

Міністерство освіти і науки України  
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

**БЛИЗНЮК ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА**

УДК 577.323

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

03.00.02 – біофізика

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фізико-математичних наук

Харків-2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Шестопалова Ганна Вікторівна**, Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, завідувач відділу біологічної фізики.

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Єфімова Світлана Леонідівна**, Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, завідувач відділу наноструктурних матеріалів;

кандидат фізико-математичних наук **Перепелиця Сергій Миколайович**, Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України, вчений секретар.

Захист відбудеться «1» лютого 2018 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий 28 грудня 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Берест В.П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** 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 непрямую 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.

**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 біооб'єкти різного рівню організації (біополімери, біомембрани, клітини)» (шифр «Модель-2», номер держреєстрації 0111U010475).

**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–N<sub>1</sub> і С–N<sub>5</sub> 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 (С=О і NH<sub>2</sub>) досліджуваних БАР: флавінмононуклеотиду (FMN), бромистого етидію (EB), профлавіну (PRF), кофеїну (CAF) і теофіліну (TPH) 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. 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 ЕВ 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* – коливальна спектроскопія (інфрачервона та комбінаційного розсіювання), метод п'єзограметрії, квантово-хімічний розрахунок та моделювання методом Монте Карло.

#### **Наукова новизна одержаних результатів.**

1. За допомогою методів коливальної спектроскопії вперше було отримано прямий доказ утворення Н-зв'язків між донорними (NH<sub>2</sub>) і акцепторними (C=O) групами при формуванні гетерокомплексів ароматичних біологічно активних речовин (FMN-EB, FMN-PRF, ТРН-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 C<sub>4</sub>=O і C<sub>2</sub>=O груп атомів для плівки FMN, отриманої зі слабкокислого розчину (рН ~ 6,0). За допомогою розрахунків резонансної взаємодії карбонільних коливань C<sub>4</sub>=O і C<sub>2</sub>=O груп у диполь-дипольному наближенні була побудована модель *n*-молекулярної самоасоціації флавінмононуклеотиду.
3. Аналіз ІЧ-спектрів сухих плівок FMN, вирощених з розчинів з рН ~ 6,0, показав, що протонування ізоалоксазинового кільця відбувається по атомах азоту N<sub>1</sub> і N<sub>5</sub>. Квантово-хімічні розрахунки зарядів на атомах ізоалоксазинового кільця підтвердили цей висновок, оскільки на атомах N<sub>1</sub> і N<sub>5</sub> знаходяться значні негативні заряди.
4. На підставі даних ІЧ-спектроскопії вперше встановлено, що у гетероасоціатах FMN-ТРН, ТРН-PRF і САФ-EB водневі зв'язки не утворюються, а стабілізація цих комплексів визначається міжплощинними взаємодіями. Виявлені високочастотні зсуви карбонільних коливань у гетерокомплексі FMN-ТРН 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-ТРН, ТРН-EB, ТРН-PRF і САФ-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, САФ і ТРН є інтерцепторами, які здатні зменшувати концентрацію мутагенів EB та PRF.
6. Вперше методом спектроскопії КР показано, що комплекси ЕВ-ДНК (за типом інтеркаляції та зовнішнього зв'язування) додатково стабілізуються

водневими зв'язками, які утворюються між  $\text{NH}_2$ -групами бромистого етидію та донорно-акцепторними групами полінуклеотидної матриці.

**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).

**Особистий внесок здобувача.** Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз наукової літератури, отримано результати експериментальних досліджень і проведено їх обробку. Автором особисто виконано первинний аналіз результатів і сформульовано 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 зроблено 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 статей 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.; 11<sup>th</sup> і 13<sup>th</sup> 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; 5<sup>th</sup> International Symposium «Methods and Applications of Computational Chemistry». – Kharkiv (Ukraine), 2013.

**Публікації.** Основні результати дисертації опубліковано в 17 наукових працях; з них: 6 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах і 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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету і задачі дослідження, показано зв'язок роботи з науковими програмами і темами, визначено наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, наведено відомості про апробацію результатів та зазначено особистий внесок здобувача.

У **першому розділі «Асоціація ароматичних біологічно активних лігандів у водних розчинах»** представлено огляд літератури за темою дисертації. Наведено загальну характеристику ароматичних біологічно активних речовин, зокрема мутагенів профлавіну і бромистого етидію, метилксантинів кофеїну і теофіліну та аналогу вітаміну В<sub>2</sub> флавінмононуклеотиду. Дано загальну характеристику інтерцепторним властивостям і біологічно важливим комбінаціям ароматичних БАР. Детально розглянуто самоасоціацію і гетероасоціацію біологічно активних речовин у водних розчинах. Наведено загальні уявлення про особливості самоасоціації флавінмононуклеотиду. Проаналізовано існуючі методи дослідження само- і гетероасоціації БАР і визначено роль води та Н-зв'язків у стабілізації асоціатів БАР і комплексів БАР з ДНК. Зокрема, розглянуто спектроскопічні методи дослідження само- і гетероасоціації ароматичних БАР. Проведено аналіз робіт, присвячених проблемі визначення міжмолекулярних Н-зв'язків у асоціатах ароматичних БАР. Окреслено коло невирішених питань, які стосуються проблеми асоціації ароматичних молекул і стабілізації само- і гетероасоціатів у водному розчині.

У **розділі 2 «Експериментальні та розрахункові методи досліджень. Приготування зразків»** розглянуто методи приготування зразків, експериментальні та теоретичні методи досліджень, які використовувались для вивчення коливальних спектрів біологічно активних речовин та їх енергетичних характеристик.

