація ароматичних молекул у водно-сольовому розчині носить характер вертикального стекінгу хромофорів, стабілізованого переважно дисперсійними та гідрофобними взаємодіями, а також в окремих випадках міжмолекулярними водневими зв'язками [65].
2. Для всіх вивчених ароматичних систем без винятку і незалежно від типу бічних груп є характерним негативна зміна ентальпії ($\Delta H < 0$) і негативна зміна ентропії ($\Delta S < 0$) (за винятком системи мітоксантрон-кофеїн з великим гідрофобним внеском [95]).
3. Рівноважна константа гетероасоціації та абсолютні значення ентальпії та ентропії мають проміжні значення між аналогічними параметрами самоасоціації взаємодіючих речовин. Перевищення термодинамічних параметрів гетероасоціації (вільної енергії ΔG , ентальпії ΔH , ентропії ΔS) над параметрами самоасоціації спостерігається тільки для систем, які можуть бути додатково стабілізовані в розчині міжмолекулярними Н-зв'язками [2].
4. Встановлено кореляцію параметрів гетероасоціації та типу бічних ланцюгів ліганду. Зокрема, наявність масивних бічних радикалів проявляється в помітному позитивному гідрофобному вкладі в ентропію гетероасоціації [65].

Очевидно, що врахування само- і гетероасоціації залишається необхідним при проведенні біофізичних досліджень за участю біологічно активних ароматичних препаратів. Але з експериментів безпосередньо визначають, як правило, тільки рівноважні константи асоціації та термодинамічні параметри, тоді як вклади різних взаємодій і роль водного оточення в стабілізацію асоціатів оцінюються опосередковано і на якісному рівні. Тому як і раніше актуальні як отримання нових експериментальних даних про міжмолекулярні взаємодії під час агрегації ароматичних лігандів, так і розробка методів їх коректної інтерпретації.

1.3 Методи дослідження само- і гетероасоціації БАР. Роль води та Н-зв'язків у стабілізації асоціатів БАР і при комплексутворенні з ДНК

1.3.1 Спектроскопічні методи дослідження само- і гетероасоціації ароматичних БАР

Спектроскопічні методи – спектрофотометрія в УФ- і видимій області, ЯМР спектроскопія, коливальна спектроскопія (інфрачервона спектроскопія і спектроскопія комбінаційного розсіювання світла) – очевидно, є найбільш ефективними методами для отримання інформації про утворення молекулярних комплексів в умовах, наближених до фізіологічних.

У більшості випадків перехід від мономерної форми ароматичних сполук до агрегованої супроводжується спектральними змінами – гіпохромізмом і короткохвильовим зміщенням смуги поглинання в УФ- і видимій області спектру [70]. За допомогою чисельного аналізу отриманих спектральних залежностей у широкій області довжин хвиль, концентрацій реагуючих компонентів і температур можна визначити індивідуальні спектри поглинання, константи асоціації (K_C) і термодинамічні параметри (ΔH , ΔG і ΔS) для мономер-димерної рівноваги, використовуючи рівняння Гіббса-Гельмгольца і Вант-Гоффа [96, 97].

Утворення вертикальних стекінг-асоціатів (стопок) з гетероциклів азотистих основ раніше було виявлено у водних розчинах і плівках нуклеотидів, а також при зв'язуванні молекул води в плівках полінуклеотидів [98-101]. Міжплощинні взаємодії гетероциклів азотистих основ супроводжуються в УФ-спектрі гіпохромізмом смуги поглинання при $\lambda = 260$ нм [102], а в інфрачервоному спектрі – гіпохромізмом смуг поглинання внутрішньокільцевих C=N коливань і високочастотними зсувами смуг поглинання коливань карбонільних груп C=O [103, 104]. Формування стопок молекул кофеїну, що фіксується методом ІЧ-спектроскопії, також

супроводжується високочастотним зсувом смуг поглинання коливань карбонільних груп [105]. Зафіксовані методом ІЧ-спектроскопії спектральні ефекти, що виникають у результаті взаємодій моментів переходів карбонільних і внутрішньокільцевих коливань у стопках різних гетероциклів, знайшли пояснення в рамках теорії молекулярних екситонів у диполь-дипольному наближенні [106, 107].

Термодинамічні параметри само- і гетероасоціації ароматичних лігандів можуть бути визначені за допомогою мікрокалориметричного титрування і молекулярного моделювання, наприклад, константи та ентальпії само- і гетероасоціації кофеїну і мітоксантрону [108]. У цьому дослідженні передбачається, що значну роль у формуванні стабільних структур стекінг-асоціатів відіграють гідрофобні взаємодії, які пов'язані зі зміною водного оточення в процесі асоціації ароматичних молекул. Цей висновок узгоджується з результатами дослідження самоасоціації нуклеїнових основ та їх похідних у водних розчинах, згідно з якими основи у вигляді стопок стабілізуються гідрофобними взаємодіями в результаті зміни впорядкованості структури молекул води [109-112]. У більшості випадків рівноважні константи гетероасоціації характеризуються проміжними значеннями між константами самоасоціації взаємодіючих речовин.

За допомогою методу ЯМР визначається хімічний зсув, який використовується для знаходження термодинамічних параметрів реакцій асоціації та просторової структури асоціатів у розчині [71, 80, 113]. Зазвичай, мономери в таких комплексах мають антипаралельну орієнтацію хромофорів у стопці з відстанню між площинами 3,2 - 3,7 Å, залежно від типу БАР, і додатково повернені навколо поперечної осі хромофора на $\approx 180^\circ$ [76, 114].

Методом ЯМР спектроскопії було проведено велику кількість досліджень само- і гетероасоціації різних біологічно активних ароматичних сполук. Для фенантридинових препаратів (ЕВ і РІ) було отримано, що величини константи рівноважної реакції і термодинамічних параметрів

займають проміжне значення між тими параметрами, що спостерігаються для самоасоціації цих молекул [92]. Такий же ефект спостерігався для гетероасоціатів акридинового помаранчевого з дауноміцином. Результати ЯМР показують, що гідрофобні взаємодії відіграють істотну роль у стабілізації комплексу АО-DAU, який характеризується відносно невеликою зміною ентропії при комплексоутворенні, в порівнянні з гетерокомплексом PF-DAU, який здебільшого стабілізується дисперсійними ван-дер-ваальсовими взаємодіями і, можливо, водневим зв'язком [33].

Для того щоб оцінити вплив бічних ланцюгів бромистого етидію і пропідія йодиду на конкурентне зв'язування між дауноміцином і мутагенами з ДНК, було проведено ЯМР дослідження самоасоціації фенантридинів і DAU, їх гетероасоціації та їх комплексоутворення з фрагментом ДНК, тетрануклеотидом 5'-d(TrGpCpA)₂. Було виявлено, що комбіноване використання інтеркалюючих препаратів призводить до зменшення зв'язування лікарського препарату (ЛП) або мутагенів з ДНК, що пов'язано як з утворенням у суміші гетероасоціатів комплексів ЛП-мутаген, так і з конкуренцією за сайти зв'язування з ароматичними молекулами [10].

У деяких випадках, як було показано [33, 86], константи гетероасоціації приймають більш високі значення, ніж константи самоасоціації. Наприклад, для гетероасоціату PRF-DAU величина константи рівноваги виявляється істотно вищою, ніж константи самоасоціації цих молекул, що може бути наслідком додаткової стабілізації гетерокомплексів БАР міжмолекулярними водневими зв'язками. Опосередковано цей висновок було недавно підтверджено на підставі аналізу експериментально вимірюної ентальпії само- і гетероасоціації великої кількості ароматичних БАР [115], а також у результаті розгляду можливості альтернативної інтерпретації додаткової стабілізації гетерокомплексів не Н-зв'язками, а взаємодіями за типом «перенесення заряду» [116].

1.3.2 Визначення міжмолекулярних Н-зв'язків у асоціатах ароматичних БАР

Висновки про утворення міжмолекулярних Н-зв'язків у роботах [33, 82, 84, 86, 115, 116] зроблені опосередковано на підставі експериментально вимірній зміні термодинамічних параметрів: через велику величину модуля ентальпії асоціації ΔH і константи асоціації K_C , у поєднанні зі структурними даними (результати рентгеноструктурного аналізу і методів молекулярного моделювання, див. огляди [2, 117-119]).

Також відомо, що водне оточення відіграє істотну роль у процесах асоціації ароматичних сполук [97, 120, 121], при формуванні нативної структури молекул ДНК, що є мішенню для протипухлинних антибіотиків [122], і при комплексоутворенні БАР з ДНК [123, 124]. Проте, відсутня більш детальна інформація про вплив розчинника і про можливість утворення водневих зв'язків, про оцінку внеску різних видів взаємодій в утворення стійких агрегатів у іон-гідратному оточенні.

Типовими прикладами є гетерокомплекси флавінмононуклеотиду з мутагенами, такими як бромистий етидій і профлавін, які раніше були охарактеризовані як термодинамічно більш стабільні, ніж їх самоасоціати внаслідок утворення міжмолекулярного Н-зв'язку між NH_2 і $\text{C}=\text{O}$ групами взаємодіючих молекул [86]. Пошук прямого експериментального підтвердження утворення міжмолекулярних Н-зв'язків, що проводився до сьогодні тільки в рамках методу ЯМР (наприклад, по зміні інтенсивності/положення сигналів протонів, які ймовірно беруть участь у формуванні Н-зв'язку), не завершився успіхом [33, 86].

Альтернативою методу ЯМР типом молекулярної спектроскопії, що дозволяє отримати інформацію про утворення Н-зв'язків, є коливальна спектроскопія: інфрачервона спектроскопія (ІЧ) і спектроскопія комбінаційного розсіювання світла (КР). Відомо, що в ІЧ-діапазоні

формування Н-зв'язку між донорами протонів (групи атомів OH, NH, NH₂, CH) і акцепторами (C=O, C–O, C–N, C=N) супроводжується низькочастотним зсувом валентних коливань, а також значним зростанням інтенсивності і збільшенням напівширини їх смуг [125, 126]. У той же час смуги поглинання деформаційних коливань (наприклад, NH₂ і OH-груп атомів) зазнають високочастотні зрушення [127]. Ці спектральні особливості є прямим доказом утворення Н-зв'язку між взаємодіючими молекулами в розчині. ІЧ-спектроскопічний прояв «донорної» частини Н-зв'язку в даний час добре вивчений як теоретично, так і експериментально [128]. На жаль, через сильне поглинання OH-груп у водних розчинах вивчення Н-зв'язку типу N–H...O або N–H...N має труднощі. У цьому випадку дослідження Н-зв'язку проводяться у розчинах важкої води, в яких відбувається суттєвий низькочастотний ізотопний зсув валентних і деформаційних коливань групи OD, що дозволяє провести аналіз поведінки валентних коливань акцептору (наприклад, карбонільної групи C=O).

У роботі [129] утворення Н-зв'язку розглядається на основі значень частоти карбонільного коливання і встановленої емпіричної залежності зміни частоти коливання C=O-груп атомів від ентальпії утворення водневих зв'язків. Однак аналіз Н-зв'язку за ІЧ-спектроскопічним проявом «донорної» частини (наприклад, атомів кисню) пов'язаний з певними ускладненнями. Як було показано раніше [107], при формуванні стопкових структур гетероциклічних речовин виникають умови, при яких стають можливими резонансні (динамічні) взаємодії карбонільних коливань, що супроводжується їх частотним зсувом. Тому при аналізі Н-зв'язків за частотою карбонільного коливання цей ефект необхідно враховувати.

Додаткову інформацію про утворення Н-зв'язків – внутрішньо- і міжмолекулярних – можна отримати на підставі аналізу результатів молекулярного моделювання: квантово-хімічних розрахунків і методів Монте-Карло та молекулярної динаміки.

Міжмолекулярні водневі зв'язки були виявлені у нуклеозидів [130, 131], нуклеотидів [132] та комплексів нуклеїнових основ з молекулами води [133], оптимізовані структури яких отримані методами квантової хімії за допомогою теорії функціоналу густини. Утворення Н-зв'язків визначалося за критеріями, запропонованими Попел'є та Кохом [134, 135], за допомогою енергетичних і структурних критеріїв Н-зв'язків [136, 137] та на підставі аналізу топології розподілу електронної густини в наближенні AIM (Atoms in Molecules) [138].

Для само- і гетероасоціатів кофеїну, похідних актиноцину (аналогів протипухлинного антибіотика актиноміцину D) [139] внутрішньо- і міжмолекулярні Н-зв'язки визначалися також на підставі енергетичних і геометричних критеріїв. Було використано значення енергії міжмолекулярного Н-зв'язку $\Delta G_{im}^{HB} = -9$ ккал/моль, отримане шляхом усереднення результатів калориметричних вимірів розгортання білків, яке узгоджується з теоретичними значеннями для внутрішньомолекулярних Н-зв'язків у білках $\Delta G_{im}^{HB} = (-6...-18)$ ккал/моль [140] (середнє значення ≈ -9 ккал/моль [141]). Також для встановлення міжмолекулярних Н-зв'язків використовуються геометричні критерії В. І. Полтєва: наявність Н-зв'язку фіксується, якщо відстань між атомами донору та акцептору не перевищує $3,2 \text{ \AA}$, а між атомами водню та акцептору – $2,4 \text{ \AA}$ [142, 143].

Питання про додаткову стабілізацію гетерокомплексів ароматичних БАР розглядається в даний час в якості однієї зі стратегій створення ефективних молекул-інтерцепторів, які за рахунок гетероасоціації перехоплюють високотоксичні ароматичні мутагени і канцерогени [11]. Тому з'ясування ролі міжмолекулярних Н-зв'язків у стабілізації гетерокомплексів БАР є актуальною задачею.

1.4 Інтерцепторні властивості та біологічно важливі комбінації ароматичних БАР

Лікарські препарати, основою яких є ароматичні сполуки, досить широко використовуються в комбінованій терапії ракових захворювань. Висока побічна токсичність протипухлинних антибіотиків дуже сильно обмежує можливість їх застосування. Одним із можливих механізмів спільної дії таких ароматичних сполук, що регулюють медико-біологічну активність препаратів, може виступати інтерцепторний механізм, яким є утворення комплексів *Ліганд-Ліганд* [11, 144].

Відомо, що молекули ксантинового типу, зокрема, кофеїн та його похідні, перешкоджають біологічній дії препаратів, мішенню для яких є ДНК. САФ може змінювати терапевтичну ефективність деяких лікарських препаратів, зокрема, протипухлинних антибіотиків – актиноміцину D, дауноміцину, мітаксантрону і канцерогенних сполук – етидія броміду, профлавіну, акридинового помаранчевого [145-147]. Препарати, біологічну дію яких змінює кофеїн, – це ароматичні сполуки, до складу яких входять поліциклічні плоскі хромофори. Окрім того, що вони є класичними інтеркаляторами, вони мають високі константи само- і гетероасоціації у водних розчинах [9, 33, 148, 149]. Кофеїн, будучи гетероциклічною сполукою, також здатний утворювати у водних розчинах асоціати у формі стопок [150, 151], але має більш низьку константу самоасоціації [9]. Також показано, що САФ утворює гетероасоціати з переліченими вище БАР [9, 152]. За даними вивчення розчинів протипухлинних антибіотиків, похідних актиноцину та їх змішаних розчинів з кофеїном методом ЯМР-спектроскопії отримано можливі структури димерів, що утворюються, у формі стопок [9, 76, 108, 146, 153] та визначено термодинамічні параметри процесів асоціації [9, 96, 154].

На підставі аналізу цих результатів було висловлено припущення про здатність САФ зменшувати концентрації ароматичних БАР в розчинах та, як

наслідок, знижувати їх біологічну активність. Тобто молекули кофеїну є інтерцепторами – «перехоплювачами» – ароматичних БАР [146, 151].

За таким же механізмом можна знижувати токсичність протипухлинних препаратів і мутагенів. У роботі [155] було показано, що цитотоксичність адриаміцину зменшилася в присутності САФ, тоді як цитотоксичність елліптіцину, актиноміцину D і хікантону значно збільшилася. На підставі цих факторів було зроблено припущення, що інтеркалюючі агенти викликають утворення розривів у ДНК. Авторами роботи [156] також зроблено висновок про те, що САФ помітно знижує цитотоксичність адриаміцину та його аналогу AD32 (N-трифторо-ацетиладриаміцин-14-валерату). Цей ефект потенційно може мати дуже важливе значення в клінічній практиці, наприклад, для швидкого регулювання рівня токсичності при передозуванні.

Механізм такої дії кофеїну в системах ЛП-САФ можна пояснити з точки зору двох основних молекулярних процесів, що діють одночасно, а саме: інтерцепторна дія (гетероасоціація САФ і лікарського препарату) [145, 146] і протекторна дія (витіснення лікарського препарату з ДНК внаслідок зв'язування САФ з ДНК) [9, 153, 157] (рис. 1.5).

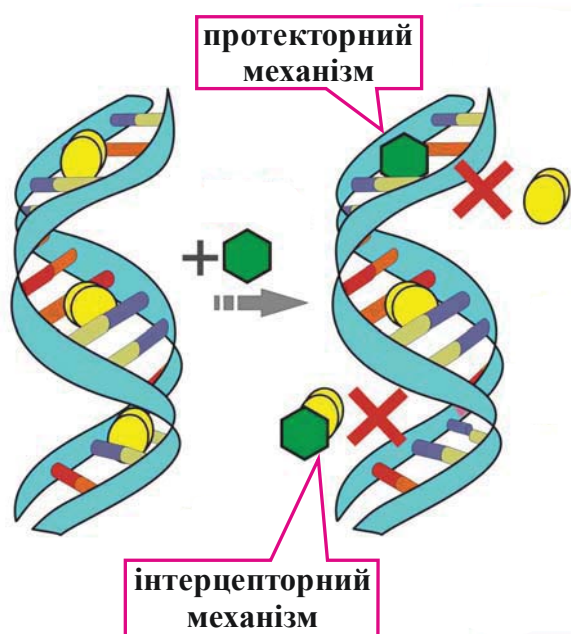


Рисунок 1.5 Інтерцепторний і протекторний механізми зміни на молекулярному рівні біологічної активності ароматичних лігандів

В обох випадках при додаванні молекул кофеїну в біологічну систему, яка містить лікарський препарат, концентрація комплексів ЛП-ДНК зменшується, що призводить до зміни біологічної дії препарату. Було показано, що додавання САФ в розчин призводить до зниження зв'язування лікарського препарату або мутагена з ДНК, що визначається конкуренцією за місця зв'язування між САФ і ароматичними молекулами або формуванням комплексів гетероасоціатів САФ-ліганд в змішаних розчинах [9].

У роботі [158] виявлено концентраційно-залежний протекторний ефект дії кофеїну на біolumінесценцію культури бактерій *P. leiognathi* Sh1, що світяться, яка містить типові мутагенні препарати профлавін і бромистий етидій. Ця дія полягає у відновленні біolumінесцентного сигналу під час введення САФ. Отримані дані опосередковано вказують на те, що в основі спостережуваного ефекту лежить інтерцепторний механізм, обумовлений гетероасоціацією препаратів з САФ, гарно відомий з літературних даних для інших клітинних систем.

Вітаміни групи B_2 широко використовуються в якості елементів вітамінотерапії, яка знижує побічні ефекти від введення в організм високотоксичного препарату. Флавінові нуклеотиди відіграють важливу роль у захисті тварин або людини від несприятливих біологічних наслідків впливу поліциклічних вуглеводнів [159]. Дослідження взаємодії флавінових сполук з деякими похідними β -карболіну (препарати-антидепресанти, які мають яскраво виражене інгібування моноаміноксидази, MAO) показало, що β -карболіни можуть конкурувати з аміном за допомогою флавінового залишку MAO та імітувати процес перенесення електронів, блокуючи активний центр [160, 161].

Також рибофлавін надає кардіопротекторний ефект при реоксигенації серця [162]. Введення RBF знижує кількість одиночних розривів у ядерній ДНК, індукованих афлатоксином B_1 та N-нітрозодиметиламіном [163]. Оскільки пошкодження ДНК та її репарація можуть бути пов'язані з канцерогенезом, зміна цих параметрів за допомогою рибофлавіну передбачає

потенційну хіміопрофілактичну роль цього вітаміну. Раніше було виявлено протекторну дію рибофлавіну по відношенню до ДНК, яка полягає в значному зменшенні зв'язування ароматичних мутагенів з ДНК у присутності вітаміну. Крім того недолік рибофлавіну в організмі може збільшити ризик карценогенезу [164].

Методом одновимірної та двовимірної ^1H -ЯМР-спектроскопії (500 МГц) було досліджено гетероасоціацію протипухлинного антибіотику новатрону з флавінмононуклеотидом у водному розчині для визначення молекулярного механізму можливої комбінованої дії антибіотику і FMN. Аналіз отриманих результатів свідчить про утворення гетерокомплексу за рахунок стекінг-взаємодій між ароматичними хромофорами з можливою додатковою стабілізацією за допомогою водневих зв'язків. Авторами зроблений висновок [84], що ароматичні молекули вітамінів, зокрема рибофлавін, можуть утворювати енергетично стабільні гетероасоціати з протипухлинними антибіотиками у водному розчині і, тим самим, впливати на ефективність їх медико-біологічної дії.

1.5 Особливості само- і гетероасоціації флавінмононуклеотиду

Вивчення структурного стану флавінмононуклеотиду в зволожених плівках є необхідністю, оскільки саме такий конденсований стан максимально наближений до природних умов функціонування FMN у живих системах. Дослідження структури FMN у водних розчинах методом ЯМР-спектроскопії показало, що в нейтральних середовищах ($\text{pH} = 7$) його молекули агрегують з константою самоасоціації 265 M^{-1} [54, 55]. Це дозволило визначити термодинамічні параметри самоасоціації та розрахувати просторову структуру димеру FMN [55, 56], який утворюється в результаті стекінг-взаємодій між хромофорами FMN – ізоалоксазиновими кільцями. У роботі [55] на основі аналізу спектрів ЯМР запропоновано паралельне

розташування ізоалоксазинових кілець у стопкообразних самоасоціатах FMN. Методом молекулярної динаміки отримано інше, антипаралельне розташування кілець у стекінг-димері FMN [165] (рис. 1.6).

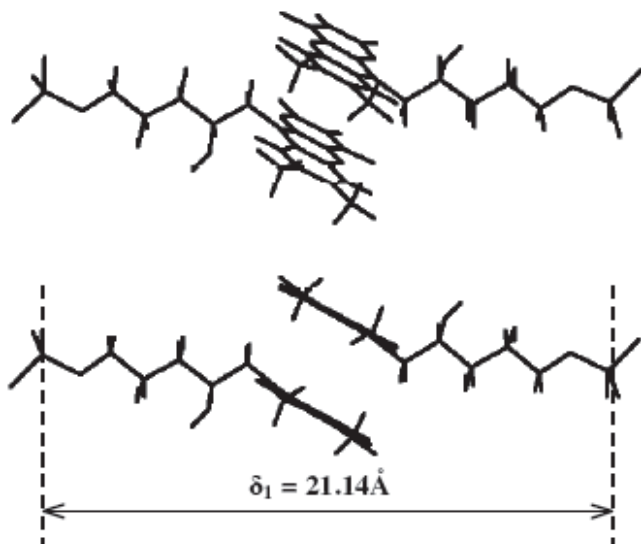


Рисунок 1.6 Проекція структури димеру FMN у вакуумі [165]

Дослідження самоасоціації нуклеозидів, нуклеотидів та ароматичних протипухлинних антибіотиків, виконані різними фізичними методами (ЯМР, ІЧ-, УФ-спектроскопія та ін.), показали, що стабільність їх стопкових структур залежить від багатьох факторів, у тому числі від рівня гідратації [103, 104] та електростатичних взаємодій, що змінюються при протонуванні гетероциклів і фосфатних груп нуклеотидів [65, 103, 166, 167]. Оскільки в молекулі FMN є фосфатна група і можливе протонування по атомах азоту N_1 і N_5 ізоалоксазинового кільця (див. рис. 1.4), то перелічені вище фактори також можуть істотно вплинути на формування і стабільність стекінг-асоціатів FMN у нейтральних і слабокислих водних середовищах. При дослідженні спектрів FMN в УФ- і видимій області поглинання ізоалоксазинового кільця (230-500 нм) було отримано дані про протонування FMN по атомах N_1 і N_5 у кислих розчинах [168].

Прямі відомості про приєднання протонів до атомів N_1 і N_5 може надати інфрачервона спектроскопія, оскільки на даний час виконано досить надійна інтерпретація смуг поглинання внутрішньокільцевих коливань за участю атомів

азоту N₁ і N₅ ізоалоксазинового кільця ІЧ-спектрів FMN [169, 170]. Додаткові відомості про вплив протонування на внутрішньокільцеві коливання можна отримати за допомогою квантово-хімічних розрахунків [57, 58].

У роботі [57] дослідження флавінмононуклеотиду, проведене за допомогою ІЧ-спектроскопії багатофотонної дисоціації (IRMPD) і квантово-хімічних розрахунків у наближенні теорії функціоналу густини (DFT), показало, що FMN найбільш стабільний у вигляді O₂- і N₁-протонованого таутомеру. Дослідження фізико-хімічних властивостей люміфлавіну (модельної сполуки рибофлавіну) в розчинах методом ІЧ-спектроскопії з розділенням у часі (TRIR) і квантово-хімічними розрахунками в наближенні DFT показали, що термодинамічно вигідне положення для приєднання протону – це атом азоту N₅ кільцевої системи флавіну [57].

Найбільш детальні дослідження гетероасоціації систем RBF/FMN-ЛПП були виконані за допомогою ЯМР спектроскопії. Під час вивчення взаємодії FMN з антибіотиками (DAU, NOG, актиноміцином D та NOV [82, 84]) та мутагенами (EB та PF [86]) структурні та термодинамічні параметри гетероасоціації визначали з концентраційної та температурної залежності хімічних зсувів протонів обох ароматичних сполук у змішаних розчинах. Авторами було зроблено висновок [82, 84, 86], що в розчині ароматичні молекули утворювали комплекси типу «сендвіч», які стабілізувалися стекінг-взаємодіями хромофорів. Величини рівноважних констант гетероасоціації для взаємодії FMN з NOG, DAU, NOR та актиноміцином D приймали проміжні за величиною значення між константами рівноваги самоасоціації окремих молекул. У той же час значення констант гетероасоціації для взаємодії FMN з NOV, EB, PF були більше, ніж відповідні константи самоасоціації, які показали, що гетероасоціація цих ароматичних БАР енергетично більш вигідна. Кількісний аналіз термодинамічних параметрів взаємодії FMN з цими БАР, доповнений прямою структурною інформацією,

отриманою з двовимірних ЯМР-спектрів, підтвердив гіпотезу про додаткову стабілізацію гетерокомплексів міжмолекулярним водневим зв'язком.

Не зважаючи на те, що в літературі з'являються нові факти про процеси само- і гетероасоціації ароматичних сполук, проблема прояву біологічної активності будь-якої ароматичної сполуки в присутності другого ароматичного ліганду до сих пір не вирішена. Зокрема, недостатньо вивчені механізми зв'язування БАР з ДНК (при протекторній дії), стабільність асоціатів (при інтерцепторній дії), роль водневих зв'язків і вплив молекул води на стабільність агрегатів ароматичних БАР.

Таким чином, для встановлення структурних особливостей само- і гетероасоціатів біологічно активних ароматичних речовин в представленій дисертаційній роботі були поставлені і вирішені наступні завдання.

1. За допомогою методу ІЧ-спектроскопії провести порівняльне вивчення самоасоціації та гідратації FMN у плівках, вирощених з нейтральних і слабокислих розчинів, рН яких впливає на заряди атомів хромофору (ізоалоксазинового кільця) і фосфатних груп.
2. Для встановлення центрів зв'язування протонів провести порівняльний аналіз у нейтральній і протонованій формі FMN смуг поглинання в області $1450\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, пов'язаних з внутрішньокільцевими коливаннями атомів C–C, C–N₁ і C–N₅ ізоалоксазинового кільця.
3. Для виявлення Н-зв'язків та їх вкладу в загальну енергію стабілізації гетерокомплексів отримати і проаналізувати коливальні спектри (ІЧ- і КР-спектри) функціональних груп атомів (C=O і NH₂) різних БАР та їх сумішей в умовах, наближених до фізіологічних.
4. За допомогою моделювання методом Монте Карло визначити міжмолекулярні Н-зв'язки в системах, які містять гетеродимери ароматичних біологічно активних лігандів FMN-EB, FMN-PRF, TPH-EB, EB-CAF, FMN-TPH, PRF-TPH з явним урахуванням молекул води.

5. Методами спектроскопії КР світла дослідити зв'язування ЕВ з тимусною ДНК при низьких і високих значеннях співвідношень концентрацій ліганд/ДНК; визначити вплив водневих зв'язків на молекулярні механізми зв'язування ЕВ з ДНК при утворенні комплексів за типом інтеркаляції та зовнішнього зв'язування, а також виявити структурний стан ДНК при щільному її заповненні лігандом.

Висновки до розділу 1

1. Наведено загальну характеристику ароматичних біологічно активних речовин, зокрема мутагенів профлавіну та бромистого етидію, метилксантинів кофеїну та теофіліну та аналогу вітаміну В₂ флавінмононуклеотиду.
2. Дано загальну характеристику інтерцепторним властивостям і біологічно важливим комбінаціям ароматичних БАР.
3. Детально розглянуто самоасоціацію і гетероасоціацію біологічно активних речовин у водних розчинах. Наведено загальні уявлення про особливості самоасоціації флавінмононуклеотиду.
4. Проаналізовано існуючі методи дослідження само- і гетероасоціації БАР і визначено роль води і Н-зв'язків у стабілізації асоціатів БАР і комплексів БАР з ДНК. Зокрема, розглянуто спектроскопічні методи дослідження само- і гетероасоціації ароматичних БАР.
5. Проведено аналіз робіт, присвячених проблемам визначення міжмолекулярних Н-зв'язків в асоціатах ароматичних БАР.
6. Окреслено коло невирішених питань, які стосуються проблеми асоціації ароматичних молекул і стабілізації само- і гетероасоціатів у водному розчині.

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ТА РОЗРАХУНКОВІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ

2.1 Коливальна спектроскопія: ІЧ- і КР-спектри. Прояв Н-зв'язків

Коливальна спектроскопія є одним з найбільш інформативних методів для вивчення структури внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій у полімерах і біополімерах [34, 171-173]. У багатьох випадках коливальний спектр є специфічним, що дозволяє досліджувати будову багатоатомних молекул та їх властивості. Коливальні спектри молекул експериментально вивчаються методами інфрачервоної спектроскопії та спектроскопії комбінаційного розсіювання світла. Ці спектри пов'язані з переходами між коливальними енергетичними станами або, в класичній інтерпретації, з коливаннями атомів у молекулі.

Для вимірювання всіх коливальних частот молекули зазвичай застосовують спільне використання ІЧ- і КР-спектрів, які доповнюють один одного. Методи ІЧ- і КР-спектроскопії ґрунтуються на різних фізичних процесах і підкоряються своїм специфічним правилам відбору. Однак деякі частоти можуть проявлятися як в ІЧ-спектрах, так і в КР-спектрах, тому що інформація, яку дають ці два методи, залежить від симетрії та полярності молекул. Симетричні коливання і неполярні групи вивчають за допомогою спектроскопії КР, а антисиметричні коливання і полярні групи – за допомогою ІЧ-спектроскопії.

2.1.1 Спектральні параметри ІЧ-смуг поглинання

Метод інфрачервоної спектроскопії заснований на тому, що при проходженні ІЧ випромінювання через речовину відбувається його

поглинання на частотах, що збігаються з деякими власними коливальними та обертальними частотами молекул. Це поглинання відбувається тільки при зміні дипольного моменту молекули, що коливається. Основними параметрами смуги поглинання є частота в максимумі поглинання, інтенсивність і напівширина. В ІЧ-спектроскопії зазвичай користуються частотою, вираженою в зворотніх сантиметрах (см^{-1}).

Колівальні спектри відповідають коливальному руху ядер одне щодо одного з певною частотою. У разі двоатомної молекули, що має одне нормальне коливання n , у наближенні гармонічного осцилятора частоту можна визначити за формулою [174]:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (2.1)$$

де

k – силова постійна;

μ – приведена маса:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}, \quad (2.2)$$

де

m_1 і m_2 – маси атомів, що коливаються.

У разі багатоатомної молекули частота кожного нормального коливання також визначається цим виразом, але відношення $\sqrt{\frac{k}{\mu}}$ в рівнянні (2.1) є складною функцією мас, координат атомів і силових постійних для всіх хімічних зв'язків. В експериментальному спектрі кількість смуг збільшується за рахунок фактор-групового розщеплення та міжмолекулярної взаємодії молекули з оточенням [175]. Для нелінійної багатоатомної молекули кількість нормальних коливань n залежить від числа атомів N і визначається як $n = 3N - 6$.

Нормальні коливання поділяються на валентні ν і деформаційні δ . У разі валентних коливань відбувається зміна довжини зв'язку уздовж її осі, при цьому розрізняють валентні симетричні та асиметричні коливання. Деформаційні коливання супроводжуються зміною кута між зв'язками (рис. 2.1).

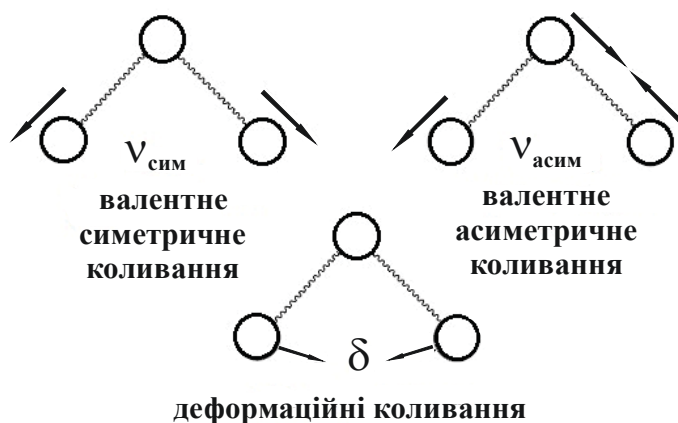


Рисунок 2.1 Типи нормальних коливань

Важливою характеристикою смуги поглинання є інтенсивність, відповідальна за електронно-оптичний стан зв'язку. Визначивши її значення, можна обчислити величину дипольного моменту зв'язку та його похідну по коливальних координатах. Ці дані дозволяють зробити висновки про природу хімічного зв'язку в молекулі, розподіл зарядів на атомах, структурні зміни і міжмолекулярні взаємодії. В основі вимірювання інтенсивності лежить закон Бугера-Ламберта-Бера [175]:

$$D(\nu) = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\nu) \cdot c \cdot l, \quad (2.3)$$

де

$D(\nu)$ – інтенсивність при поточній частоті;

I_0 та I – інтенсивності падаючого світлового потоку та світлового потоку, що пройшов;

$\varepsilon(\nu)$ – молярний коефіцієнт екстинкції;

c – концентрація речовини;

l – товщина поглинаючого шару.

Інтегральна інтенсивність B визначається як площа під кривою поглинання:

$$B = 2,3 \int \varepsilon(\nu) d\nu . \quad (2.4)$$

При дослідженні міжмолекулярної взаємодії важливими параметрами є частота коливання, інтенсивність і напівширина смуги поглинання, викликана коливаннями атомів, що утворюють водневий зв'язок. Відомо, що в ІЧ-діапазоні формування Н-зв'язку між донорами протонів (групи атомів ОН, NH, NH₂, CH) та акцепторами (групи атомів C=O, C–O, C–N, C=N) супроводжується низькочастотним зсувом, а також зростанням інтенсивності та збільшенням напівширини смуг поглинання валентних коливань. У той же час смуги поглинання деформаційних коливань (наприклад, NH₂ і ОН-груп атомів) зазнають високочастотні зрушення [125, 176]. Інтенсивність смуг поглинання карбонільної групи завжди досить велика. Чим більшу електронегативність має група X в системі R–CO–X, тим вище буде частота коливання. Чим сильніше сполучення зв'язку C=O, тим більшою мірою вона ослаблена, а валентне коливання зсунуто в бік менших хвильових чисел. Утворення водневого зв'язку призводить до зміщення відповідної смуги валентних коливань C=O групи до більш низьких частот [177]. Метод ІЧ-спектроскопії є головним методом вивчення Н-зв'язку.

Експериментальні дослідження великої кількості молекул, що мають однакові хімічні групи, показали, що, незалежно від змін в іншій частині молекули, ці однакові групи поглинають у вузькому інтервалі частот. Такі частоти називають характеристичними. До них відносяться, наприклад, коливання груп CH, CH₂, CH₃, О–Н, N–Н, NH₂, C=C, C=O, NO₂ та ін. Наявність групових частот викликано тим, що в такому коливанні найбільшу участь приймає деяка група атомів, внесок решти молекули малий, хоча в

кожному коливанні змінюються довжини всіх зв'язків і величини кутів між зв'язками. У табл. 2.1 наведено деякі характеристичні частоти різних груп.

Таблиця 2.1

Деякі характеристичні коливання різних груп атомів [178]

Коливання*	Область (см ⁻¹)
$\nu(\text{O-H})$	3650-3000
$\nu(\text{N-H})$	3500-3300
$\nu(=\text{C-H})$	3100-3000
$\nu(-\text{C-H})$	3000-2800
$\nu(\text{C=O})$	1820-1650
$\nu(\text{C=C})$	1900-1500
$\nu(\text{C=N})$	1680-1610
$\nu(\text{N-N})$, аліфатичний замінник	1580-1550
$\nu(\text{N-N})$, ароматичний замінник	1440-1410
$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta_a(\text{CH}_3)$	1470-1400
$\delta_c(\text{CH}_3)$	1380
$\nu(\text{CC})$, ароматичні сполуки	1600, 1580, 1500, 1450, 1000

* ν – валентне коливання, δ – деформаційне коливання, δ_a – асиметричне коливання, δ_c – симетричне коливання

Численні дослідження ІЧ-спектрів нуклеїнових кислот [107, 179, 180] показали, що формування структур стопок азотистих основ супроводжується зменшенням інтенсивності внутрішньо- та зовнішньокільцевих коливань C=N і C=O -груп атомів (інфрачервоний гіпохромізм). Подібні ефекти можна пояснити, використовуючи теорію молекулярних екситонів [181]. Енергія коливального екситонного збудження дорівнює:

$$\Delta E_0^f = \Delta E_0 + A + \varepsilon_{\text{рез}}^f, \quad (2.5)$$

де

ΔE_0 – енергія збудження коливальної групи в ізольованій молекулі;

A – різниця коливальної енергії взаємодії збудженої та нормальної коливальних груп з усіма іншими групами в молекулі;

$\varepsilon_{рез}^f$ – енергія резонансної взаємодії для коливання з типом симетрії f .

Якщо припустити, що частота незбуреного коливання:

$$\nu_0 = \frac{1}{h}(\Delta E_0 + A), \quad (2.6)$$

то, відповідно до рівняння (2.5), частота переходу дорівнює:

$$\nu^f = \nu_0 + \frac{1}{h} \varepsilon_{рез}^f, \quad (2.7)$$

де

h – постійна Планка, яка дорівнює $6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с.

У реальних умовах (наприклад, в розчинах води) на частоту карбонільного коливання, крім резонансної взаємодії, впливає водневий зв'язок, який утворюється між атомом кисню С=О груп і атомом водню (в складі молекул води або інших молекул). У рамках моделі слабозв'язаних осциляторів [182], з урахуванням утворення водневого зв'язку та резонансної взаємодії, частоту смуги поглинання С=О групи атомів у ІЧ-спектрах поглинання можна записати як:

$$\nu = \nu_0 - \Delta \nu_{H-3\theta} \pm \Delta \nu_{рез}, \quad (2.8)$$

де

ν_0 – частота незбуреного карбонільного коливання;

$\Delta \nu_{H-3\theta}$ – зміщення частоти за рахунок утворення Н-зв'язку;

$\Delta \nu_{рез}$ – резонансний зсув.

Резонансний зсув визначається так [183]:

$$\Delta \nu_{рез} = 2 (\Delta \nu_{11,12} \cos \varphi + \Delta \nu_{11,13} \cos 2\varphi + \dots + \Delta \nu_{11,k} \cos k\varphi), \quad (2.9)$$

де

k – кількість карбонільних груп в агрегаті;

$\Delta\nu_{11,12}$ – зміщення частоти C=O коливання за рахунок резонансної взаємодії карбонільних груп у положенні 11, 12 і т.д.;

φ – кут повороту моментів переходу сусідніх карбонільних груп.

Зазвичай при розрахунку резонансної (динамічної) взаємодії коливальних моментів переходу використовують диполь-дипольне наближення [107, 183, 184]. У згорнутому вигляді резонансний частотний зсув у простому випадку двох взаємодіючих коливальних груп (рис. 2.2) запишеться так [183]:

$$\Delta\nu_{рез} = \frac{M}{h\varepsilon} \cdot \frac{\cos\varphi - 3\cos\beta\cos\gamma}{R^3} = \frac{M}{h\varepsilon} \cdot G, \quad (2.10)$$

де

G – геометричний фактор, що залежить від розташування диполів у агрегаті;

$M = \left| \frac{\partial\vec{\mu}_1}{\partial S_1} \right| \cdot \left| \frac{\partial\vec{\mu}_2}{\partial S_2} \right|$ – добуток дипольних моментів переходу, які визначаються з

абсолютних інтенсивностей смуг поглинання в інфрачервоному спектрі;

S_1 і S_2 – валентні координати;

R – відстань між диполями;

ε – діелектрична постійна.