Для ІЧ-спектроскопічних досліджень розчини флавінмононуклеотиду (FMN), бромистого етидію (EB), профлавіну (PRF), кофеїну (CAF) і теофіліну (TRH) та їх гетерокомплекси 1:1 готували в D<sub>2</sub>O (99,8% чистоти). Структурні формули досліджуваних лігандів приведено на рис. 1. Концентрація лігандів FMN, EB, CAF і TRH у вільному стані та в сумішах становила  $C = 1,3 \times 10^{-2}$  М, концентрація PRF, FMN у вільному стані та в суміші FMN-PRF становила  $C = 7,7 \times 10^{-3}$  М. Для отримання ІЧ-спектрів поглинання плівок флавінмононуклеотиду готували розчини з концентрацією  $C \approx 0,01$  М.

Для отримання КР-спектрів розчини БАР та їх гетерокомплексів, а також комплекси EB-ДНК готувалися в стандартному фосфатному буферному розчині при рН = 6,86. Концентрація всіх досліджуваних речовин становила  $C = 1,5 \times 10^{-5}$  М. Суміші гетероасоціатів готували в співвідношенні 1:1. Концентрація бромистого етидію в комплексах EB-ДНК становила

$C_{EB} = 1,1 \times 10^{-4}$  М. Плівки ДНК вирощували з розчину полінуклеотиду з  $C_{ДНК} = 10^{-3}$  М.

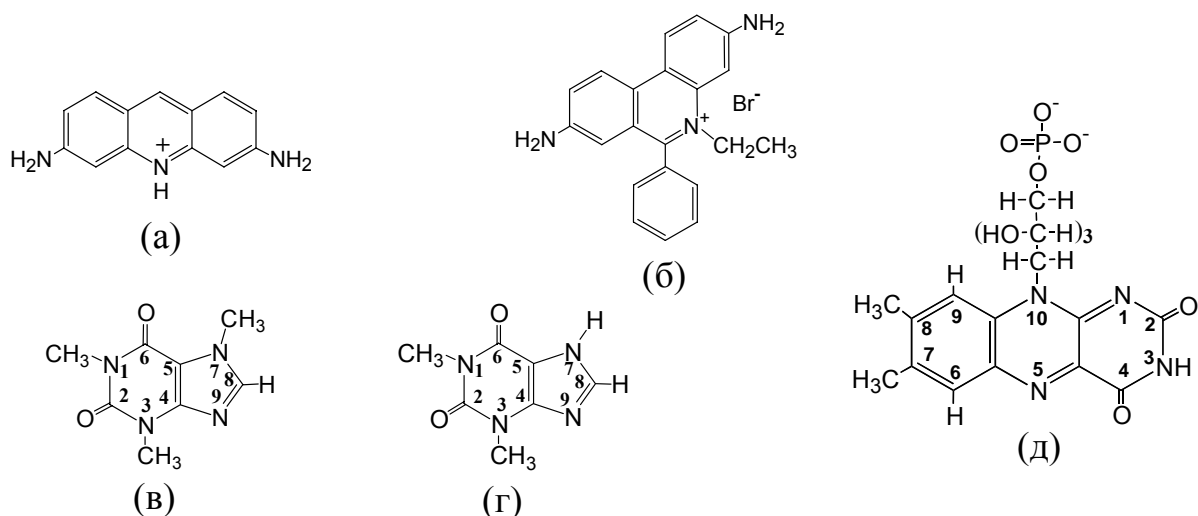


Рисунок 1 Структурні формули молекул профлавіну (а), бромистого етидію (б), кофеїну (в), теофіліну (г) і флавінмононуклеотиду (д)

У роботі розглянуто такі експериментальні методики: методи ІЧ- і КР-спектроскопії та метод п'єзогравіметрії. Наведено основні характеристики та фізичні принципи кожного методу. ІЧ-спектри досліджуваних речовин реєструвалися за допомогою двопроменевого спектрометра UR-20 (Karl Zeiss, Jena, Німеччина) з використанням призми NaCl. Спектри КР досліджуваних речовин було записано за допомогою спектрометра DILOR Z-16 (Франція) з подвійним монохроматором. У роботі використовували аргонний лазер з лінією збудження  $\lambda = 488$  та  $514,5$  нм. Для визначення числа молекул води, сорбованих зразками при заданій відносній вологості (ВВ), застосовувався метод п'єзогравіметричного мікрозважування з використанням розробленої раніше установки.

Оптимізація геометрії та розрахунок атомних зарядів вільних лігандів виконувались за допомогою DFT/B3LYP/6-31G(d) з використанням програм GAMESS для CAF, THP, PRF і EB та ORCA для FMN. Заряди на атомах отримано за допомогою схеми Merz-Kollman-Singh розподілу зарядів. За допомогою комп'ютерного моделювання методом Монте Карло було побудовано комплекси БАР і виконано оцінку внеску Н-зв'язків в загальну енергію їх стабілізації.

У розділі 3 «Самоасоціація флавінмононуклеотиду в розчинах і плівках» наведено результати дослідження структурних особливостей і молекулярних механізмів у самоасоціаті FMN.

На рис. 2 приведено ІЧ-спектри плівок FMN, які вирощені з розчинів з рН = 6,9 ( $\pm 0,05$ ) і рН = 6,2 ( $\pm 0,05$ ).

Аналіз ІЧ-спектрів показав, що при переході від нейтрального до слабкокислового середовища частота коливання карбонільної групи  $C_2=O$  змінилася неістотно, тоді як смуга поглинання  $C_4=O$  змістилася у високочастотну область на  $\Delta\nu = 25$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\pm 1$   $\text{cm}^{-1}$ ), а її інтенсивність зменшилася, тобто для цієї смуги виявлено гіпохромізм. Такий характер зміни спектральних



параметрів коливання  $C_4=O$  може бути пояснений динамічною взаємодією карбонільних коливань  $C_4=O$ , яка виникла в результаті стекінгу ізоалоксазинових кілець при утворенні самоасоціатів.