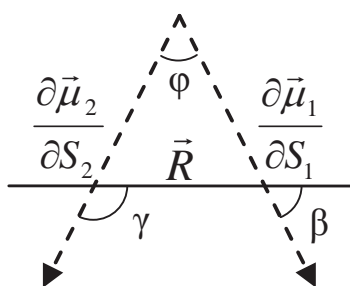


Рисунок 2.2 Схема взаємодії
дипольних моментів переходу

2.1.2 Техніка отримання ІЧ-спектрів

ІЧ-спектри досліджуваних речовин реєструвалися за допомогою двопробеневого спектрометра UR-20 (Karl Zeiss, Jena, Німеччина) з використанням призми NaCl. Оптимальна ширина щілини відповідала щілинній програмі 6,0, швидкість сканування – 50 см⁻¹/с. Для запобігання

розігріву зразка використовувався германієвий фільтр, поміщений до камери глобару. Для запису спектрів поглинання розчинів було використано кювети з флюоритовими віконцями з товщиною робочого шару 50 мкм, зроблені за моделлю, запропонованою Фішманом [185].

ІЧ-спектри плівок були отримані за допомогою розробленої раніше герметичної кювети [186]. Плівки вирощувалися при температурі 4°C шляхом повільного випаровування води з розчинів досліджуваних речовин, розміщених на горизонтально розташованій підложці. В якості підложки використовувалися віконця спектроскопічної кювети, виготовлені з флюориту (CaF_2). Використання флюориту обумовлено тим, що цей матеріал практично не поглинає у широкій спектральній області ($1200\text{-}5000\text{ см}^{-1}$) і не розчиняється у воді. Флюоритове віконце з плівкою поміщали до герметичної кювети.

Дейтерування і зволоження плівкових зразків до 92% відносної вологості (ВВ) здійснювали за допомогою насичених у D_2O розчинів набором солей, як описано в роботі [100]. Рівноважний стан по вологості та дейтерування досягалися протягом 1-2 діб.

Значення частоти ν та оптичної щільності D отримувались усереднюванням результатів не менше десяти незалежних експериментів з декількома вимірами в кожній точці. Достовірність визначення частот перевірялася за допомогою спектра еталонної плівки полістиролу. Помилка визначення оптичної щільності становила не більше 2%, а частот – $\pm 1\text{ см}^{-1}$.

Детальний аналіз ІЧ-спектрів у області поглинання карбонільних груп $\text{C}=\text{O}$ ($1600\text{-}1800\text{ см}^{-1}$) і внутрішньокільцевих $\text{C}=\text{N}$ коливань ($1450\text{-}1600\text{ см}^{-1}$) проводили шляхом побудови залежностей частот ν та інтенсивностей R (у відносних одиницях) від числа сорбованих молекул води N на моль досліджуваної речовини, використовуючи раніше розроблену методику для плівок нуклеїнових кислот [98]. Відносну інтенсивність визначали як:

$$R = \frac{D_i}{D_0}, \quad (2.11)$$

де

D_i і D_0 – оптичні щільності в максимумі поглинання при i -тій та нульовій довжині хвилі, відповідно.

Число сорбованих молекул N взято з ізотерм гідратації. Оптична щільність D визначалася методом базової лінії [187], за яку брали значення D при частоті $\nu = 1800 \text{ см}^{-1}$.

2.1.3 Спектроскопія комбінаційного розсіювання

Спектроскопія комбінаційного розсіювання світла є ще одним методом, що дозволяє отримати інформацію про коливальні стани молекул. Для появи КР-смуг необхідно, щоб рухи ядер призводили до зміни поляризованості, а не постійного дипольного моменту, як у випадку ІЧ-спектрів. Основною перевагою спектроскопії КР є те, що вода тут поглинає досить слабо. Отже, метод зручний при вивченні біологічних систем у водних розчинах.

Спектроскопія КР заснована на непружному розсіянні фотонів. Припустимо, що на молекулу падає випромінювання з енергією $h\nu_0$ (h – постійна Планка, ν_0 – частота падаючого кванта). Велика частина випромінювання у разі непоглинаючої речовини буде проходити крізь неї. Невелика частина випромінювання буде пружно розсіюватися. Цей процес можна представити як збудження молекули до віртуального стану з енергією $h\nu_0$ і повернення її в основний стан (релеївське розсіювання). Молекула, що знаходиться у збудженому стані з енергією E_0 , під дією кванта з енергією $h\nu_0$ збуджується до проміжного (віртуального) стану з енергією $E_{\text{вирт}}$, звідки може або повернутися до початкового стану, випустивши квант $h\nu_0$ (релеївське розсіювання), або перейти до стану E_i , випустивши квант $h(\nu_0 - \nu_i)$, що

призводить до появи у спектрі розсіяного випромінювання ліній з частотами $\nu_0 - \nu_i$ (стоксові лінії) (рис. 2.3).

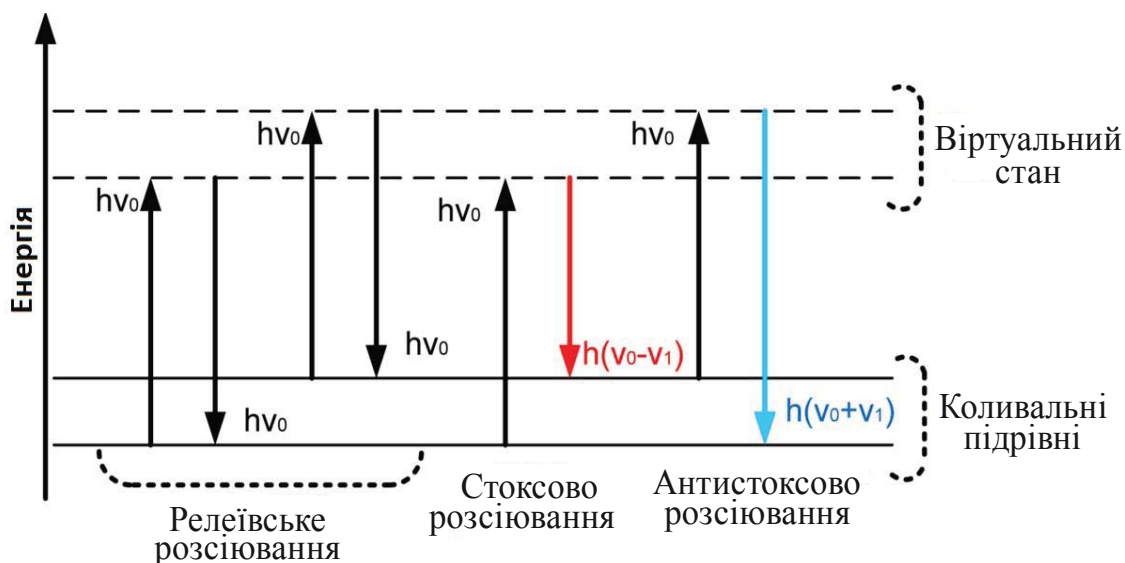


Рисунок 2.3 Схема переходів молекули на різні енергетичні рівні

Якщо до поглинання фотона молекула перебувала у збудженому стані з енергією E_i , то після розсіювання світла вона може перейти як до початкового, так і до основного стану E_0 , тоді енергія розсіяного світла зростає, складаючи $h(\nu_0 + \nu_i)$, що призводить до появи у спектрі ліній з частотами $\nu_0 + \nu_i$ (антистоксові лінії). Енергетичний стан речовини характеризує різниця енергій збуджуючого і розсіяного світла $E_i + h\nu_i$, тобто, найважливішою характеристикою спектрів КР є не самі частоти, а їх зсув відносно частоти релеївської лінії (рис. 2.3).

Сутність явища комбінаційного розсіювання можна пояснити у рамках квантової теорії випромінювання [174]. Якщо помістити молекулу в постійне електричне поле, то позитивно заряджені ядра притягуватимуться до негативного полюса, а електрони – до позитивного, що призведе до деформування молекули. Таке розділення центрів зарядів призведе до формування наведеного електричного дипольного моменту, тобто молекула поляризується. Величину наведеного диполя μ можна записати як:

$$\mu = \alpha E , \quad (2.12)$$

де

α – поляризованість молекули;

E – напруженість прикладеного поля.

Коли молекули потрапляють в поле випромінювання частоти ν , кожна з них опиняється в електричному полі, що змінюється за законом:

$$E = E_0 \sin 2\pi\nu t , \quad (2.13)$$

отже, наведений дипольний момент також осцилює з частотою ν :

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \sin 2\pi\nu t . \quad (2.14)$$

Осцилюючий диполь випромінює з частотою падаючого на нього випромінювання. Таким чином, у формулі (2.14) міститься класичне пояснення релєївського розсіювання.

Якщо ж у молекулі відбуваються деякі внутрішні рухи (наприклад, коливання або обертання), які періодично впливають на поляризованість, то осцилюючий диполь буде додатково відчувати коливальні або обертальні осциляції. Вплив коливання частоти $\nu_{\text{кол}}$ на поляризованість можна записати так:

$$\alpha = \alpha_0 + \beta \sin 2\pi\nu_{\text{кол}} t , \quad (2.15)$$

де

α_0 – рівноважна поляризованість;

β – характеризує швидкість зміни поляризованості при коливанні.

Тоді маємо:

$$\mu = \alpha E = (\alpha_0 + \beta \sin 2\pi\nu_{\text{кол}} t) E_0 \sin 2\pi\nu t , \quad (2.16)$$

і з урахуванням тригонометричного співвідношення

$\sin A \sin B = \frac{1}{2} [\cos(A - B) - \cos(A + B)]$ в остаточному вигляді можна записати:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \sin 2\pi \nu t + \frac{1}{2} \beta E_0 [\cos 2\pi(\nu - \nu_{\text{кол}})t - \cos 2\pi(\nu + \nu_{\text{кол}})t]. \quad (2.17)$$

З формули (2.17) видно, що у диполя, який осцилює, поряд зі збуджуючою частотою ν з'являються компоненти з частотою $\nu \pm \nu_{\text{кол}}$ (відповідно стоксові та антистоксові лінії). Отже, для прояву комбінаційного розсіювання молекулярне обертання або коливання повинно викликати зміну будь-якої складової поляризованості молекули.

У разі, коли частота збуджуючого світла близька до частоти поглинання зразка, спостерігається ефект прирезонансного КР [188]. У цьому випадку поляризованість на цій частоті буде визначатися в основному поляризованістю поглинаючої речовини. Внаслідок цього інтенсивність смуг комбінаційного розсіювання, що відносяться до коливань цієї речовини, різко зросте. Цей ефект дозволяє вивчати коливальні спектри окремих хромофорів навіть при наявності величезного числа інших коливань.

2.1.4 Техніка отримання спектрів КР

Спектри КР досліджуваних речовин були записані за допомогою спектрометра DILOR Z-16 (Франція) з подвійним монохроматором. Градування спектрометра здійснювалося по частотах спектру CCl_4 [178]. У роботі використовували аргонний лазер з лінією збудження $\lambda = 488$ та $514,5$ нм. Досліджувані розчини поміщали до квадратних кварцових кювет з довжиною оптичного шляху світла 10 мм та герметизували. Потужність лазерного випромінювання не перевищувала 20-25 мВт, що не викликало фото- та теплоруйнування зразків. Спектральна ширина щілини становила $4,5 \text{ см}^{-1}$, швидкість сканування $30 \text{ см}^{-1}/\text{хв}$. Точність відтворення смуг спектрів КР була у межах $\pm 2 \text{ см}^{-1}$. Спектри досліджуваних речовин записували при кімнатній температурі ($t = 20\text{-}22^\circ\text{C}$). Усі спектри було отримано усередненням не менш десяти вимірювань в однакових експериментальних умовах.

2.2 Метод п'єзогравіметрії для отримання ізотерм гідратації

Для визначення числа молекул води N , сорбованих зразками при заданій відносній вологості (ВВ), застосовувався метод п'єзогравіметричного мікрозважування з використанням розробленої раніше установки [189, 190]. Головними перевагами цього методу є відсутність впливу навколишнього середовища, висока (близько нанограмів) чутливість і мала витрата досліджуваної речовини $\sim 10^{-5}$ г.

П'єзогравіметричний метод отримання ізотерм гідратації речовин заснований на визначенні залежності зміни резонансної частоти Δf кварцового резонатора від маси речовини m , нанесеного на поверхню кварцової пластини [191]:

$$\Delta f = \frac{-f_0^2 K m}{n \rho A}, \quad (2.18)$$

де

f_0 – резонансна частота;

ρ – щільність кварцової пластини;

A – площа кварцової пластини;

n і K – постійні кварцу.

Значення K залежить від розподілу маси по поверхні кварцу і зазвичай дорівнює ≈ 1 , якщо речовина рівномірно розподілена по контакту пластини.

Згідно з виразом (2.18) навіть незначне збільшення маси δm за рахунок адсорбції води на плівці викликає відповідну зміну частоти δf у кристалі, тоді:

$$\frac{\delta f}{\Delta f} = \frac{\delta m}{\Delta m}. \quad (2.19)$$

Використовуючи це співвідношення, визначаємо середнє число молей води на моль досліджуваної речовини за формулою:

$$N = \frac{M_{\text{реч}} \cdot \delta f}{M_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \Delta f_m}, \quad (2.20)$$

де

$$\delta f = \Delta f_i - \Delta f_m;$$

Δf_i – поточне значення різницевої частоти між опорним і вимірювальним кварцовими резонаторами при i -тій вологості;

Δf_m – зміна різницевої частоти, викликана сухим зразком;

$M_{\text{реч}}$ – молекулярна маса досліджуваної речовини;

$M_{\text{H}_2\text{O}}$ – молекулярна маса води.

Для п'єзогравіметричного дослідження плівки речовин, що вивчаються, отримували з концентрованого розчину, який наносили у вигляді мікрокраплі на контакти кварцового резонатора і сушили у вакуумній камері під тиском 10^{-3} Торр. Зволоження плівок здійснювалося шляхом дозованої подачі парів двічі дистильованої та дегазованої води до камери. Помилка визначення кількості сорбованої води в інтервалі ВВ до 70% становила 0,05 молекул води на молекулу досліджуваної речовини, вище 70% – 0,5 молекул води. Виміри проводилися при температурі 20°C.

Ізотерми гідратації записувалися у вигляді залежності кількості сорбуємої зразком води N (у $\Gamma_{\text{H}_2\text{O}}/\Gamma_{\text{реч}}$ або в $M_{\text{H}_2\text{O}}/M_{\text{реч}}$) від відносної вологості (%).

2.3 Моделювання методом Монте Карло та оптимізація геометрії і розрахунок атомних зарядів БАР

Одним із сучасних методів визначення Н-зв'язків на молекулярному рівні є дані квантово-хімічних розрахунків з використанням Теорії функціоналу густини (DFT) та Бейдерівського аналізу (AIM аналіз [138, 192]). Відповідно до теорії AIM, Н-зв'язок повинен відповідати певним значенням електронної густини між атомом водню та атомом-акцептором на

топологічній карті електронної густини ($0,002 \div 0,035$ au) і лапласіана електронної густини ($0,024 \div 0,139$ au) [134, 135]. Інші критерії засновані на змінах властивостей взаємодіючих атомів (зарядів, поляризаційних моментів, радіусів) і порівнянні з аналогічними властивостями невзаємодіючих атомів. За допомогою такого підходу визначено, зокрема, утворення неklasичних C–H...O зв'язків у нуклеотидах та їх протонованих формах [132, 135, 193].

Недоліком цих методів оцінки можливості утворення H-зв'язків є моделювання відносно невеликих систем (не більше 100-150 атомів) у газовій фазі, що не відповідає умовам експериментів у водному розчині. Більш адекватним може бути використання методів молекулярної динаміки та методу Монте Карло (МС), які дозволяють в явному вигляді врахувати роль розчинника у формуванні стабільних асоціатів ароматичних молекул і на атомному рівні визначити структуру та обчислити енергетичні характеристики само- і/або гетероасоціатів, що утворюються [120, 121, 139, 144, 194-197].

Були досліджені системи, що містять стекінг-асоціати біологічно активних ароматичних сполук (гетеродимери) і водні кластери різного розміру. У МС комп'ютерному експерименті розрахунки були виконані у канонічному (N, V, T) ансамблі у рамках алгоритму Метрополіса при 298 K [198]. Кожна система «гетеродимер + вода» містила 800 молекул води. Початкові структури гетероасоціатів для МС моделювання були отримані з ЯМР даних (Evstigneev M.P., personal communication). До вивчення гідратації стекінг-гетеродимерів у водному кластері було знайдено конфігурації гетероасоціатів у вакуумі за допомогою процедури МС оптимізації. В якості стартових структур взято найбільш енергетично вигідні конфігурації. У процесі моделювання одна з молекул у стекінг-гетеродимері зміщувалася згідно з алгоритмом Метрополіса.

Енергії взаємодії гетеродимер-вода і ліганд-ліганд апроксимувались за допомогою атом-атомних потенційних функцій 1-6-12 (атом-атомні потенційні функції Маленкова-Полтєва) [97, 143, 199]:

$$U_{ij} = \sum_{i,j} \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + B_{ij} r_{ij}^{-12} - A_{ij} r_{ij}^{-6} \right], \quad (2.21)$$

де

q_i, q_j – парціальні заряди на атомах;

r_{ij} – відстані між i та j атомами.

Параметри цієї функції A_{ij}, B_{ij} відтворюють довжини Н-зв'язків між молекулами води та нуклеотидами або лігандами (наприклад, CAF), а також експериментальні положення молекул води в кристалогідратах цих молекул.

Енергія взаємодії вода-вода була апроксимована за допомогою потенційної функції 1-6- \exp [199, 200]:

$$U_{ij} = \sum_{i,j} \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + B_{ij} \exp(-C_{ij} r_{ij}) - A_{ij} r_{ij}^{-6} \right], \quad (2.22)$$

де

q_i, q_j – парціальні заряди на атомах;

r_{ij} – відстані між i та j атомами.

Параметри цієї функції A_{ij}, B_{ij} і C_{ij} обрані так, щоб відтворювалися енергії гексагональної кристалічної решітки льоду і силова постійна деформації Н-зв'язків. Сумування виконується по всім парам атомів i та j . Модель молекули води Маленкова [200, 201], що використовується у розрахунках, відтворює термодинамічні та структурні особливості рідкої води, отримані експериментально.

Повна енергія взаємодії обчислювалася як сума енергій взаємодій вода-вода, ліганд-вода та ліганд-ліганд.

В якості граничних умов використовувалося кластерне наближення [202, 203]. При такому підході система містилася в сферу з непроникними стінками таким чином, щоб центр мас розчиненої речовини збігався з центром сфери. Спочатку в сферу поміщалося тільки конфігурація з N молекул води. Ця конфігурація генерується за допомогою спеціальної

програми для створення енергетично вигідної структури водного кластеру певного розміру. Радіус сфери дорівнює радіусу, отриманому для водного кластера відповідного розміру та має густину, відповідну густині води при нормальних умовах (температурі 298 К та тиску 1 атм). Потім у водній «краплі» формувалася порожнина, необхідна для розташування димера в центрі сфери, а радіус сфери збільшувався на величину, необхідну для розміщення молекул води, «витиснутих» димером.

Довжина ланцюга Маркова, що генерується, налічувала до $5-7 \times 10^6$ елементарних кроків до досягнення стаціонарної області. В області усереднення було отримано $4-6 \times 10^6$ елементарних конфігурацій для розрахунку термодинамічних характеристик досліджуваних систем у рівноважному стані. Статистична помилка, викликана кінцевим числом розглянутих конфігурацій, розрахована з використанням методу контрольних функцій. Значення статистичної помилки не перевищувало $\pm 0,005$.

Для отримання інформації про Н-зв'язки, що формуються у гетеродимерах і/або між молекулами води і стекінг-асоціатами, проводилося МС моделювання ($1-2 \times 10^3$ елементарних конфігурацій) при 5 К («заморожені – frozen» або F-структури). Н-зв'язки в F-структурах визначалися відповідно до геометричних та енергетичних критеріїв [204].

Оптимізація геометрії та розрахунок атомних зарядів вільних лігандів виконувались за допомогою DFT/B3LYP/6-31G(d) з використанням програм GAMESS [205] для CAF (загальний заряд 0), THP (загальний заряд 0), PRF (загальний заряд +1), EB (загальний заряд +1) та Orca [206] для FMN (загальний заряд -2). Заряди на атомах отримані за допомогою схеми Merz-Kollman-Singh розподілу зарядів. Структурні формули CAF, THP, PRF, EB і FMN, нумерація атомів і заряди, які використовувалися в моделюванні методом Монте Карло, наведені у додатку В, рис. В.1-В.5, табл. В.1-В.5.

2.4 Приготування зразків для дослідження

У роботі використовували ліганди флавінмононуклеотид і бромистий етидій фірми "Fluka", ліганди профлавін, кофеїн і теофілін фірми "Sigma", структурні формули яких наведені на рис. 1.2, 1.3 і 1.4, і ДНК з тимуса теляти ("Serva", ФРН). Усі препарати використовувалися без додаткового очищення. Концентрації розчинів БАР визначали з використанням молярних коефіцієнтів екстинкції: для FMN $\epsilon_{445} = 12500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [207], для PRF $\epsilon_{444} = 41000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [208], для EB $\epsilon_{480} = 5860 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ і для ДНК $\epsilon_{260} = 6400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [209], а також для CAF $\epsilon_{270} = 10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [210]. Концентрацію ТРН визначали за вагою ($M = 180,16 \text{ г/моль}$).

Через сильне поглинання ОН-груп у водних розчинах легкої води (H_2O) вивчення Н-зв'язку типу $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ або $\text{N}-\text{H}\cdots\text{N}$ зазвичай ускладнено. У цьому випадку дослідження Н-зв'язку проводяться у водних розчинах важкої води (D_2O), в яких відбувається суттєвий низькочастотний ізотопний зсув валентних і деформаційних коливань групи OD, що дозволяє провести аналіз поведінки валентних коливань виключно акцептора (наприклад, карбонільної групи $\text{C}=\text{O}$).

Розчини для ІЧ-спектроскопічних досліджень готували в D_2O (99,8% чистоти), нейтральне значення рН ($\text{pH} = 6,9\div 7,1$) досягали додаванням малої кількості NaOD. Концентрація лігандів FMN, EB, CAF і ТРН у вільному стані та в сумішах становила $C = 1,3 \times 10^{-2} \text{ М}$, тоді як концентрація PRF через низьку розчинність становила $C = 7,7 \times 10^{-3} \text{ М}$. Для того щоб досягти рівномолярної концентрації компонентів у суміші FMN-PRF, концентрацію FMN також було доведено до $C = 7,7 \times 10^{-3} \text{ М}$. Всі розчини було поміщено до герметичних рідинних кювет. Оскільки смуга поглинання деформаційних коливань OD-групи знаходиться в області з максимумом поглинання 1200 cm^{-1} , це дозволило записати ІЧ-спектри досліджуваних БАР та їх сумішей у

спектральній області $1600-1750\text{ см}^{-1}$ без урахування внеску сильного поглинання води.

Для отримання ІЧ-спектрів поглинання плівок FMN готували розчини з концентрацією $C \approx 0,01\text{ М}$. Значення $\text{pH} = 6,0 \div 6,4$ отримували при додаванні парів розчину HCl , тоді як нейтральне значення ($\text{pH} = 6,8 \div 7,1$) досягалося додаванням малої кількості NaOH (для розчинів FMN у D_2O використовували DCl і NaOD , відповідно). Значення pH вимірювали за допомогою іоніміра І-115 (Antex, ТОВ, Росія) з точністю $\pm 0,05$.

Спектральні параметри смуг поглинання карбонільних коливань $\text{C}_2=\text{O}$ і $\text{C}_4=\text{O}$ були отримані розкладанням спектру за стандартною методикою [211]. Розрахунок резонансних частот карбонільних коливань виконувався так само, як у роботі [107].

Для отримання КР-спектрів гетерокомплексів усі розчини готувалися в стандартному фосфатному буферному розчині ($2,5 \times 10^{-2}\text{ М}$ KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-2}\text{ М}$ Na_2HPO_4) при $\text{pH} = 6,86$. Концентрація всіх досліджуваних речовин становила $C = 1,5 \times 10^{-5}\text{ М}$. Суміші гетероасоціатів готували в співвідношенні 1:1. Розчини БАР та їх сумішей поміщали до кварцових кювет квадратного перетину товщиною 10 мм і герметизували.

Комплекси ЕВ-ДНК для вимірювань методом КР готували при різних значеннях P/D (співвідношення мольних концентрацій ДНК і бромистого етидію), при цьому концентрація ліганду залишалася незмінною ($C_{\text{ЕВ}} = 1,1 \times 10^{-4}\text{ М}$). Усі розчини готувалися в стандартному фосфатному буферному розчині ($2,5 \times 10^{-2}\text{ М}$ KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-2}\text{ М}$ Na_2HPO_4) при $\text{pH} = 6,86$. Плівки ДНК отримували випаровуванням води при $t = 4^\circ\text{C}$ з розчину полінуклеотиду з $C_{\text{ДНК}} = 10^{-3}\text{ М}$. Для отримання А- та В-форм ДНК в герметично закриті кювету з плівкою ДНК поміщали відповідні розчини насичених солей для досягнення необхідного значення відносної вологості: NaCl – 76% ВВ і K_2SO_4 – 96% ВВ для А- та В-форм ДНК, відповідно [212-]

214]. Розчини ЕВ та його сумішей з ДНК, а також плівки ДНК поміщали до квадратних кварцових кювет (10 мм) і герметизували.

Висновки до розділу 2

1. Докладно описано фізичні принципи інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії і спектроскопії комбінаційного розсіювання (КР) та проведено їх порівняльний аналіз.
2. Розглянуто спектральні параметри смуг поглинання і описано техніку отримання ІЧ-спектрів.
3. Наведено базові принципи спектроскопії КР та описано методику отримання спектрів комбінаційного розсіювання.
4. Детально описано метод п'єзогравіметрії для отримання ізотерм гідратації.
5. Розглянуто теоретичні методи дослідження, які використовувалися для вивчення енергетичних характеристик біологічно активних речовин та їх комплексів.
6. Детально описано методику приготування зразків для досліджень.

РОЗДІЛ 3

САМОАСОЦІАЦІЯ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ В РОЗЧИНАХ І ПЛІВКАХ

Вивчення природи самоасоціації ароматичних молекул (тобто структури і термодинаміки комплексоутворення) є важливим етапом для розуміння механізмів взаємодії таких молекул з нуклеїновими кислотами та їх компонентами.

Аналог вітаміну B_2 (рибофлавіну), флавінмононуклеотид, є протетичною групою флавопротеїнів, які беруть участь у перенесенні водню та регуляції окислювально-відновних процесів. На відміну від рибофлавіну, флавінмононуклеотид добре розчиняється у водному середовищі, що дозволяє використовувати його в різних фізико-хімічних і біофізичних дослідженнях взаємодії вітаміну B_2 з різними сполуками.

Експериментальні дослідження самоасоціації ароматичного вітаміну B_2 та флавінмононуклеотиду виконувалися раніше тільки в розчині такими методами як ЯМР-спектроскопія, спектрофотометрія в УФ і видимій області та флюоресценція [54, 55, 59, 84], що дозволило визначити термодинамічні параметри самоасоціації та запропонувати просторову структуру димерного комплексу [55, 56, 84].

Флавінмононуклеотид функціонує в клітинах у конденсованому стані в якості коферменту деяких флавінозалежних дегідрогеназ. Тому дослідження особливостей фізико-хімічних характеристик FMN у вологих плівках становить інтерес для розуміння впливу його конденсованого стану на окислювальні функції, оскільки саме такий стан максимально наближений до природних умов функціонування FMN у живих системах.

3.1 ІЧ-спектроскопічний прояв самоасоціації FMN у плівках

ІЧ-спектри FMN у розчинах та у вологих плівках записано в області 1600-1800 cm^{-1} . Розчини для отримання плівок готувалися при нейтральних ($\text{pH} = 7$) і слабкокислих ($\text{pH} = 6,2$) середовищах.

На рис. 3.1 приведено ІЧ-спектри поглинання FMN у нейтральному водному розчині в D_2O (рис. 3.1 а) та у вологих плівках (рис. 3.1 б). Усі спектри було отримано усередненням 10 сканів, записаних при однакових умовах.

Видно, що в області поглинання 1600-1800 cm^{-1} наявні дві компоненти. Використовуючи віднесення смуг поглинання, наведені у роботах [215-217], високочастотну смугу поглинання з максимумом при $\nu_1 = 1704 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) можна віднести до коливань $\text{C}_4=\text{O}$ групи атомів, а низькочастотну смугу при $\nu_2 = 1653\text{-}1655 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) – до коливань карбонільної групи $\text{C}_2=\text{O}$ FMN (див. рис. 1.4). Зі спектрів видно, що для зразків FMN у розчинах і вологих плівках частоти коливань карбонільних груп $\text{C}_2=\text{O}$ і $\text{C}_4=\text{O}$ в межах експериментальної помилки ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) практично збігаються.

У неполярній рідині (хлороформі) смуги поглинання вільних від будь-яких Н-зв'язків груп $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$ мають більш високі значення частот 1710 cm^{-1} і 1685 cm^{-1} , відповідно [218]. У нейтральних водних розчинах і в плівках FMN (рис. 3.1) смуги поглинання цих карбонільних груп мають більш низькі частоти, що пов'язано з впливом водного оточення і наявністю сусідніх молекул FMN. Нами не виявлено високочастотних зрушень смуг поглинання карбонільних груп в самоасоціаті FMN [219], як при утворенні стопок азотистих основ нуклеїнових кислот [98, 103, 104] і кофеїну [105]. Очевидно, самоасоціація ізоалоксазинових кілець флавінмононуклеотиду пройшла таким чином, що динамічна взаємодія дипольних моментів переходу карбонільних коливань $\text{C}_2=\text{O}$ і $\text{C}_4=\text{O}$ виявилася неможливою. Цей висновок підтверджується результатами виконаного розрахунку динамічної

взаємодії карбонільних коливань у димерній моделі [56], які дали нульовий зсув смуг поглинання $C_2=O$ і $C_4=O$ груп атомів (див. нижче).

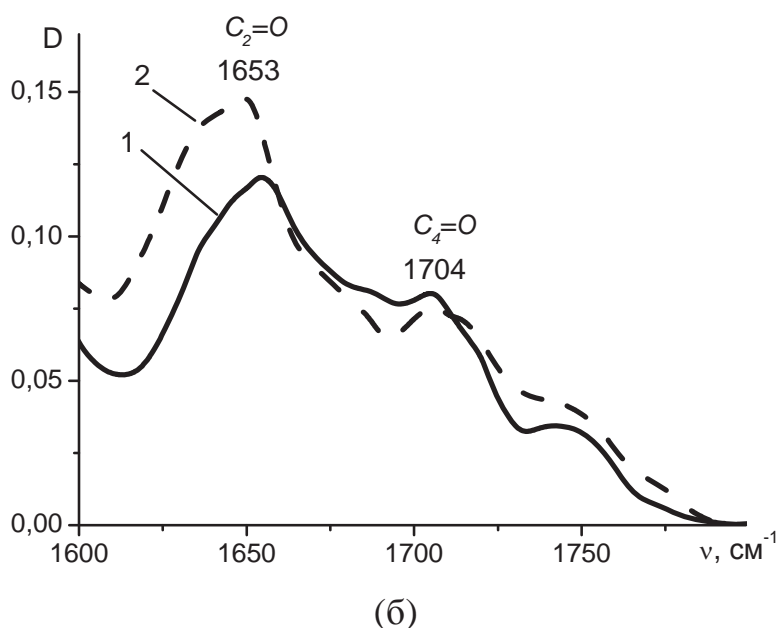
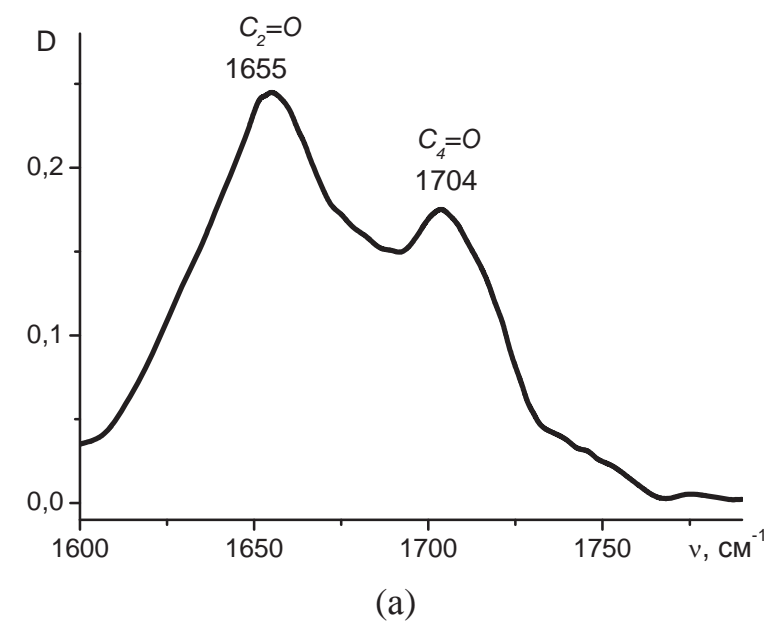


Рисунок 3.1 ІЧ-спектри поглинання FMN у D_2O розчині при $pH = 7,0$ ($\pm 0,05$) (а) і плівках (б), вирощених з розчинів з $pH = 6,9$ ($\pm 0,05$), при значеннях ВВ 32 % (1) і 86 % (2)

Також варто відзначити, що в нейтральному водному розчині, по аналогії з нуклеотидами, натрій-фосфатна група молекули FMN дисоціює, і негативний заряд на атомах кисню фосфатних груп, мабуть, впливає на

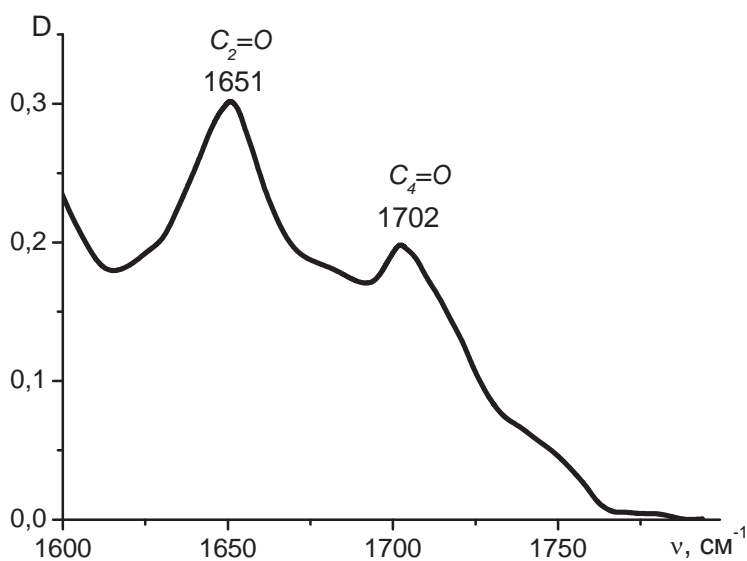
структуру самоасоціатів. У роботі [56] розглядається димерна модель з антипаралельним укладанням ізоалоксазинових кілець FMN, при якому фосфатні групи розташовуються далеко одна від одної. Таке розташування фосфатних груп практично виключає вплив їх кулонівської взаємодії (електростатичного відштовхування) на стабільність самоасоціатів FMN. Тому можна припустити, що наведена у роботі [56] структура самоасоціата FMN, в якій не реалізуються динамічні взаємодії карбонільних коливань і враховано зменшення електростатичного відштовхування фосфатних груп, узгоджується з отриманими нами результатами [219].

В умовах слабокислого середовища, як відомо, відбувається протонування ізоалоксазинового кільця по атому N₅ з pK = 5,2 [169] і нейтралізація фосфатної групи. Тому, в порівнянні з самоасоціатами, які утворюються в нейтральних середовищах [55, 56], у слабокислому водному розчині і в плівці, вирощеній зі слабокислого розчину, з великою ймовірністю можна очікувати утворення іншої структури стекінг-асоціатів FMN. На сьогоднішній день немає достовірних досліджень самоасоціації FMN в умовах слабокислого середовища. Також не досліджувався і вплив води на стабілізацію стекінг-асоціатів FMN. Тому нами було проведено дослідження ІЧ-спектрів, отриманих для слабокислих розчинів FMN і плівок, вирощених з них, у спектральній області карбонільних коливань 1600-1800 см⁻¹ [219].

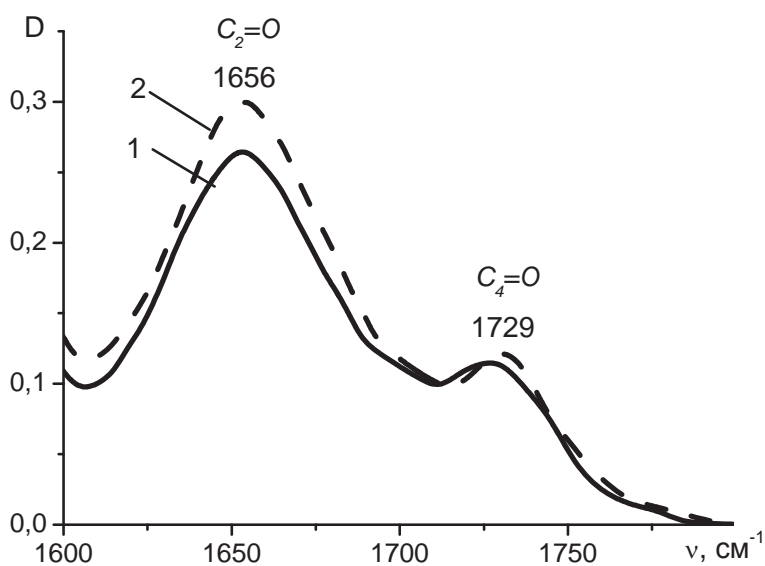
На рис. 3.2 представлено спектри FMN у D₂O розчині при pH = 6,4 і плівок, вирощених з розчину з pH = 6,2. Представлені спектри було отримано шляхом усереднення не менше 10 сканів, записаних при однакових умовах.

У плівках FMN, вирощених зі слабокислих розчинів (рис. 3.2 б), зафіксовано значну зміну спектрів в області поглинання карбонільних груп у порівнянні зі спектрами FMN у нейтральному середовищі (див. рис. 3.1) та зі спектром розчину при pH = 6,4 (рис. 3.2 а). Якщо частота коливання карбонільної групи C₂=O ($\nu_2 = 1656 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$) змінилася неістотно, то смуга поглинання C₄=O ($\nu_1 = 1704 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$) змістилася у височастотну

область до 1729 см^{-1} ($\pm 1\text{ см}^{-1}$), а її інтенсивність зменшилася, тобто для цієї смуги виявлено гіпохромізм.



(a)



(б)

Рисунок 3.2 ІЧ-спектри поглинання FMN у D_2O розчині при $\text{pH} = 6,4$ ($\pm 0,05$) (а) та плівках (б), вирощених з розчинів з $\text{pH} = 6,2$ ($\pm 0,05$), при значеннях ВВ 32% (1) і 80% (2)

Такий характер зміни спектральних параметрів коливання $\text{C}_4=\text{O}$, як і в разі поведінки смуг поглинання карбонільних коливань у стопках гетероциклів азотистих основ у полінуклеотидах [103, 104], може

пояснюватися динамічною взаємодією карбонільних коливань $C_4=O$, яка виникла в результаті стекінгу ізоалоксазинових кілець при утворенні самоасоціатів. Цікаво відзначити, що в слабокислих розчинах не виявлено високочастотних зсувів коливань $C_2=O$ і $C_4=O$ груп атомів (рис. 3.2 а). Це свідчить про те, що в слабкислому розчині якщо і відбулася самоасоціація FMN, то структура стекінг-асоціату і розташування ізоалоксазинових кілець іншого типу, ніж у плівках.

Для пояснення високочастотних зміщень смуг поглинання карбонільних коливань $C_4=O$ ($\Delta\nu_1 = 25 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$) і $C_2=O$ ($\Delta\nu_2 \approx 3-4 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$), що проявляються в умовах зволжених плівок, вирощених зі слабкислих розчинів, у порівнянні з поведінкою цих смуг у спектрах плівок, отриманих з нейтральних розчинів, розглянуто динамічну (резонансну) взаємодію дипольних моментів переходів цих груп атомів.

3.2 Резонансні взаємодії карбонільних коливань у стопках FMN. Побудова *n*-молекулярної структури самоасоціату FMN

Теоретичною основою динамічної (резонансної) взаємодії є теорія молекулярних екситонів [181]. Основні положення цієї теорії розглянуто в підрозділі 2.1.1.

Абсолютні інтенсивності карбонільних коливань FMN у водному розчині (D_2O) визначено зі спектру (див. рис. 3.1 а), у якому видно якісне розділення компонентів. Значення частот і напівширину смуг, які слабо перекриваються, визначали з точністю $\pm 1 \text{ см}^{-1}$, помилка розрахунку абсолютних інтенсивностей становила 10%.