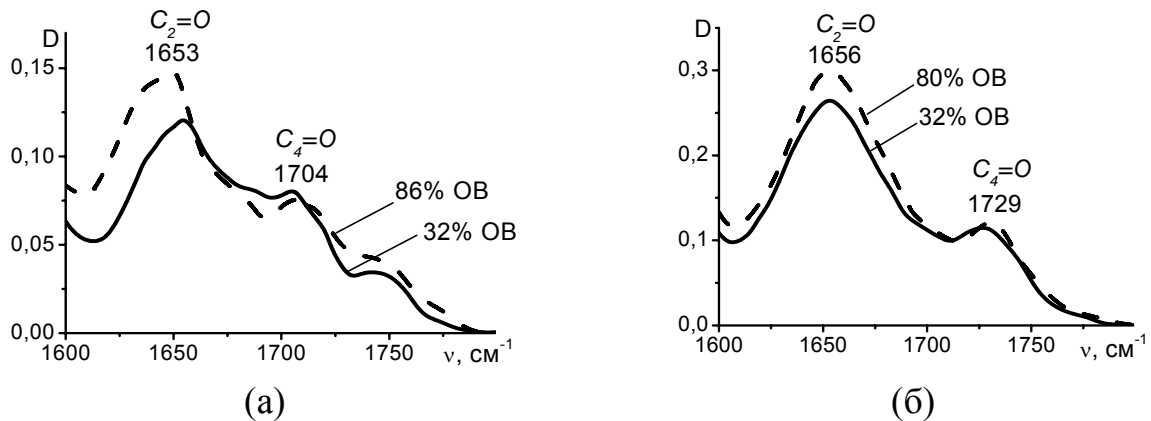


Рисунок 2 ІЧ-спектри поглинання плівок FMN, вирощених з розчину з рН = 6,9 ( $\pm 0,05$ ) (а) і розчину з рН = 6,2 ( $\pm 0,05$ ) (б)

Для пояснення високочастотних зміщень смуг поглинання карбонільних коливань  $C_4=O$  ( $\Delta\nu_1 = 25 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ )) і  $C_2=O$  ( $\Delta\nu_2 \approx 3-4 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ )), що проявляються в умовах зволжених плівок, вирощених зі слабких розчинів, було розглянуто динамічну (резонансну) взаємодію дипольних моментів переходів цих груп атомів. Відповідність розрахункових зсувів частот карбонільних коливань експериментальним значенням ( $\Delta\nu_1 = 25 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ )) спостерігалася для  $n$ -молекулярної структури самоасоціату FMN ( $n \geq 3$ ).

Як показали наші дослідження сорбції води на плівках, які вирощені зі слабких розчинів FMN (рН = 6,2), 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 слабких розчинів.

Далі було досліджено ІЧ-спектроскопічний прояв протонування ізоалоксазинового кільця FMN. На рис. 3 представлено ІЧ-спектри в області поглинання  $1450-1600 \text{ cm}^{-1}$  сухих (0% ВВ) плівок FMN, вирощених з нейтрального (рН = 7,0) і слабкого (рН = 6,0) розчинів.

Шляхом розкладання спектра за стандартною методикою було виділено найсильнішу смугу при  $\nu_1 = 1541-1554 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ ), низькочастотну компоненту з максимумом при  $\nu_2 = 1501-1517 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ ) і високочастотну смугу з максимумом при  $\nu_3 = 1575-1583 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ ). Можна відмітити (рис. 3), що частоти смуг поглинання  $\nu_1$  і  $\nu_2$  є чутливими «в чистому вигляді» до протонування по атомах азоту  $N_1$  і  $N_5$ . У смугу  $\nu_3$  дають внесок обидва атоми азоту  $N_1$  і  $N_5$ .

З результатів випливає, що наявність протона  $H^+$  у слабкому середовищі викликає значне збільшення частот коливань  $\nu_1$  та  $\nu_2$  і в меншій мірі – для смуги  $\nu_3$ . Виявлене високочастотне зміщення смуг може бути пояснене

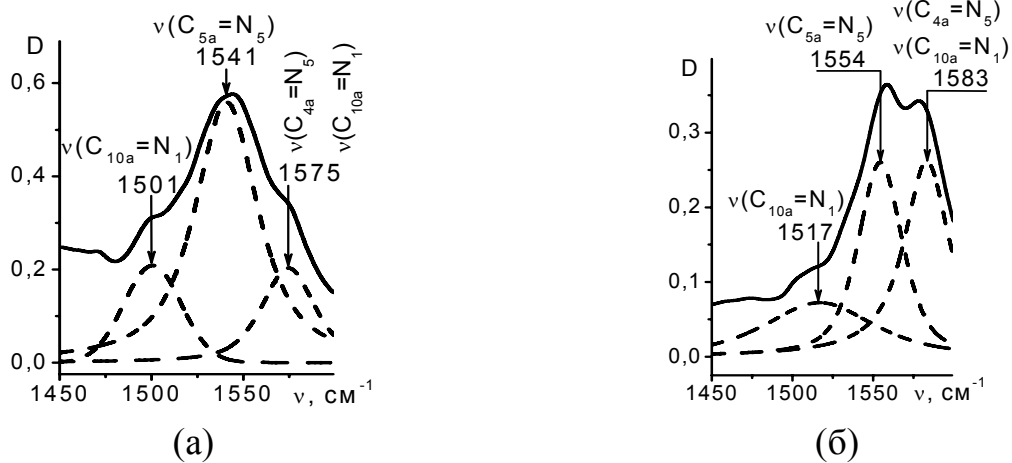


Рисунок 3 ІЧ-спектри поглинання внутрішньокільцевих С–С і С–N коливань ізоалоксазинового кільця FMN для сухих плівок (0% ОБ), вирощених з розчину з рН = 7,0 ( $\pm 0,05$ ) (а) і розчину з рН = 6,0 ( $\pm 0,05$ ) (б). Експериментально отриманий спектр (—) та його спектр, який отримано методом розкладання (---)

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  $N_5$ .

Квантово-хімічні розрахунки показали, що на атомах азоту  $N_1$  і  $N_5$  знаходяться значні негативні заряди  $-0,612$  і  $-0,545$ , відповідно. Крім того протонування атомів  $N_1$  і  $N_5$  супроводжується перерозподілом електронної густини (зарядів): (i) по атомах  $C_{5a}$ ,  $C_6$ ,  $C_8$  і  $C_9$  спільно з атомом  $N_5$ , що визначають частоту смуги  $\nu_1$ ; (ii) по атомах  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_9$ ,  $C_{9a}$  і  $C_{10a}$  і  $N_1$ , що визначають частоту смуги  $\nu_2$ ; (iii) по атомах  $C_{4a}$ ,  $N_5$ ,  $C_4$ ,  $C_{10a}$  і  $N_1$ , що визначають частоту смуги  $\nu_3$ .

Отримані дані про порядки зв'язків також корелюють з частотними зрушеннями смуг поглинання  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  і  $\nu_3$ , оскільки найбільші зміни порядків зв'язків спостерігаються переважно для тих пар атомів, у які входять атоми азоту  $N_1$  і  $N_5$ . Таким чином, можна зробити висновок, що зв'язування позитивно зарядженого атома водню (протону) буде йти по цих атомах.

У четвертому розділі «Міжплощинні взаємодії при формуванні гетерокомплексів FMN-ТРН, ТРН-ЕВ, ТРН-PRF та ЕВ-САФ» розглянуто результати ІЧ- і КР-спектроскопічних досліджень ароматичних БАР, які у водних розчинах формують гетероасоціати без утворення міжмолекулярних Н-зв'язків, і виконано їх детальний аналіз за допомогою комп'ютерного моделювання.

Було проведено ІЧ-спектроскопічне дослідження нейтральних водних ( $D_2O$ ) розчинів FMN, ТРН та їх комплексу в області карбонільних коливань ( $1600-1750\text{ cm}^{-1}$ ) (рис. 4).

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 значно зменшилася (інфрачервоний гіпохромізм). Можна також відзначити, що

високочастотні смуги  $C_4=O$  (FMN) і  $C_2=O$  (ТРН) свого положення у комплексі практично не змінили.

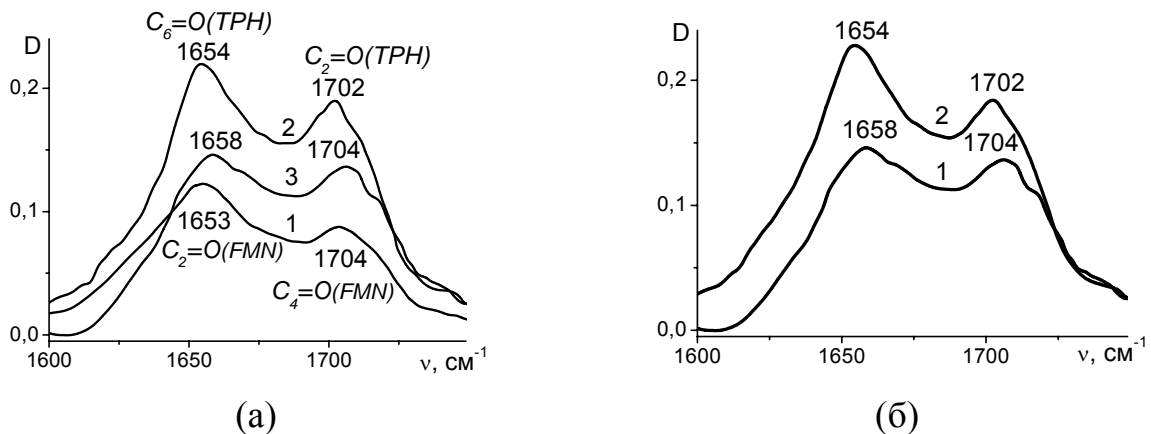


Рисунок 4 (а) ІЧ-спектри поглинання розчинів FMN (1), ТРН (2) і гетерокомплексу FMN-ТРН (3); (б) ІЧ-спектр поглинання розчину гетерокомплексу FMN-ТРН (1) і сумарний спектр FMN+ТРН (2). Для всіх розчинів рН = 6,9÷7,0 ( $\pm 0,05$ )

Очевидно, спостережувані нами 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 ( $n \geq 3$ ).

Далі було досліджено гетероасоціацію теофіліну та бромистого етидію. На рис. 5 а наведено ІЧ-спектри поглинання нейтральних водних ( $D_2O$ ) розчинів ТРН, ЕВ та їх комплексу, а також сумарний ІЧ-спектр ТРН+ЕВ. На рис. 5 б наведено КР-спектри ЕВ і суміші ТРН-ЕВ.

Зі спектрів поглинання можна бачити невеликий низькочастотний зсув ( $\Delta\nu = 4 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ )) карбонільних атомних груп ТРН  $C_2=O$  і  $C_6=O$  (рис. 5 а, спектр 3). Зі спектрів КР видно, що смуги ЕВ при  $\nu = 1628$  і  $1644 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ) зазнали в суміші високочастотні зсуви до  $1639$  і  $1652 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ ), 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 про те, що 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».