У табл. 3.1 наведено спектральні параметри смуг поглинання карбонільних коливань ($C_2=O$ і $C_4=O$) FMN, які використовувалися при розрахунку резонансних зсувів у самоасоціаті FMN у плівці.

Таблиця 3.1

Спектральні параметри смуг поглинання карбонільних коливань FMN: частота ν_0 і напівширина $\Delta\nu_{1/2}$ смуг поглинання, максимум поглинання ϵ_0 , інтегральні інтенсивності B і моменти переходів μ (у Дебаях)

Віднесення	$\nu_0, \text{см}^{-1}$	$\Delta\nu_{1/2}, \text{см}^{-1}$	$\epsilon_0 \cdot 10^{-3},$ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$B \cdot 10^{-4},$ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	$\mu, \text{Д}$
$\text{C}_2=\text{O}$	1655	58,7	9,3	12,8	0,56
$\text{C}_4=\text{O}$	1704	45,4	5,9	6,4	0,39

З таблиці видно, що дипольні моменти переходів карбонільних коливань мають значну величину ($\sim 0,4\text{-}0,6 \text{ Д}$), тому можна очікувати, що при певній структурі самоасоціатів FMN можливе виникнення взаємодій між коливаннями карбонільних груп ізоалоксазинових кілець.

Проведений нами [219] розрахунок резонансних взаємодій моментів переходів карбонільних груп $\text{C}_2=\text{O}$ і $\text{C}_4=\text{O}$ для моделей самоасоціатів FMN, представлених у роботах [55, 56], з використанням даних табл. 3.1, показав відсутність зсуву смуг поглинання ($\Delta\nu = 0 \text{ см}^{-1}$). Цей результат не узгоджується з поведінкою цих смуг в отриманих ІЧ-спектрах (див. рис. 3.1 і 3.2). Ми припускаємо, що структура самоасоціатів FMN у цих моделях така, що відстань між карбонільними групами, відповідно до формули (2.10), виявилася значною – понад $4,5 \text{ \AA}$, тому взаємодія моментів переходів цих карбонільних груп у таких структурах самоасоціатів неможлива. Для пояснення спостережуваних в ІЧ-спектрах змін ми виконали пошук інших структур стекінг-асоціатів FMN.

Оскільки в формулі (2.10) $M/h\varepsilon$ – постійна величина (в припущенні, що $\varepsilon = 1$), то пошук можливої конфігурації стекінг-асоціатів FMN проводили, варіюючи наступні структурні параметри: зміщення молекули уздовж великої осі ($\text{C}_2\text{--C}_8$) ізоалоксазинового кільця (x), малої осі ($\text{N}_{10}\text{--N}_5$) кільця (y) та перпендикуляра до площини кільця (z), відповідно; θ – кут повороту навколо осі Z , що проходить через центр кільця; φ_1, φ_2 – кути відхилень (в площині кільця) коливальних моментів $\text{C}_2=\text{O}$ і $\text{C}_4=\text{O}$ від напрямків відповідних

зв'язків. На підставі цих структурних параметрів обчислювалися відстані R між середніми точками моментів переходу і кути φ , β , γ – кути між напрямками диполів та лінією, що з'єднує їх центри зв'язків. На початку розрахунку ми прийняли, що моменти переходів спрямовано по зв'язкам атомів вуглецю і кисню, а потім – для отримання кращої узгоджуваності розрахованих високочастотних зсувів з експериментально зафіксованими – змінювали напрямки моментів переходів (див. роботи [103, 104]).

Критеріями відбору «правильних» структур слугували: (1) відповідність геометрії стекінг-асоціатів умовам збереження міжплощинних взаємодій між ізоалоксазиновими кільцями (площини кілець повинні перекриватися); (2) незначні відхилення векторів коливальних моментів від напрямку зв'язків; (3) відсутність стеричних перешкод.

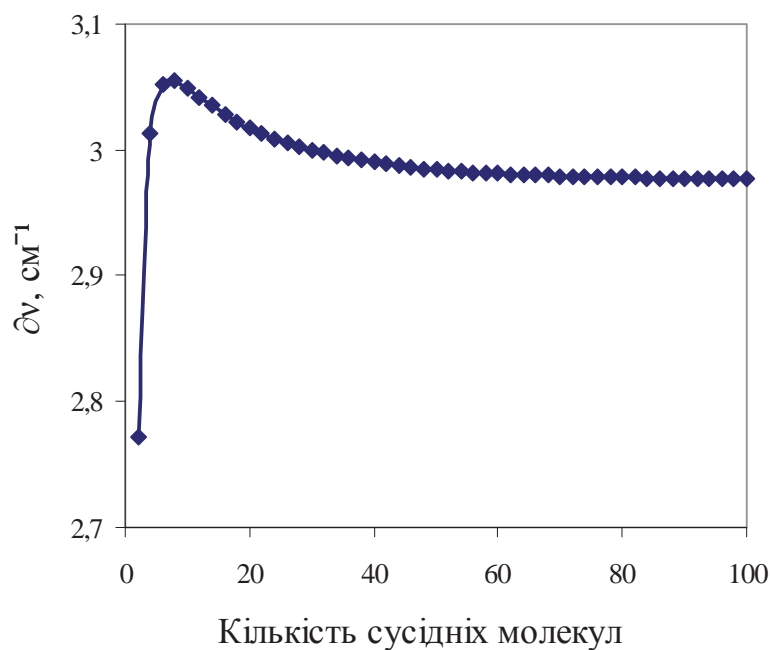
Параметри варіювалися в таких межах: x – до 2,45 Å (при такому зміщенні перекриваються два з трьох циклів ізоалоксазинових кілець), y – до 0,6 Å (зміщення, отримане для структури стекінг-димеру FMN при молекулярному моделюванні та в ЯМР дослідженнях [55, 56]), z – від 3,4 до 3,7 Å (діапазон міжплощинних відстаней, характерних для стекінгу асоціатів більшості гетероциклічних та ароматичних молекул [65, 103]), θ – до 30°, φ_1 і φ_2 – до 10°. Відповідність експериментально спостережуваного зсуву частот для $C_2=O$ і $C_4=O$ досягається при $x = 2,45$ Å, $y = 0,6$ Å, $z = 3,44$ Å, $\theta = 4^\circ$, $\varphi_1 = 0,6^\circ$, $\varphi_2 = 9,9^\circ$. Відповідні цій конфігурації значення R , φ , β , γ наведено у табл. 3.2.

На рис. 3.3 приведено розраховані залежності зсувів частот $\Delta\nu$ для однієї молекули FMN від кількості її сусідів вздовж n -молекулярного самоасоціату.

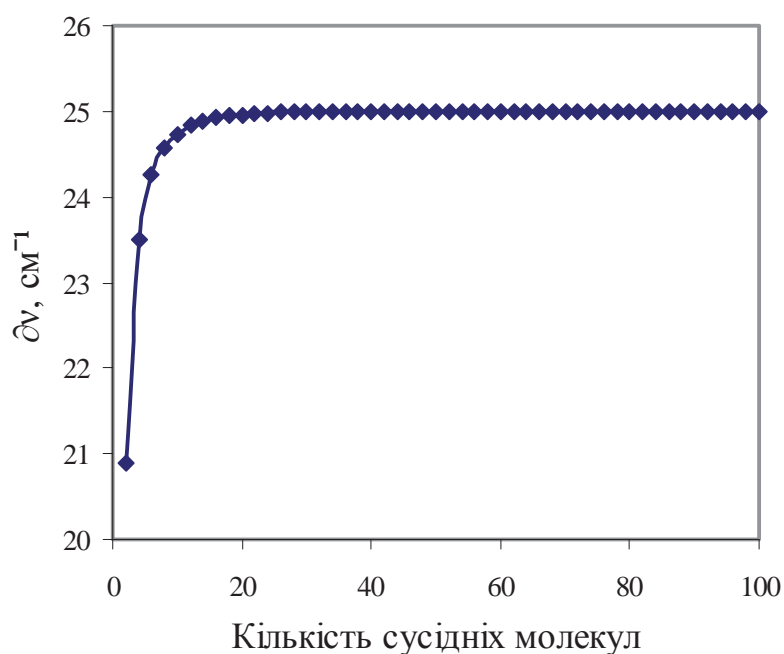
Таблиця 3.2

Значення параметрів геометричного фактора для $C_2=O$ і $C_4=O$

Віднесення	R , Å	φ , °	β , °	γ , °
$C_2=O$	4,27	4,0	123,3	124,3
$C_4=O$	4,16	4,0	91,5	89,1



(а)



(б)

Рисунок 3.3 Залежність частотних зсувів однієї молекули FMN від кількості її сусідів (2, 4, 6, ... n) при взаємодії моментів переходів для карбонільних коливань $\text{C}_2=\text{O}$ (а) і $\text{C}_4=\text{O}$ (б)

Видно, що найбільший зсув за частотою смуг поглинання карбонільних груп досягається в разі, коли стопка FMN містить більше двох молекул. Треба також зазначити, що відповідність розрахункових зсувів частот карбонільних

коливань до експериментальних значень ($\Delta\nu_l = 25 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$) при $n = 2$ (димер FMN) отримано для самоасоціату FMN, в якого не спостерігається перекривання площин ізоалоксазинових кілець, тобто, при мінімальному стекінгу і, отже, нестабільній структурі самоасоціату. Це означає, що конфігурація самоасоціатів FMN містить як мінімум три молекули. Відповідно до формули (2.9) були отримані розрахункові зсуви частот, що узгоджуються з експериментальними ($\Delta\nu_2 \approx 3 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$ і $\Delta\nu_l \approx 25 \text{ см}^{-1} (\pm 1 \text{ см}^{-1})$), саме для n -молекулярної структури самоасоціату ($n \geq 3$).

На рис. 3.4 представлено просторову структуру самоасоціату FMN. Пунктиром вказано взаємодіючі карбонільні групи.

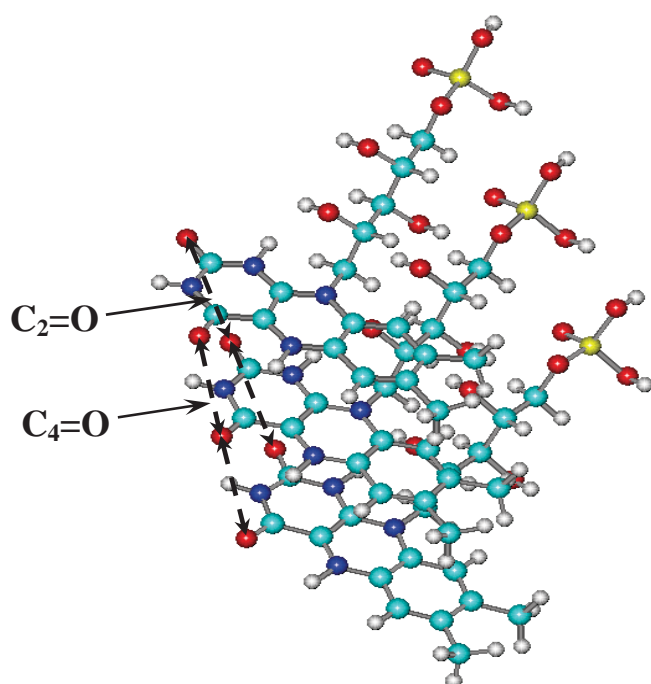


Рисунок 3.4 Фрагмент просторової структури n -молекулярного самоасоціату FMN. Пунктиром вказано взаємодіючі карбонільні групи $C_2=O$ і $C_4=O$

Які основні фактори, що визначають стабільність n -молекулярних самоасоціатів FMN, що утворюються в умовах слабкого середовища? Проведені нами [219] дослідження впливу води на стабільність самоасоціатів дозволили виявити високочастотні зсуви карбонільних коливань (див. рис. 3.2 б) в півці FMN. Можна припустити, що утворення стекінг-асоціатів FMN і розташування ізоалоксазинових кілець в них не визначається

взаємодією з молекулами води. Оскільки в *n*-молекулярній структурі самоасоціатів FMN площини I-II та II-III кілець (рис. 3.4) перекриваються, то ми вважаємо, що стабілізація такої структури в плівці досягається в результаті стекінг-взаємодій між цими кільцями. Про це свідчать численні розрахунки щодо оцінки вкладу міжплощинних взаємодій в стабільність асоціатів різних гетероциклічних сполук, які утворюють стопки (див., наприклад, [65]). Як показали наші дослідження сорбції води на плівках, вирощених зі слабокислих розчинів FMN [219], тільки на першому етапі зволоження вода практично не зв'язується з гідратно-активними групами ізоалоксазинового кільця (див. підрозділ 3.4, рис. 3.9), а при збільшенні її активності (при зв'язуванні більше 6 молекул води на молекулу FMN, $N > 6$) гідратація істотно зростає. Вочевидь, молекули води також можуть впливати на стабільність *n*-молекулярних самоасоціатів FMN, що формуються в плівках, вирощених зі слабокислих розчинів.

3.3 Протонування FMN за даними ІЧ-спектроскопії та квантово-хімічних розрахунків зарядів на атомах ізоалоксазинового кільця і порядку їх зв'язків

3.3.1 ІЧ-спектроскопічний прояв протонування ізоалоксазинового кільця FMN

На рис. 3.5 представлено ІЧ-спектр в області поглинання $1450\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ сухої плівки FMN (0% ВВ), вирощеної з нейтрального розчину (рН = 7,0). Спектр був отриманий усередненням не менше 10 сканів, зроблених при однакових умовах запису. Видно, що ця спектральна область складається з трьох смуг поглинання з вираженими максимумами, що перекриваються. Шляхом розкладання спектра за стандартною методикою [220] та згідно з роботою [170] було виділено найсильнішу смугу при $\nu_1 = 1541\text{ см}^{-1}$ ($\pm 1\text{ см}^{-1}$),

низькочастотну компоненту з максимумом при $\nu_2 = 1501 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$) і високочастотну смугу з максимумом при $\nu_3 = 1575 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$).

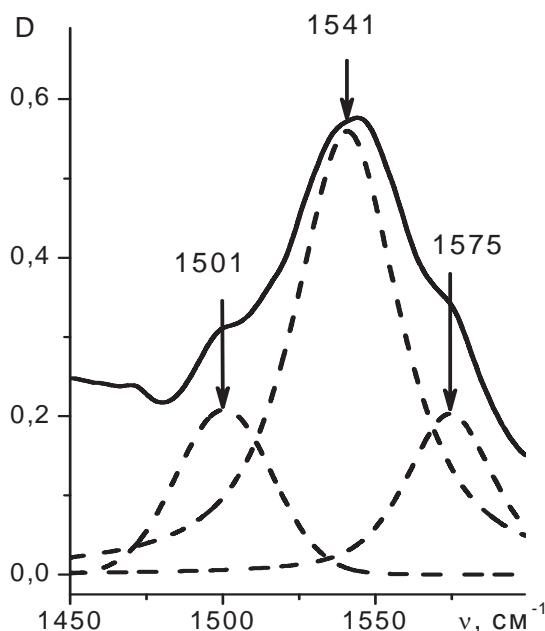


Рисунок 3.5 ІЧ-спектр поглинання внутрішньокільцевих С–С і С–N коливань ізоалоксазинового кільця FMN: експериментально отриманий спектр (—) та його спектр, отриманий методом розкладання (---). Плівку FMN вирощено з розчину з рН = 7,0 ($\pm 0,05$)

Згідно з даними роботи [170] ці смуги пов'язані з коливаннями атомів С–С і С–N в ізоалоксазиновому кільці FMN (див. рис. 1.4). У табл. 3.3 наведено виділені смуги та їх віднесення.

Таблиця 3.3

ІЧ-смуги поглинання внутрішньокільцевих коливань ізоалоксазинового кільця FMN та їх віднесення [170]

Частота (ν), см^{-1}	Віднесення
1501 (ν_2)	Полоса IV, $\nu(\text{C}_6=\text{C}_7)$; $\nu(\text{C}_9-\text{C}_{9a})$; $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$
1541 (ν_1)	Полоса III, $\nu(\text{C}_{5a}=\text{C}_6)$; $\nu(\text{C}_8-\text{C}_9)$; $\nu(\text{C}_{5a}=\text{N}_5)$
1575 (ν_3)	Полоса II, $\nu(\text{C}_{4a}=\text{N}_5)$; $\nu(\text{C}_4-\text{C}_{4a})$; $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$

Як видно з табл. 3.3, частоти смуг поглинання ν_1 і ν_2 можуть бути чутливі «в чистому вигляді» до протонування по атомам азоту N_1 і N_5 . У смугу ν_3 дають внесок обидва атоми азоту N_1 і N_5 .

Для з'ясування впливу протонування на смуги поглинання ν_1 , ν_2 і ν_3 був отриманий спектр сухої плівки FMN, вирощеної зі слабнокислого (pH = 6,0) водного розчину. Передбачається, що в цих умовах відбувається протонування ізоалоксазинового кільця по атомах N_1 і N_5 [168]. На рис. 3.6 представлено ІЧ-спектр плівки FMN (pH = 6,0) в області поглинання внутрішньокільцевих коливань та його компоненти, отримані розкладанням експериментального спектра.

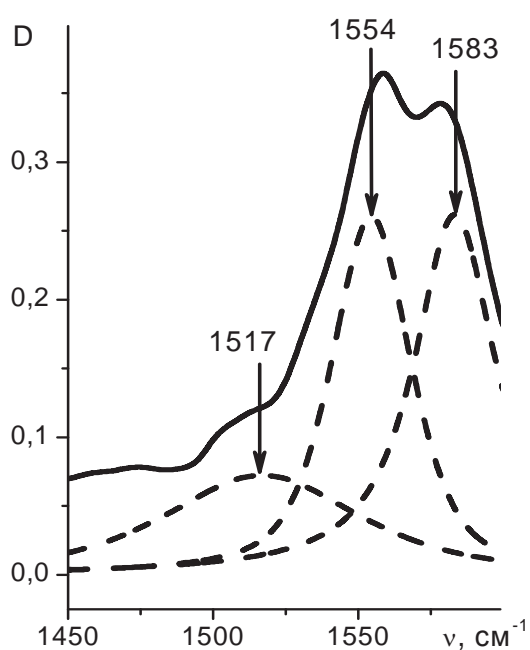


Рисунок 3.6 ІЧ-спектр поглинання внутрішньокільцевих С–С та С–N коливань ізоалоксазинового кільця FMN: експериментально отриманий спектр (—) та його спектр, отриманий методом розкладання (---). Плівку FMN було вирощено з розчину з pH = 6,0 ($\pm 0,05$)

Таблиця 3.4

Частоти і частотні зсуви смуг поглинання для плівок FMN, вирощених з нейтрального і слабнокислого розчинів

Смуга	Максимум смуги поглинання плівки FMN (pH = 7,0), cm^{-1}	Максимум смуги поглинання плівки FMN (pH = 6,0), cm^{-1}	Частотний зсув $\Delta\nu$, cm^{-1}
ν_1	1541 (± 1)	1555 (± 1)	+14 (± 1)
ν_2	1501 (± 1)	1517 (± 1)	+16 (± 1)
ν_3	1575 (± 1)	1583 (± 1)	+8 (± 1)

Можна бачити істотні зсуви розглянутих смуг поглинання, порівняно з таким же спектром для плівки, вирощеної з нейтрального розчину (див. рис. 3.5 і дані табл. 3.4).

З результатів, представлених у табл. 3.4, видно, що наявність протону H^+ у слабнокислому середовищі викликає значне збільшення частот коливань ν_1 та ν_2 і в меншій мірі – для смуги ν_3 . З теорії коливання молекул [175] відомо, що збільшення зарядів і порядків зв'язків призводить до збільшення силових постійних атомів, що коливаються, і, отже, до зростання частоти коливання. Виявлене високочастотне зміщення смуг може бути пояснене протонуванням ізоалоксазинового кільця по атомах N_1 і N_5 . Квантово-хімічний розрахунок електронної густини (зарядів) на атомах і порядку зв'язків ізоалоксазинового кільця дозволить дати відповідь на питання: чи протонуються атоми N_1 і N_5 .

3.3.2 Квантово-хімічний розрахунок зарядів на атомах і порядку зв'язків ізоалоксазинового кільця FMN

Квантово-хімічні розрахунки ізоалоксазинового кільця флавінмононуклеотиду було виконано з використанням програми Orca 2.9 [221]. Більш докладно метод описано в нашій роботі [222].

У табл. 3.5 представлено заряди на атомах для протонованого по атомах N_1 і N_5 (FMN $N_1H^+N_5H^+$) і нейтрального FMN та різниця зарядів FMN $N_1H^+N_5H^+$ - FMN N_1N_5 .

З цих даних видно, що на атомах азоту N_1 і N_5 знаходяться значні негативні заряди -0,612 і -0,545, відповідно. Тому зв'язування позитивно зарядженого атома водню (протону), ймовірно, буде йти по цих атомах.

Таблиця 3.5

Заряди на атомах протонованого і непротонованого ізоаллоксазинового кільця FMN та їх різниця (усі заряди приведено в атомних одиницях, а.о.)

Нумерація атомів	FMN N ₁ H ⁺ N ₅ H ⁺	FMN N ₁ N ₅	FMN N ₁ H ⁺ N ₅ H ⁺ – FMN N ₁ N ₅
N ₁	-0,447	-0,612	0,165
C ₂	0,725	0,927	-0,202
O	-0,405	-0,623	0,218
N ₃	-0,575	-0,756	0,181
C ₄	0,643	0,742	-0,099
O	-0,420	-0,581	0,161
C _{4a}	-0,054	0,236	-0,290
N ₅	-0,122	-0,545	0,423
C _{5a}	0,258	0,570	-0,311
C ₆	-0,379	-0,473	0,094
C ₇	0,259	0,203	0,056
C	-0,421	-0,416	-0,005
C ₈	0,237	0,185	0,053
C	-0,434	-0,468	0,034
C ₉	-0,272	-0,289	0,017
C _{9a}	0,035	-0,283	0,318
N ₁₀	0,153	0,349	-0,196
C _{10a}	0,307	0,179	0,128
C(R)	-0,416	-0,528	0,112

З табл. 3.5 також можна бачити, що протонування атомів N₁ і N₅ супроводжується перерозподілом електронної густини (зарядів): (i) по атомах C_{5a}, C₆, C₈ і C₉ спільно з атомом N₅ (див. табл. 3.3), що визначають частоту смуги III (ν_1); (ii) по атомах C₆, C₇, C₉, C_{9a} і C_{10a} і N₁, що визначають частоту смуги IV (ν_2); (iii) по атомах C_{4a}, N₅, C₄, C_{10a} і N₁, що визначають частоту смуги II (ν_3).

Для порівняльного аналізу в роботі було розраховано порядки зв'язків атомів у протонізованому і непротонізованому ізоалоксазинових кільцях FMN та їх різниця (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Порядки зв'язків протонізованого і непротонізованого ізоалоксазинових
кільць FMN та їх різниця**

Зв'язки	FMN $N_1H^+N_5H^+$	FMN N_1N_5	FMN $N_1H^+N_5H^+$ - FMN N_1N_5
N_1-C_2	0,9762	1,1138	-0,1376
N_1-C_{10a}	1,3301	1,5857	-0,2556
N_1-H	0,7721	—	—
C_2-O	2,2159	2,1143	0,1016
C_2-N_3	1,0538	1,0307	0,0231
N_3-C_4	1,1522	1,1293	0,0229
N_3-H	0,8759	0,8921	-0,162
C_4-O	2,1831	2,2582	-0,0751
C_4-C_{4a}	0,8850	0,8828	0,0022
$C_{4a}-N_5$	1,4361	1,7284	-0,2653
$C_{4a}-C_{10a}$	1,1588	1,0737	0,0851
N_5-C_{5a}	1,2734	1,3684	-0,095
N_5-H	0,8422	—	—
$C_{5a}-C_6$	1,2325	1,2560	-0,0235
$C_{5a}-C_{9a}$	1,1772	1,2714	-0,0942
C_6-C_7	1,4499	1,4007	0,0492
C_6-H	0,9953	1,0022	-0,0069
C_7-C_8	1,1800	1,2868	-0,1068
C_8-C_9	1,3610	1,3827	-0,0217
C_9-C_{9a}	1,3307	1,2826	0,0481
$C_{9a}-N_{10}$	1,1259	1,1170	0,0089
$N_{10}-C_{10a}$	1,2681	1,1968	0,0713
$N_{10}-C$	0,8998	0,9436	-0,0438

З результатів, представлених у табл. 3.6, випливає, що для смуги ν_1 (див. табл. 3.3) порядок зв'язків $C_{5a}-C_6$, C_8-C_9 і $C_{5a}-N_5$ незначно зменшився (від 0,022 до 0,095); для смуги ν_2 порядок зв'язків C_6-C_7 , C_9-C_{9a} незначно збільшується (на 0,049), а для $C_{10a}-N_1$ в той же час зменшується (на 0,256); для смуги ν_3 порядок зв'язку C_4-C_{4a} практично не змінився, тоді як порядок зв'язків $C_{4a}-N_5$ і $C_{10a}-N_1$ зменшується на 0,265 і 0,256, відповідно.

Отримані дані про порядки зв'язків корелюють з частотними зміщеннями смуг поглинання ν_1 , ν_2 і ν_3 (див. табл. 3.5), оскільки найбільші зміни порядків зв'язків спостерігаються переважно для тих пар атомів, до яких входять атоми азоту N_1 і N_5 . Виявлені високочастотні зсуви смуг поглинання внутрішньокільцевих коливань пов'язані зі збільшенням силової постійної (k): частота коливань пропорційна k . У величину k , відповідно до теорії коливань багатоатомних молекул, у тому числі гетероциклічних [175], вносять вклад зміни зарядів і порядків зв'язків, що і було визначено при проведенні квантово-хімічних розрахунків протонованої форми ізоалоксазинового кільця FMN. Але зв'язок між силовими постійними k атомів, що коливаються, і зміною зарядів і порядків зв'язків вимагає спеціального теоретичного розгляду.

3.4 Роль води в стабілізації самоасоціатів FMN

Відомо, що розташування у вигляді стопок азотистих основ у нуклеїнових кислотах істотно стабілізується молекулами води [101], які займають місткові положення між донорно-акцепторними групами основ і цукрофосфатного остову. Щоб встановити, чи можлива стабілізація стекінг-асоціатів FMN за рахунок аналогічних водних містків, використовувалася раніше розроблена ІЧ-спектроскопічна методика визначення центрів гідратації для плівок нуклеїнових кислот [98, 103, 104]. Було проведено дослідження залежності спектральних параметрів (частот ν та інтенсивностей R , див.

формулу (2.11)) смуг поглинання коливань карбонільних груп $C_2=O$, $C_4=O$ і внутрішньокільцевих $C=N$ і $C=C$ коливань від кількості сорбованих молекул води N на моль FMN. Значення N взято з отриманих нами ізотерм гідратації (рис. 3.7).

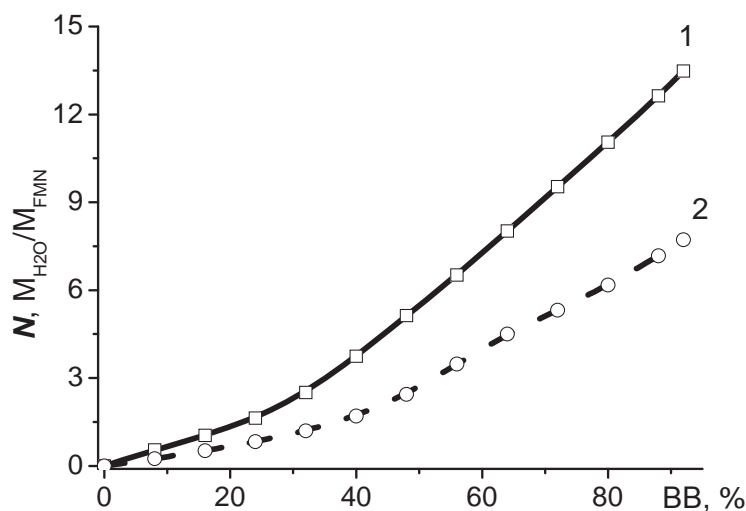


Рисунок 3.7 Ізотерми гідратації плівок FMN, вирощених з нейтрального $pH = 7,0$ ($\pm 0,05$) (1) і слабкокислого $pH = 6,2$ ($\pm 0,05$) (2) розчинів

З рис. 3.7 видно, що ізотерма гідратації для плівки FMN, вирощеної з розчину при $pH = 6,2$, проходить нижче ізотерми, отриманої для нейтральної ($pH = 7,0$) форми флавінмононуклеотиду. Зниження рівня адсорбції води при $pH = 6,2$ свідчить про те, що розташування ізоалоксазинових кілець FMN у цих умовах призводить до зменшення кількості атомних груп, доступних молекулам води. Цей факт також підтверджує зроблений раніше висновок (див. підрозділ 3.1) про те, що самоасоціація флавінмононуклеотиду в нейтральних і слабкокислих умовах розрізняється як за структурою самоасоціатів FMN, так і за їх взаємодією з водним оточенням.

На рис. 3.8 представлено залежності ν і R від N для смуг поглинання коливань карбонільних груп $C_2=O$, $C_4=O$ та внутрішньокільцевих $C=N$ і $C=C$ коливань у нейтральному середовищі ($pH = 7,0$). Видно, що частоти розглянутих смуг $\nu(N)$ зменшуються, а їх інтенсивність $R(N)$ збільшується.

Такий характер зміни залежностей $R(N)$ і $\nu(N)$ в інтервалі сорбції води $0 \leq N \leq 12$ для смуг поглинання FMN свідчить про поляризацію зв'язків атомів при формуванні водневих зв'язків з молекулами води. Одночасне зростання

інтенсивностей смуг поглинання коливань $C_2=O$, $C_4=O$ і коливань за участю внутрішньокільцевого атома азоту N_5 дозволяє припустити можливість утворення водних «містків» між донорно-акцепторними групами FMN і молекулами води, які, разом зі стекінг-взаємодіями додатково стабілізують самоасоціати FMN.

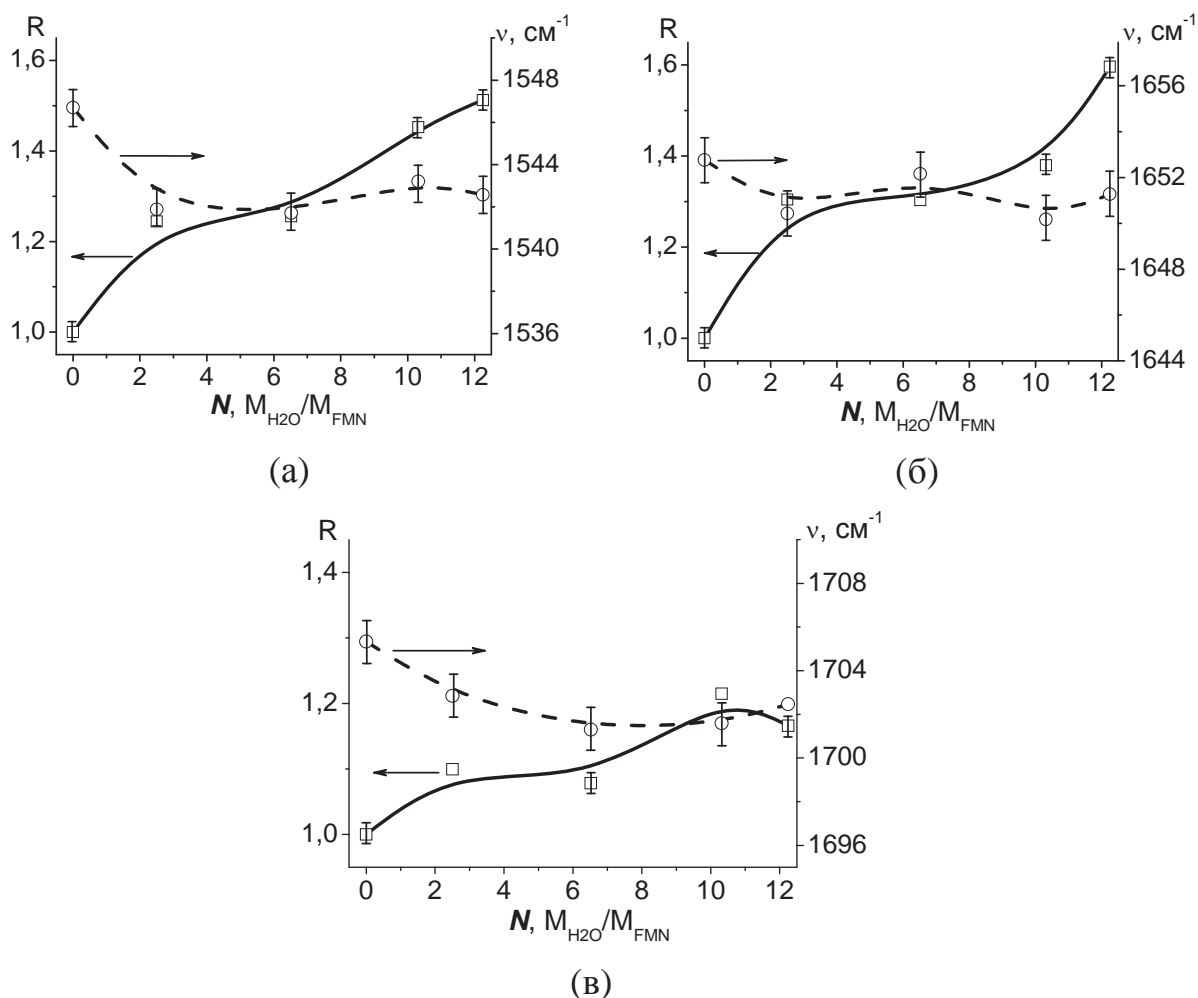


Рисунок 3.8 Залежність частоти (ν) та відносної інтенсивності (R) від кількості сорбованих молекул води (N) для смуг поглинання внутрішньокільцевих $C=N_5$, $C=C$ (а) і карбонільних $C_2=O$ (б) та $C_4=O$ (в) груп атомів ізоалоксазинового кільця FMN (pH = 7,0 ($\pm 0,05$))

Ми також дослідили вплив води на стабільність самоасоціатів FMN в плівках, вирощених зі слабкого розчину [219]. На рис. 3.9 представлено залежності ν і R від N для досліджуваних смуг поглинання з частотами

$\nu_1 = 1729 \text{ cm}^{-1}$ і $\nu_2 = 1656 \text{ cm}^{-1}$ (коливання карбонільних груп $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$), а також $\nu_3 = 1552 \text{ cm}^{-1}$ (коливання внутрішньокільцевих груп $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$).

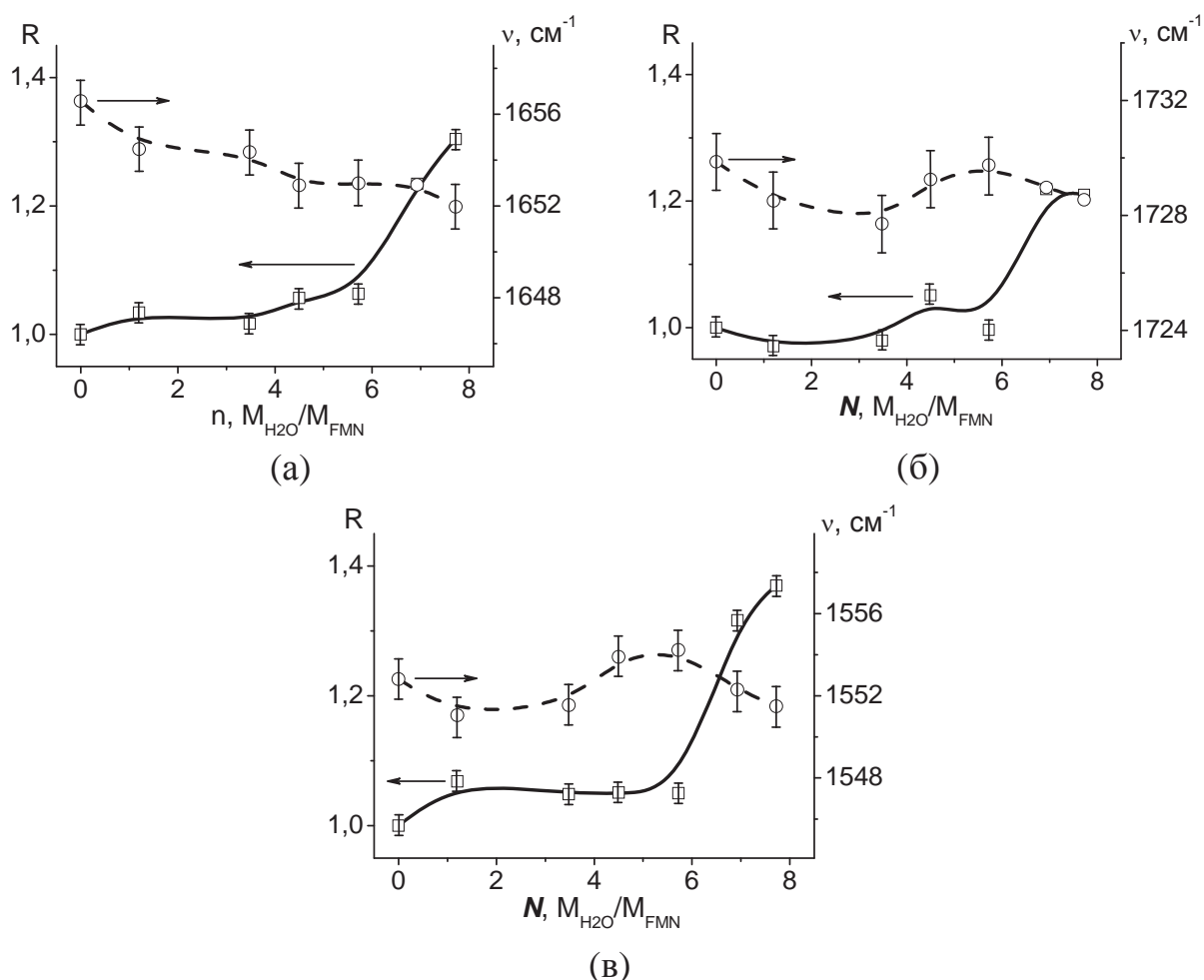


Рисунок 3.9 Залежність частоти (ν) і відносної інтенсивності (R) від кількості сорбованих молекул води (N) для смуг поглинання карбонільних $\text{C}_2=\text{O}$ (а), $\text{C}_4=\text{O}$ (б) і внутрішньокільцевих $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$ (в) груп атомів ізоалоксазинового кільця FMN ($\text{pH} = 6,2 (\pm 0,05)$)

Видно, що частота карбонільного коливання $\text{C}_2=\text{O}$ (рис. 3.9 а) із зростанням сорбції води в інтервалі $0 \leq N \leq 6$ зменшується на $\Delta\nu = 4 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$). Зниження частоти свідчить про утворення Н-зв'язків молекул води з карбонільною групою $\text{C}_2=\text{O}$. Однак, частота коливання $\text{C}_4=\text{O}$ групи атомів у цьому інтервалі N практично не змінилася (рис. 3.9 б), що пов'язано з обмеженою доступністю молекул води через більш щільне упакування

ізоалоксазинових кілець самоасоціату протонованої форми FMN порівняно з нейтральною.

На відміну від нейтральної форми FMN (див. рис. 3.8 а) частота смуги поглинання внутрішньокільцевих коливань ν_3 (за участю груп атомів $C=N_5$ і $C=C$) в цьому інтервалі сорбції також практично не змінилася (рис. 3.9 в). Однак з підвищенням активності води в інтервалі $6 \leq N \leq 8$ інтенсивності смуг $C_2=O$, $C_4=O$ і внутрішньокільцевих коливань (рис. 3.9) одночасно різко зростають, як і у випадку нейтральної форми FMN. Найбільш ймовірно, це пов'язано з формуванням водних «містків» між донорно-акцепторними групами атомів в утвореному самоасоціаті протонованої форми FMN. Ці водні «містки» разом з міжплощинними взаємодіями додатково стабілізують *n*-молекулярну структуру протонованої форми FMN.

Висновки до розділу 3

1. Аналіз ІЧ-спектрів в області поглинання внутрішньокільцевих $C-C$, $C-N$ та карбонільних $C_2=O$, $C_4=O$ коливань ізоалоксазинового кільця FMN показав, що утворення самоасоціатів FMN у нейтральних середовищах ($pH \sim 7,0$) відбувається без виникнення динамічної взаємодії моментів переходу коливань карбонільних груп ізоалоксазинових кілець. Спектри нейтральних розчинів FMN і плівок, вирощених з них, практично не відрізняються, що свідчить про однаковий тип самоасоціації FMN у нейтральних середовищах. Розрахунки спектральних параметрів для відомих структур самоасоціатів FMN, які узгоджуються з експериментальними даними, підтвердили цей висновок.
2. Вперше виявлено високочастотне зміщення смуг поглинання коливань $C_4=O$ і $C_2=O$ груп атомів для плівки FMN, отриманої зі слабкого розчину ($pH \sim 6,0$). За допомогою розрахунків резонансної взаємодії карбонільних коливань $C_4=O$ і $C_2=O$ груп у диполь-дипольному

наближенні було побудовано модель *n*-молекулярної самоасоціації FMN. Стабільність таких самоасоціатів FMN визначається міжплощинними взаємодіями між кільцями ізоалоксазинового хромофора, які перекриваються.