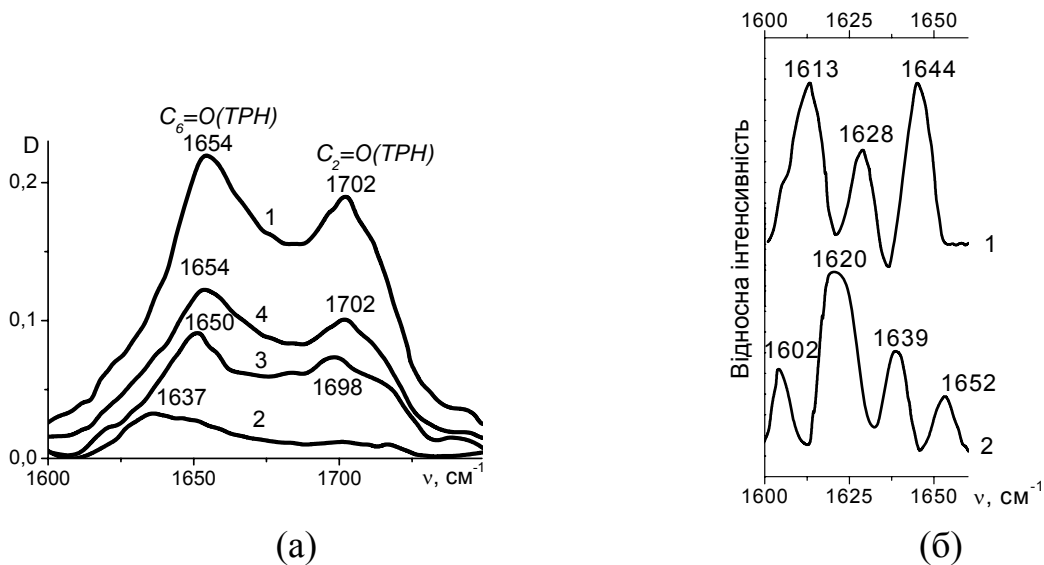


Рисунок 5 (а) ІЧ-спектри поглинання розчинів теофіліну (1), бромистого етидію (2), гетерокомплексу ТРН-ЕВ (3) і сумарний спектр ТРН+ЕВ (4); (б) спектри КР розчинів бромистого етидію (1) і гетерокомплексу ТРН-ЕВ (2). Для всіх розчинів рН=6,9÷7,0 (±0,05)

Дослідження спектрів поглинання гетероасоціатів ТРН-PRF (рис. 6 а) і САФ-ЕВ (рис. 6 б) показали відсутність змін спектральних параметрів карбонільних коливань у сумішах. Це може бути ознакою того, що в цих умовах гетерокомплекси не сформувалися.

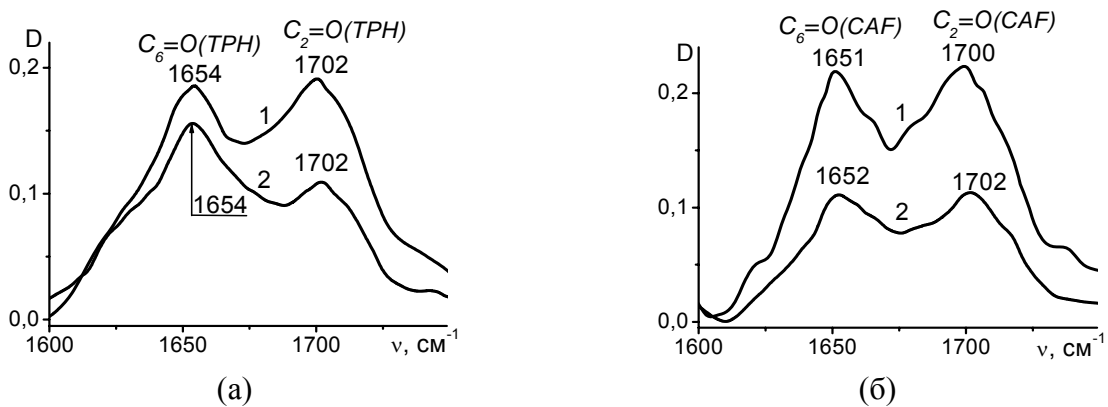


Рисунок 6 ІЧ-спектри поглинання розчинів гетерокомплексів: (а) ТРН-PRF (1) і сумарний спектр ТРН+PRF (2); (б) САФ-ЕВ (1) і сумарний спектр САФ+ЕВ (2). Для всіх розчинів рН = 6,9÷7,0 (±0,05)

Однак, згідно з літературними даними, ТРН і PRF, САФ і ЕВ утворюють гетероасоціати. Для з'ясування можливості утворення гетероасоціатів ТРН-PRF і САФ-ЕВ і механізмів стабілізації гетерокомплексів було проведено комп'ютерне моделювання цих систем у водному оточенні.

За допомогою комп'ютерного моделювання методом Монте Карло (МС) у водному кластері (800 молекул води) був досліджений вплив міжплощинних взаємодій, міжмолекулярних Н-зв'язків і молекул води на стабілізацію гетерокомплексів БАР. 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.

Згідно з даними моделювання методом МС міжмолекулярні Н-зв'язки не виявлено ні в одній зі структур гетерокомплексу FMN-ТРН. Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері з 800 молекулами води, а також миттєвих конфігурацій F-структур, дозволив встановити два водних містка навколо гетеродимера FMN-ТРН (рис. 7).

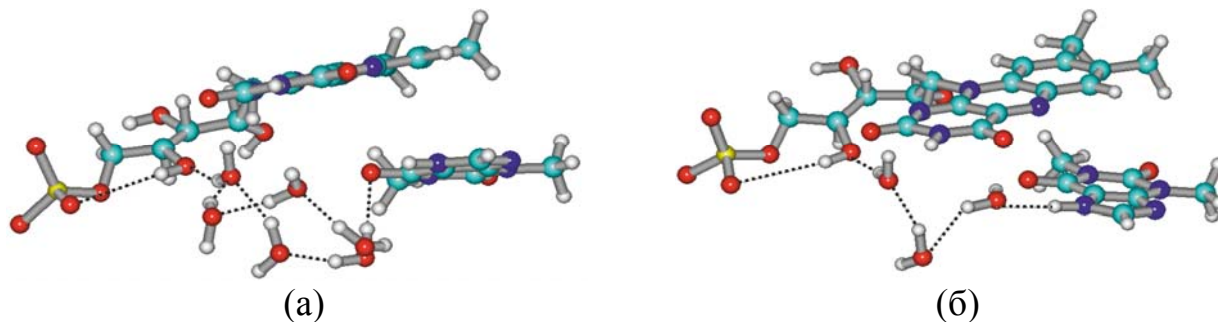


Рисунок 7 Миттєві конфігурації F-структури гетеродимеру FMN-ТРН; спостерігаються два водних містка між (а) РО групою FMN і C9=O12 групою ТРН; (б) C24=O25 групою «хвоста» FMN і N1H21 групою ТРН. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Однак утворення водних містків між молекулами в гетероасоціаті не підтверджується даними ІЧ-спектроскопії, оскільки в ІЧ-спектрах не зафіксовано низькочастотних зсувів смуг поглинання донорно-акцепторних груп, які зазвичай пов'язують з гідратацією відповідних гідратно-активних центрів. А також, згідно з експериментальними даними, більш вірогідною формою гетерокомплексу FMN-ТРН є *n*-молекулярний агрегат FMN-ТРН по типу  $\pi$ -стекингу. Тому необхідно в подальшому виконати комп'ютерне моделювання *n*-молекулярного агрегату FMN-ТРН методом молекулярної динаміки.

Аналіз миттєвих конфігурацій у водному кластері (800 молекул води) та у F-структурах дозволив визначити існування водних містків, що сформувалися між донорно-акцепторними групами лігандів у гетерокомплексах ТРН-ЕВ, ТРН-PRF і САФ-ЕВ. Для гетерокомплексу ТРН-ЕВ встановлено три водних містка між групами (ТРН)N4 $\cdots$ H<sub>2</sub>N24(ЕВ) (рис. 8 а), (ТРН)N4 $\cdots$ H<sub>2</sub>N23(ЕВ) та (ТРН)C9=O12 $\cdots$ H<sub>2</sub>N23(ЕВ). Для гетерокомплексу ТРН-PRF визначено два водних містка між групами (PRF)N15H<sub>2</sub> $\cdots$ N1–H21(ТРН) (рис. 8 б) та (PRF)N16H<sub>2</sub> $\cdots$ C7=O10(ТРН). У гетерокомплексі САФ-ЕВ сформувалися три водних містка між (CAF)N9 $\cdots$ H<sub>2</sub>N23(ЕВ) (рис. 8 в), (CAF)C2=O11 $\cdots$ H<sub>2</sub>N24(ЕВ) та (CAF)C6=O13 $\cdots$ H<sub>2</sub>N23(ЕВ).

На підставі результатів моделювання методом МС можна стверджувати, що у гетерокомплексах ТРН-ЕВ, ТРН-PRF і САФ-ЕВ міжмолекулярні Н-зв'язки не утворюються. Докладний опис взаємодії цих гетероасоціатів з водним оточенням, який отримано за результатами моделювання методом МС, дозволяє пояснити додаткову стабілізацію цих гетерокомплексів шляхом

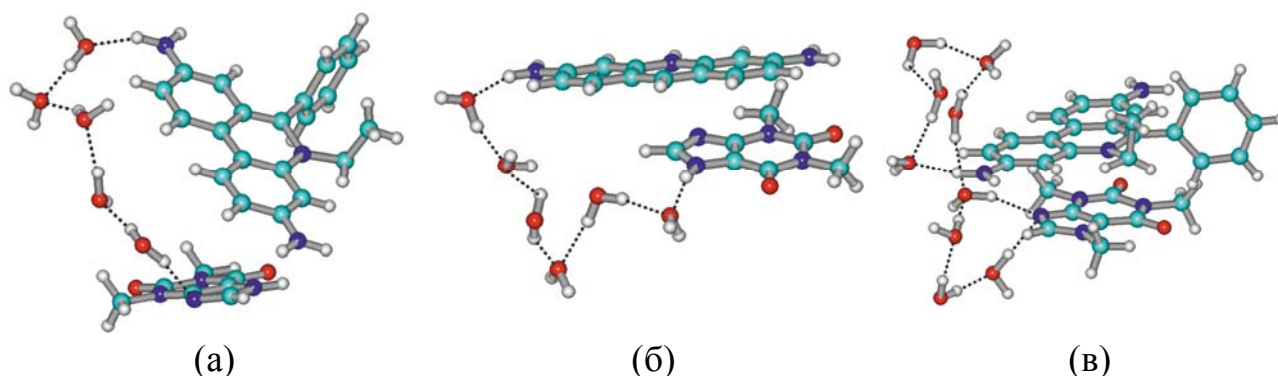


Рисунок 8 Миттєві конфігурації F-структури у водному кластері гетерокомплексів ТРН-ЕВ (а), ТРН-РРФ (б) і САФ-ЕВ (в). Н-зв'язки показано пунктирними лініями

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.