3. Аналіз отриманих ІЧ-спектрів в області поглинання внутрішньокільцевих C–C і C–N коливань ізоалоксазинового кільця FMN у висушеній плівці (0% BB), вирощеній зі слабнокислого розчину, показав, що протонування кільця відбувається по атомах азоту N₁ і N₅. Квантово-хімічні розрахунки зарядів на атомах ізоалоксазинового кільця підтвердили цей висновок, оскільки на атомах N₁ і N₅ знаходяться значні негативні заряди.
4. Дослідження гідратації FMN показало, що додаткова стабілізація нейтральної та протонованої форм флавінмононуклеотиду досягається шляхом формування водних «містків» між донорно-акцепторними групами атомів ізоалоксазинових кілець. Показано, що в нейтральній формі FMN водні «містки» формуються в усьому інтервалі сорбції води ($0 \leq N \leq 12$), тоді як в сформованому *n*-молекулярному асоціати FMN у слабнокислому середовищі (pH~6,0) такі «містки» утворюються під час високої активності води ($6 \leq N \leq 8$).

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [219], [222].

РОЗДІЛ 4

МІЖПЛОЩИННІ ВЗАЄМОДІЇ ПРИ ФОРМУВАННІ

ГЕТЕРОКОМПЛЕКСІВ FMN-ТРН, ТРН-ЕВ, ТРН-PRF ТА ЕВ-CAF

Вивчення гетероасоціації ароматичних БАР представляє інтерес з фізико-хімічної точки зору, оскільки дозволяє визначити вплив структури хромофорів та бічних ланцюгів на утворення асоціатів і оцінити внесок різних взаємодій в їх стабільність. Такі дослідження необхідні для розуміння механізмів медико-біологічних ефектів, які спостерігаються під час спільного використання різних терапевтичних БАР. Крім того, гетероасоціація розглядається як основний механізм збільшення розчинності важко розчинних ароматичних БАР у присутності інших ароматичних молекул. Утворення стабільних само- та гетероасоціатів ароматичних сполук у водних розчинах визначається перш за все міжплощинними взаємодіями хромофорів, пов'язаних як зі взаємодіями їх π -систем, так і впливом полярного водного оточення на гідрофобні молекули ароматичних БАР. Додатковий вклад у стабільність таких асоціатів можуть вносити міжмолекулярні водневі зв'язки. У цьому розділі дисертації буде розглянуто результати ІЧ- і КР-спектроскопічних досліджень ароматичних БАР, які у водних розчинах, згідно з даними ЯМР, спектроскопії в УФ- і видимій області та люмінесценції, формують гетероасоціати без утворення міжмолекулярних Н-зв'язків, і виконано їх детальний аналіз за допомогою комп'ютерного моделювання [223, 224].

4.1 Інфрачервоні спектри поглинання FMN, ТРН та їх гетерокомплексу

Проведені раніше дослідження методом спектроскопії ядерного магнітного резонансу показали, що за умов, близьких до фізіологічних,

молекули ароматичних БАР – флавінмононуклеотиду і теофіліну – формують само- і гетерокомплекси у вигляді стопок. Рівноважна константа їх гетероасоціації за величиною займає проміжне значення ($K_C = 180 \text{ M}^{-1}$) між константами самоасоціації цих молекул ($K_{FMN} = 265 \text{ M}^{-1}$ та $K_{TRH} = 7,4 \text{ M}^{-1}$) [11].

В якості непрямого критерію додаткової стабілізації гетерокомплексів при утворенні міжмолекулярного Н-зв'язку було запропоновано фактор

$$f_C = \frac{K_C}{K_{FMN} + K_{TRH} + K_C} \quad [91, 116].$$

За умови $f_C \geq 35\%$ є висока ймовірність саме

такого типу стабілізації гетерокомплексу. Для комплексу FMN і TRH значення $f_C = 39,7$, що вказує на можливість додаткової стабілізації гетерокомплексу Н-зв'язком. Просторова модель гетерокомплексу FMN-TRH, побудована за допомогою методу молекулярної механіки за отриманими значеннями хімічних зміщень [88], вказує на те, що теофілін утворює комплекси з флавінмононуклеотидом, які стабілізуються переважно стекінг-взаємодіями. Крім того, розрахункова структура комплексу свідчить про можливість утворення між молекулами Н-зв'язку. Однак цей висновок було зроблено опосередковано на підставі зміни термодинамічних параметрів. Для отримання прямого експериментального підтвердження або спростування утворення водневого зв'язку нами було проведено ІЧ-спектроскопічне дослідження нейтральних D_2O розчинів FMN, TRH та їх комплексу в області карбонільних коливань ($1600-1750 \text{ cm}^{-1}$) [223].

На рис. 4.1 представлено ІЧ-спектри поглинання нейтральних водних (D_2O) розчинів FMN і TRH та їх комплексу. Спектри отримано шляхом усереднення не менше 10 вимірювань, виконаних в однакових експериментальних умовах.

Видно, що ці спектри складаються з двох компонент. Як зазначалося вище (див. підрозділ 3.1) високочастотна смуга поглинання FMN з максимумом при 1704 cm^{-1} ($\pm 1 \text{ m}^{-1}$) (рис. 4.1, спектр 1) відноситься переважно до коливань

карбонільної групи $C_4=O$, а більш низькочастотна смуга при 1653 см^{-1} ($\pm 1\text{ см}^{-1}$) пов'язана з коливаннями карбонільної групи $C_2=O$ (див. рис. 1.4).

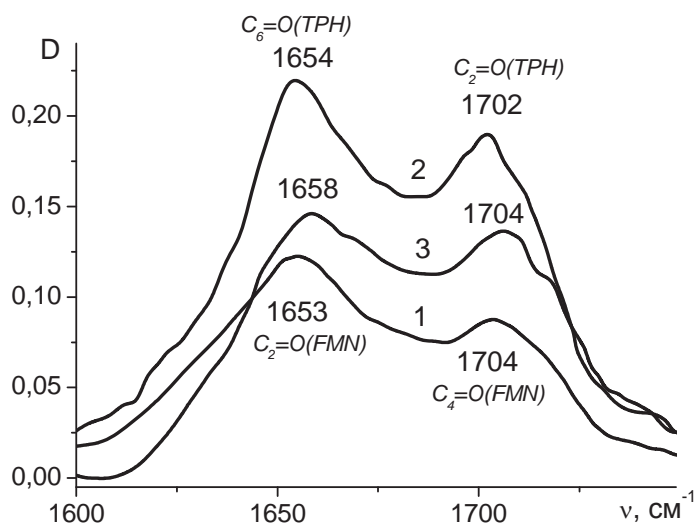


Рисунок 4.1 ІЧ-спектри поглинання розчинів FMN (1), TRN (2) і гетерокомплексу FMN-TRN (3). Для всіх розчинів $pH = 6,9 \div 7,0$ ($\pm 0,05$)

Теофілін належить до ксантинових похідних та його структура близька до кофеїну, для якого надійно виконано віднесення смуг поглинання в ІЧ-спектрі на підставі експериментальних і розрахункових досліджень [151, 225]. Так, високочастотна смуга поглинання TRN при 1702 см^{-1} ($\pm 1\text{ см}^{-1}$) (рис. 4.1, спектр 2) пов'язана з коливанням кільця в фазі з основним внеском карбонільної групи $C_2=O$, тоді як низькочастотна смуга поглинання при 1654 см^{-1} ($\pm 1\text{ см}^{-1}$) відноситься до кільцевого коливання в протифазі з переважним внеском $C_6=O$ -груп атомів (див. рис. 1.3 б).

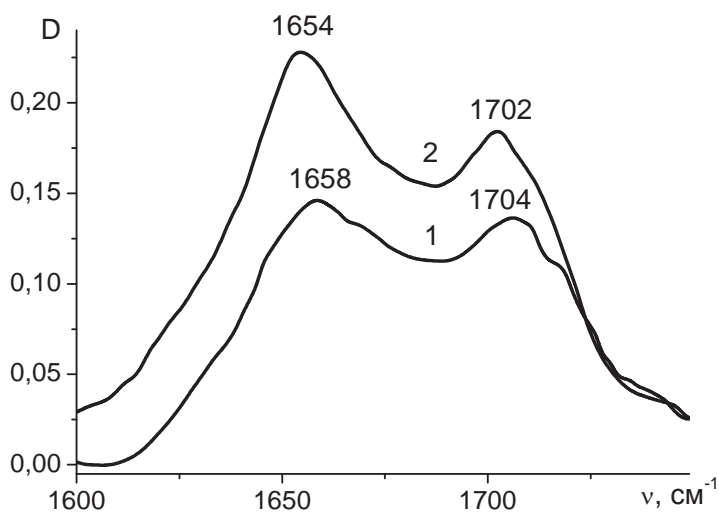


Рисунок 4.2 ІЧ-спектр поглинання розчину гетерокомплексу FMN-TRN (1) і сумарний спектр FMN+TRN (2). Для всіх розчинів $pH = 6,9 \div 7,0$ ($\pm 0,05$)

На рис. 4.2 наведено ІЧ-спектр гетерокомплексу FMN-TPH і сумарний спектр лігандів FMN і TPH. Видно, що частоти смуг поглинання карбонільних груп $C_2=O$ флавінмононуклеотиду та $C_6=O$ теофіліну зазнали високочастотні зміщення на $\Delta\nu = 4-5 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$), а інтенсивність спектру поглинання гетерокомплексу істотно зменшилася (інфрачервоний гіпохромізм). Можна також відзначити, що високочастотні смуги $C_4=O$ (FMN) і $C_2=O$ (TPH) свого положення у комплексі практично не змінили.

Таким чином, в ІЧ-спектрах гетерокомплексу FMN-TPH частоти карбонільних коливань зазнають високочастотні зміщення і зменшення інтенсивності смуг поглинання карбонільних груп і FMN, і TPH. Аналогічні зміни ІЧ-спектрів спостерігалися в стопках гетероциклів азотистих основ у полінуклеотидах [103, 104], для яких така поведінка смуг поглинання пояснювалася резонансними взаємодіями карбонільних коливань. Очевидно, спостережувані нами зміни спектральних параметрів гетерокомплексу FMN-TPH свідчать про те, що утворення стабільного асоціату може супроводжуватися резонансними взаємодіями моментів переходів карбонільних груп FMN і TPH. Для підтвердження цього припущення і з'ясування механізму стабілізації гетероасоціату FMN-TPH ми провели обчислення резонансних взаємодій коливань карбонільних груп FMN і TPH.

4.2 Резонансні взаємодії карбонільних коливань у гетерокомплексі FMN-TPH

4.2.1 Спектральні параметри карбонільних коливань FMN і TPH у розчинах D_2O

Для розрахунку резонансних взаємодій карбонільних коливань необхідно визначити їх моменти переходів, які розраховуються з абсолютних інтенсивностей.

Абсолютні інтенсивності карбонільних коливань флавінмононуклеотиду і теофіліну визначені зі спектру (рис. 4.1), в яких, як можна бачити, компоненти добре розділені. При цьому форму смуг описували лінійною комбінацією функцій Гаусса і Лоренца, як у роботі [211]. Пошук потрібних значень параметрів здійснювали методом деформованого багатогранника [220] до досягнення мінімального значення $\sum_{i=1}^n [D(\nu_i)_{\text{експ}} - D(\nu_i)_{\text{розрах}}]^2$, де $D(\nu_i)_{\text{експ}}$ і $D(\nu_i)_{\text{розрах}}$ – експериментальні та розрахункові значення поглинання при i -тій частоті.

Інтегральну інтенсивність вираховували за формулою [226]:

$$B = 2,3 \int \varepsilon(\nu) d\nu = \frac{\varepsilon(\nu_0) \Delta \nu_{1/2}}{2} (f_G \sqrt{\frac{\pi}{\ln 2}} + (1 - f_G) \pi), \quad (4.1)$$

де

$\Delta \nu_{1/2}$ – напівширина смуги;

f_G – фактор Гауса, що показує внесок розподілу Гауса у контур, який описує функцію;

$\varepsilon(\nu_0)$ – молярний коефіцієнт поглинання, пов'язаний з $D(\nu)$ співвідношенням Бугера-Ламберта-Бера:

$$D(\nu) = \varepsilon(\nu) \cdot k \cdot l, \quad (4.2)$$

де

k – концентрація речовини;

l – товщина поглинаючого шару.

Матричний момент переходу $\langle \vec{\mu} \rangle$ визначався зі співвідношення:

$$A = 0,5 \cdot 10^{-10} B = \frac{8\pi^3 \nu}{3ch} |\langle \vec{\mu} \rangle|^2, \quad (4.3)$$

де

A – абсолютна інтенсивність в одиницях ($\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{молекула}^{-1}$);

c – швидкість світла;

h – постійна Планка.

Значення частот і напівширину смуг, які частково перекриваються, визначалися з точністю $\pm 1 \text{ см}^{-1}$, помилка розрахунку абсолютних інтенсивностей становила 10%.

Для визначення резонансної (динамічної) взаємодії карбонільних коливань були розраховані спектральні параметри (частоти та інтенсивності) карбонільних коливань теофіліну ($\text{C}_2=\text{O}$, $\text{C}_6=\text{O}$) і флавінмононуклеотиду ($\text{C}_2=\text{O}$, $\text{C}_4=\text{O}$). Ці дані наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Спектральні параметри смуг поглинання карбонільних коливань FMN і TRH

Ліганд	Віднесення	ν_0 , см^{-1}	ε , $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$\Delta\nu_{1/2}$, см^{-1}	f_G	$B \cdot 10^{-4}$, $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	μ , D
FMN	$\text{C}_2=\text{O}$	1653	$1,09 \cdot 10^5$	50	0,1	10,9	0,514
	$\text{C}_4=\text{O}$	1704	$3,85 \cdot 10^4$	32	0,69	3,9	0,301
TRH	$\text{C}_2=\text{O}$	1702	$4,98 \cdot 10^4$	46	0	5,0	0,342
	$\text{C}_6=\text{O}$	1654	$6,45 \cdot 10^4$	34	0,57	6,4	0,395

З результатів, представлених у табл. 4.1 видно, що дипольні моменти переходів карбонільних коливань мають значну величину, тому можна очікувати, що при певній структурі комплексу можуть взаємодіяти групи: (1) $\text{C}_2=\text{O}$ (FMN) і $\text{C}_6=\text{O}$ (TRH) і (2) $\text{C}_4=\text{O}$ (FMN) і $\text{C}_2=\text{O}$ (TRH).

4.2.2 Розрахунок резонансних взаємодій карбонільних коливань у комплексі FMN-TRH і побудова моделі гетероасоціату

Виявлені раніше високочастотні зсуви карбонільних коливань гуаніну, тимідину і урацилу при вивченні формування стопок азотистих основ у нуклеїнових кислотах [107] були пояснені динамічною взаємодією моментів

переходу С=О-груп атомів. Не виключена можливість, що такий тип взаємодій карбонільних коливань виникає в агрегатах димерних форм гетерокомплексів FMN-ТРН, які формуються у водних розчинах.

Як і у випадку стопок самоасоціатів FMN (див. підрозділ 3.3), розрахунок резонансних взаємодій карбонільних коливань у комплексі FMN-ТРН можна виконати з використанням теорії молекулярних екситонів [181]. Основні положення цієї теорії стисло викладено в підрозділі 2.1.1.

Якщо припустити, що в розчині FMN і ТРН утворився *n*-молекулярний агрегат (необмежений одновимірний кристал), в якому послідовно чергуються гетероцикли з цих молекул, то згідно з роботою [227] активними будуть повносиметричні коливання типу А (поляризовані вздовж осі полімерної молекули або агрегату) та двічі вироджені типу Е (поляризовані перпендикулярно до осі агрегату).

У реальних умовах (у водному середовищі) на частоту карбонільного коливання крім резонансної взаємодії впливає водневий зв'язок, який утворюється між киснем С=О-груп атомів та воднем молекули води. У рамках моделі слабозв'язаних осциляторів [182], з урахуванням Н-зв'язку або «ефекту» середовища і резонансних взаємодій, частоти смуг поглинання С=О-груп, поляризованих паралельно і перпендикулярно, запишуться так:

$$\nu_A = \nu_0 - \Delta\nu_{H-36} \pm \Delta\nu_{рез}^A, \quad (4.4)$$

$$\nu_E = \nu_0 - \Delta\nu_{H-36} \pm \Delta\nu_{рез}^E, \quad (4.5)$$

де

ν_0 – частота незбуреного карбонільного коливання;

$\Delta\nu_{рез}^A$ і $\Delta\nu_{рез}^E$ – резонансні зсуви для типів коливань А та Е;

$\Delta\nu_{H-36}$ – зсув за рахунок утворення Н-зв'язку.

Резонансні зсуви для цих типів коливань запишуться так [183]:

$$\Delta \nu_{рез}^A = 2(\Delta \nu_{11,12} + \Delta \nu_{11,13} + \dots + \Delta \nu_{11,k}), \quad (4.6)$$

$$\Delta \nu_{рез}^E = 2(\Delta \nu_{11,12} \cdot \cos \varphi + \Delta \nu_{11,13} \cdot \cos 2\varphi + \dots + \Delta \nu_{11,k} \cdot \cos k\varphi), \quad (4.7)$$

де

k – число карбонільних груп в агрегаті або полімерній молекулі;

$\Delta \nu_{11,12}$ – зміщення частоти коливання С=О за рахунок резонансної взаємодії карбонільних груп у положенні 11 та 12 і т.д.;

φ – кут повороту моментів переходу сусідніх карбонільних груп.

Зазвичай під час розрахунку резонансної (динамічної) взаємодії коливальних моментів переходу в біополімерах використовують диполь-дипольне наближення [107, 184, 228]. При цьому резонансне зрушення виражається формулою:

$$\Delta \nu_{рез} = \nu_C - \nu_0 - \frac{1}{h} L_a^f L_p^f \nu_{n\alpha, m\beta}, \quad (4.8)$$

де

h – постійна Планка;

L_a^f і L_p^f – коефіцієнти симетрії для коливань типу f ;

ν_0 – незбурена частота;

m і n – числа, які нумерують коливальні групи в елементарному осередку (полімерної молекули або агрегату);

$\nu_{n\alpha, m\beta}$ – матричний елемент оператора диполь-дипольної взаємодії моментів переходу, локалізованих у двох однакових коливальних групах.

У спрощеному вигляді енергія взаємодії між двома орієнтованими дипольними моментами переходу (див. рис. 2.2) може бути записана як [229]:

$$V = \frac{1}{\varepsilon} \frac{\left| \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial S_1} \right| \cdot \left| \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial S_2} \right|}{|\vec{R}|^3} (\cos \varphi - 3 \cos \beta \cdot \cos \gamma) \cdot S_1 \cdot S_2, \quad (4.9)$$

де

ε – діелектрична постійна;

$\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial S_1}$ – дипольний момент переходу (D1Å);

S_1 і S_2 – валентні координати;

R – відстань між центрами взаємодіючих диполів (Å).

У згорнутому вигляді резонансний частотний зсув у випадку двох взаємодіючих коливальних груп відповідно до формул (4.8) і (4.9) записується так:

$$\Delta \nu_{\text{рез}} = \frac{M}{h\varepsilon} \cdot \frac{\cos \alpha - 3 \cos \beta \cdot \cos \gamma}{R^3} = \frac{M}{h\varepsilon} \cdot G, \quad (4.10)$$

де

перший член є постійною величиною і містить добуток дипольних моментів

переходу $M = \left| \frac{\partial \vec{\mu}_1}{\partial S_1} \right| \cdot \left| \frac{\partial \vec{\mu}_2}{\partial S_2} \right|$, які визначаються з абсолютних інтенсивностей смуг

поглинання в інфрачервоних спектрах за формулою:

$$\left| \langle \vec{\mu} \rangle \right|^2 = \frac{2Ach}{8\pi^3\nu}, \quad (4.11)$$

де

A – абсолютна інтенсивність смуги поглинання;

c – швидкість світла у вакуумі;

ν – частота максимуму смуги;

h – постійна Планка.

У роботі [88] методом ЯМР спектроскопії у водному розчині визначено координати атомів димерного гетерокомплексу FMN-ТРН. Використовуючи ці дані можна визначити геометричний фактор G у формулі (4.10), вважаючи, в першому наближенні, що дипольний момент переходу спрямований по зв'язку C=O. Розрахунок показує, що величина R у формулі (4.10) між зв'язками C₂=O ТРН і C₄=O FMN більше 7 Å, тому моменти переходів цих груп атомів у димері практично не взаємодіють. Однак зв'язки C₂=O FMN і C₆=O ТРН

розташовуються у димері на досить близькій відстані ($R \approx 5 \text{ \AA}$) і цього виявилось цілком достатньо, щоб виникла взаємодія їх моментів переходу.

Використовуючи спектральні параметри з табл. 4.1 для обчислення геометричного фактора G і вважаючи, що моменти переходів розташовуються по зв'язках $C_2=O$ FMN і $C_6=O$ ТРН, можна отримати, що $\Delta\nu_{\text{рез}} = 3,5 \text{ см}^{-1}$.

Відомо, що для молекул білків та нуклеїнових кислот моменти переходів $C=O$ -груп атомів відхилені від напрямку зв'язку на кут $\varphi \approx 20^\circ$ [107, 184]. Враховуючи це і вважаючи, що агрегат FMN-ТРН є n -молекулярним ($n \geq 3$), а також враховуючи в розрахунках тільки взаємодію найближчих сусідів, отримуємо частотний зсув для перпендикулярної поляризації $\Delta\nu_{\text{рез}}^E \approx 5,5 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$), що узгоджується з експериментально спостережуваною величиною. Для паралельної поляризації – $\Delta\nu_{\text{рез}}^A \approx 7 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$). Відсутність експериментального значення поки не дозволяє провести порівняння з теоретично розрахованим значенням.

Таким чином, можна зробити висновок, що FMN і ТРН утворюють n -молекулярний агрегат ($n \geq 3$).

4.3 Гетероасоціація ТРН-ЕВ

Дослідження методом ЯМР показали, що в нейтральному розчині в суміші теофіліну і бромистого етидія формується стопковий гетерокомплекс з константою рівноваги 102 M^{-1} , яка займає проміжне значення між константами самоасоціації вихідних речовин ($K_{\text{ЕВ}} = 305 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{ТРН}} = 7,4 \text{ M}^{-1}$) [88].

Для з'ясування можливості утворення міжмолекулярного Н-зв'язку в стопковій структурі гетерокомплексу ТРН і ЕВ нами було отримано ІЧ- та КР-спектри в інтервалі частот функціональних груп ТРН і ЕВ [223].

На рис. 4.3 а наведено ІЧ-спектри поглинання нейтральних водних (D_2O) розчинів ТРН, ЕВ та їх комплексу, а також сумарний ІЧ-спектр

ТРН+ЕВ. Усі представлені спектри є результатом усереднення 10 вимірювань, виконаних в однакових експериментальних умовах.

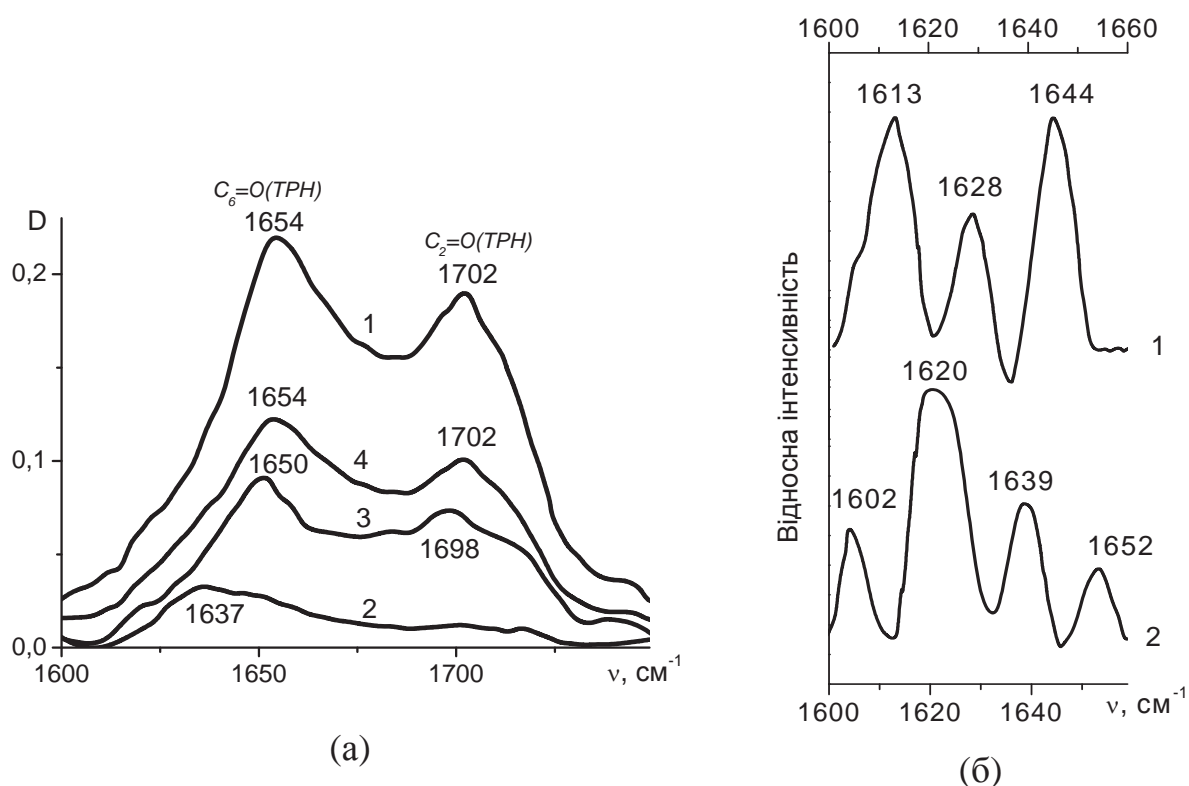


Рисунок 4.3 (а) ІЧ-спектри поглинання розчинів теofilіну (1), бромистого етидію (2), гетерокомплексу ТРН-ЕВ (3) і сумарний спектр ТРН+ЕВ (4); (б) спектри КР розчинів бромистого етидію (1) і гетерокомплексу ТРН-ЕВ (2). Для всіх розчинів $\text{pH} = 6,9 \div 7,0 (\pm 0,05)$

Звертає на себе увагу невеликий низькочастотний зсув ($\Delta\nu = 4 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$)) карбонільних атомних груп ТРН $\text{C}_2=\text{O}$ і $\text{C}_6=\text{O}$ (рис. 4.3 а, спектр 3), що свідчить про можливе утворення слабких Н-зв'язків.

На рис. 4.3 б наведено КР-спектри ЕВ і суміші ТРН-ЕВ, які отримані за результатами усереднення 10 вимірювань, виконаних в однакових експериментальних умовах. Відповідно до робіт [230, 231] на КР-спектрі бромистого етидію смуги при $\nu = 1628$ і 1644 cm^{-1} ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) відносяться до деформаційних коливань NH_2 -груп атомів ЕВ (див. рис. 1.2 б). Видно, що ці

смуги ЕВ зазнали в суміші високочастотних зміщень до 1639 і 1652 см^{-1} ($\pm 2\text{ см}^{-1}$), відповідно.

Низькочастотні зсуви карбонільних коливань ТРН в ІЧ-спектрі та високочастотні зсуви деформаційних коливань NH_2 -груп ЕВ у КР-спектрі вказують на формування Н-зв'язків. Однак це не узгоджується з даними роботи [88]. Згідно з моделлю структури гетерокомплексу ТРН-ЕВ, запропонованій у цій роботі, відстань між донорно-акцепторними групами ЕВ і ТРН занадто велика для того, щоб утворився Н-зв'язок. Ми припускаємо, що цю відстань міг перекрити ланцюжок з молекул води з Н-зв'язками типу $-C=O\cdots(H-O)_n\cdots(H-N-H)$. Це припущення може бути підтверджено або спростовано за допомогою результатів комп'ютерного моделювання системи «ТРН-ЕВ – вода» (див. підрозділ 4.5.2).

4.4 Гетероасоціація ТРН-PRF і CAF-ЕВ

За даними спектроскопії ЯМР теofilін та профлавін, кофеїн та бромистий етидій у водних розчинах формують стопкові гетероасоціати [9, 88]. Величини рівноважних констант гетероасоціації приймають проміжні значення між константами самоасоціації цих речовин ($K_{\text{ТРН}} = 7,4\text{ М}^{-1}$, $K_{\text{PRF}} = 698\text{ М}^{-1}$, $K_{\text{ТРН-PRF}} = 180\text{ М}^{-1}$ [88] і $K_{\text{CAF}} = 11,8\text{ М}^{-1}$, $K_{\text{ЕВ}} = 305\text{ М}^{-1}$, $K_{\text{CAF-ЕВ}} = 62\text{ М}^{-1}$ [9]), але міжмолекулярні Н-зв'язки в цих системах не виявлені. Разом з тим зазначені молекули в своїх структурах містять донорні та акцепторні групи, які здатні утворювати Н-зв'язки. Тому ми скористалися методом коливальної спектроскопії для оцінки можливості утворення міжмолекулярних Н-зв'язків у цих гетероасоціатах [223].

На рис. 4.4 і 4.5 приведено ІЧ-спектри сумішей ТРН-PRF і CAF-ЕВ, які є результатом усереднення 10 вимірювань, виконаних в однакових

експериментальних умовах, і сумарні спектри поглинання молекул їх складових.

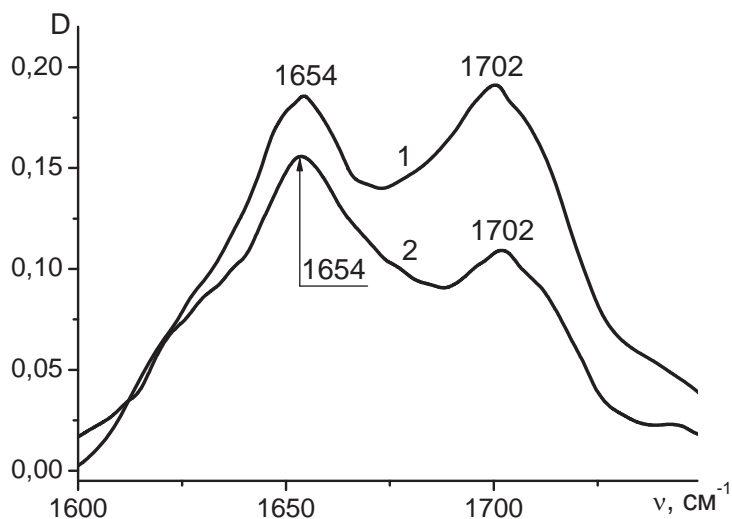


Рисунок 4.4 ІЧ-спектри поглинання розчину гетерокомплексу ТРН-PRF (1) і сумарний спектр ТРН+PRF (2). Для всіх розчинів рН = 6,9÷7,0 ($\pm 0,05$)

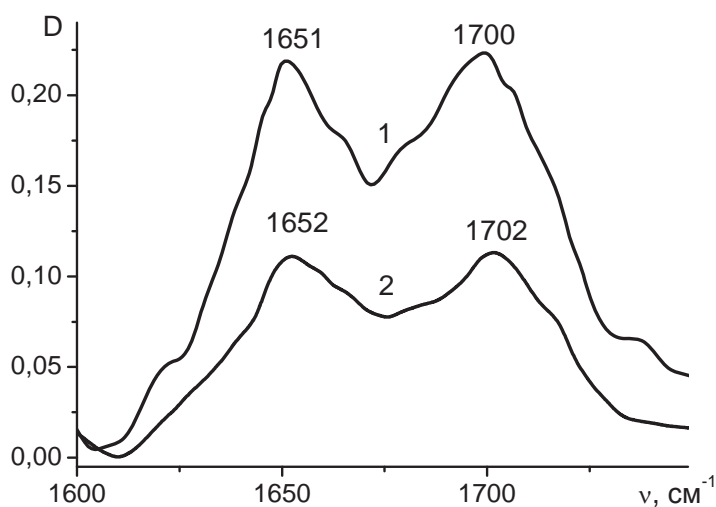


Рисунок 4.5 ІЧ-спектри поглинання розчину гетерокомплексу САФ-ЕВ (1) і сумарний спектр САФ+ЕВ (2). Для всіх розчинів рН = 6,9÷7,0 ($\pm 0,05$)

Видно, що частоти смуг поглинання карбонільних груп ТРН (рис. 4.4) і САФ (рис. 4.5) у сумішах практично не змінилися в порівнянні зі сумарними спектрами. Такий же частотний ефект (відсутність зсувів по частоті) смуг деформаційних коливань NH_2 -груп PRF і EB спостерігався в спектрах КР (дані не наведено). Тому слід виключити існування в цих гетероасоціатах міжмолекулярного Н-зв'язку. Цей висновок узгоджується з результатами аналізу даних ЯМР [9, 88].

Відсутність змін спектральних параметрів карбонільних коливань у сумішах TPH-PRF і CAF-EB може бути ознакою того, що в цих умовах гетерокомплекси не сформувалися. Однак, за даними робіт [9, 88, 232], TPH і PRF, CAF і EB утворюють гетероасоціати. Для з'ясування можливості утворення гетероасоціатів TPH-PRF і CAF-EB і механізмів стабілізації гетерокомплексів нами було проведено комп'ютерне моделювання цих систем у водному оточенні [224].

4.5 Комп'ютерне моделювання гетероасоціатів

Вплив міжплощинних взаємодій, міжмолекулярних Н-зв'язків та молекул води на стабілізацію гетерокомплексів БАР було досліджено за допомогою комп'ютерного моделювання методом Монте Карло (МС) у водному кластері (800 молекул води), докладний опис якого надано в підрозділі 2.3.

Результати комп'ютерного моделювання всіх досліджених нами гетероасоціатів наведено у табл. 4.2 [224]. Такі відомості необхідні нам для обґрунтування адекватності даних моделювання методом МС, які використовуються при побудові молекулярних моделей гетероасоціатів та описі механізмів їх стабілізації.

Результати методу МС включають у себе енергетичні характеристики (наведені в ккал/моль): E_{total} – повна потенційна енергія систем; E_{MEAN} – середнє значення загальної потенційної енергії систем; $E_{\text{WW-MEAN}}$ – середнє значення потенційної енергії вода-вода (на одну молекулу води); $E_{\text{W-BAC-MEAN}}$ – середнє значення потенційної енергії вода-Ліганд; $E_{\text{L1-L2}}$ – середнє значення потенційної енергії Ліганд1-Ліганд2 у гетероасоціаті; N, H_2O – кількість Н-пов'язаних молекул води в кластерах, обраних для моделювання F-структур ($1-2 \times 10^3$ елементарних конфігурацій при 5 К).

Таблиця 4.2

Результати моделювання методом МС систем «гетеродимер + 800 Н₂О» та їх F-структур; усі значення енергій наводяться у ккал/моль

гетеродимер	800 молекул води				F-структура	
	E _{MEAN}	E _{total}	E _{WW-MEAN}	E _{WBAC-MEAN}	N, H ₂ O	E _{W-BAC} , E _{L1-L2}
FMN-TPH	-9,2821 ±0,0043	-7383,85	-8,06	E _{W-TPH} = -69,24 E _{W-FMN} = -894,22 E _{FMN-TPH} = -11,13	113	E _{W-FMN} = -811,48 E _{W-TPH} = -72,27 E _{FMN-TPH} = -10,08
TPH-EB	-8,6897 ±0,0049	-6951,76	-8,36	E _{W-TPH} = -107,52 E _{W-EB} = -160,26 E _{TPH-EB} = -4,24	14	E _{W-EB} = -38,52 E _{W-TPH} = -57,00 E _{EB-TPH} = -2,78
					98	E _{W-EB} = -174,30 E _{W-TPH} = -113,18 E _{EB-TPH} = -2,74
TPH-PRF	-8,6968 ±0,005	-7046,94	-8,36	E _{W-TPH} = -108,51 E _{W-PRF} = -137,17 E _{TPH-PRF} = -8,56	13	E _{W-TPH} = -53,76 E _{W-PRF} = -59,81 E _{TPH-PRF} = -7,73
					46	E _{W-TPH} = -92,62 E _{W-PRF} = -113,34 E _{TPH-PRF} = -7,73
EB-CAF	-8,7007 ±0,0059	-6979,32	-8,39	E _{W-CAF} = -91,23 E _{W-EB} = -144,88 E _{CAF-EB} = -10,95	13	E _{W-CAF} = -46,11 E _{W-EB} = -40,73 E _{CAF-EB} = -10,41
					79	E _{W-CAF} = -91,45 E _{W-EB} = -138,38 E _{CAF-EB} = -10,43
FMN-EB	-9,4182 ±0,0048	-7534,56	-7,97	E _{W-FMN} = -988,92 E _{W-EB} = -113,72 E _{FMN-EB} = -91,59	106	E _{W-FMN} = -903,72 E _{W-EB} = -97,83 E _{FMN-EB} = -85,75
FMN-PRF	-9,1704 ±0,0036	-7336,32	-8,24	E _{W-FMN} = -604,77 E _{W-PRF} = -108,42 E _{FMN-PRF} = -75,78	84	E _{W-FMN} = -553,48 E _{W-PRF} = -96,53 E _{FMN-PRF} = -73,09

Як видно з табл. 4.2, всі системи «гетеродимер + 800 Н₂О» є енергетично вигідними та стабільними (значення E_{MEAN} і E_{total}, табл. 4.2). Структура водного кластеру зберігається (значення E_{WW-MEAN}, табл. 4.2),

оскільки у «чистому» водному кластері для моделі молекули води Маленкова та атом-атомних потенційних функцій Маленкова-Полтєва, які використовуються в розрахунках, значення енергії взаємодії порядку $-8,50 \div -8,60$ ккал/моль. Експериментальне значення енергії взаємодії вода-вода порядку $-9,90$ ккал/моль [233].

Також можна порівняти енергію взаємодії *Ліганд-Ліганд*, отриману для гетероасоціатів (E_{L1-L2} , табл. 4.2) з даними про вклади електростатичних E_{el-st} і ван-дер-ваальсових E_{vdw} взаємодій, отриманих з результатів моделювання методом молекулярної динаміки [234-236].

Значення енергій таких взаємодій $E_{el-st} + E_{vdw}$ для гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF становили $-39,8$ ккал/моль і $-28,9$ ккал/моль, відповідно. Між цими значеннями $E_{el-st} + E_{vdw}$ і даними табл. 4.2 (E_{L1-L2}) немає прямої відповідності, але спостерігається загальна тенденція зміни цих величин, отриманих двома різними методами. Обидві серії даних дозволяють припустити наступну послідовність зменшення енергії в гетеродимерах: $FMN-EB > FMN-PRF$.

Для гетероасоціатів TRH-EB, FMN-TRH, TRH-PRF дані для енергій електростатичних, ван-дер-ваальсових і гідрофобних взаємодій у літературних джерелах відсутні.

Отримані результати для енергій взаємодії E_{L1-L2} можна порівняти тільки з константами та ентальпіями гетероасоціації, одержаними з ЯМР експериментів [11, 88]. Константи асоціації дорівнюють 102 M^{-1} , 180 M^{-1} і 180 M^{-1} , а ентальпії гетероасоціації $-5,98$ ккал/моль, $-8,01$ ккал/моль і $-8,21$ ккал/моль для TRH-EB, FMN-TRH і TRH-PRF, відповідно. У цьому випадку можна говорити тільки про загальну тенденцію: спорідненість TRH до FMN і до PRF є саме такою або більшою, ніж їх спорідненість до EB, що узгоджується з експериментальними даними роботи [88] і нашими результатами моделювання методом MC [224].

Таблиця 4.3

Гідрофобні взаємодії в системі гетеродимер + H₂O за даними моделювання методом МС; початкові структури гетеродимерів взяті з ЯМР даних (ЯМР); «МС, вода» відповідає структурам гетеродимерів, отриманих моделюванням методом МС у водному кластері з 800 H₂O; «МС, F-стр» відповідає структурам гетеродимерів, отриманих моделюванням методом МС F-структур; у дужках наведені Δ SASA і E_{hyd}, отримані методом молекулярної динаміки [240]

гетеродимер	Δ SASA, Å ²	E _{hyd} , ккал/моль
FMN-TPH (ЯМР)	224,92	-11,3
FMN-TPH (МС, вода)	205,79	-10,3
FMN-TPH (МС, F-стр)	190,14	-9,5
TPH-EB (МС, вак)*	217,16	-10,9
TPH-EB (МС, вода)	161,77	-8,1
TPH-EB (МС, F-стр)	132,23	-6,6
TPH-PRF (ЯМР)	199,39	-9,9
TPH-PRF (МС, вода)	182,18	-9,1
TPH-PRF (F-стр)	183,27	-9,2
EB-CAF (ЯМР)	237,06	-11,9
EB-CAF (МС, вода)	245,39	-12,3
EB-CAF (МС, F-стр)	246,4 (258)	-12,3 (-12,9)
FMN-EB (ЯМР)	353,44	-17,7
FMN-EB (МС, вода)	282,45	-14,1
FMN-EB (МС, F-стр)	313,5 (308)	-15,7 (-15,4)
FMN-PRF (ЯМР)	244,88	-12,2
FMN- PRF (МС, вода)	230,52	-11,5
FMN- PRF (МС, F-стр)	251,94 (252)	-12,6 (-12,6)

* – початкову структуру отримано при оптимізації методом МС у вакуумі

Також було розраховано енергію гідрофобних взаємодій асоціатів, що утворюються, за допомогою методу, заснованого на експериментально встановленій лінійній залежності між енергією розчинення гідрофобних амінокислот і простих вуглеводнів та зміни площі поверхні, яка доступна розчиннику (Solvent Accessible Surface Area, SASA): $\Delta E_{\text{hyd}} = \gamma \Delta \text{SASA}$ [237,

238]. Зменшення SASA на 1 \AA^2 змінює гідрофобні взаємодії на $\gamma \sim 50$ кал/моль [239]. SASA визначається за допомогою «обкатування» поверхні молекули пробною кулею з радіусом $1,4 \text{ \AA}$. Розрахунок зміни SASA після асоціації визначали як $\Delta\text{SASA} = (\text{SASA}_{\text{L1}} + \text{SASA}_{\text{L2}}) - \text{SASA}_{\text{h}}$, де SASA_{L1} і SASA_{L2} – це SASA мономерів, SASA_{h} – це SASA гетеродимерів, відповідно. Значення $\Delta\text{SASA} (\text{\AA}^2)$ і E_{hyd} (ккал/моль) наведені у табл. 4.3.