У розділі 5 «Прояв водневого зв'язку в коливальних спектрах гетероасоціатів та при зв'язуванні БАР з ДНК» представлені експериментальні результати ІЧ- і КР-спектроскопії та комп'ютерного моделювання гетероасоціатів FMN-ЕВ і FMN-РРФ які у водних розчинах формують гетероасоціати з утворенням міжмолекулярних Н-зв'язків, і комплексоутворення бромистого етидія з ДНК.

Для з'ясування існування міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-ЕВ було записано ІЧ-спектри водних ( $D_2O$ ) розчинів FMN, ЕВ і їх суміші в області поглинання карбонільних коливань (рис. 9 а) і КР-спектри розчинів ЕВ і гетерокомплексу в області  $NH_2$  деформаційних коливань (рис. 9 б).

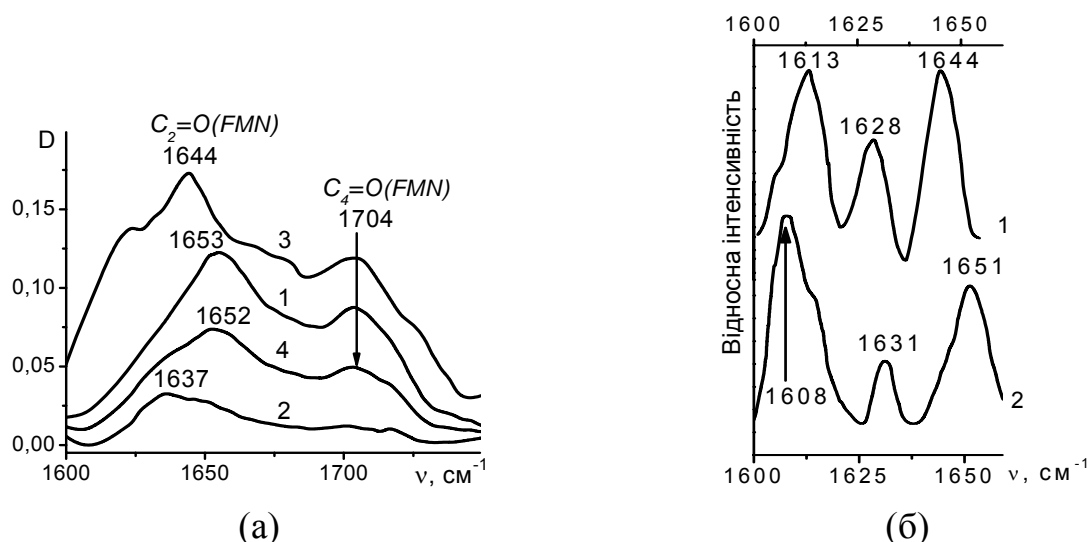


Рисунок 9 (а) ІЧ-спектри поглинання розчинів FMN (1), ЕВ (2), гетерокомплексу FMN-ЕВ (3) і спектр суми однокомпонентних спектрів FMN+ЕВ (4); (б) КР-спектри розчинів ЕВ (1), і суміші FMN-ЕВ (2). Для всіх розчинів рН = 6,9÷7,0 ( $\pm 0,05$ )

Видно, що інтенсивність спектру суміші істотно зростає, а частота коливання групи  $C_2=O$  в комплексі зазнає низькочастотний зсув на  $\Delta\nu = 9 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ см}^{-1}$ ). У той же час смуга поглинання групи  $C_4=O$  з максимумом при  $1704 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ см}^{-1}$ ) не зазнає будь-яких частотних зсувів у порівнянні зі спектром FMN без EB. У спектрі КР смуга EB при  $1644 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) змістилася у високочастотну область на  $\Delta\nu = 7 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) при утворенні комплексу.

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 стехіометрії.

Аналіз ІЧ- і КР-спектрів FMN, PRF і їх суміші ми проводили, як і у випадку системи FMN-EB. На рис. 10 а приведено ІЧ-спектри суміші FMN-PRF і спектр суми FMN і PRF однокомпонентних спектрів.