Ці результати дозволяють зробити висновок про значну роль гідрофобних взаємодій у стабілізації всіх досліджуваних гетеродимерів. Отримані дані узгоджуються з результатами моделювання методом молекулярної динаміки гетеродимерів FMN-EB, FMN-PRF і CAF-EB [240].

Таким чином, аналіз енергетичних характеристик всіх вивчених систем гетеродимер-вода дозволяє зробити висновок, що результати, отримані за допомогою моделювання методом МС, є коректними, і цей метод може використовуватися при аналізі структур гетеродимерів у водному кластері та для побудови їх молекулярних моделей. Далі розглянуто більш докладно результати МС моделювання гетеродимерів FMN-TPH, TPH-EB, TPH-PRF і CAF-EB. Результати ІЧ- і КР-спектроскопічного дослідження і моделювання методом МС систем FMN-EB і FMN-PRF будуть викладені в Розділі 5.

4.5.1 Гетеродимер FMN-TPH

Згідно з даними моделювання методом МС структура FMN-TPH відрізняється від структури, що спостерігалася за допомогою ЯМР або була отримана за допомогою оптимізації методом МС у вакуумі (рис. 4.6): міжмолекулярні Н-зв'язки не виявлено ні в одній зі структур FMN-TPH.

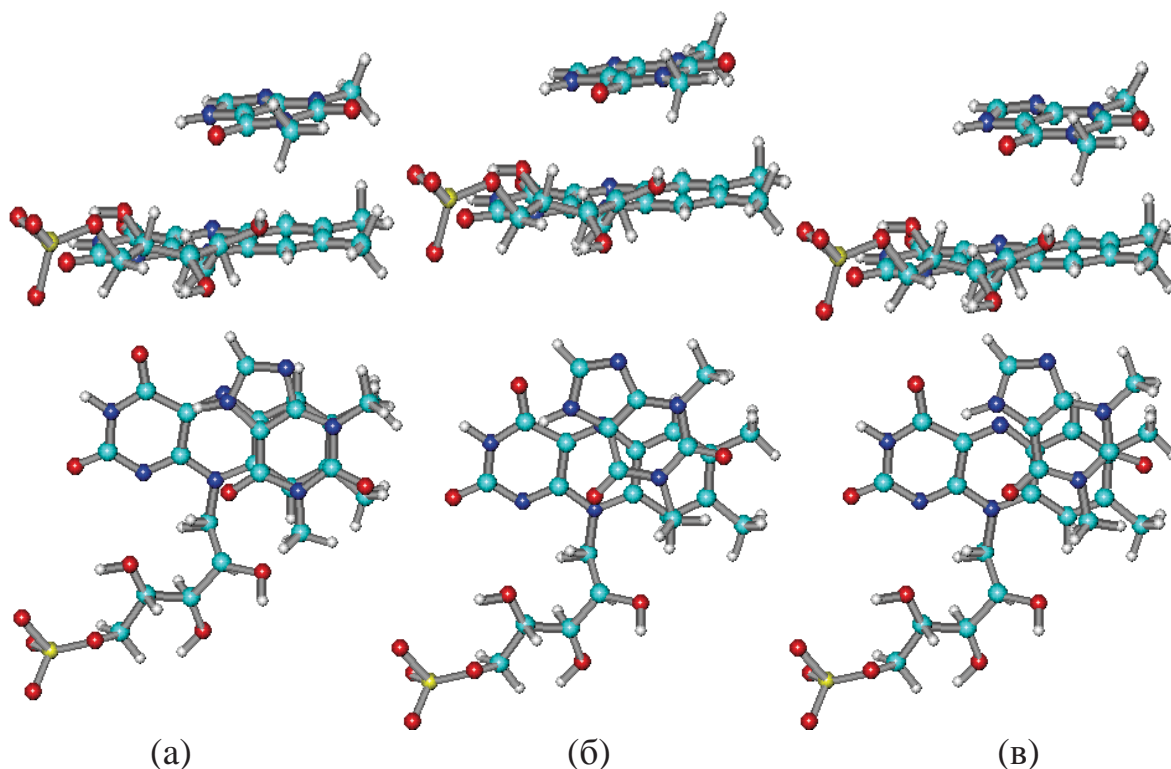


Рисунок 4.6 Конфігурація гетеродимеру FMN-ТРН: (а) початкова структура (ЯМР дані), $E_{\text{FMN-ТРН}} = -17,1$ ккал/моль; (б) оптимізація методом МС у вакуумі, $E_{\text{FMN-ТРН}} = -12,8$ ккал/моль; (в) моделювання методом МС у воді (800 H_2O): $E_{\text{FMN-ТРН}} = -10,2$ ккал/моль

За результатами моделювання методом МС визначено координати атомів димерного гетерокомплексу FMN-ТРН. Як і в разі визначення координат з даних ЯМР (див. підрозділ 4.2.2), визначали геометричний фактор G і відстань R за формулою (4.10) між моментами переходів на зв'язках $\text{C}_2=\text{O}$ (FMN) і $\text{C}_6=\text{O}$ (ТРН) і між моментами переходів на зв'язках $\text{C}_4=\text{O}$ (FMN) і $\text{C}_2=\text{O}$ (ТРН). Відстані R для гетеродимера у водному кластері (як і для оптимізованої у вакуумі його структури) виявилися близько 9 Å. Тому можна зробити висновок, що для димерної форми гетерокомплексу FMN-ТРН, отриманого з результатів моделювання методом МС, моменти переходів цих груп атомів у димері практично не взаємодіють.

Використовуючи дані моделювання методом МС у водному кластері, було визначено кількість молекул води, які утворюють Н-зв'язки з FMN і/або ТРН згідно з енергетичними і геометричними критеріями (113 молекул води).

Потім було сформовано систему FMN-TPH + 113 H₂O і виконано її моделювання методом МС для отримання F-структури. Миттєві конфігурації гетеродимеру FMN-TPH приведено на рис. 4.7 і 4.8.

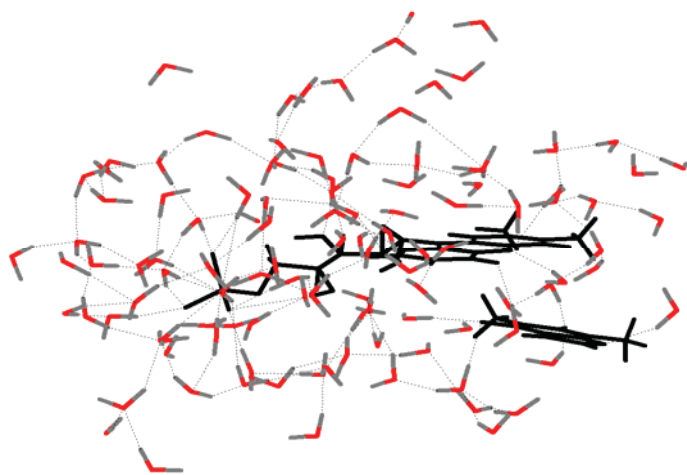
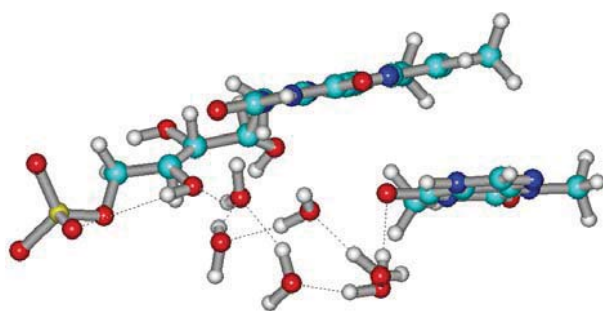
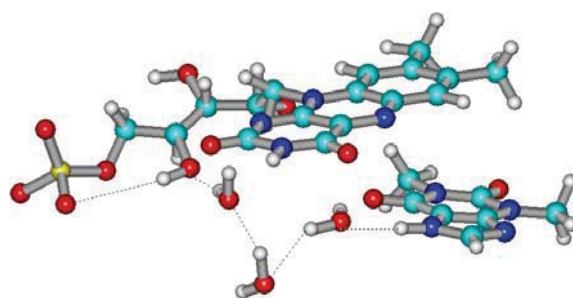


Рисунок 4.7 Миттєва конфігурація гетеродимеру FMN-TPH у водному кластері (F-структура): FMN-TPH + 113 H₂O, $E_{\text{FMN-TPH}} = -10,08$ ккал/моль; Н-зв'язки показано пунктирними лініями



(а)



(б)

Рисунок 4.8 Миттєві конфігурації F-структури гетеродимеру FMN-TPH; спостерігаються два водних містки між: (а) РО групою FMN і C9=O12 групою TPH; (б) C24=O25 групою «хвоста» FMN і N1H21 групою TPH. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері з 800 молекулами води, а також миттєвих конфігурацій F-структур, дозволив встановити два водних містки навколо гетеродимеру FMN-TPH.

Перший розташовується між РО акцепторною групою FMN і C9=O12 (група C₆=O в експерименті) акцепторною групою TPH (6 молекул води, рис. 4.8 а), а другий – між C24=O25 акцепторною групою «хвоста» FMN і N1H21 (група N₇-H в експерименті) донорною групою TPH (3 молекули

води, рис. 4.8 б). Для результатів МС моделювання нумерація атомів та заряди на атомах відповідних лігандів цього гетероасоціату приведено у додатку В, рис. В.1 і В.2, табл. В.1 і В.2.

Однак, необхідно відзначити, що згідно з експериментальними даними, більш вірогідною формою гетерокомплексу FMN-TPH є *n*-молекулярний агрегат FMN-TPH за типом π -стекингу.

Отримані нами дані моделювання методом МС вказують на те, що структури гетеродимерів стабілізуються як взаємодіями між молекулами FMN і TPH у стопці (енергії взаємодії у вакуумі $E_{\text{FMN-TPH}} = -12,8$ ккал/моль та у водному кластері $E_{\text{FMN-TPH}} = -10,20$ ккал/моль), так і водними містками [224]. Однак утворення водних містків між молекулами в гетероасоціаті не підтверджується нашими ІЧ-спектроскопічними даними [223], оскільки в ІЧ-спектрах не зафіксовано низькочастотних зсувів смуг поглинання донорно-акцепторних груп, які зазвичай пов'язують з гідратацією відповідних гідратно-активних центрів. Необхідно в подальшому виконати комп'ютерне моделювання *n*-молекулярного агрегату FMN-TPH методом молекулярної динаміки.

4.5.2 Гетеродимер TPH-EB

При переході з вакууму до водного кластеру гетероасоціат TPH-EB практично «розвалився» (рис. 4.9 а): енергія взаємодії гетероасоціату TPH-EB у водному кластері зменшилася приблизно в чотири рази в порівнянні з її значенням у вакуумі, а хромофори двох лігандів виявилися розташованими під значним кутом (рис. 4.9 б). Орієнтація донорно-акцепторних груп (C=O і NH₂) обох лігандів виявилася такою, що утворення міжмолекулярних Н-зв'язків між ними неможливе.

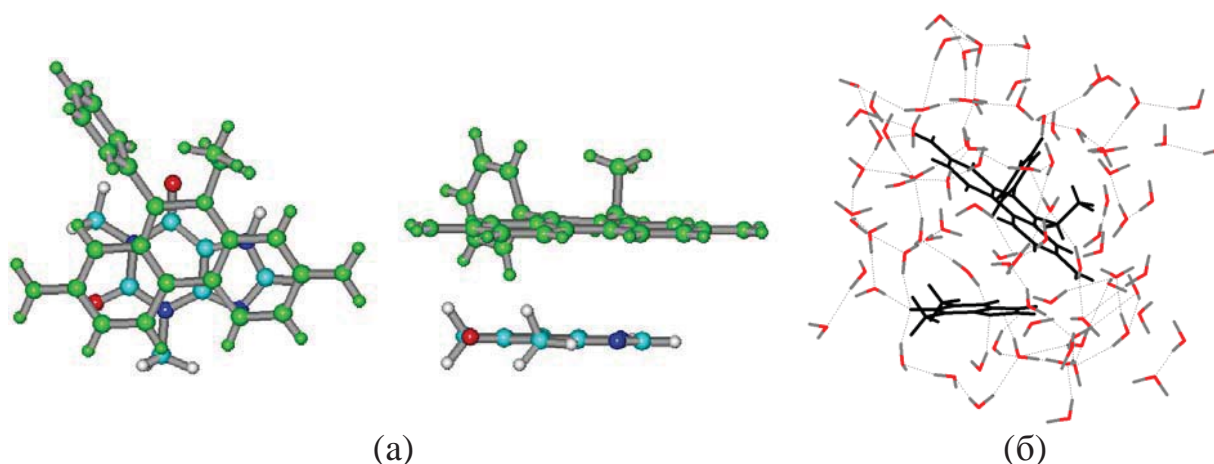


Рисунок 4.9 Конфігурація гетеродимеру ТРН-ЕВ: (а) у вакуумі, моделювання методом МС, $E_{\text{ТРН-ЕВ}} = -11,62$ ккал/моль; (б) гетеродимер ТРН-ЕВ і найближчі 98 H_2O , $E_{\text{ТРН-ЕВ}} = -2,74$ ккал/моль. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Слід зазначити, що згідно з ЯМР даними міжмолекулярний Н-зв'язок у гетеродимері ТРН-ЕВ не утворюється. Значення константи гетероасоціації ТРН-ЕВ (102 M^{-1}) займає проміжне значення між константами самоасоціації ЕВ і ТРН ($K_{\text{ЕВ-ЕВ}} = 305 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{ТРН-ТРН}} = 7,4 \text{ M}^{-1}$) [11, 88]. Але показані нами [223] низькочастотні зсуви карбонільних коливань ТРН в ІЧ-спектрі та високочастотні зсуви деформаційних коливань NH_2 -груп ЕВ у КР-спектрі вказують на формування Н-зв'язків. Ймовірно, таку зміну спектрів стекінг-димеру ТРН-ЕВ можна пояснити взаємодією донорно-акцепторних груп лігандів з молекулами води.

Дійсно, аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері (800 молекул води) і в F-структурах дозволив визначити існування трьох водних містків, що сформувалися між донорно-акцепторними групами лігандів (рис. 4.10).

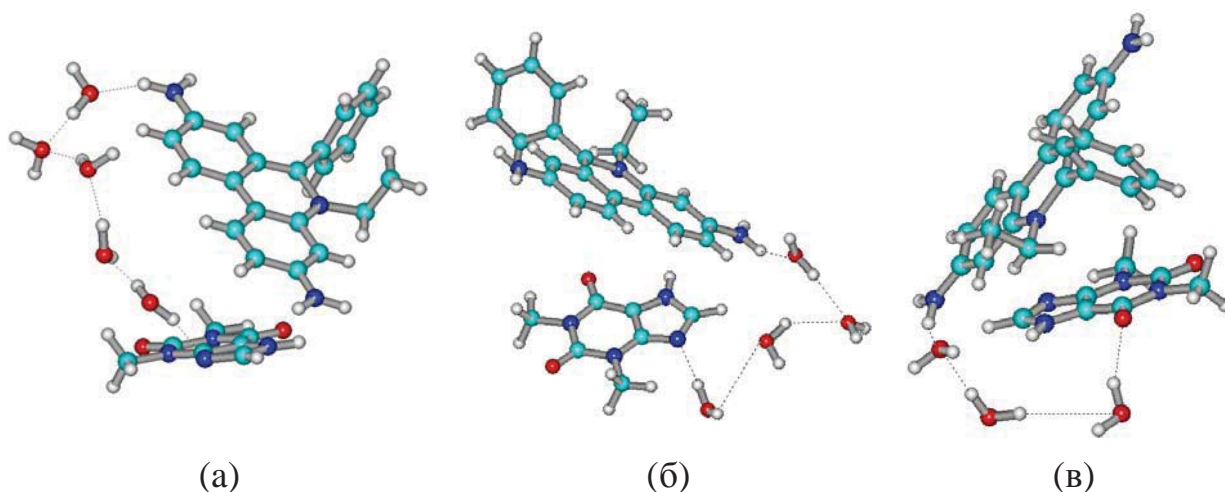


Рисунок 4.10 Миттєві конфігурації F-структури ТРН-ЕВ у водному кластері, три водних містки: (а) ТРН N4...H₂N₂₄ ЕВ (5 H₂O); (б) ТРН N4...H₂N₂₃ ЕВ (4 H₂O); (в) ТРН C9=O12...H₂N₂₃ ЕВ (3 H₂O). Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Перший утворюється між атомом-акцептором N4 ТРН (група N₉ в експерименті) і донорною групою N₂₄H₂ ЕВ і складається з 5 молекул води (рис. 4.10 а, для результатів МС моделювання цього гетероасоціату нумерація атомів та заряди на атомах відповідних лігандів приведено у додатку В, рис. В.2 і В.3, табл. В.2 і В.3). Другий складається з 4 молекул води, розташованих між тим же акцептором ТРН і донорною аміногрупою N₂₃H₂ ЕВ (рис. 4.10 б). Третій водний місток розташований між акцепторною карбонільною групою C9=O12 ТРН (C₆=O-група в експерименті) і донорною аміногрупою N₂₃H₂ ЕВ (рис. 4.10 в). Така «упорядкована» водна структура навколо гетероасоціату ТРН-ЕВ може додатково стабілізувати гетеродимер, обмежуючи рухливість молекул у стекінг-асоціаті.

4.5.3 Гетеродимер ТРН-PRF

Міжмолекулярні Н-зв'язки не формуються ні в одній зі структур гетеродимеру ТРН-PRF. Використовуючи дані моделювання методом МС у водному кластері, нами було визначено кількість молекул води, що

утворюють Н-зв'язки з PRF і/або ТРН згідно з енергетичними та геометричними критеріями (56 молекул води). Потім було сформовано систему ТРН-PRF + 56 H₂O і виконано її моделювання методом МС для отримання F-структури [224]. Миттєві конфігурації гетеродимеру ТРН-PRF приведено на рис. 4.11.

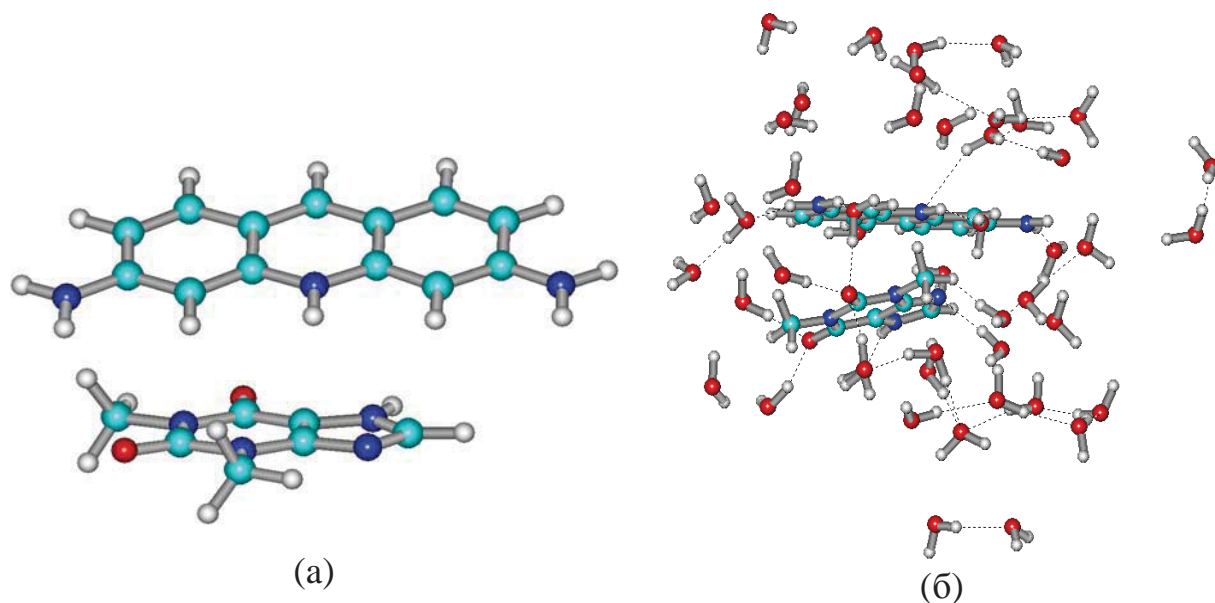


Рисунок 4.11 Миттєві конфігурації гетеродимеру ТРН-PRF: (а) оптимізація у вакуумі, $E_{\text{ТРН-PRF}} = -9,92$ ккал/моль; (б) миттєва конфігурація у водному кластері: ТРН-PRF + 56 H₂O, $E_{\text{ТРН-PRF}} = -7,73$ ккал/моль. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері та F-структур дозволив визначити 11 молекул води, що утворюють Н-зв'язки з PRF і/або ТРН і два водних містки між мономерами в гетероасоціаті ТРН-PRF (для результатів МС моделювання нумерація атомів та заряди на атомах відповідних лігандів цього гетероасоціату приведено у додатку В, рис. В.2 і В.4, табл. В.2 і В.4). Перший місток (6 молекул води, рис. 4.12 а) виявлено між N15H₂ донорною групою PRF і N1H21 донорною групою ТРН (група N₇–Н в експерименті). Другий (1 молекула води, рис. 4.12 б) виявлено між N16H₂

донорною групою PRF і $C7=O10$ акцепторною групою TPH ($C_2=O$ -група в експерименті).

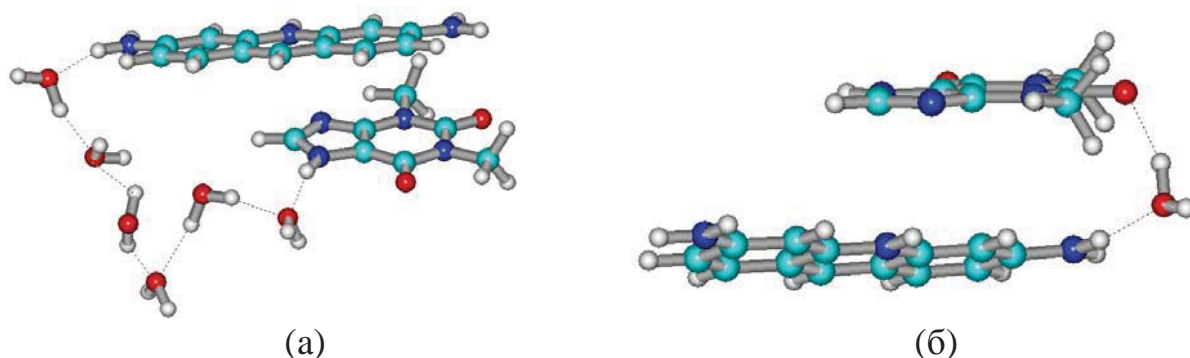


Рисунок 4.12 Миттєві конфігурації F-структури гетеродимеру TPH-PRF; водні містки між $N15H_2$ групою PRF і $N1-H21$ групою TPH (а); та між $N16H_2$ групою PRF і $C7=O10$ групою TPH (б). Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Такі водні містки навколо гетероасоціату TPH-PRF можуть додатково стабілізувати гетеродимер, обмежуючи рухливість молекул у стекінг-асоціаті.

4.5.4 Гетеродимер CAF-EB

Згідно з даними моделювання методом МС структура CAF-EB дещо відрізняється від структури, отриманої за допомогою ЯМР або після оптимізації методом МС у вакуумі: міжмолекулярні Н-зв'язки не формуються ні в одній зі структур CAF-EB.

Використовуючи дані моделювання методом МС у водному кластері, було визначено кількість молекул води, які утворюють Н-зв'язки з EB і/або CAF згідно з енергетичними та геометричними критеріями (79 молекул води). Потім для отримання F-структури нами було сформовано систему CAF-EB + 79 H_2O і проведено її МС моделювання [224].

Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері з 800 молекулами води і миттєвих конфігурацій F-структур дозволив встановити три водних містки навколо гетеродимеру CAF-EB. Перший місток утворюється між акцепторною

N9 групою CAF і донорною N23H₂ групою EB (9 молекул води, рис. 4.13 а), другий – між C2=O11 акцепторною групою CAF і N24H₂ донорною групою EB (2 молекули води, рис. 4.13 б), третій – між C6=O13 акцепторною групою CAF і N23H₂ донорною групою EB (5 молекул води, рис. 4.13 в).

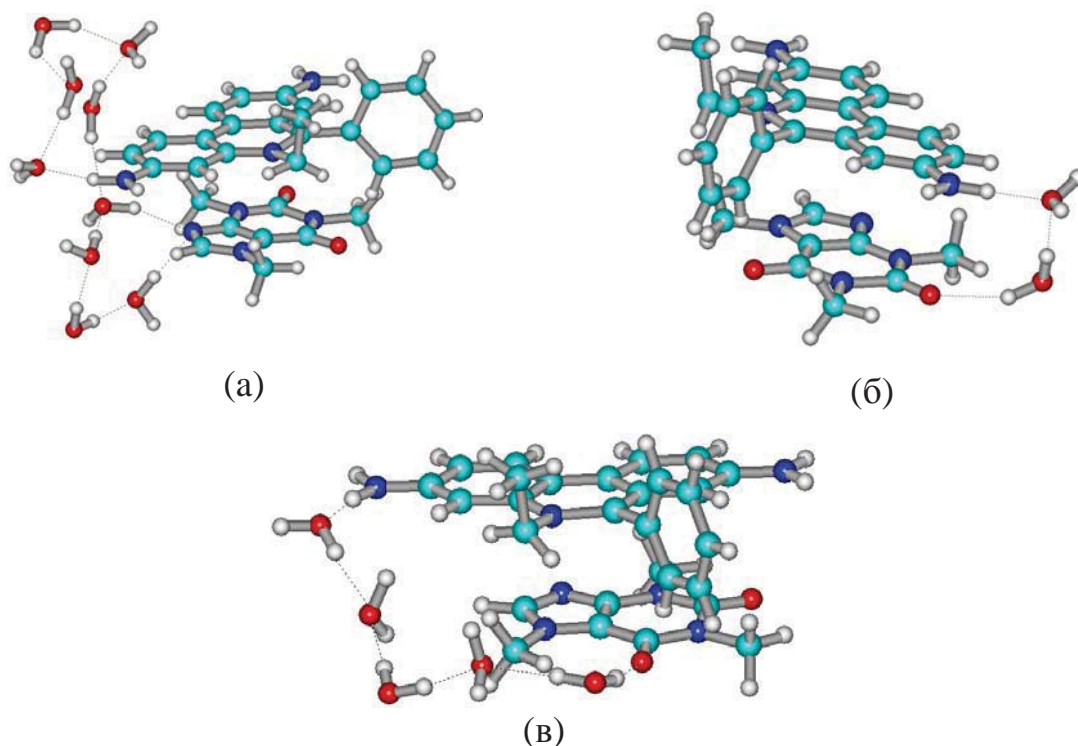


Рисунок 4.13 Миттєві конфігурації гетеродимеру CAF-EB; спостерігаються 3 водних містки навколо гетеродимеру CAF-EB: (а) CAF N9...H2N23 EB; (б) CAF C2=O11...H2N24 EB; (в) CAF C6=O13...H2N23 EB. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Для кофеїну нумерація основних атомів кільця для експериментальної частини збігається з нумерацією атомів, що використовувалася в моделюванні МС. Для результатів МС моделювання нумерація атомів та заряди відповідних лігандів цього гетероасоціату приведено у додатку В, рис. В.3 і В.5, табл. В.3 і В.5.

На рис. 4.14 і 4.15 приведено миттєві конфігурації гетеродимеру CAF-EB.

міжмолекулярні Н-зв'язки не утворюються. Ці результати узгоджуються з експериментальними дослідженнями асоціації лігандів у водних розчинах [11, 86, 88, 223], крім ТРН-ЕВ [223].

У разі гетеродимерів ТРН-ЕВ, ТРН-PRF і САФ-ЕВ докладний опис їх взаємодії з водним оточенням, отриманий за результатами моделювання методом МС, дозволяє пояснити додаткову стабілізацію цих гетерокомплексів шляхом утворення водних містків між донорно-акцепторними атомними групами лігандів. Утворення «впорядкованої» водної структури навколо гетероасоціатів може додатково стабілізувати гетеродимери, обмежуючи рухливість молекул у стекінг-асоціаті, а також рухливість їх бічних ланцюжків.

Висновки до розділу 4

1. ІЧ-спектроскопічні дослідження в нейтральних розчинах показали відсутність міжмолекулярних Н-зв'язків у гетероасоціатах FMN-ТРН, ТРН-PRF і САФ-ЕВ, на відміну від комплексу ТРН-ЕВ, в якому формується міжмолекулярний Н-зв'язок. Зроблено висновок про те, що FMN і ТРН формують *n*-молекулярний агрегат.
2. Методом МС моделювання гетероасоціатів FMN-ТРН, ТРН-ЕВ, ТРН-PRF і САФ-ЕВ встановлено факт додаткової стабілізації цих гетерокомплексів шляхом утворення водних містків між донорно-акцепторними атомними групами лігандів. Утворення «впорядкованої» водної структури навколо гетероасоціатів може додатково стабілізувати гетеродимери, обмежуючи рухливість молекул у стекінг-асоціатах, а також рухливість їх бічних ланцюжків.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [223], [224].

РОЗДІЛ 5

ПРОЯВ ВОДНЕВОГО ЗВ'ЯЗКУ В КОЛИВАЛЬНИХ СПЕКТРАХ ГЕТЕРОАСОЦІАТИВ І ПРИ ЗВ'ЯЗУВАННІ БАР З ДНК

У цьому розділі дисертації представлені експериментальні результати ІЧ- і КР-спектроскопії та комп'ютерного моделювання гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF [223, 241], які у водних розчинах, згідно з даними ЯМР і УФ-спектроскопії, формують гетероасоціати з утворенням міжмолекулярних Н-зв'язків, і комплексоутворення бромистого етидію з ДНК [242].

5.1 Гетероасоціація флавінмононуклеотиду і бромистого етидію

У роботі [86] показано, що при фізіологічних умовах ($\text{pH} = 7,1$ і $0,1 \text{ M}$ Na-фосфатний буфер) мутаген бромистий етидій формує π -стопковий гетерокомплекс з флавінмононуклеотидом з константою рівноваги $K_C = 640 \text{ M}^{-1}$ і енергією (ентальпією) $\Delta H_C = -7,9 \text{ ккал/моль}$, що в 2,0-2,5 рази вище, ніж константа самоасоціації для кожної з речовин ($K_{\text{FMN}} = 265 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{EB}} = 305 \text{ M}^{-1}$). Передбачалося, що збільшення стабільності гетерокомплексу пов'язано з утворенням міжмолекулярного Н-зв'язку, $\text{C}_2=\text{O}(\text{FMN}) \cdots \text{H} - \overset{|}{\text{N}} - \text{H}(\text{EB})$, про що також свідчила структура, розрахована для суміші 1:1 вихідних речовин [86]. Ця розрахована структура демонструє високу ступінь перекривання ароматичних хромофорів лігандів, до енергії стабілізації яких найбільший внесок дають дисперсійні взаємодії.

Для з'ясування існування міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-EB нами було записано ІЧ-спектри водних (D_2O) розчинів FMN, EB та їх суміші в області поглинання карбонільних коливань (рис. 5.1 а). Також було записано КР-спектри розчинів EB і гетерокомплексу в області NH_2 деформаційних коливань (рис. 5.1 б) [223, 241]. Усі спектри

отримано усередненням не менше 10 вимірювань, виконаних в однакових експериментальних умовах.

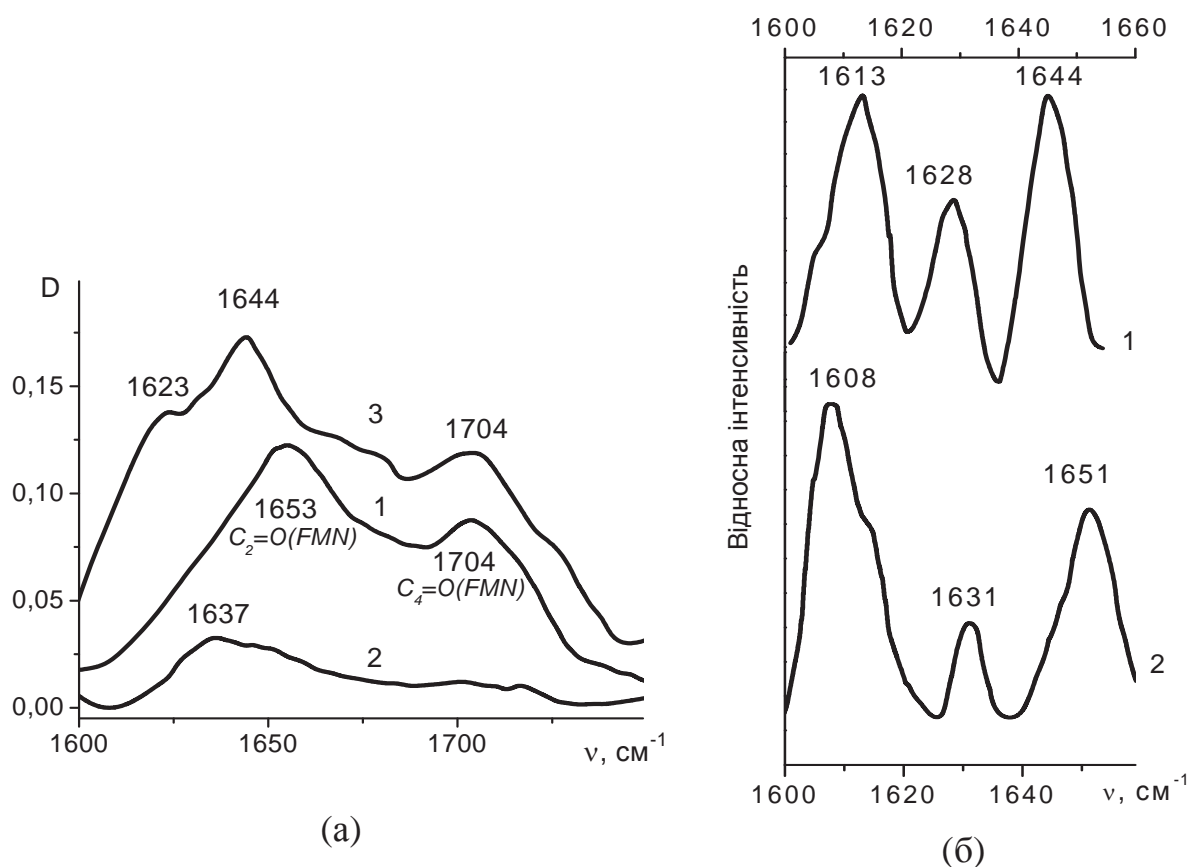


Рисунок 5.1 (а) ІЧ-спектри поглинання розчинів FMN (1), EB (2) і гетерокомплексу FMN-EB (3); (б) КР-спектри розчинів EB (1), і суміші FMN-EB (2). Для всіх розчинів pH = 6,9÷7,0 ($\pm 0,05$)

Як згадувалося в підрозділі 3.1, високочастотна смуга поглинання з максимумом при $\nu = 1704 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ cm}^{-1}$) пов'язана з коливаннями карбонільної $\text{C}_4=\text{O}$ -групи FMN, а більш низькочастотна смуга пов'язана з коливаннями карбонільної групи $\text{C}_2=\text{O}$ (див. рис. 1.4) [215-217]. Також у підрозділі 4.3 було наведено дані про те, що на спектрі КР смуги при $\nu = 1628$ і 1644 cm^{-1} ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) відносяться до деформаційних коливань NH_2 -груп атомів EB (див. рис. 1.2 б) [230, 231].

На рис. 5.2 приведено ІЧ-спектр поглинання суміші FMN-EB і спектр суми однокомпонентних спектрів FMN і EB. Видно, що інтенсивність

спектру суміші істотно зросла, а частота коливання групи $C_2=O$ в комплексі зазнала низькочастотного зсуву на $\Delta\nu = 9 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$) (рис. 5.1 а). У той же час смуга поглинання групи $C_4=O$ з максимумом при 1704 см^{-1} ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$) не зазнала будь-яких частотних зміщень у порівнянні зі спектром FMN без EB. У спектрі КР (рис. 5.1 б) при утворенні комплексу FMN-EB смуга бромистого етидію при 1644 см^{-1} ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) змістилася у високочастотну область на $\Delta\nu = 7 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$).

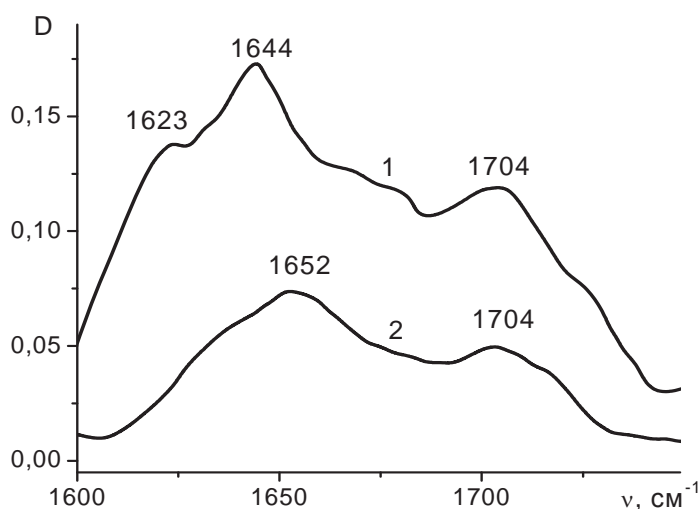


Рисунок 5.2 ІЧ-спектр поглинання розчину суміші FMN-EB (1) і спектр суми однокомпонентних спектрів FMN і EB (2). Для всіх розчинів рН = 6,9÷7,0 ($\pm 0,05$)

Такий характер зміни частот та інтенсивностей в ІЧ- і КР-спектрах однозначно свідчить про утворення міжмолекулярного Н-зв'язку типу $C_2=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H$ (EB) між молекулами FMN і EB в 1:1 стекінг-асоціаті. Цей висновок узгоджується з припущенням про формування Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-EB, зазначеному в посиланні [86] і отриманим опосередковано з ЯМР даних, на підставі аналізу ентальпії гетероасоціації [115] і ймовірності перенесення заряду [116].

Як вже згадувалося раніше (див. підрозділ 4.1), авторами робіт [91, 116] в якості непрямого критерію додаткової стабілізації гетерокомплексів було запропоновано фактор f_C , що відображає відносний внесок гетероасоціації в

сумарну динамічну рівновагу в розчині. Згідно з [91, 116], за умови $f_C \geq 35\%$ є висока ймовірність стабілізації гетерокомплексу Н-зв'язком.

Величина фактора f_C для системи FMN-EB ($K_{\text{FMN}} = 265 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{EB}} = 305 \text{ M}^{-1}$, $K_C = 640 \text{ M}^{-1}$ [86]) дорівнює $f_C = 52,9\%$, що помітно перевищує поріг 35% і також підтверджує припущення про формування Н-зв'язку.

5.2 Гетероасоціація флавінмононуклеотиду і профлавіну

ЯМР дослідження комплексоутворення флавінмононуклеотиду з мутагеном профлавіном так само, як і у випадку з бромистим етидієм, показали, що рівноважна константа гетероасоціації ($K_C = 920 \text{ M}^{-1}$) і ентальпія ($\Delta H = -9,8 \text{ ккал/моль}$) значно вище за абсолютною величиною, ніж значення тих же параметрів для самоасоціації вихідних речовин ($K_{\text{FMN}} = 265 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{PRF}} = 700 \text{ M}^{-1}$) [86]. У цій же роботі автори припустили, що збільшення значень термодинамічних параметрів гетероасоціації також можна пояснити утворенням міжмолекулярного Н-зв'язку між відповідними донорно-акцепторними групами молекул FMN і PRF.

Аналіз ІЧ-спектрів і спектрів комбінаційного розсіювання світла FMN, PRF та їх суміші ми проводили, як і у випадку системи FMN-EB [223, 241]. На рис. 5.3 а приведено ІЧ-спектри суміші FMN-PRF і спектр суми FMN і PRF однокомпонентних спектрів, які отримані на основі усереднення 10 вимірювань, виконаних в однакових експериментальних умовах.

З рис. 5.3 а можна бачити, що інтенсивність смуг поглинання спектру суміші значно збільшується, а максимум смуги поглинання при 1650 см^{-1} ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$) (коливання $\text{C}_2=\text{O}$ -групи FMN) змістився в межах помилки ($\Delta\nu = 2 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$)). Разом з цим максимум смуги поглинання $\text{C}_4=\text{O}$ -групи FMN зміщується в низькочастотну область на $\Delta\nu = 6 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 1 \text{ см}^{-1}$) при формуванні комплексу. В той же час у КР-спектрах (рис. 5.3 б) смуги з

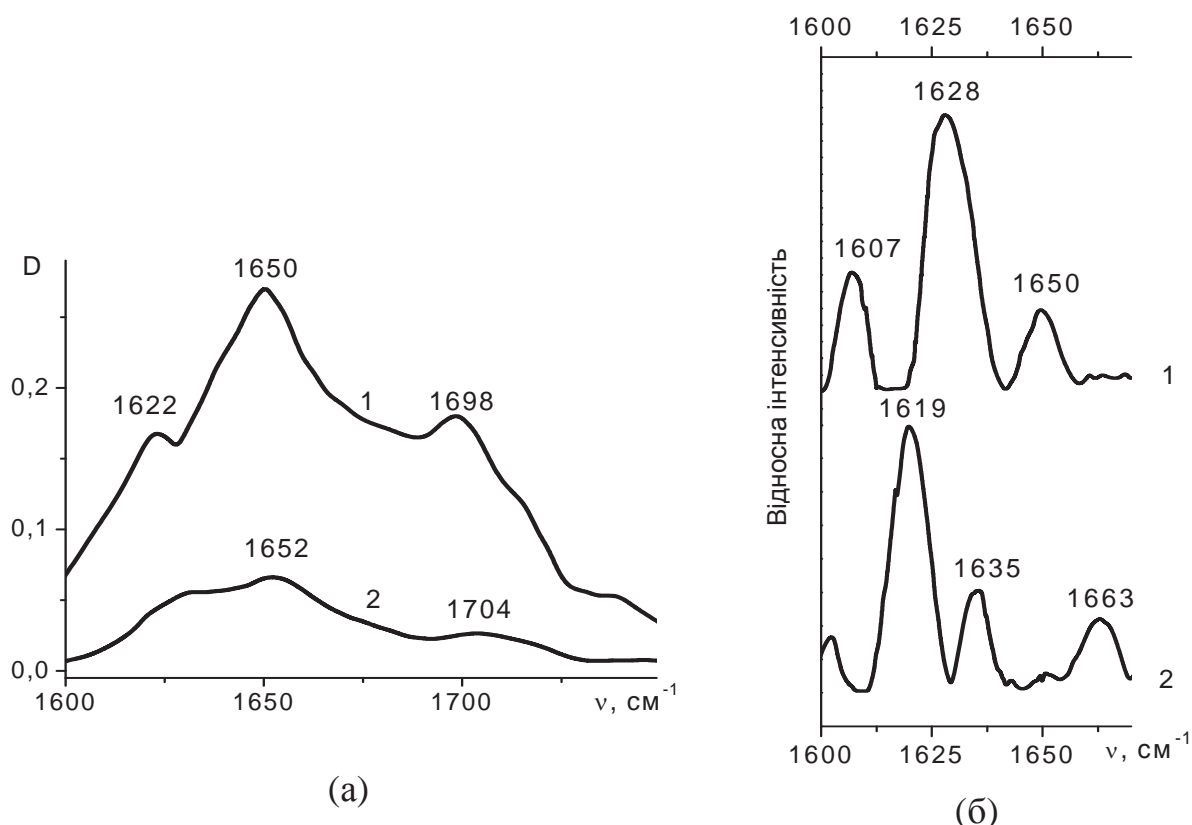


Рисунок 5.3 (а) ІЧ-спектр поглинання розчину суміші FMN-PRF (1) і спектр суми однокомпонентних спектрів FMN і PRF (2); (б) КР-спектри розчинів PRF (1) і суміші FMN-PRF (2). Для всіх розчинів $\text{pH} = 6,9 \div 7,0 (\pm 0,05)$

максимумами $\nu = 1628$ і 1650 cm^{-1} ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$), пов'язані з деформаційними коливаннями NH_2 -груп профлавіну (див. рис. 1.2 а) [230], зазнали відповідно високочастотний зсув до $\nu = 1635$ і 1663 cm^{-1} ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$), тобто на $\Delta\nu = 7$ і 13 cm^{-1} .

Такий частотний зсув характеристичних смуг і зростання інтенсивності карбонільних коливань у спектрі поглинання свідчить про формування міжмолекулярного Н-зв'язку типу $\text{C}_4=\text{O}(\text{FMN}) \cdots \text{H}-\text{N}-\text{H}(\text{PRF})$ і більш слабкого Н-зв'язку $\text{C}_2=\text{O}(\text{FMN}) \cdots \text{H}-\text{N}-\text{H}(\text{PRF})$ у гетерокомплексі FMN-PRF.

Цей висновок знаходиться в згоді з припущенням про утворення Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-PRF, отриманому за непрямыми ознаками з даних ЯМР-спектроскопії, на підставі аналізу ентальпії гетероасоціації [115] і ймовірності перенесення заряду [116]. Величина фактору f_c для системи FMN-PRF ($K_{\text{FMN}} = 265 \text{ M}^{-1}$, $K_{\text{PRF}} = 700 \text{ M}^{-1}$, $K_c = 920 \text{ M}^{-1}$ [11]) дорівнює

$f_C = 48,8\%$, що помітно перевищує поріг 35% . Все це, як і у випадку розглянутої вище системи FMN-EB, також підтверджує формування Н-зв'язку. Однак слід зазначити, що за даними ЯМР [86] саме карбонільна група $C_2=O$ (FMN) повинна бути залучена в утворення Н-зв'язку. Для того щоб з'ясувати чи суперечить цей результат даним коливальної спектроскопії, наведеними в цьому розділі, нами проаналізовано дані ЯМР, представлені в роботі [86], в контексті можливого формування Н-зв'язку $C_4=O$ -групою FMN, як встановлено вище.

У роботі [86] набір наведених крос-пиків було розділено на дві частини, кожна з яких відповідає двом різним структурам гетерокомплексу FMN-PRF: *структура 1* з 3,6- NH_2 -групами PRF, орієнтованими в напрямку рибітильного ланцюжка FMN, і *структура 2* з 3,6- NH_2 -групами PRF, орієнтованими в протилежну від рибітильного ланцюжка сторону. *Структура 1* повністю відповідає участі в утворенні Н-зв'язку групи $C_2=O$ (FMN) і не допускає участі в утворенні Н-зв'язку групи $C_4=O$, не руйнуючи π -стекингу хромофорів. І навпаки, *структура 2* характеризується близьким розташуванням однієї з NH_2 -груп PRF або до $C_2=O$, або до $C_4=O$ карбонільних груп FMN. Відмінною особливістю набору міжмолекулярних NOE крос-пиків у роботі [86] є те, що вони спостерігалися виключно для бензольного кільця молекули FMN (див. рис. 1.4), збагаченого нездатними до обміну протонами. Це збільшує можливість для обертання хромофорів FMN і PRF один щодо одного без спотворення π -стекингу і втрати NOE контактів, характерних для *структури 2*.

Можливість утворення такої структури було підтверджено повторним моделюванням методом молекулярної механіки з урахуванням відповідних обмежень (протокол моделювання ідентичний використаному в роботі [86]). Отриману структуру представлено на рис. 5.4.

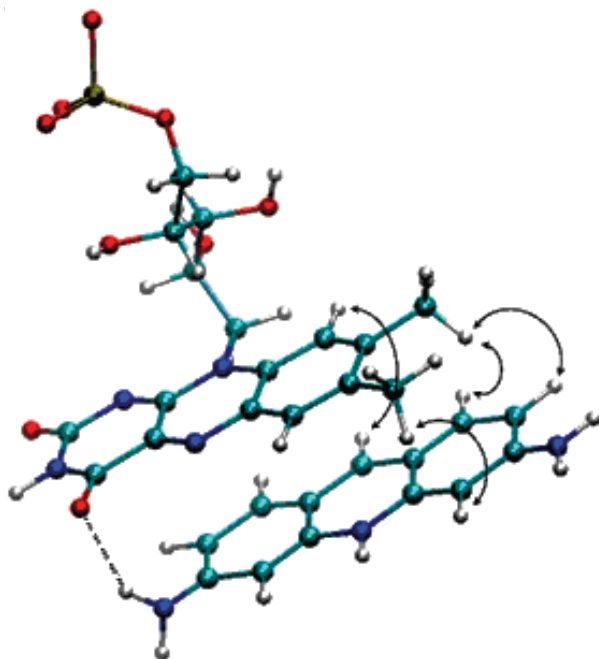


Рисунок 5.4 Структура гетерокомплексу FMN-PRF, отримана повторним моделюванням з урахуванням відповідних обмежень. Міжмолекулярні NOE контакти показано стрілками. Міжмолекулярний Н-зв'язок показано пунктиром

Енергетично ця структура практично еквівалентна *структурі 2*, яка представлена в роботі [86], але розташування молекул у гетероасоціації різниться. Хромофори FMN і PRF повернені відносно один одного на 15° , і, що дуже важливо, їх розташування стерично сприяє утворенню Н-зв'язку між $C_4=O$ (FMN) і NH_2 -групою PRF. Така структура (рис. 5.4) узгоджується як з даними ЯМР, так і з даними коливальної спектроскопії.

Необхідно відзначити ще один момент, що стосується можливості існування двох різних структур комплексу FMN-PRF. В умовах відносно високих концентрацій взаємодіючих молекул у розчині (мМ) цілком можливе формування агрегатів більш високого порядку, таких як 1:2 і вище. Це зазвичай враховується при розрахунку рівноважної константи зв'язування K_C , і термодинамічних параметрів з експериментальних кривих титрування в ЯМР [33, 86] і аналізі гетероасоціації за даними спектрофотометрії в УФ- і видимій області [108]. Доказ існування Н-зв'язків з двома карбонільними групами молекули FMN ($C_4=O$ і $C_2=O$) може бути пояснено, як наслідок формування комплексу 1:2 PRF:FMN:PRF, в якому дві гетеро-стопки PRF:FMN стабілізуються Н-зв'язками з двома різними карбонільними групами молекули FMN. На жаль, поділ вкладу 1:1 і 1:2 у спостережуваних

нами частотних зсувах [223, 241] виконати неможливо, проте, система PRF-FMN може служити моделлю для подальшого експериментального тестування агрегації більш високого порядку.

5.3 Комп'ютерне моделювання методом Монте-Карло гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF у водних кластерах

Для інтерпретації експериментальних результатів коливальної спектроскопії і пояснення механізмів стабілізації гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF, а також побудови їх молекулярних моделей, нами виконано комп'ютерне моделювання методом Монте Карло систем, що містять гетерокомплекси FMN-EB, FMN-PRF і водні кластери [224]. Процедуру виконання моделювання докладно описано в підрозділі 2.3.

5.3.1 Гетеродимер FMN-EB

Згідно з результатами ЯМР даних і моделювання методом МС в гетеродимері FMN-EB утворюються три міжмолекулярні Н-зв'язки (рис. 5.5 а) між $C2=O3$ групою FMN і $N24H_2$ групою EB ($R = 3,17 \text{ \AA}$; кут $N24H \text{ EB} \cdots C2O3 \text{ FMN} = 138^\circ$), $C5=O6$ групою FMN і $C16H$ групою EB ($R = 3,21 \text{ \AA}$; кут $C16H \text{ EB} \cdots C5O6 \text{ FMN} = 127^\circ$), $C20=O21$ групою FMN і $C20H$ групою EB ($R = 3,20 \text{ \AA}$; кут $C20H \text{ EB} \cdots C20O21 \text{ FMN} = 111^\circ$). Нумерація атомів і заряди відповідних лігандів приведено в додатку В (рис. В.1 і В.3, табл. В.1 і В.3).

Відсутність низькочастотних зсувів смуги поглинання карбонільного коливання $C_4=O$ FMN на ІЧ-спектрах гетероасоціату FMN-EB, якій відповідає карбонільна група $C5=O6$ у МС моделюванні, можна пояснити відносно слабкими зв'язками типу $C=O \cdots H-C$, які не завжди призводять до низькочастотних зміщень карбонільних коливань [128].

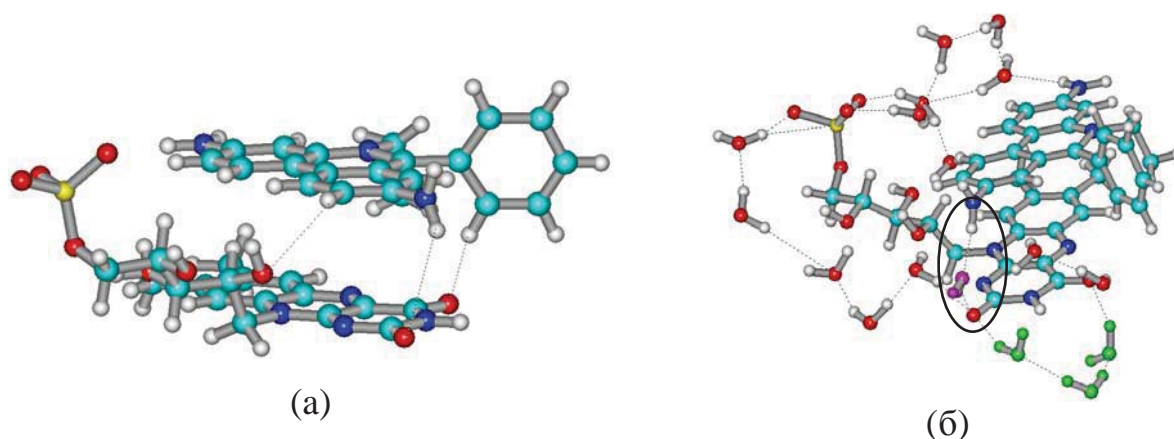


Рисунок 5.5 Миттєві конфігурації FMN-EB у водному кластері:
 (а) конфігурація гетеродимеру FMN-EB, $E_{\text{FMN-EB}} = -91,59$ ккал/моль;
 (б) F-структура: два водних містки: C5=O6 FMN і N24H₂ EB (3 H₂O, внизу); C2=O3 FMN і N24H₂ EB (1 H₂O, виділено чорним овалом); невеликий водний кластер навколо FMN (11 H₂O, зліва, зверху). Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Для моделювання F-структури було сформовано систему, яка містить гетеродимер FMN-EB і 106 молекул води. Відбір такого числа молекул води визначається енергетичними і геометричними критеріями Н-зв'язку: значеннями енергій взаємодій вода-гетеродимер і орієнтацією молекул води навколо гетеродимеру. Частина відібраних за цими критеріями молекул води утворюють Н-зв'язки з FMN і/або EB. Решта молекули води об'єднується водневими зв'язками, утворюючи з молекул води одну «нанокраплю». Миттєву конфігурацію гетеродимеру FMN-EB у водному кластері (F-структура) приведено на рис. 5.6.

Було встановлено утворення двох водних містків навколо FMN-EB як у водному кластері (800 H₂O), так і для F-структури цієї системи. Перший місток складається з трьох молекул води, розташованих між C5=O6 групою FMN (група C₄=O в експерименті) і N24H₂ групою EB. Другий складається з однієї молекули води, розташованої між C2=O3 групою FMN (група C₂=O в експерименті) і N24H₂ групою EB (рис. 5.5 б).

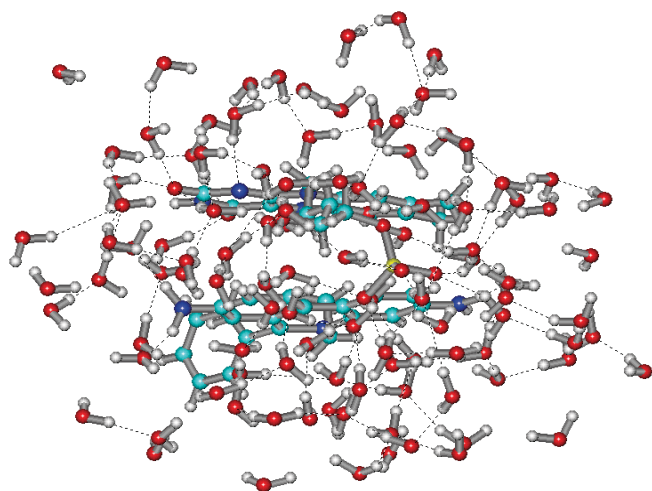


Рисунок 5.6 Миттєва
конфігурація гетеродимеру
FMN-EB у водному кластері (F-
структура): FMN-EB+106 H₂O,
 $E_{\text{FMN-EB}} = -85,75$ ккал/моль.
Н-зв'язки показано
пунктирними лініями

Інші 11 молекул води утворюють невеликі водні кластери. Такі «впорядковані» структури води навколо гетероасоціату FMN-EB можуть додатково стабілізувати гетеродимер, обмежуючи рухливість молекул в стекінг-асоціаті, а також рухливість бічного ланцюжка FMN.

5.3.2 Гетеродимер FMN-PRF

У гетеродимері FMN-PRF утворюється один міжмолекулярний Н-зв'язок між C2=O3 групою FMN і N16H₂ групою PRF ($R = 3,12 \text{ \AA}$; кут N16H₂ PRF...C2O3 FMN = 143°), як отримано за допомогою ЯМР, а також при МС оптимізації структури FMN-PRF у вакуумі та у водному кластері (рис. 5.7). У додатку В приведено відповідну нумерацію атомів і заряди досліджуваних лігандів (рис. В.1 і В.4, табл. В.1 і В.4).

Використовуючи дані моделювання методом МС у водному кластері (800 H₂O), нами було визначено кількість молекул води, які утворюють Н-зв'язки з FMN і/або PRF згідно з енергетичними та геометричними критеріями (84 молекул води) [224]. Потім було сформовано систему FMN-PRF + 84 H₂O і проведено її моделювання методом МС (рис. 5.8).

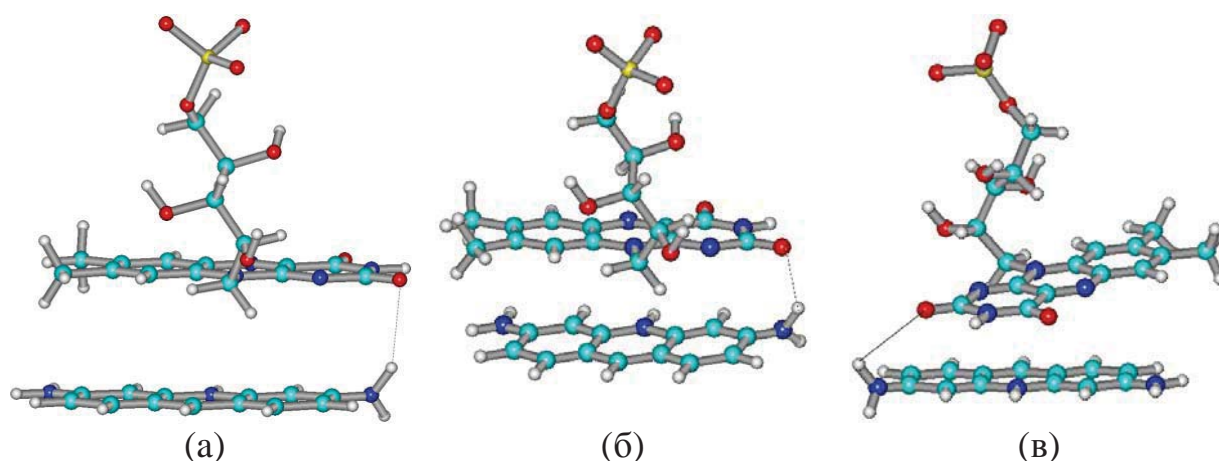


Рисунок 5.7 Конфігурації гетеродимеру FMN-PRF: (а) ЯМР дані; (б) МС оптимізація у вакуумі, $E_{\text{FMN-PRF}} = -78,75$ ккал/моль; (в) моделювання методом МС у водному кластері, $E_{\text{FMN-PRF}} = -74,94$ ккал/моль. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

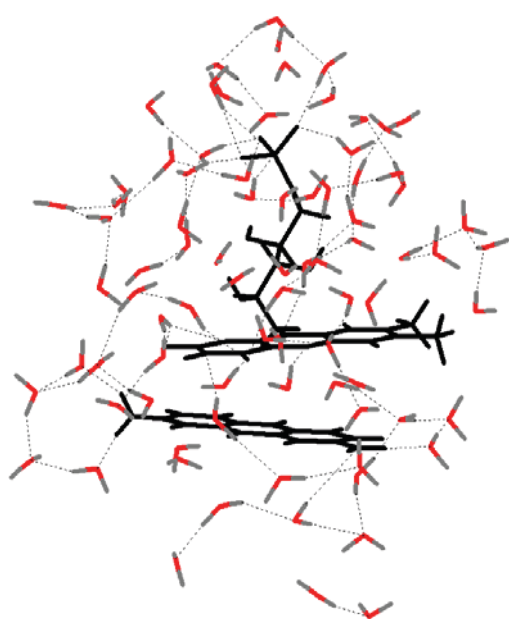


Рисунок 5.8 Миттєва конфігурація гетеродимеру FMN-PRF у водному кластері (F-структура): $\text{FMN-PRF} + 84 \text{ H}_2\text{O}$, $E_{\text{FMN-PRF}} = -73,09$ ккал/моль. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Як у водному кластері (800 молекул води), так і для F-структури, виявлено один водний місток, розташований між донорно-акцепторними групами обох лігандів: C5=O6 група FMN і N16H₂ група PRF (рис. 5.9), який складається з семи молекул води. Також було виявлено два ланцюжки молекул води, що сформувалися між донорно-акцепторними групами ароматичного кільця і бічним ланцюгом FMN (рис. 5.9).

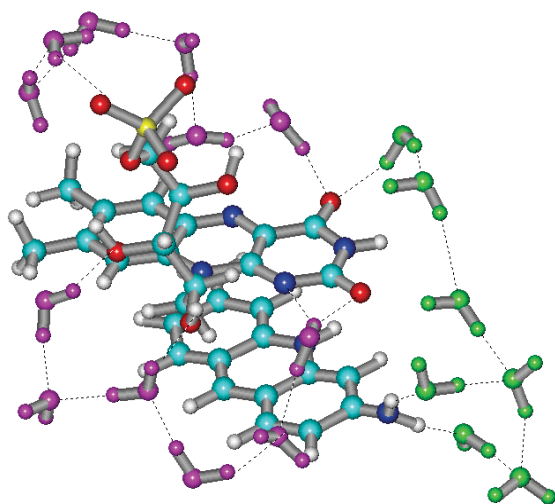


Рисунок 5.9 Миттєва конфігурація F-структури FMN-PRF, водний місток біля гетеродимеру FMN-PRF: 7 H₂O між C5=O6 FMN і N16H₂ PRF (зелений, справа); дві водні сітки навколо FMN: 6 H₂O и 6 H₂O (фіолетові, зліва). Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Така «упорядкована» водна структура навколо гетероасоціату FMN-PRF, як і у випадку FMN-EB, може додатково стабілізувати гетеродимер, обмежуючи рухливість молекул у стекінг-асоціаті, а також рухливість бічного ланцюжка FMN.

5.4 Внесок енергії Н-зв'язків у загальну енергію стабілізації комплексів FMN з EB і PRF

На основі даних коливальної спектроскопії можна оцінити внесок енергії Н-зв'язків у стабілізацію стопкових асоціатів. Найбільш близьким аналогом до стопкової агрегації ароматичних БАР є вертикальне і горизонтальне укладання азотистих пар основ у нуклеїнових кислотах, у даний час досить добре вивчене методами коливальної спектроскопії. В азотистих гетероциклах основ нуклеїнових кислот при утворенні міжпарних Н-зв'язків валентні коливання карбонільних груп зміщуються в низькочастотну область на 10-30 см⁻¹ [126]. Таким чином, частота спостережуваного карбонільного коливання ($\nu_{\text{сном}}$) записується як:

$$\nu_{\text{сном}} = \nu_0 - \Delta\nu_{\text{Н-зв}} , \quad (5.1)$$

де

ν_0 – незбурена частота С=О-груп (визначається в неполярних рідинах);

$\Delta\nu_{H-36}$ – зсув за рахунок Н-зв'язку.

Проведений у підрозділах 5.1 і 5.2 аналіз свідчить про утворення міжмолекулярних Н-зв'язків у гетерокомплексах FMN-EB/PRF по характеристичному зсуву частоти коливань атомів, які належать відповідним донорно-акцепторним групам. У свою чергу цей характеристичний зсув дає можливість оцінити енергетику Н-зв'язування. Можна виконати оцінку ентальпії Н-зв'язку для даних двох систем.

Ентальпія утворення Н-зв'язку може бути оцінена, якщо відома незбурена ν_0 частота карбонільного коливання (див. формулу (5.1)). Частота ν_0 може бути визначена з коливального спектру досліджуваної речовини в розчині неполярної рідини, оскільки молекули такої рідини не збурюють карбонільні коливання. У роботі [218] показано, що в розчині хлороформу карбонільне коливання $C_2=O$ -групи рибофлавін тетраацетату має незбурену частоту $\nu_0=1685\text{ см}^{-1}$, а коливання групи $C_4=O$ – $\nu_0=1710\text{ см}^{-1}$. Як показано в підрозділі 5.1 збурена частота карбонільного коливання $C_2=O$ в гетерокомплексі FMN-EB становить $\nu_{\text{спост}}^{C_2=O} = 1644\text{ см}^{-1}$, отже, утворення Н-зв'язку супроводжується низькочастотним зсувом $\Delta\nu_{H-36} = 41 \pm 10\text{ см}^{-1}$. Використовуючи емпіричну залежність ентальпії утворення Н-зв'язку відносно енергії взаємодії вода-вода (ΔH) від частотного зсуву карбонільного коливання [129, 243]:

$$\Delta H = 0,205 \cdot \Delta\nu_{H-36} \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}, \quad (5.2)$$

ми знайшли, що енергія міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-EB буде $|\Delta H| = 8,4\text{ кДж/моль}$ [223, 241], що становить приблизно 25% від експериментально вимірної загальної ентальпії формування гетероасоціату [86].

Провівши такі ж розрахунки для гетероасоціату FMN-PRF (підрозділ 5.2), ми отримуємо ентальпію Н-зв'язку типу $C_4=O(\text{FMN}) \cdots H - \overset{|}{N} - H$ (PRF), рівну $|\Delta H| = 7,3\text{ кДж/моль}$, а для Н-зв'язку типу $C_2=O(\text{FMN}) \cdots H - \overset{|}{N} - H$ (PRF)

– $|\Delta H| = 2,5$ кДж/моль [223, 241]. Звідси випливає, що міжмолекулярні водневі зв'язки в гетерокомплексах FMN-EB і FMN-PRF дають ~ 25-30% -ий внесок у загальну ентальпію стабілізації цих комплексів, а інша ентальпія здебільшого є внеском міжплощинних взаємодій між хромофорами молекул [234] і гідратної водою навколо комплексів [101].

Однак необхідно відзначити, що це не завжди вірно для зміни «чистої» вільної енергії Гіббса реакції гетероасоціації. Результати нещодавнього теоретичного оцінювання вкладу різних фізичних факторів у загальну енергію гетероасоціації (ΔG_C) [234] показали, що внесок Н-зв'язку в ΔG_C може бути порівняний з самим ΔG_C , як наслідок компенсації факторів, що формують ΔG_C у водному розчині. Хоча утворення міжмолекулярних Н-зв'язків зазвичай виводиться з рівноваги енергетично несприятливою втратою Н-зв'язків з водним оточенням, докладний розгляд утворення міжмолекулярних Н-зв'язків як на рівні ентальпії, так і вільної енергії Гіббса має важливе значення для правильного розуміння енергетики реакції гетероасоціації.

5.5 Вплив водневого зв'язку на комплексоутворення EB з ДНК

У попередніх розділах встановлено, що біологічно активні речовини мають у своїх структурах атомні групи, здатні формувати водневі зв'язки в комплексах. У цьому підрозділі на прикладі біологічно активної речовини бромистого етидію нами було показано роль Н-зв'язку в стабілізації комплексу EB-ДНК [242].

Відомо, що бромистий етидій у водних розчинах в залежності від концентрації може перебувати в мономерній і димерній формах [244]. Тому для визначення спектральних відмінностей мономерної та димерної форм EB було записано спектри КР при різних концентраціях.

У табл. 5.1 наведено частоти смуг у спектрах КР для полікристалічного зразку EB та EB у буферному розчині з концентраціями

$C_{\text{ЕВ}} \approx 10^{-2} \text{ М}$ і $C_{\text{ЕВ}} \approx 10^{-4} \div 10^{-5} \text{ М}$. Віднесення частот атомних груп бромистого етидію для спектрів КР зроблені на підставі літературних даних [230, 231, 245, 246]. Смуго при $\nu = 1372\text{-}1377 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) віднесено до валентних симетричних коливань сполучених зв'язків С–С і С–N фенантридинового кільця [246], смуго при $\nu = 1411\text{-}1417 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) – до дихального коливання фенантридинового кільця (див. рис. 1.2 б) [245].

Таблиця 5.1

Частоти смуг у спектрі КР та їх віднесення для кристалічного зразку і буферних розчинів бромистого етидію (ЕВ) при двох концентраціях (С)

Віднесення	Полікрис. ЕВ, см^{-1}	ЕВ ($C \approx 10^{-2} \text{ М}$), см^{-1}	ЕВ ($C \approx 10^{-4} \text{ М}$), см^{-1}
Фенантр. кільце и(С–С, С–N)	1354 \pm 2	1350 \pm 2	1351 \pm 2
	1375 \pm 2	1372 \pm 2	1377 \pm 2
$\delta(\text{CH}_3)$	1389 \pm 2	1394 \pm 2	1389 \pm 2
Дихальне кол. фенантр. кільця	1412 \pm 2	1417 \pm 2	1411 \pm 2
$\delta(\text{CH}_2)$	—	1442 \pm 2	1434 \pm 2
$\delta(\text{CH}_3)$	1454 \pm 2	1462 \pm 2	1452 \pm 2
Фенільне кільце	1605 \pm 2	1605 \pm 2	1602 \pm 2
$\delta(\text{NH}_2)$	1626 \pm 2	1627 \pm 2	1626 \pm 2

З даних табл. 5.1 випливає, що при великій концентрації бромистого етидію ($\approx 10^{-2} \text{ М}$), при якій у розчині утворюється приблизно однакова кількість мономерної та димерної форм ліганду [113], спостерігається смуга коливань С–С-, С–N-груп фенантридинового хромофору з максимумом при $\nu = 1372 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$). Для розчинів ліганду з меншими концентраціями ($\approx 10^{-4} \div 10^{-5} \text{ М}$, коли переважає концентрація мономерної форми ЕВ [113]) цей максимум зсувається у височастотну область до $\nu = 1377 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$). Низькочастотний зсув смуги до $\nu = 1372 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) слід пов'язати зі взаємодією ароматичних кілець ліганду в димері.

На рис. 5.10 наведено спектри КР для вільного ЕВ та його сумішей з ДНК, а в табл. 5.2 – відповідні частоти смуг КР та їх віднесення для ЕВ в комплексі з ДНК. Усі спектри отримано усередненням не менше 10 вимірювань, виконаних у однакових умовах.

Оскільки при розглянутих концентраціях ДНК в цих сумішах вже практично відсутній вільний ліганд, спостережувані розбіжності в спектрах КР для бромистого етидію можна віднести до двох різних типів його зв'язування з ДНК. Як видно з КР-спектру комплексу ЕВ-ДНК при $P/D = 20$ (рис. 5.10), коливання фенантридинового кільця з максимумом при $\nu = 1377 \text{ см}^{-1}$ зсувається на 5 см^{-1} ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) у низькочастотну область порівняно з вільним лігандом. Подібний низькочастотний зсув спостерігався також для димерів ЕВ, що свідчить про взаємодію ароматичних кілець ЕВ з азотистими основами ДНК. Тому такий зсув смуги фенантридинового кільця може бути

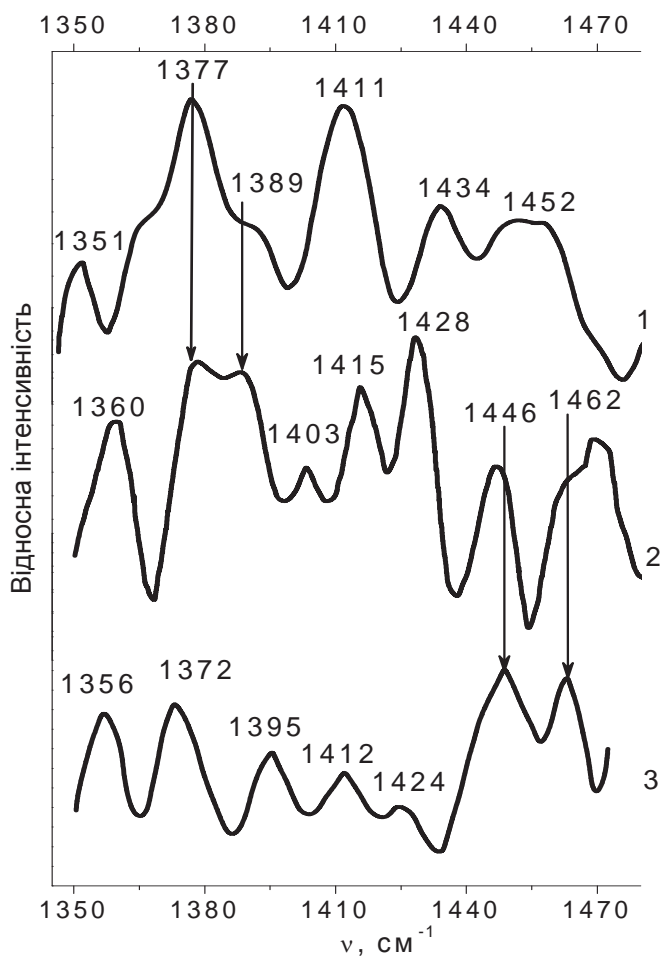


Рисунок 5.10 Спектри КР розчинів бромистого етидію (1) і комплексів ЕВ-ДНК при $P/D = 3$ (2) і $P/D = 20$ (3) в інтервалах частот $1340\text{-}1470 \text{ см}^{-1}$; $C_{\text{ЕВ}} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ М}$, $\text{pH} = 6,86$

Таблиця 5.2

Частоти смуг у спектрі КР та їх віднесення для бромистого етидію (ЕВ) і в комплексі з ДНК в частотному діапазоні 1350-1465 см^{-1}

Віднесення	ЕВ ($C \approx 1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$), см^{-1}	ЕВ-ДНК	
		P/D = 3, см^{-1}	P/D = 20, см^{-1}
Фенантр. кільце (C-C, C-N)	1351 \pm 2	1360 \pm 2	1356 \pm 2
	1377 \pm 2	1377 \pm 2	1372 \pm 2
$\delta(\text{CH}_3)$	1389 \pm 2	1388 \pm 2	1395 \pm 2
Дихальне кол. фенантр. кільця	1411 \pm 2	1415 \pm 2	1412 \pm 2
$\delta(\text{CH}_2)$	1434 \pm 2	1446 \pm 2	1447 \pm 2
$\delta(\text{CH}_3)$	1452 \pm 2	1462 \pm 2	1462 \pm 2

критерієм інтеркаляції хромофору ЕВ між парами основ ДНК. Схожий ефект спостерігався в спектрах КР доксорубіцину при його інтеркаляції до ДНК [247].

Зі спектра КР комплексу при P/D = 3 (рис. 5.10) видно, що смуга при $\nu = 1377 \text{ см}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) не зазнає низькочастотного зміщення порівняно зі спектром вільного ЕВ. Це пов'язано з тим, що при низьких значеннях P/D у сумішах ЕВ-ДНК утворюються здебільшого комплекси за зовнішнім типом зв'язування, а концентрація комплексів за типом інтеркаляції незначна і практично не вносить змін у КР-смуги.

Для деформаційних коливань CH_2 - і CH_3 -груп ЕВ спостерігаються високочастотні зсуви при утворенні обох типів комплексів з ДНК (рис. 5.10, Табл. 5.2). З Табл. 5.1 також видно, що ці коливання чутливі до мономерно-димерного переходу. Однак пояснення такої залежності вимагає додаткових досліджень.

Інша смуга фенантридинового кільця при 1411 см^{-1} ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$) (рис. 5.10), що відноситься до дихального коливання кільця, в розчині з P/D = 3 зсувається до більш високочастотного значення при 1415 см^{-1} ($\pm 2 \text{ см}^{-1}$). Подібний ефект відмічено у роботі [245] при заміщенні атома водню N_2H_2 -групи ЕВ на кільце 2-аміно-4-хлор-6-метилпіримідину. При P/D = 20 ця

смука не змінює свого положення. Такі відмінності також можуть свідчити про різні типи комплексів ліганду з полінуклеотидною матрицею, що утворюються при високих і низьких значеннях P/D . Але для однозначного висновку потрібен більш детальний аналіз, як і у випадку CH_2 - і CH_3 -груп.

На рис. 5.11 наведено спектри КР сумішей ЕВ-ДНК при різних значеннях P/D , а також спектр вільного ЕВ. Представлені спектри було отримано шляхом усереднення не менше 10 сканів, записаних при однакових умовах.

В цю спектральну область основний внесок дають деформаційні коливання NH_2 -груп [230, 231] і коливання фенільного кільця ЕВ [231, 245]. Відповідні смуги КР бромистого етидію та їх віднесення наведено в табл. 5.3.

Як видно зі спектрів 2 і 3 (рис. 5.11), а також з даних, наведених у Табл. 5.3, утворення двох типів комплексів ЕВ-ДНК ($P/D = 3$ і $P/D = 20$) супроводжується високочастотним зсувом на $\Delta\nu = 5 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$) смуги деформаційних коливань NH_2 -груп фенантридинового хромофора ліганду [245].

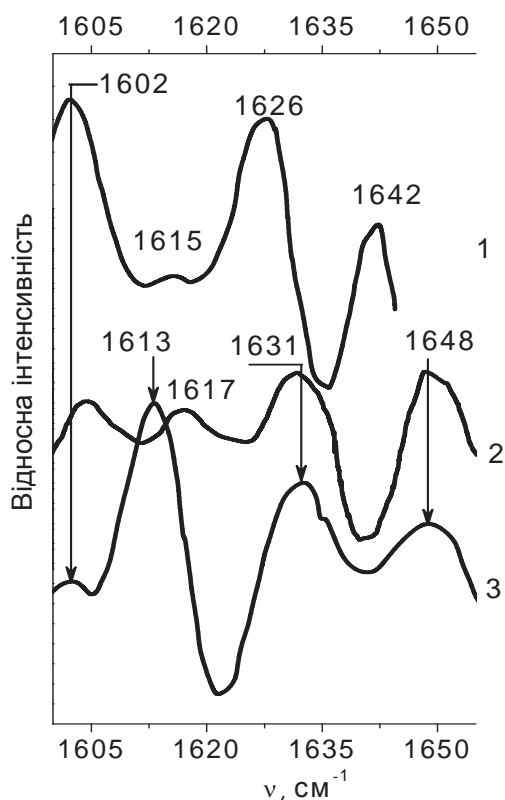


Рисунок 5.11 Спектри КР розчинів бромистого етидію (1) і комплексів ЕВ-ДНК при $P/D = 3$ (2) і $P/D = 20$ (3) в інтервалах частот $1600\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$; $C_{\text{ЕВ}} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 6,86$

Таблиця 5.3

**Частоти смуг у спектрі КР та їх віднесення для бромистого етидію в
комплексі з ДНК в частотному діапазоні 1600-1660 см⁻¹**

Віднесення	ЕВ ($C \approx 1,1 \times 10^{-4}$ М), см ⁻¹	ЕВ-ДНК	
		P/D = 3, см ⁻¹	P/D = 20, см ⁻¹
Фенильне кільце	1602±2	1603±2	1602±2
Фенильне кільце (C=C)	1615±2	1617±2	1613±2
δ(NH ₂)	1626±2	1631±2	1631±2

Цей факт свідчить про утворення водневих зв'язків між NH₂-групами ЕВ і акцепторними групами ДНК. Згідно із запропонованою в роботі [246] моделлю інтеркаляції фенантридинового хромофору ЕВ, такими акцепторними групами можуть бути атоми N₁ цитозину і N₉ гуаніну в протилежних ланцюгах ДНК.

Однак у роботі [248] методом молекулярного докінгу показано можливість утворення Н-зв'язків між NH₂-групами ЕВ, інтеркальованого в GC-сайт ДНК, з атомами O_{4'} і O_{5'} дезоксирибози гуаніну протилежних ланцюгів. Така модель підтверджується даними рентгено-структурного аналізу комплексу ЕВ з динуклеотидом d(CpG), в якому виявлено Н-зв'язок між NH₂ групою ЕВ і атомом O_{5'} дезоксирибози [249].

Таким чином, при високих та низьких значеннях P/D на спектрах КР спостерігаються високочастотні зсуви смуг деформаційних коливань NH₂-груп ліганду, що свідчить про утворення водневих зв'язків цих груп з ДНК як у випадку інтеркальованого хромофору ЕВ, так і у випадку зовнішнього зв'язування на поверхні молекули ДНК. Ці водневі зв'язки разом з міжплощинними взаємодіями ароматичних кілець хромофору ЕВ і азотистих основ (цитозину і гуаніну) додатково стабілізують комплекс ЕВ-ДНК, що призводить до збільшення його термостабільності [250].

Для того щоб встановити, в якому структурному стані знаходиться ДНК у комплексі з ЕВ при низьких і високих значеннях P/D , було отримано КР-спектри комплексів у області маркерних смуг ДНК [212, 251-253].

На рис. 5.12 наведено частотний діапазон $\nu = 750\text{-}850\text{ см}^{-1}$ для спектру чистого ЕВ, спектрів сумішей ЕВ-ДНК при двох значеннях P/D і спектрів ДНК в В- та А-формах. Усі спектри було отримано шляхом усереднення не менше 10 сканів, записаних при однакових умовах. Дуже слабка інтенсивність КР-смуг ЕВ у цьому спектральному діапазоні порівняно зі спектрами ДНК дозволяє знехтувати внеском коливань ліганду в спектр комплексів ЕВ-ДНК і стежити за поведінкою молекули ДНК.

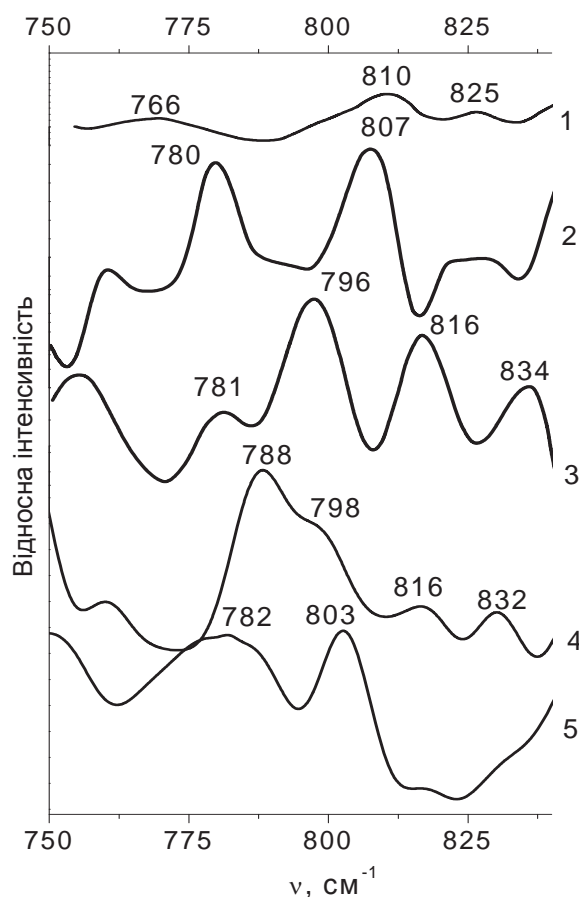


Рисунок 5.12 Спектри КР бромистого етидію (1), комплексів ЕВ-ДНК при $P/D = 3$ (2) і $P/D = 20$ (3) і спектри плівок ДНК при різних відносних вологостях: 96% ВВ – В-ДНК (4) і 76% ВВ – А-ДНК (5); $C_{\text{ЕВ}} = 1,1 \times 10^{-4}\text{ М}$, $\text{pH} = 6,86$

Як видно з рис. 5.12, при більш щільному заповненні матриці ДНК лігандом ($P/D = 3$) утворення комплексу супроводжується появою смуг при $\nu = 780$ і 807 см^{-1} ($\pm 2\text{ см}^{-1}$). Як відомо [212, 251-253], ці смуги є характерними

маркерами А-форми ДНК. Тому проведене дослідження підтверджує зроблені раніше висновки про те, що щільне заповнення матриці ДНК бромистим етидієм переводить її з В-форми до А-подібної конформації [231, 254, 255]. При $P/D = 20$ у спектрі КР спостерігаються смуги при $\nu = 834, 796$ і 781 см^{-1} (рис. 5.12), які характерні для В-форми ДНК [212, 251-253]. Отже, при великих значеннях $P/D (\geq 20)$ ДНК в комплексах з ЕВ знаходиться у В-конформації.

Формування комплексу при малих значеннях $P/D (\leq 3)$ супроводжується витісненням бромистого етидія з інтеркаляційного сайту під час структурного переходу ДНК до А-подібної форми, у якій мінорний жолобок ширшає і стає дрібнішим, і призводить до зовнішнього типу зв'язування ліганду.

Висновки до розділу 5

1. На підставі ІЧ- і КР-спектроскопії вперше отримано прямий доказ утворення Н-зв'язків у гетерокомплексах ароматичних біологічно активних речовин (FMN-EB, FMN-PRF). У нейтральних розчинах у стопкових структурах гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF міжмолекулярні Н-зв'язки додатково стабілізують ці комплекси разом з міжплощинними взаємодіями між хромофорами молекул у комплексах та їх взаємодією з водним оточенням.
2. Виконаний методом МС детальний аналіз енергетичних і структурних характеристик систем, що містять гетероасоціати ароматичних біологічно активних лігандів FMN, EB, PRF і водні клатери, підтвердив, що в гетерокомплексах FMN-EB, FMN-PRF міжмолекулярні Н-зв'язки формуються між функціональними донорно-акцепторними групами ($C=O$ і NH_2), додатково стабілізуючи структури гетеродимерів. Результати моделювання методом МС продемонстрували можливість

формування водних «містків» та їх роль у додатковій стабілізації гетероасоціатів досліджуваних БАР.

3. Виконано оцінку ентальпії Н-зв'язку для систем FMN-EB і FMN-PRF. Внесок Н-зв'язків становить ~25-30% від загальної ентальпії стабілізації цих комплексів. Однак, детальний розгляд міжмолекулярних Н-зв'язків має велике значення для правильного розуміння енергетики реакцій гетероасоціації.
4. Проведене дослідження комплексоутворення бромистого етидію з ДНК методом спектроскопії КР дозволило встановити, що при високих значеннях P/D , коли концентрація ліганду в розчині мала, стабілізація комплексу здійснюється не тільки за рахунок міжплощинних взаємодій інтеркальованого хромофору, але й шляхом утворення міжмолекулярних Н-зв'язків між аміногрупами EB і атомами O_4' і O_5' дезоксирибози. У цьому випадку ДНК зберігається у В-формі. При низьких значеннях P/D формування комплексу EB-ДНК супроводжується структурним переходом ДНК з В- до А-подібної конформації, а аміногрупи EB взаємодіють з цукрофосфатним остовом полінуклеотидної матриці, стабілізуючи зовнішню «посадку» хромофору на поверхні молекули ДНК.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях здобувача: [223], [241], [242]

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено одну з актуальних проблем сучасної молекулярної біофізики – з'ясування ролі водневих зв'язків і молекул води в стабілізації самоасоціатів і гетероасоціатів ряду біологічно активних речовин і при їх зв'язуванні з ДНК. З використанням методів коливальної (ІЧ і КР) спектроскопії та комп'ютерного моделювання побудовано комплекси БАР і виконано оцінку вкладу Н-зв'язків у загальну енергію їх стабілізації. Отримані результати закладають основу для більш повного розуміння молекулярних механізмів інтерцепторної дії БАР на ДНК. Основні результати, отримані в роботі, можна сформулювати наступним чином:

1. Вперше на підставі ІЧ- і КР-спектроскопії отримано прямий доказ утворення Н-зв'язків між донорними (NH_2) та акцепторними (C=O) групами при формуванні гетерокомплексів ароматичних біологічно активних речовин (FMN-EB, FMN-PRF, ТРН-EB). Показано, що в нейтральних водних розчинах у стопкових структурах гетероасоціатів міжмолекулярні Н-зв'язки додатково стабілізують комплекси разом з міжплощинними взаємодіями та взаємодією з водним оточенням. У гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF міжмолекулярні Н-зв'язки вносять вклад до 30% у загальну енергію стабілізації комплексів.
2. Показано, що виявлені в сухих плівках, отриманих зі слабокислих ($\text{pH} \sim 6,0$) розчинів FMN, високочастотні зсуви смуг поглинання внутрішньокільцевих коливань атомів ізоалоксазинового кільця пов'язані з протонуванням атомів азоту N_1 і N_5 , що підтверджується квантово-хімічними розрахунками зарядів на атомах кільця.
3. Використовуючи отримані спектроскопічні параметри коливань $\text{C}_4=\text{O}$ і $\text{C}_2=\text{O}$ груп атомів FMN і розрахунки резонансної взаємодії карбонільних коливань у диполь-дипольному наближенні, вперше побудовано модель *n*-молекулярної самоасоціації флавінмононуклеотиду.

4. Вперше встановлено, що в гетероасоціатах FMN-TPH, TPH-PRF і CAF-EB водневі зв'язки не утворюються, а стабілізація цих комплексів визначається міжплощинними взаємодіями. Виявлені високочастотні зсуви карбонільних коливань у гетерокомплексі FMN-TPH пояснено резонансними взаємодіями карбонільних груп, що дозволило побудувати *n*-молекулярну структуру гетероасоціату, стабілізовану міжплощинними взаємодіями.
5. За допомогою комп'ютерного моделювання показано, що утворення Н-зв'язків у гетерокомплексах FMN-EB і FMN-PRF додатково стабілізує їх структури. Для гетероасоціатів FMN-TPH, TPH-EB, TPH-PRF і CAF-EB було встановлено факт додаткової стабілізації цих гетерокомплексів у результаті утворення водних містків між донорно-акцепторними групами лігандів. Таким чином, на підставі експериментальних даних та результатів комп'ютерного моделювання доведено, що FMN, CAF і TPH є інтерцепторами, які здатні зменшувати концентрацію мутагенів EB та PRF.
6. Методом спектроскопії КР показано, що при $P/D \geq 20$ стабілізація комплексу EB-ДНК (зі збереженням В-форми ДНК) досягається не тільки міжплощинними взаємодіями інтеркальованого хромофору, але й Н-зв'язками між NH_2 -групами бромистого етидію та донорно-акцепторними групами дезоксирибози. При $P/D \leq 3$ формування комплексу EB-ДНК супроводжується структурним переходом ДНК з В- до А-подібної конформації, а аміногрупи EB утворюють Н-зв'язки з полінуклеотидною матрицею, стабілізуючи зовнішню «посадку» хромофору на поверхні молекули ДНК.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Palchaudhuri R. Hergenrother P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action // *Current Opinion in Biotechnology*. 2007. Vol. 18. P. 497–503. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.09.006
2. Evstigneev M. P. Hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution // *International Reviews in Physical Chemistry*. 2014. Vol. 33. P. 229–273. DOI: 10.1080/0144235X.2014.926151
3. Meyer E. A., Castellano R. K., Diederich F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2003. Vol. 42. P. 1210–1250.
4. Waters M. L. Aromatic interactions in model systems // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002. Vol. 6. P. 736–741.
5. Hoeben F. J., Jonkheijm P., Meijer E., Schenning A. P. About supramolecular assemblies of pi-conjugated systems // *Chem. Rev.* 2005. Vol. 105. P. 1491–1546.
6. Klosterman J. K., Yamauchi Y., Fujita M. Engineering discrete stacks of aromatic molecules // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38. P. 1714–1725.
7. De Greef T. F., Smulders M. M., Wolffs M., Schenning A. P., Sijbesma R. P., Meijer E. Supramolecular polymerization // *Chem. Rev.* 2009. Vol. 109. P. 5687–5754.
8. Graves D. E., Velea L. M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids // *Current Organic Chemistry*. 2000. Vol. 4. P. 915–929.
9. Davies D. B., Veselkov D. A., Dijmunt L. N., Veselkov A. N. Heteroassociation of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer // *Eur. Biophys. J.* 2001. Vol. 30. P. 354–366.
10. Davies D. B., Veselkov D. A., Veselkov A. N. NMR determination of the hetero-association of phenanthridines with daunomycin and their competitive binding to a DNA oligomer // *Eur. Biophys. J.* 2002. Vol. 31. P. 153–162.
11. Evstigneev M. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles. Lambert Academic Publishing, 2010. 96 p.

12. Hamilton P.L., Arya D.P. Natural product DNA major groove binders // *Nat. Prod. Rep.* 2012. Vol. 29(2). P. 134–143. doi: 10.1039/c1np00054c
13. Denny W.A. DNA-intercalating ligands as anti-cancer drugs: prospects for future design // *Anticancer Drug Des.* 1989. Vol. 4(4). P. 241–263.
14. Sirajuddin M., Ali S., Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry // *J. Photochem. Photobiol.* 2013. Vol. 124. P. 1–19.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>
15. Neidle S., Waring M. J. *Molecular aspects of anti-cancer drug action.* London, 1983. 483 p.
16. Blackburn G. M., Gait M. J. *Nucleic acid in chemistry and biology.* New York, 1990. 455 p.
17. Hurley L. H., Boyd F. L. DNA as a target for drug action // *Trends Pharm. Sci.* 1988. Vol. 9. P. 402–407.
18. Chu E., DeVita V. T. *Physicians' cancer chemotherapy drug manual.* Jones and Bartlett Publishers, 2008. 562 p.
19. Demeunynck M., Bailly C., Wilson W. D. *Small Molecule DNA and RNA binders: from synthesis to nucleic acid complexes.* Weinheim, 2003. 711 p.
20. Neidle S., Thurston D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies // *Nat. Rev. Cancer.* 2005. Vol. 5. P. 285–296.
21. Monneret C. Recent developments in the field of antitumour anthracyclines // *Eur. J. Med. Chem.* 2001. Vol. 36. P. 483–493.
22. Hortobagyi G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer // *Drugs.* 1997. Vol. 54. P. 1–7.
23. Arcamone F., Penco S. *Anthracyclines and antracenedione-based anticancer agents.* New York, 1988. 43 p.
24. Stockley I. H. *Stockley's Drug Interactions.* London, 2008. 1464 p.
25. Neidle S., Pearl L. H., Herzyk P., Berman H. M. A molecular model for proflavine-DNA intercalation // *Nucleic Acids Res.* 1988. Vol. 16. P. 8999–9016.
26. Ferguson L. R., Denny W. A. The genetic toxicology of acridines // *Mutat. Res.* 1991. Vol. 258(2). P. 123–160.
27. Brenner S., Barnett L., Crick F. H. C., Orgel A. The theory of mutagenesis // *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3(1) P. 121–124.

28. Griffiths A. J. F., Gelbart W. M., Miller J. H., Lewontin R. C. The Molecular Basis of Mutation. New York, 1999. 675 p.
29. Peacocke A. R., Skemeti I. N. The interaction of ammoacridines with nucleic acids // Trans. Faraday Soc. 1956. Vol. 52. P. 261–279.
30. Lerman L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines // J. Mol. Biol. 1961. Vol. 3. P. 18–30.
31. Shieh H.-Sh., Berman H. M., Dabrow M., Neidle S. The structure of drug-deoxydinucleoside phosphate complex; generalized conformational behavior of intercalation complexes with RNA and DNA fragments // Nucleic Acids Research. 1980. Vol. 8(1). P. 85–97.
32. Schneider B., Ginell S. L., Berman H. M. Low temperature structures of dCpG-proflavine. Conformational and hydration effects // Biophysical Journal. 1992. Vol. 63(6). P. 1572–1578.
33. Davies D. B., Veselkov D. A., Kodintsev V. V., Evstigneev M. P., Veselkov A. N. ^1H NMR investigation of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution: factors involved in the stabilization of complexes of daunomycin and acridine drugs // Molecular Phys. 2000. Vol. 98(23). P. 1961–1971.
34. Benevides J. M., Kawakami J., Thomas G. J., Jr. Mechanisms of drug–DNA recognition distinguished by Raman spectroscopy // J. Raman Spectrosc. 2008. Vol. 39. P. 1627–1634.
35. Waring M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13. P. 269–282.
36. Huang Q., Fu W. L. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis // Clin. Chem. Lab. Med. 2005. Vol. 43. P. 841–842.
37. Karapetian A. T., Mehrabian N. M., Terzikian G. A., Vardevanian P. O., Antonian A. P., Borisova O. F., Frank-Kamenetskii M. D. Theoretical treatment of melting of complexes of DNA with ligands having several types of binding sites on helical and single-stranded DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. 1996. Vol. 14(2). P. 275–283.
38. Minasyan S. H., Tavadyan L. A., Antonyan A. P., Davtyan H. G., Parsadanyan M. A., Vardevanyan P. O. Differential pulse voltammetric

- studies of ethidium bromide binding to DNA // *Bioelectrochemistry*. 2006. Vol. 68. P. 48–55.
39. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Москва, 2012. 1216 с.
 40. Nurminen M. L., Niittynen L., Korpela R., Vapaatalo H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review // *Eur. J. Clin. Nutr.* 1999. Vol. 53. P. 831–839.
 41. Jafari M., Rabbani A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis // *Metabolism*. 2004. Vol. 53(6). P. 687–692.
 42. Brauer L. H., Buican B., De Wit H. Effects of caffeine deprivation on taste and mood // *Behav. Pharmacol.* 2002. Vol. 5. P. 111–118.
 43. Florensa R., Bachs O., Agell N. ATM/ATR-independent inhibition of cyclin B accumulation in response to hydroxyurea in nontransformed cell lines in altered in tumor cell lines // *Oncogene*. 2003. Vol. 22(51). P. 8283–8292.
 44. Tempel K., von Zallinger C. Caffeine-DNA interactions: biochemical investigations comprising DNA-repair enzymes and nucleic acid synthesis // *Z. Naturforsch.* 1997. Vol. 52. P. 466–474.
 45. Marheineke K., Hyrien O. Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279(27). P. 28071–28081.
 46. Vavrova J., Marekova-Rezacova M., Vokurkova D., Szkanderova S., Psutka J. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells // *Radiat. Environ Biophys.* 2003. Vol. 42(3). P. 193–199.
 47. He Z., Ma W. Y., Hashimoto T., Bode A. M., Yang C. S., Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63(15). P. 4396–4401.
 48. Kan L-S., Borer P. N., Cheng D. M., Ts'o P. O. P. ¹H- and ¹³C-NMR studies on caffeine and its interaction with nucleic acids // *Biopolymers*. 1980. Vol. 19. P. 1641–1654.
 49. Fritzsche H., Petri I., Schutz H., Weller K., Sedmera R., Lang H. On the interaction of caffeine with nucleic acids. III. ¹H NMR studies of caffeine -5'-adenosine monophosphate and caffeine-poly(riboadenylate) interaction // *Biophys. Chem.* 1980. Vol. 11. P. 109–119.

50. Fritzsche H., Lang H., Sprinz H., Pohle W. On the interaction of caffeine with nucleic acids. IV. Studies of caffeine-DNA interaction by infrared and ultraviolet linear dichroism, proton and deuteron nuclear magnetic resonance // *Biophys. Chem.* 1980. Vol. 11. P. 121–131.
51. Tilley S. L. Methylxanthines in asthma // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2011. Vol. 200. P. 439–56. doi: 10.1007/978-3-642-13443-2_17
52. Березовский В. М. Химия витаминов. Москва, 1973. 632 с.
53. Grajek H. Flavins as photoreceptors of blue light and their spectroscopic properties: review // *Current Topics Biophysics*. 2011. Vol. 34. P. 53–65.
54. Bastian M., Sigel H. The self-association of flavin mononucleotide (FMN²⁻) as determined by ¹H NMR shift measurements // *Biophys. Chem.* 1997. Vol. 67. P. 27–34.
55. Веселков А. Н., Лантушенко А. О., Чубаров А. С., Веселков Д. А., Дэвис Д. Б. ¹H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-монопнуклеотида и его комплексообразования с никотинамидом в водном растворе // *Журн. физ. химии*. 2002. № 76(7). С. 1313–1320.
56. Smyk B., Grajek H. Conformation of FMN dimer obtained by molecular modeling methods // *Curr. Topics Biophys.* 2001. Vol. 25. P. 81–84.
57. Martin C. B., Tsao M.-L., Hadad C. M., Platz M. S. The reaction of triplet flavin with indole. A study of the cascade of reactive intermediates using density functional theory and time resolved infrared spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124(24). P. 7226–7234. DOI: 10.1021/ja0123711
58. Langer J., Günther A., Seidenbecher S., Berden G., Oomens J., Dopfer O. Probing protonation sites of isolated flavins using IR spectroscopy: from lumichrome to the cofactor flavin mononucleotide // *ChemPhysChem*. 2014. Vol. 15(12). P. 2550–2562. doi: 10.1002/cphc.201402146
59. Grajek H., Drabent R., Żurkowska G., Bojarski C. Absorption of the flavin dimers // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. Vol. 801(3). P. 456–460.
60. Ioannides C., Yoxall V. Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2003. Vol. 6. P. 649–656.
61. Adel A. L., Dorr R. T., Liddi J. D. The effects of anticancer drug sequence in experimental combination chemotherapy // *Cancer Invest.* 1993. Vol. 11. P. 15–24.

62. Wang H. L., Zou H. F., Zhang Y. K. Quantitative study of competitive binding of drugs to protein by microdialysis high performance liquid chromatography // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 373–377.
63. Ts'o P. O. P., Melvin I. S., Olson A. C. Interaction and association of bases and nucleosides in aqueous solutions // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. Vol. 85. P. 1289–1296.
64. Buurma N. J., Haq I. Calorimetric and spectroscopic studies of Hoechst 33258: self-association and binding to non-cognate DNA // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 381. P. 607–621.
65. Костюков В. В., Евстигнеев М. П. Энергетика комплексообразования биологически активных соединений и нуклеиновых кислот в водном растворе. Севастополь, 2012. 474 с.
66. Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. Self-association of daunomycin // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. P. 3927–3932.
67. Gormally J., Natarajan N., Wyn-Jones E. Aggregation by stacking of a drug in aqueous solution studied by means of light scattering and ultrasonic relaxation // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* 1984. Vol. 80. P. 243–259.
68. Attwood D. The mode of association of amphiphilic drugs in aqueous solution // *Adv. Colloid. Inter. Sci.* 1995. Vol. 55. P. 271–303.
69. Aradi F. Effect of methylation on the pyrimidine-pyrimidine stacking interaction studied by ^1H NMR chemical shift // *Biophys. Chem.* 1995. Vol. 54. P. 67–73.
70. Ts'o P. O. P. Bases, nucleosides and nucleotides. New York : Academic Press, 1974. Vol. 1. P. 453–584.
71. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis // *J. Chem. Soc. Faraday. Trans.* 1996. Vol. 92. P. 383–390.
72. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Куликов Э. Л. Исследование ассоциации красителя акридинового оранжевого методом протонного магнитного резонанса // *Журнал структурной химии.* 1985. № 27. С. 43–46.
73. Eaton R. J., Veselkov D. A., Baranovsky S. F., Osetrov S. G., Djimant L. N., Davies D. B., Veselkov A. N. ^1H -NMR studies of self-association of

- anthracycline antibiotic molecules in aqueous solution // Russ. J. Phys. Chem. B. 2000. Vol. 19. P. 387–399.
74. Veselkov A. N., Evstigneev M. P., Veselkov D. A., Davies D. B. A generalized NMR-derived statistical-thermodynamical model of hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution // J. Chem. Phys. 2001. Vol. 115(5). P. 2252–2266.
 75. Veselkov D. A., Evstigneev M. P., Davies D. B., Kodintsev V. V., Veselkov A. N. A generalized statistical-thermodynamical model of hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution for the NMR data interpretation // Biopolym. Cell. 2001. Vol. 17(6). P. 501–511. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0005D9>
 76. Davies D. B., Veselkov D. A., Evstigneev M. P., Veselkov A. N. Self-association of the antitumour agent novatrone (mitoxantrone) and its hetero-association with caffeine // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 2001. P. 261–267. DOI: 10.1039/B007042O
 77. Evstigneev M. P., Veselkov D. A., Djimant L. N., Davies D. B., Veselkov A. N. ^1H NMR analysis of heteroassociation of caffeine with mitoxanthrone in aqueous solution // J. Struct. Chem. 2001. Vol. 42(5). P. 777–783.
 78. Веселков Д. А., Евстигнеев М. П., Кодинцев В. В., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н. Исследование гетероассоциации молекул дауномицина и бромистого этидия в водном растворе методом ^1H ЯМР-спектроскопии // Физ. химия. 2001. № 75. С. 879–884.
 79. Lyles M. B., Cameron I. L., Rawls H. R. Structural basis for the binding affinity of xanthines with the DNA intercalator acridine orange // J. Med. Chem. 2001. Vol. 44(26). P. 4650–4660.
 80. Veselkov A. N., Evstigneev M. P., Rozvadovska A. O., Hernandez Santiago A. A., Zubchenok O. V., Djimant L. N., Davies D. B. ^1H NMR structural and thermodynamical analysis of the hetero-association of daunomycin and novatrone in aqueous solution // J. Mol. Struct. 2004. Vol. 701. P. 31–37.
 81. Евстигнеев М. П., Розвадовская А. О., Эрнандес Сантьяго А. А., Мухина Ю. В., Веселков К. А., Рогова О. В., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н.

- Анализ ассоциации кофеина с флавиномононуклеотидом по данным ПМР-спектров в водном растворе // Физ. химия. 2005. № 79(4). С. 673–679.
82. Evstigneev M. P., Mykhina Yu. V., Davies D. B. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B₂) determined by NMR spectroscopy // *Biophys. Chem.* 2005. Vol. 118. P. 118–127.
 83. Евстигнеев М. П., Розвадовская А. О., Чубаров А. С., Эрнандес Сантьяго А. А., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н. Структурный и термодинамический анализ гетероассоциации молекул дауномицина и флавиномононуклеотида в водном растворе методом ¹H ЯМР спектроскопии // *Журн. структ. химии.* 2005. № 46(1). С. 70–76.
 84. Veselkov A. N., Evstigneev M. P., Rozvadovska A. O., Mukhina Yu. V., Davies D. B. A structural and thermodynamic analysis of novatrone and flavin mononucleotide heteroassociation in aqueous solution by ¹H NMR spectroscopy // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2005. Vol. 31. P. 453–459. <https://doi.org/10.1007/s11171-005-0062-0>
 85. Evstigneev M. P., Rybakova K. A., Davies D. B. Complexation of norfloxacin with DNA in the presence of caffeine // *Biophys. Chem.* 2006. Vol. 121. P. 84–95.
 86. Evstigneev M. P., Mukhina Yu. V., Davies D. B. ¹H NMR study of the hetero-association of flavin-monomonucleotide with mutagenic dyes: ethidium bromide and proflavine // *Molecular Phys.* 2006. Vol. 104(4). P. 647–654.
 87. Evstigneev M. P., Khomich V. V., Davies D. B. Complexation of anthracycline drugs with DNA in the presence of caffeine // *Eur. Biophys. J.* 2006. Vol. 36. P. 1–11. DOI: 10.1007/s00249-006-0071-9
 88. Andrejuk D. D., Hernandez Santiago A. A., Khomich V. V., Voronov V. K., Davies D. B., Evstigneev M. P. Structural and thermodynamic analysis of the hetero-association of theophylline with aromatic drug molecules // *J. Mol. Struct.* 2008. Vol. 889. P. 229–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.01.051>
 89. Hernandez Santiago A. A., Andrejuk D. D., Cervantes Tavera A. M., Davies D. B., Evstigneev M. P. Complexation of biologically active aromatic compounds with DNA in the presence of theophylline // *J. Biol. Phys.* 2009. Vol. 35. P. 115–126. DOI: 10.1007/s10867-008-9124-x

90. Мосунов А.А., Костюков В. В., Евстигнеев М. П. Изучение методом ^1H ЯМР-спектроскопии комплексообразования ароматических биологически активных соединений с антибиотиком топотеканом // Укр. биохим. журн. 2012. № 84(2). С. 61–72.
91. Evstigneev M. P., Davies D. B., Veselkov A. N. Stochastic models (cooperative and non-cooperative) for NMR analysis of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution // Chem. Phys. 2006. Vol. 321. P. 25–33.
92. Davies D. B., Veselkov D. A., Veselkov A. N. Structure and thermodynamics of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution determined by NMR spectroscopy // Molecular Physics. 1999. Vol. 97(3). P. 439–451.
93. Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф., Болотин П. А., Завьялова О. С., Веселков Д. А., Дэвис Д. Б. Исследование самоассоциации антибиотика актиномицина D в водном растворе методом ^1H -ЯМР спектроскопии // Журн. структ. химии. 1995. № 36(1). С. 81–88.
94. Tavagnacco L., Schnupf U., Mason P. E., Saboungi M.-L., Cesaro A., Brady J. W. Molecular dynamics simulation studies of caffeine aggregation in aqueous solution // J. Phys. Chem. B. 2011. Vol. 115(37). P. 10957–10966. doi: 10.1021/jp202135
95. Евстигнеев М. П., Веселков Д. А., Дымант Л. Н., Дэвис Д. Б., Веселков А. Н. ^1H ЯМР анализ гетероассоциации кофеина с антибиотиком митоксантроном в водном растворе // Журн. структ. химии. 2001. № 42(5). С. 928–935.
96. Круглова Е. Б., Малеев В. Я., Глибин Е. Н., Веселков А. Н. Физические механизмы взаимодействия производных актиноцина с ДНК. 5. Спектрофотометрический анализ димеризации производных актиноцина с разной длиной боковых цепей // Вісник Харків. нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна. 2002. №560. Вип. 1(10). С. 12–20.
97. Veselkov A. N., Davies D. B. Anti-cancer drug design. Biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives. Sevastopol, 2002. 259 p.
98. Семенов М. А., Кашпур В. А., Больбух Т. В., Малеев В. Я. Исследование гидратации компонентов нуклеиновых кислот методами инфракрасной

- спектроскопии и сверхвысокой диэлектрметрии // Биополимеры и клетка. 1987. № 3(1). С. 18–22.
99. Семенов М. А., Суэтова В. П. Исследование спектральных параметров полос поглощения нуклеотидов в области 1100-2400 см⁻¹ в D₂O при различных температурах // Киев. Молекулярная генетика и биофизика : Межведомственный научный сборник. 1979. Вып. 4. С. 24–31.
 100. Малеев В. Я., Семенов М. А., Гасан А. И., Кашпур В. А. Физические свойства системы ДНК-вода // Биофизика. 1993. № 38(5). С. 789–811.
 101. Semenov M. A., Bereznyak E. G. Hydration and stability of nucleic acids in the condensed state // Comments Mol. Cel. Biophys. 2000. Vol. 10(1). P. 1–23.
 102. Vetzal R., Zirwer D., Berker M. Optical anisotropy of oriented deoxyribonucleic acid films of different water content // Biopolymers. 1969. Vol. 8. P. 391–401.
 103. Семенов М. А., Больбух Т. В., Малеев В. Я. Исследование гидратации двуспирального комплекса поли А·поли У методами ИК-спектроскопии и пьезогравиетрии // Биофизика. 1985. № 30(4). С. 571–577.
 104. Семенов М. А., Малеев В. Я., Березняк Е. Г., Гасан А. И., Больбух Т. В. Гидратация и стабильность комплекса поли(гУ) поли(гЦ) // Молекулярная биология. 1991. № 25(6). С. 1626–1634.
 105. Шестопалова А. В., Стариков Е. Б., Семенов М. А., Больбух Т. В. Исследование гидратации кофеина и комплекса ДНК-кофеин во влажных пленках методами ИК-спектроскопии и пьезогравиетрии. Харьков, 1987. 29 с. (Препринт / АН УССР, Ин-т радиофизики и электроники; № 332).
 106. Tinoco J. J. Hypochromism in Polynucleotides // J. Amer. Chem. Soc. 1960. Vol. 82. P. 4785–4790.
 107. Semenov M. A. Bolbukh T. V. Carbonyl vibration resonance interactions of helical polynucleotides Poly(dA)·Poly(dT) and Poly G·Poly C // Studia Biophysica. 1984. Vol. 102. P. 215–220.
 108. Piosik J., Zdunek M., Kapuchinski J. The modulation by xanthines of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents. Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone // Biochem. Pharm. 2002. Vol. 63(4). P. 635–646.

109. Kikkert I. N., Kelly G. R., Kuruscev T. Interaction between purine derivatives: electronic spectral study. I. Electronic transition in caffeine monomer and exciton coupling in dimer // *Biopolymers*. 1973. Vol. 12. P. 1459–1477.
110. Poger R., Peter S. Nucleotide aggregation in aqueous solution. A multicomponent self-diffusion study // *Biophys. Chem*. 1985. Vol. 21. P. 145–156.
111. Danilov V. I., Tolokh I. S. Nature of the stacking of nucleic acids bases in water: a Monte Carlo simulation // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 1984. Vol. 2. P. 119–130.
112. Alderfer J. L., Danilov V. I., Poltev V. I., Slyusarchuk O. N. A study of the hydration of deoxydinucleoside monophosphates containing thymine, uracil and its 5-halogen derivatives: Monte Carlo simulation // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 1999. Vol. 16. P. 1107–1117.
113. Веселков А. Н., Евстигнеев М. П., Эрнандес Сантьяго А. А., Рогова О. В., Веселков Д. А., Дэвис Д. Б. Исследование гетероассоциации гомодимера этидия и иодистого пропидия в водном растворе методом ^1H ЯМР спектроскопии // *Журн. структ. химии*. 2004. № 45(5). С. 837–843.
114. Davies D. B., Evstigneev M. P., Veselkov D. A., Veselkov A. N. Hetero-association of anti-cancer antibiotics in aqueous solution: NMR and molecular mechanics analysis // *Biophys. Chem*. 2005. Vol. 117. P. 111–118.
115. Hernandez Santiago A. A., Rosas Castilla S., Morales Rodriguez A., Aleskerova E. A., Lantushenko A. O., Kostjukov V. V., Davies D. B., Evstigneev M. P. Relation between tructure and enthalpy for stacking interactions of aromatic molecules // *Molecular Phys*. 2010. Vol. 108(15). P. 1941–1947. <http://dx.doi.org/10.1080/00268976.2010.498389>
116. Kostjukov V. V., Mosunov A. A., Ermolaev M. A., Sykhonos P. A., Evstigneev M. P. Additional stabilization of hetero-complexes of aromatic molecules: H-bonds or charge-transfer? // *J. Mol. Str*. 2011. Vol. 985(2-3). P. 403–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.11.031>
117. Yang X.-L., Wang A. H.-J. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA // *Pharm. Ther*. 1999. Vol. 83. P. 181–215.

118. Panigrahi S. K., Desiraju G. R. Strong and weak hydrogen bonds in drug–DNA complexes: A statistical analysis // *J. Biosci.* 2007. Vol. 32. P. 677–691.
119. Tabernero L., Bella J., Aleman C. Hydrogen bond geometry in DNA–minor groove binding drug complexes // *Nucleic Acids Res.* 1996. Vol. 24. P. 3458–3466.
120. Danilov V. I., Shestopalova A. V. Hydrophobic effect in biological associates: a Monte Carlo simulation of caffeine molecules stacking // *Int. J. Quantum. Chem.* 1989. Vol. 35. P. 103–112.
121. Danilov V. I., Slyusarchuk O. N., Poltev V. I., Alderfer J. L., Wollman R. M., Brickmann J. A., Lautenschlager P. A Monte Carlo simulation of hydration of xanthine-derivatives and their stacked forms // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1992. Vol. 9. P. 1239–1252.
122. Auffinger P., Westhof E. Roles of hydration on the structure and dynamics of nucleic acids. In: *Water management in the design and distribution of quality foods*. Basel, 1999. P. 165–198.
123. Qu X., Chaires B. Hydration changes for DNA intercalation reactions // *J. Amer. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123(1). P. 1–7
124. Breusegem S. Y., Sadat-Ebrahimi S. E., Douglas K. T., Bichenkova E. V., Clegg R. M., Loontjens F. G. Experimental precedent for the need to involve the primary hydration layer of DNA in lead drug design // *J. Med. Chem.* 2001. Vol. 44. P. 2503–2506.
125. Пиментел Дж., Мак-Клеллан О. Водородная связь : пер. с англ. Москва, 1964. 464 с.
126. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A. An infrared study of hydrogen bonding between adenine and uracil derivatives in chloroform solution // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. Vol. 89. P. 496–504.
127. Hartman K. A., Lord R. C., Thomas G. J., Jr. *Structural studies of nucleic acids and polynucleotides by infrared and Raman spectroscopy*. New York, 1973. P. 1–89.
128. Соколов Н. Д. Водородная связь. Москва, 1981. 288 с.
129. Boryskina O. P., Bolbukh T. V., Semenov M. A., Gasan A. I., Maleev V. Ya. Energies of peptide–peptide and peptide–water hydrogen bonds in collagen: Evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry and differential scanning calorimetry // *J. Mol. Struct.* 2007. Vol. 827(1–3). P. 1–10.

130. Yurenko Y. P., Zhurakivsky R. O., Samijlenko S. P., Ghomi M., Hovorun D. M. The whole of intramolecular H-bonding in the isolated DNA nucleoside thymidine. AIM electron density topological study // *Chemical Physics Letters*. 2007. Vol. 447. P. 140–146.
131. Zhurakivsky R. O., Hovorun D. M. Which intramolecular hydrogen bonds stabilize conformers of deoxyadenosine? The results of quantum-chemical analysis of electron density topology // *Biopolym. Cell*. 2007. Vol. 23(4). P. 363–367.
132. Shishkin O. V., Palamarchuk G. V., Gorb L., Leszczynsky J. Intramolecular hydrogen bonds in canonical 2'-deoxyribonucleotides: An atoms in molecules study // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110(9). P. 4413–4422.
133. Sukhanov O. S., Shishkin O. V., Gorb L., Leszczynski J. Structure and hydrogen bonding in polyhydrated complexes of guanine // *Structural Chem*. 2008. Vol. 19(1). P. 171–180.
134. Popelier P. L. A. Characterization of a dihydrogen bond on the basis of the electron density // *J. Phys. Chem. A*. 1998. Vol. 102. P. 1873–1878.
135. Koch U., Popelier P. L. A. Characterization of C-H-O hydrogen bonds on the basis of the charge density // *J. Phys. Chem*. 1995. Vol. 99. P. 9747–9754.
136. Grabowski S. J. *Hydrogen bonding: new insights*. Springer, 2006. 519 p.
137. Wendler K., Thar J., Zahn S., Kirchner B. Estimating the hydrogen bond energy // *J. Phys. Chem. A*. 2010. Vol. 114(35). P. 9529–9536. DOI: 10.1021/jp103470e
138. Bader R. W. F. *Atoms in molecules: a quantum theory*. Oxford, 1990. 438 p.
139. Shestopalova A. V. The investigation of the association of caffeine and actinocin derivatives in aqueous solution: A molecular dynamics simulation // *J. Mol. Liquids*. 2006. Vol. 127(1–3). P. 113–117.
140. Doig A. J., Williams D. H. Binding energy of an amide-amide hydrogen bond in aqueous and nonpolar solvents // *J. Am. Chem. Soc*. 1992. Vol. 114. P. 338–343
141. Makhatadze G. I., Privalov P. L. Energetics of protein structure // *Adv. Protein Chem*. 1995. Vol. 47. P. 307–425.
142. Teplukhin A. V., Poltev V. I., Chuprina V. P. Dependence of the hydration shell structure in the minor groove of the DNA double helix on the groove

- width as revealed by Monte Carlo simulation // *Biopolymers*. 1991. Vol. 31. P. 1445–1453.
143. Teplukhin A. V., Zhurkin V. B., Poltev V. I. Monte Carlo modeling of DNA hydration. Poly(A)-water interaction in the major groove stabilizes the B₀ conformation // *Mol. Biol.* 1996. Vol. 30(1). P. 75–84.
 144. Evstigneev M. P. Physicochemical mechanisms of synergistic biological action of combinations of aromatic heterocyclic compounds // *Organic Chemistry International*. 2013. Vol. 2013. ID 278143. 10 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/278143>
 145. Larsen R. W., Jasuja R., Hetzler R. K., Muraoka P. T., Andrada V. G., Jameson D. M. Spectroscopic and molecular modelling studies of caffeine complexes with DNA intercalators // *Biophys. J.* 1996. Vol. 70(1). P. 443–452.
 146. Lyles M. B., Cameron I. L. Caffeine and other xanthines as cytochemical blockers and removers of heterocyclic DNA intercalators from chromatin // *Cell Biology International*. 2002. Vol. 26(2). P. 145–154. doi:10.1006/cbir.2001.0810
 147. Bedher E., Du I., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Caffeine dissociates complexes between DNA and intercalating dyes // *Cytometry*. 2001. Vol. 43(1). P. 38–45.
 148. Abraha A., Gholap A., Belay A. Investigation of self-association, optical transition probability and hetero-association with chlorogenic acid of nicotinamide using UV-Vis spectroscopy // *Int. J. Phys. Sci.* 2016. Vol. 11(21). P. 269–278. DOI: 10.5897/IJPS2016.4550
 149. Maleev V. Ya., Semenov M. A., Kruglova E. B., Bolbukh T. V., Gasan A. I., Berezhnyak E. G., Shestopalova A. V. Spectroscopic and calorimetric study of DNA interaction with a new series of actinocin derivatives // *J. Mol. Struct.* 2003. Vol. 645. P. 145–158.
 150. Veselkov A. N., Lantushenko A. O., Rogova O. V., Veselkov D. A., Davies D. B. Thermodynamical analysis of self-association of antibiotic actinocyl-bis-(2-dimethylaminoethyl) amid in aqueous solution by ¹H NMR spectroscopy // *Rus. J. Org. Chem.* 2003. Vol. 39(1). P. 87–91.
 151. Falk M., Gil M., Iza N. Self-association of caffeine in aqueous solution – a FT-IR study // *Can. J. Chem.* 1990. Vol. 68. P. 1293–1299.

152. Falk M., Chew W., Walter J. A., Kwiatkowski W., Barclay K. D., Klassen G. A. Molecular modeling and NMR studies of the caffeine dimmer // *Can. J. Chem.* 1998. Vol. 76. P. 48–56.
153. Traganos F., Kapuscinsky J., Darzynkiewicz Z. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: a flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novatrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 // *Cancer Res.* 1991. Vol. 51. P. 3682–3689.
154. Веселков А. Н., Лантушенко А. О., Веселков Д. А., Дэвис Д. Б. ¹Н ЯМР анализ гетероассоциации кофеина с антибиотиком актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амином в водном растворе // *Биоорганич. химия.* 2002. № 28(5). С. 474–480.
155. Ross W. E., Zwelling L. A., Kohn K. W. Relation between cytotoxicity and DNA strand breakage produced by adriamycin and other intercalating agents // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 1979. Vol. 5. P. 1221–1224.
156. Ganapathi R., Grabowski D., Schmidt H., Yen A., Iliakis G. Modulation of adriamycin and N-trifluoroacetyl adriamycin-14-valerate induced effects on cell cycle traverse and cytotoxicity in P388 mouse leukemia cells by caffeine and the calmodulin inhibitor trifluoperazine // *Cancer Res.* 1986. Vol. 46. P. 5553–5557.
157. Traganos F., Kaminska-Eddy B., Darzynkiewicz Z. Caffeine reverses the cytotoxic and cell kinetic effects of novatrone (mitoxantrone) // *Cell. Prolif.* 1991. Vol. 24. P. 305–319. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1991.tb01159.x
158. Кацев А. М., Скамрова Г. Б., Евстигнеев М. П. Изучение биологического действия комбинаций ДНК-интеркаляторов с кофеином на люминесцентные бактерии // *Уч. зап. Крымского фед. ун-та имени В. И. Вернадского.* 2014. Вып. 27. № 2(66). С. 186–195.
159. Wood A. W., Sayer J. M., Newmark H. L., Yagi H., Michaud D. P., Jerina D. M., Conney A. H. Mechanism of the inhibition of mutagenicity of a benzo[*a*]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide by riboflavin 5'-phosphate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. Vol. 79. P. 5122–5126.
160. Munoz M. A., Carmona C., Hidalgo J., Guardado P., Balon M. Molecular associations of flavins with betacarbolines and related indoles // *Bioorg. Med. Chem.* 1995. Vol. 3. P. 41–47.

161. Codoner A., Monzo I. S., Ortiz C., Olba A. Spectroscopic study of molecular associations between riboflavin and some β -carboline derivatives // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 1989. P. 107–111.
162. Mack C. P., Hultquist D. E., Schlafer M. Myocardial flavin reductase and riboflavin: a potential role in decreasing reoxygenation injury // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. Vol. 212(1). P. 35–40.
163. Webster R. P., Gawde M. D., Bhattacharya R. K. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin // Cancer Letters. 1996. Vol. 98(2). P. 129–135.
164. Pangrekar J., Krishnaswamy K., Jagadeesan V. Effects of riboflavin deficiency and riboflavin administration on carcinogen-DNA binding // Fd. Chem. Toxic. 1993. Vol. 31. P. 745–750.
165. Grajek H., Zurkowska G., Drabent R., Bojarski C. The structure of the flavomononucleotide dimer // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 881(2). P. 241–247.
166. Tribolet R., Sigel H. Self-association of adenosine 5'-monophosphate (5'-AMP) as a function of pH and in comparison with adenosine, 2'-AMP and 3'-AMP // Biophys. Chem. 1987. Vol. 27. P. 119–130.
167. Corfu N. A., Sigel H. Acid-base properties of nucleosides and nucleotides as a function of concentration // Eur. J. Biochem. 1991. Vol. 199. P. 659–669.
168. Beiner H. Spectral characteristics of flavins at the semiquinoid oxidation Level // J. Am. Chem. Soc. 1956. Vol. 78(20). P. 5323–5328. DOI: 10.1021/ja01601a046
169. Thöing C., Pfeifer A., Kakorin S., Kottke T. Protonated triplet-excited flavin resolved by step-scan FTIR spectroscopy: implications for photosensory LOV domains // Phys. Chem. Chem. Phys. 2013. Vol. 15. P. 5916–5926. doi: 10.1039/c3cp43881c
170. Ataka K., Hegemann P., Heberle J. Vibrational spectroscopy of an algal phot-LOV1 domain probes the molecular changes associated with blue-light reception // Biophys. J. 2003. Vol. 84(1). P. 466–474. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74866-8
- 171 Butler B. C., Hanchett R H., Rafailov H., MacDonald G. Investigating Structural Changes Induced By Nucleotide Binding to RecA Using Difference

- FTIR // *Biophys. J.* 2002. Vol. 82. P. 2198–2210. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75566-5
- 172 Screen J., Stanca-Kaposta E. C., Gamblin D. P., Liu B., Macleod N. A., Snoek L. C., Davis B. G., Simons J. P. IR-spectral signatures of aromatic-sugar complexes: probing carbohydrate-protein interactions // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. Vol. 46. P. 3644–3648. DOI: 10.1002/anie.200605116
 - 173 Xie W.; Ye Y., Shen A., Zhou L., Lou Z., Wang X., Hu M. Evaluation of DNA-targeted anti-cancer drugs by Raman spectroscopy // *Vibrational Spectroscopy*. 2008. Vol. 47. P. 119–123. DOI: 10.1016/j.vibspec.2008.03.003
 - 174 Бенуэлл К. Основы молекулярной спектроскопии : пер. с англ. Москва, 1985. 384 с.
 - 175 Волькенштейн М. В., Ельяшевич М. А., Степанов Б. И., Грибов Л. А. Колебания молекул. Москва, 1972. 699 с.
 - 176 Чиргадзе Ю. Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. Москва, 1965. 135 с.
 - 177 Бёккер Ю. Спектроскопия : пер. с нем. Москва, 2009. 528 с.
 - 178 Граселли Дж., Снейвили М., Балкин Б. Применение спектроскопии КР в химии : пер. с англ. Москва, 1984. 216 с.
 - 179 Малеев В. Я., Семенов М. А. Гиперхромизм нуклеиновых кислот в инфракрасной области // *Биофизика*. 1971. № 16(3). С. 389–397.
 - 180 Семенов М. А., Сухоруков Б. И., Малеев В. Я. Гидратируются ли азотистые основания при низкой влажности? // *Биофизика*. 1981. № 26(6). С. 979–984.
 - 181 Давыдов А. С. Теория поглощения света в молекулярных кристаллах. Киев, 1951. 141 с.
 - 182 Miyazawa T. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations // *J. Chem. Phys.* 1960. Vol. 32(6). P. 1647–1652.
 - 183 Мележик Е. П., Семенов М. А., Иванов А. Ю. Исследование тонкой структуры полосы амид I ИК-фурье спектра коллагена // *Вісник Харків. нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна*. 2005. № 665. Вип. 1(15). С. 62–67.

- 184 Nevskaya N. A., Chirgadze Yu. N. Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of α -helix // *Biopolymers*. 1976. Vol. 15, № 4. P. 637–648.
- 185 Fishman E. A Very High Temperature Infrared Cell for Pure Liquids or Solutions // *Appl. Opt.* 1962. Vol. 1. P. 493–495.
- 186 Семенов М. А., Сухоруков Б. И., Малеев В. Я., Шабарчина Л. И. Исследование температурной аномалии воды, сорбированной на ДНК, методом ИК-спектроскопии // *Биофизика*. 1979. № 24(2). С. 210–216.
- 187 Бабушкин А. А., Бажулин П. А., Королев Ф. А., Левшин Л. В., Прокофьев В. К., Стриганов А. Р. Методы спектрального анализа. Москва, 1962. 509 с.
- 188 Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия: в 3-х т. Москва, 1984. Т. 2. 496 с.
- 189 Больбух Т. В., Семенов М. А., Малеев В. Я., Сечкин В. В. Использование метода кварцевого резонатора для получения изотерм гидратации полинуклеотидов. Харьков, 1983. 19 с. (Препринт / АН УССР, Ин-т радиофизики и электроники; № 228).
- 190 Semenov M. A., Starikov E. B., Bolbukh T. V. Hydration isotherms and structural state of nucleotides and polynucleotides // *Studia biophysica*. 1988. Vol. 123. P. 217–224.
- 191 Gascoyne P. R. C., Pethig R. Experimental and theoretical aspects of hydration isotherms for biomolecules // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*. 1977. Vol. 73. P. 171–180.
- 192 Biegler-Konig F., Schonbohm J., Bayles D. AIM2000 – A program to analyze and visualize atoms in molecules // *J. Comput. Chem.* 2001. Vol. 22(5). P. 545–559.
- 193 Shishkin O. V., Palamarchuk G. V., Gorb L., Leszczynsky J. Opposite charges assisted extra strong C–H...O hydrogen bond in protonated 2'-deoxyadenosine monophosphate // *Chem. Phys. Letters*. 2008. Vol. 452(1–3). P. 198–205.
- 194 Dailidonis V. V., Danilov V. I., Früchtl H. A., van Mourik T. The nature of base stacking: a Monte Carlo study // *Theoretical Chemistry Accounts*. 2011. Vol. 130(4). P. 859–870.

- 195 Danilov V. I., Dailidonis V. V., van Mourik T., Früchtl H. A. A study of nucleic acid base-stacking by the Monte Carlo method: extended cluster approach // *Centr. Eur. J. Chem.* 2011. Vol. 9(4). P. 720–727.
- 196 Evstigneev M. P., Shestopalova A. V. Structure, thermodynamics and energetics of drug-DNA interactions: computer modeling and experiment // *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*. 2014. Vol. 17. P. 21–57. DOI: 10.1007/978-94-017-9257-8_2
- 197 Poltev V. I., Grokhlina T. I., González E. The study of three-dimensional structure of caffeine associates using computational and experimental methods // *J. Mol. Struct.* 2004. Vol. 709(1–3). P. 123–128.
- 198 Metropolis N., Rosenbluth A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H. Equation of state calculations by fast computing machines // *J. Chem. Phys.* 1953. Vol. 21(6). P. 1087–1092. doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.1699114>
- 199 Poltev V. I., Malenkov G. G., Gonzalez E. J., Teplukhin A. V., Rein R., Shibata M., Miller J. H. Modeling DNA hydration: comparison of calculated and experimental hydration properties of nucleic acid bases // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1996. Vol. 13(4). P. 717–726.
- 200 Teplukhin A. V., Malenkov G. G., Poltev V. I. Monte Carlo simulation of DNA fragment hydration in the presence of alkaline cations using novel atom-atom potential functions // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1998. Vol. 16(2). P. 289–300.
- 201 Malenkov G. Liquid water and ices: understanding the structure and physical properties // *J. Phys. Condens. Matter*. 2009. Vol. 21(28):283101. 35 p. doi:10.1088/0953-8984/21/28/283101
- 202 Abraham F. F. Monte Carlo simulation of physical clusters of water molecules // *J. Chem. Phys.* 1974. Vol. 61(3). P. 1221–1225.
- 203 Mruzik M. R., Abraham F. F., Schreiber D. F., Pound G. M. A Monte Carlo study of ion-water clusters // *J. Chem. Phys.* 1976. Vol. 64(2). P. 481–491.
- 204 Jeffrey G. A., Saenger W. *Hydrogen bonding in biological structures*. Berlin, 1991. 569 p.
- 205 Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K. A., Su S. J., Windus T. L., Dupuis M., Montgomery J. A. General atomic and molecular electronic

- structure system // J. Comput. Chem. 1993. Vol. 14(11), P. 1347–1363. doi: 10.1002/jcc.540141112
- 206 Neese F. The ORCA program system // Comp. Mol. Sci. 2012. Vol. 2(1). P. 73–78. doi: 10.1002/wcms.81
- 207 Grajek H., Gryczynski I., Bojarski P., Gryczynski Z., Bharill S., Kułak L. Flavin mononucleotide fluorescence intensity decay in concentrated aqueous solutions // Chem. Phys. Letters, 2007. Vol. 439. P. 151–156.
- 208 Dourlent M., Helene C. A quantitative analysis of proflavine binding to polyadenylic acid, polyuridylic acid, and transfer RNA // Eur. J. Biochem. 1971. Vol. 23. P. 86–95.
- 209 Bresloff J. L., Crothers D. M. Equilibrium studies of ethidium-polynucleotide interactions // Biochemistry. 1981. Vol. 20. P. 3547–3553
- 210 Cesaro A., Russo E., Tessarotto D. Thermodynamics of caffeine in aqueous denaturant solutions // J. Solut. Chem. 1980. Vol. 9(3). P. 221–235.
- 211 Березняк Е. Г., Семенов М. А. Спектральные параметры нуклеотидов и полинуклеотидов в D₂O. Харьков, 1989. 16 с. (Препринт / АН УССР, Ин-т радиофизики и электроники; № 89–379).
- 212 Erfurth S. C., Kiser E. J., Peticolas W. L. Determination of the backbone structure of nucleic acids and nucleic acid oligomers by laser Raman scattering // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. Vol. 69(4). P. 938–941.
- 213 Семенов М. А., Гасан А. И., Больбух Т. В., Малеев В. Я. Гидратация и структурные переходы ДНК из *Micrococcus Lysodeikticus* в пленках // Биофизика. 1996. № 41(5). С. 1007–1015.
- 214 Семенов М. А., Гасан А. И., Больбух Т. В., Малеев В. Я. Влияние воды на структурные переходы и стабильность ДНА из *Clostridium Perfringens* // Биофизика. 1997. № 42(3). С. 591–598.
- 215 Bowman W. D., Spiro T. G. Normal mode analysis of lumiflavin and interpretation of resonance Raman spectra of flavoproteins // Biochemistry. 1981. Vol. 20(11). P. 3313–3318. DOI:10.1021/bi00514a051
- 216 Lee N. S. Fourier transform Raman spectroscopic investigation of silver ion – flavin mononucleotide complexation // Bull. Korean Chem. Soc. 1991. Vol. 12(5). P. 465–467.

- 217 Kim M., Carey P. R. Observation of a carbonyl feature for riboflavin bound to riboflavin-binding protein in the red-excited raman spectrum // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115(15). P. 7015–7016. DOI: 10.1021/ja00068a086
- 218 Kyogoku Y., Yu B. S. Specific association of riboflavin and adenine derivatives in chloroform solution and the effect of barbiturates on the association // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1969. V. 42(5). P. 1387–1393.
- 219 Близнюк Ю. Н., Глибицкий Д. М., Семёнов М. А., Шестопалова А. В., Малеев В. Я. Самоассоциация и гидратация флавин-монопнуклеотида в растворах и плёнках // Біофізичний вісник. 2014. Вип. 31(1). С. 5–22.
- 220 Химмельблау Д. М. Прикладное нелинейное программирование : пер. с англ. Москва, 1975. 536 с.
- 221 Frank N. The ORCA program system // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. 2012. Vol. 2(1). P. 73–78. doi: 10.1002/wcms.81
- 222 Близнюк Ю. Н., Песина Д. А., Глибицкий Д. М., Семёнов М. А., Шестопалова А. В. ИК спектроскопическое и квантово-химическое проявление протонирования изоаллоксазинового кольца флавин-монопнуклеотида // Біофізичний вісник. 2015. Вип. 34(2). С. 16–23.
- 223 Близнюк Ю. Н., Семёнов М. А., Больбух Т. В., Шестопалова А. В., Малеев В. Я. Проявление межмолекулярных водородных связей в гетерокомплексах биологически активных веществ по данным колебательной спектроскопии // Біофізичний вісник. 2011. Вип. 27(2). С. 5–16.
- 224 Blyzniuk J. N., Semenov M. A., Shestopalova A. V. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic ligands: Monte Carlo simulations results // Structural Chemistry. 2016. Vol. 27(1). P. 77–89. DOI: 10.1007/s11224-015-0696-3
- 225 Pavel I., Szeghalmi A., Moigno D., Cîntă S., Kiefer W. Theoretical and pH dependent surface enhanced Raman spectroscopy study on caffeine // Biopolymers. 2003. Vol. 72(1). P. 25-37.
- 226 Маянц Л. С. Авербух Б. С. Теория и расчет интенсивностей в колебательных спектрах молекул. Москва, 1971. 141 с.
- 227 Грибов Л. А. Теория инфракрасных спектров полимеров. Москва, 1977. 240 с.

- 228 Мележик Е. П., Семенов М. А. Резонансные взаимодействия карбонильных колебаний в коллагеновых структурах // Вісник Харків. нац. ун-ту імені В. Н. Каразіна. 2003. № 606. Вип. 13. С. 62–68.
- 229 Гиршфельдер Д., Кетисс Ч., Берд Ю. Р. Молекулярная теория газов и жидкостей : пер. с англ. Москва, 1961. 928 с.
- 230 Parker F. S. Application of infrared, Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry. New York, 1983. 550 p.
- 231 Benevides J. M., Thomas G. J., Jr. Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation // Biochemistry. 2005. Vol. 44(8). P. 2993–2999.
- 232 Zdunek M., Piosik J., Kapuscinski J. Thermodynamical model of mixed aggregation of ligands with caffeine in aqueous solution. Part II // Biophys. Chem. 2000. Vol. 84. P 77–85. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00152-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00152-0)
- 233 Yu H., van Gunsteren W. F. Charge-on-spring polarizable water models revisited: from water clusters to liquid water to ice // J. Chem. Phys. 2004. Vol. 121(19). P. 9549–9564.
- 234 Kostjukov V. V., Khomytova N. M., Hernandez Santiago A. A., Cervantes Tavera A.-M., Alvarado Salas J., Evstigneev M. P. Parsing of the free energy of aromatic–aromatic stacking interactions in solution // J. Chem. Thermodynamics. 2011. Vol. 43(10). P. 1424–1434.
- 235 Kostjukov V. V., Khomutova N. M., Davies D. B., Evstigneev M. P. Electrostatic contribution to the energy of binding of aromatic ligands with DNA // Biopolymers. 2008. Vol. 89(8). P. 680–690.
- 236 Kostjukov V. V., Khomutova N. M., Evstigneev M. P. Partition of thermodynamic energies of drug-DNA complexation // Biopolymers. 2009. Vol. 91(9) P. 773–790.
- 237 Janin J. Angstroms and calories // Structure. 1997. Vol. 5(4). P. 473–479.
- 238 Sharp K. A., Nicholls A., Fine R. F., Honig B. Reconciling the magnitude of the microscopic and macroscopic hydrophobic effects // Science. 1991. Vol. 252(5002). P. 106–109.
- 239 Baginski M., Fogolari F., Briggs J. M. Electrostatic and non-electrostatic contributions to the binding free energies of anthracycline antibiotics to DNA // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 274(2). P. 253–267.

- 240 Kostjukov V. V., Khomutova N. M., Lantushenko A. O., Evstigneev M. P. Hydrophobic contribution to the free energy of complexation of aromatic ligands with DNA // *Biopolym. Cell.* 2009. № 25(2). P. 133–141.
- 241 Semenov M. A., Blyzniuk Iu. N., Bolbukh T. V., Shestopalova A. V., Evstigneev M. P., Maleev V. Ya. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic molecules probed by the methods of vibrational spectroscopy // *Spectrochim. Acta.* 2012. Vol. 95. P. 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.05.003>
- 242 Близнюк Ю. Н., Больбух Т. В., Круглова Е. Б., Семенов М. А., Малеев В. Я. Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК методом спектроскопии комбинационного рассеяния света // *Биополимеры и клетка.* 2009. № 25(2). С. 126–132.
- 243 Boryskina O. P., Bolbukh T. V., Semenov M. A., Maleev V. Ya. Physical factors of collagen triple helix stability // *Biopolym. Cell.* 2006. № 22(6). P. 458–467.
- 244 Porumb H. The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1978. Vol. 34(3). P. 175–195.
- 245 Breuzard G., Millot J. M., Riou J. F., Manfait M. Selective Interactions of Ethidiums with G-quadruplex DNA revealed by surface-enhanced Raman scattering // *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75(1)6. P. 4305–4311.
- 246 Tsuboi M., Benevides J. M., Thomas G. J., Jr. The complex of ethidium bromide with genomic DNA: structure analysis by polarized Raman spectroscopy // *Biophys. J.* 2007. Vol. 92(3). P. 928–934.
- 247 Yan Q., Priebe W., Chaires J. B., Czernuszewicz R. S. Interaction of doxorubicin and its derivatives with DNA: elucidation by resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman spectroscopy // *Biospectroscopy.* 1997. Vol. 3(4). P. 307–316.
- 248 Miroschnychenko K. V., Shestopalova A. V. The effect of drug-DNA interactions on the intercalation site formation // *Int. J. Quant. Chem. (Special Is.).* 2010. Vol. 110(1). P. 161–176. DOI: 10.1002/qua.22290
- 249 Jain S. C., Sobell H. M. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. VIII. Structures of two ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complexes containing ethidium: cytidyl(3'-5')guanosine // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1984. Vol. 1(5). P. 1179–1194.

- 250 Карапетян А. Т., Пермогоров В. И., Франк-Каменецкий М. Д., Лазуркин Ю. С. Термодинамические исследования комплексов ДНК с красителями // Мол. Биол. 1972. № 6(6). С. 867–873.
- 251 Martin J. C., Wartell R. M. Changes in Raman vibrational bands of calf thymus DNA during the B-to-A transition // Biopolymers. 1982. Vol. 21(3). P. 499–512.
- 252 Prescott B., Steinmetz W., Thomas G. J., Jr. Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy // Biopolymers. 1984. Vol. 23(2). P. 235–256.
- 253 Thomas G. J., Jr., Benevides J. M., Overman S. A., Ueda T., Ushizawa K., Saitoh M., Tsuboi M. Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations // Biophys. J. 1995. Vol. 68(3). P. 1073–1088.
- 254 Семенов М. А., Больбух Т. В. Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК во влажных пленках методом инфракрасной спектроскопии // Биополимеры и клетка. 1987. № 3(5). С. 234–240.
- 255 Yuzaki K., Hamaguchi H. Intercalation-induced structural change of DNA as studied by 1064 nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy // J. Raman Spectrosc. 2004. Vol. 35(12). P. 1013–1015.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. **Близнюк Ю. Н.,** **Большух Т. В.,** **Круглова Е. Б.,** **Семенов М. А.,**
Малеев В. Я. Исследование комплексообразования бромистого этидия с ДНК методом спектроскопии комбинационного рассеяния света // Биополимеры и клетка. 2009. № 25(2). С. 126–132.
2. **Близнюк Ю. Н.,** **Семёнов М. А.,** **Большух Т. В.,** **Шестопалова А. В.,**
Малеев В. Я. Проявление межмолекулярных водородных связей в гетерокомплексах биологически активных веществ по данным колебательной спектроскопии // Біофізичний вісник. 2011. Вип. 27(2). С. 5–16.
3. **Близнюк Ю. Н.,** **Глибицкий Д. М.,** **Семёнов М. А.,** **Шестопалова А. В.,**
Малеев В. Я. Самоассоциация и гидратация флавин-моноклеотида в растворах и плёнках // Біофізичний вісник. 2014. Вип. 31(1). С. 5–22.
4. **Близнюк Ю. Н.,** **Песина Д. А.,** **Глибицкий Д. М.,** **Семёнов М. А.,**
Шестопалова А. В. ИК спектроскопическое и квантово-химическое проявление протонирования изоаллоксазинового кольца флавин-моноклеотида // Біофізичний вісник. 2015. Вип. 34(2). С. 16–23.
5. **Semenov M.A.,** **Blyzniuk Iu. N.,** **Bolbukh T. V.,** **Shestopalova A. V.,**
Evstigneev M. P., **Maleev V. Ya.** Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic molecules probed by the methods of vibrational spectroscopy // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2012. Vol. 95. P. 224–229.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.05.003>
6. **Blyzniuk J.N.,** **Semenov M. A.,** **Shestopalova A. V.** Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic ligands: Monte Carlo simulations results // Structural Chemistry. 2016. Vol. 27(1). P. 77–89.
DOI 10.1007/s11224-015-0696-3

7. Будько Л. В., **Близнюк Ю. Н.** Применение Раман спектроскопии для исследования комплексообразования этидиума бромида с ДНК // Радиофизика и СВЧ электроника : тезисы докл. V Харьковская конференция молодых ученых, 14–16 декаб. 2005 г. Харьков, 2005. С. 47.
8. **Близнюк Ю. Н.**, Круглова Е. Б. Раман исследование В→А структурного перехода ДНК в присутствии этидия бромида // Радиофизика и Электроника : тезисы докл. VI Харьковская конференция молодых ученых, 13–14 декаб. 2006 г. Харьков, 2006. С. 33–34.
9. **Близнюк Ю. Н.**, Больбух Т. В. Структурные изменения ДНК при взаимодействии с ЭБ по данным Раман спектроскопии // УБФТ-2006 : тези доп. IV З'їзд Українського біофізичного товариства, 19–21 груд. 2006 р. Донецьк, 2006. С. 274–275.
10. **Близнюк Ю. Н.**, Семенов М. А., Шестопалова А. В. Исследование гетероассоциации флавин монопнуклеотида, бромистого этидия и теофиллина в водных растворах методами ИК и Раман спектроскопии // УБФТ-2011 : тези доп. V З'їзд Українського біофізичного товариства, 22–25 черв. 2011 р. Луцьк, 2011. С. 24–25.
11. **Blyzniuk Iu. N.** Study of heteroassociation of biologically active compounds by IR and Raman spectroscopy [Электронный ресурс] // Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics : abstr. 11th Kharkiv Young Scientists Conf., 29 Nov.–1 Dec. 2011. Kharkiv, 2011.
12. **Blyzniuk Iu. N.** Formation of intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active compounds probed by vibrational spectroscopy // Modern Problems of Theoretical Physics : abstr. III Young Scientist Conference, 21–23 Dec. 2011. Kyiv, 2011. P. 93.
13. **Близнюк Ю. Н.** Образование межмолекулярных водородных связей в гетероассоциатах биологически активных веществ по данным колебательной спектроскопии // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2012 : тезисы докл. VIII Международная

науочно-технічна конференція, 23–27 апр. 2012 г. Севастополь, 2012. С. 128–129.

14. **Blyzniuk Iu. N.**, Semenov M. A., Shestopalova A. V. Intermolecular hydrogen bonds in hetero-complexes of biologically active aromatic ligands: Monte Carlo simulations // Methods and Applications of Computational Chemistry : abstr. 5th International Symposium, 1–5 July 2013. Kharkiv, 2013. P. 107.
15. **Blyzniuk Iu. N.** pH-dependent self-association of flavin-mononucleotide. [Електронний ресурс] // Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics : abstr. 13th Kharkiv Young Scientists Conference, 2–6 Dec. 2013. Kharkiv, 2013.
16. **Blyzniuk Iu. N.**, Glibitskiy D. M. Self-association and hydration of flavin-mononucleotide in films // Problems of Theoretical Physics : abstr. V Young scientists conference, 24–27 December 2013. Kyiv, 2013. P. 72.
17. **Близнюк Ю. М.**, Песіна Д. О., Глибицький Д. М., Семенов М. О., Шестопалова Г. В. Самоасоціація ізоаллоксазинових кілець флавін-мононуклеотида у вологих плівках, вирощених з нейтральних і слабокислих розчинів // УБФТ-2015 : тези доп. VI З'їзд Українського біофізичного товариства, 28–30 трав. 2015 р. Луцьк-Світязь, 2015. С. 40.

Особистий внесок здобувача у роботах № 1, 2, 3, 4, 5 – пошук і критичний аналіз літературних даних, отримання коливальних спектрів, аналіз та інтерпретація отриманих експериментальних даних, написання статей; у роботах № 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 – аналіз літературних даних, експериментальне отримання коливальних спектрів, аналіз та інтерпретація отриманих даних, написання тез; у роботах № 6, 14 – аналіз і обговорення отриманих результатів, написання статті і тез.

ДОДАТОК В

Нумерація атомів і заряди на атомах відповідних лігандів, що використовувались в моделюванні методом Монте Карло

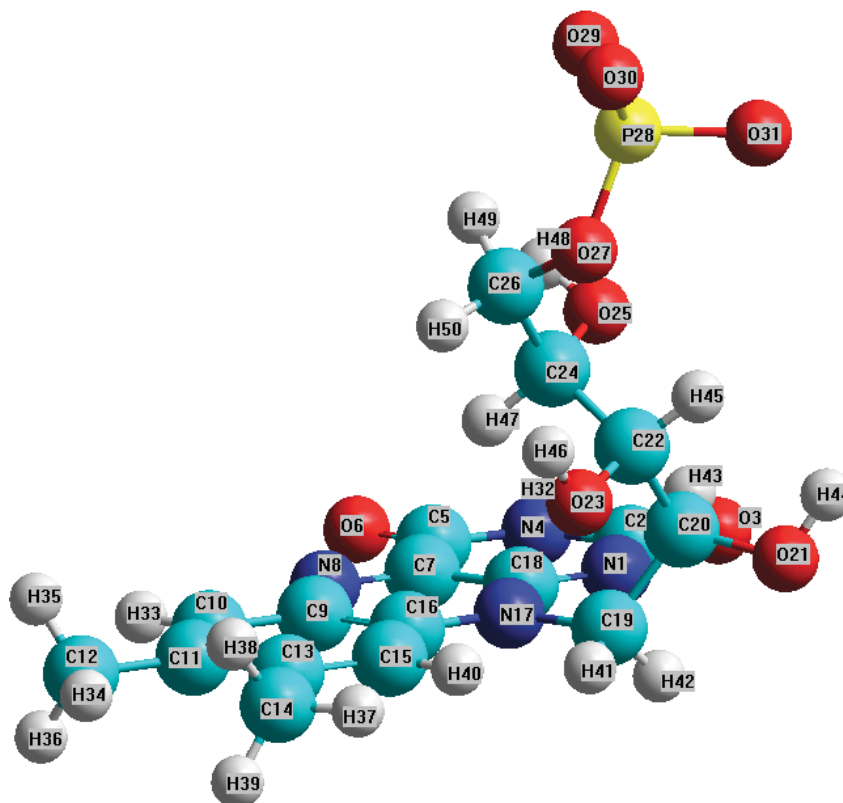


Рисунок В.1 Структурна формула флавінмононуклеотиду

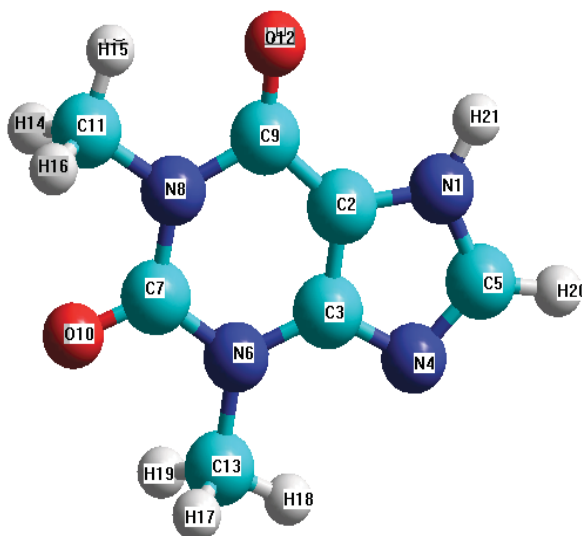


Рисунок В.2 Структурна формула теофіліну

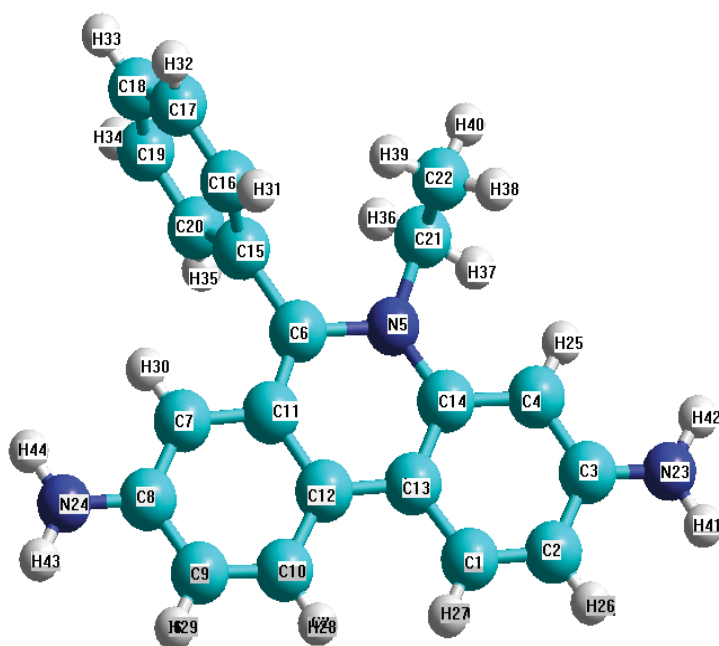


Рисунок В.3 Структурна формула бромистого етидію

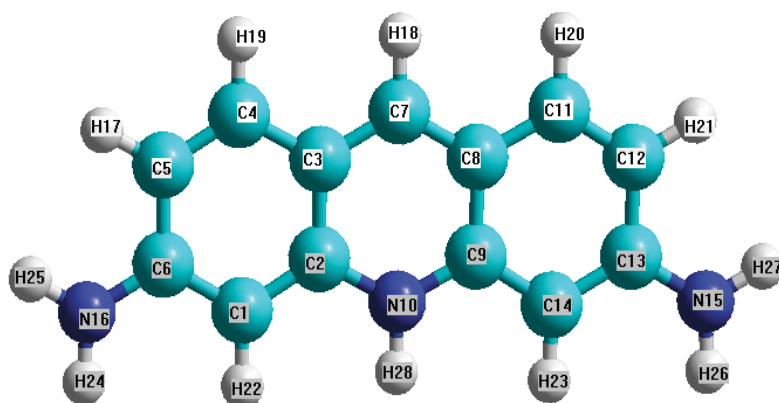


Рисунок В.4 Структурна формула профлавіну

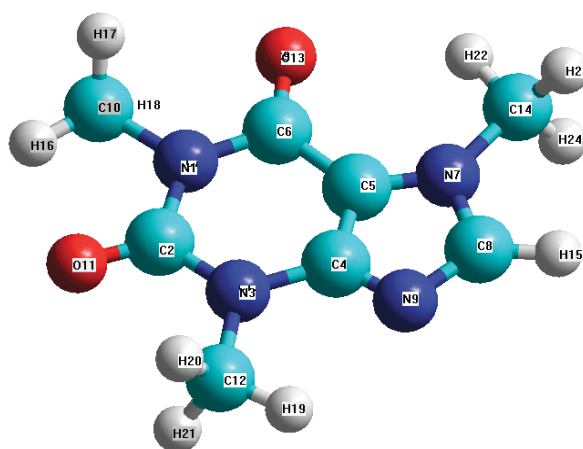


Рисунок В.5 Структурна формула кофеїну

Таблиця В.1

Флавінмононуклеотид; заряди ESP1 (атомні заряди обчислюються на основі розподілу електростатичного потенціалу – ESP, за схемою Мерца-Коллмана); оптимізація геометрії – DFT/B3LYP/6-31G(d, p)

N	атоми	заряди	N	атоми	заряди	N	атоми	заряди
1	N	-0,2433	18	C	0,4271	35	HC12	0,1220
2	C	1,0571	19	C	0,1976	36	HC12	0,1250
3	O	-0,4071	20	C	0,1592	37	HC14	0,1192
4	N	-0,8240	21	O	-0,5366	38	HC14	0,1262
5	C	0,6737	22	C	-0,0326	39	HC14	0,1375
6	O	-0,4697	23	O	-0,5880	40	HC15	0,2076
7	C	0,2990	24	C	0,2320	41	HC19	0,0428
8	N	-0,5852	25	O	-0,6110	42	HC19	0,0251
9	C	0,8448	26	C	-0,1177	43	HC20	0,0426
10	C	-0,5577	27	O	-0,3547	44	HO21	0,3876
11	C	0,5833	28	P	1,0708	45	HC22	0,1388
12	C	-0,3898	29	O	-0,6089	46	HO23	0,4085
13	C	0,1411	30	O	-0,6012	47	HC24	0,0681
14	C	-0,4001	31	O	-0,6256	48	HO25	0,4110
15	C	-0,2258	32	HN4	0,3871	49	HC26	0,1356
16	C	0,0504	33	HC10	0,2156	50	HC26	0,1370
17	N	0,1745	34	HC12	0,1247			

Таблиця В.2

Теофілін; ESP заряди, DFT/B3LYP/6-31G(d,p)

N	атоми	заряди	N	атоми	заряди
1	N	-0,2613	12	O	-0,3865
2	C	0,5509	13	C	-0,3265
3	C	-0,3892	14	HC11	0,1988
4	N	-0,1882	15	HC11	0,2015
5	C	0,2605	16	HC11	0,1991
6	N	-0,1241	17	HC13	0,2046
7	C	0,1186	18	HC13	0,1811
8	N	-0,1484	19	HC13	0,1997
9	C	-0,2383	20	HC5	0,2273
10	O	-0,3594	21	HN1	0,3366
11	C	-0,2571			

Таблиця В.3

Бромистий етидій; заряди ESP1, DFT/B3LYP/6-31G(d,p)

N	атоми	заряди	N	атоми	заряди
1	C	-0,4631	23	N	-0,8538
2	C	0,7864	24	N	-0,8070
3	C	-0,3911	25	HC4	0,2322
4	C	-0,1059	26	HC2	0,1865
5	N	0,1183	27	HC1	0,1745
6	C	-0,1535	28	HC10	0,1793
7	C	-0,0483	29	HC9	0,1845
8	C	-0,5074	30	HC7	0,2036
9	C	0,1516	31	HC16	0,1989
10	C	0,0165	32	HC17	0,1604
11	C	0,1161	33	HC18	0,1556
12	C	0,2426	34	HC19	0,1490
13	C	-0,2542	35	HC20	0,1994
14	C	-0,1705	36	HC21	0,0216
15	C	0,3924	37	HC21	0,0032
16	C	-0,4332	38	HC22	0,1068
17	C	-0,4404	39	HC22	0,0877
18	C	0,4363	40	HC22	0,1089
19	C	-0,2253	41	HN23	0,4007
20	C	-0,1950	42	HN23	0,3953
21	C	0,2026	43	HN24	0,3718
22	C	-0,3194	44	HN24	0,3855

Таблиця В.4

Профлавін; заряди ESP1, DFT/B3LYP/6-31G(d,p)

N	атоми	заряди	N	атоми	заряди
1	C	-0,5402	15	N	-0,9596
2	C	0,3144	16	N	-0,9588
3	C	0,0250	17	HC5	0,2048
4	C	-0,1440	18	HC7	0,1666
5	C	-0,3342	19	HC4	0,1835
6	C	0,6357	20	HC11	0,1854
7	C	-0,1349	21	HC12	0,2030
8	C	0,0468	22	HC1	0,2215
9	C	0,3007	23	HC14	0,2202
10	N	-0,3857	24	HN16	0,4487
11	C	-0,1578	25	HN16	0,4404
12	C	-0,3299	26	HN15	0,4501
13	C	0,6344	27	HN15	0,4413
14	C	-0,5348	28	HN10	0,3574

Таблиця В.5

Кофеїн; ESP заряди, DFT/B3LYP/6-31G(d,p)

N	атоми	заряди	N	атоми	заряди
1	N	-0,388	13	O	-0,532
2	C	0,671	14	C	-0,294
3	N	-0,343	15	HC8	0,155
4	C	0,555	16	HC10	0,089
5	C	-0,498	17	HC10	0,094
6	C	0,723	18	HC10	0,101
7	N	0,193	19	HC12	0,077
8	C	0,065	20	HC12	0,083
9	N	-0,531	21	HC12	0,095
10	C	-0,113	22	HC14	0,127
11	O	-0,519	23	HC14	0,160
12	C	-0,076	24	HC14	0,103

ПОДЯКА

На завершення я хочу висловити щиру вдячність моєму науковому керівнику доктору фіз.-мат. наук Шестопаловой Ганні Вікторівні за чуйне наукове керівництво, постійну увагу і підтримку на всіх етапах виконання роботи.

Приношу особливу подяку проф. Семенову Михайлу Олексійовичу за активну участь, допомогу і практичні поради під час виконання експериментальних робіт і при оформленні дисертаційної роботи.

Я вдячна с.н.с. Березняк Катерині Германівні і с.н.с. Духопельникову Євгену Володимировичу за уважне ознайомлення з дисертацією, корисні зауваження і рекомендації. Дякую всім співробітникам відділу біологічної фізики Інституту радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України за інтерес, проявлений до роботи, всебічну підтримку, обговорення результатів та критичні зауваження.

Хочу також подякувати моїм рідним і близьким за допомогу і підтримку.