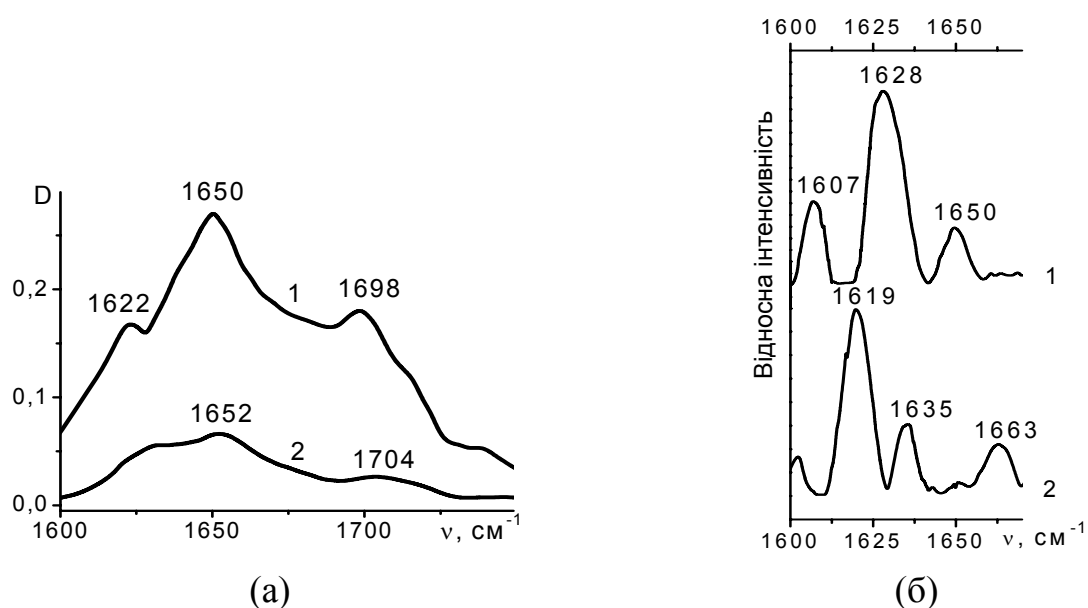


Рисунок 10 (а) ІЧ-спектр поглинання розчину суміші FMN-PRF (1) і спектр суми однокомпонентних спектрів FMN і PRF (2); (б) КР-спектри розчинів PRF (1) і суміші FMN-PRF (2). Для всіх розчинів  $\text{pH} = 6,9 \div 7,0$  ( $\pm 0,05$ )

Видно, що інтенсивність смуг поглинання спектру суміші значно збільшується, а максимум смуги поглинання при  $1650 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ см}^{-1}$ ) (коливання  $C_2=O$ -групи FMN) зміщується в межах помилки ( $\Delta\nu = 2 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ см}^{-1}$ )). Разом з цим максимум смуги поглинання  $C_4=O$ -групи FMN зсувається в низькочастотну область на  $\Delta\nu = 6 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 1 \text{ см}^{-1}$ ) при формуванні комплексу. В той же час у спектрах комбінаційного розсіювання (рис. 10 б) смуги з максимумами  $\nu = 1628$  і  $1650 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ), пов'язані з деформаційними коливаннями  $NH_2$ -груп профлавіну, зазнали відповідно високочастотний зсув до  $\nu = 1635$  і  $1663 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ), тобто на  $\Delta\nu = 7$  і  $13 \text{ см}^{-1}$ .

Такий частотний зсув характеристичних смуг і зростання інтенсивності карбонільних коливань у спектрі поглинання свідчить про формування міжмолекулярного Н-зв'язку типу  $C_4=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H$  (PRF) і більш слабкого Н-зв'язку  $C_2=O(FMN) \cdots H - \overset{|}{N} - H$  (PRF) у гетерокомплексі FMN-PRF.

Для інтерпретації експериментальних результатів коливальної спектроскопії і пояснення механізмів стабілізації гетероасоціатів FMN-EB і FMN-PRF, а також побудови їх молекулярних моделей, було виконано комп'ютерне моделювання методом Монте Карло систем, що містять гетерокомплекси FMN-EB, FMN-PRF і водні кластери.

Згідно з результатами моделювання методом МС у гетеродимері FMN-EB утворюються три міжмолекулярні Н-зв'язки між (FMN)C2=O3 і N24H<sub>2</sub>(EB), (FMN)C5=O6 і C16H(EB) та (FMN)C20=O21 і C20H(EB) (рис. 11 а). Відсутність низькочастотних зсувів смуги поглинання карбонільного коливання C<sub>4</sub>=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...H-C, які не завжди призводять до низькочастотних зсувів карбонільних коливань.

За допомогою МС оптимізації структури FMN-PRF у водному кластері отримано, що у гетеродимері FMN-PRF утворюється один міжмолекулярний Н-зв'язок між C<sub>2</sub>=O групою FMN і NH<sub>2</sub> групою PRF (рис. 11 б).

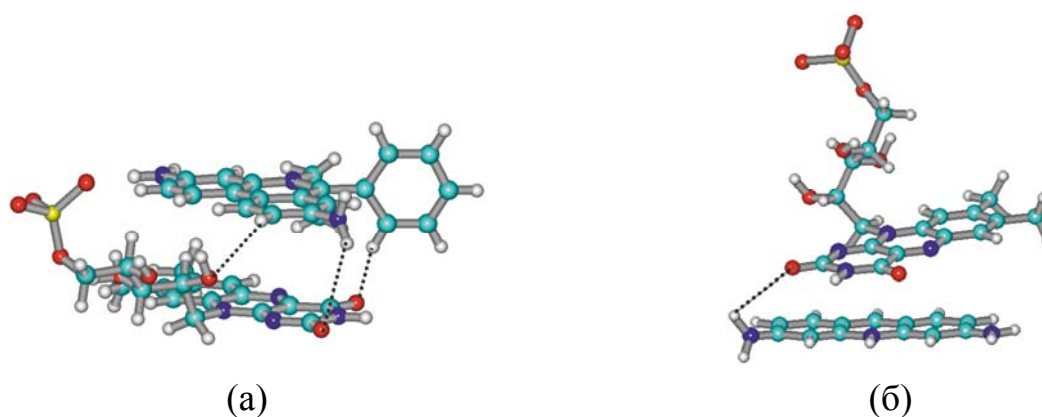


Рисунок 11 Миттєві конфігурації у водному кластері: (а) конфігурація гетеродимеру FMN-EB,  $E_{\text{FMN-EB}} = -91,59$  ккал/моль; (б) конфігурація гетеродимеру FMN-PRF,  $E_{\text{FMN-PRF}} = -74,94$  ккал/моль. Н-зв'язки показано пунктирними лініями

Також моделювання у водному кластері (800 молекул води) і F-структур дозволило встановити утворення водних містків навколо гетерокомплексів FMN-EB і FMN-PRF. Така «упорядкована» водна структура навколо обох гетероасоціатів може додатково стабілізувати гетеродимери, обмежуючи рухливість молекул у стекінг-асоціаті, а також рухливість бічного ланцюжка FMN.

На основі даних коливальної спектроскопії можна оцінити внесок енергії Н-зв'язків у стабілізацію стопкових асоціатів. Використовуючи емпіричну залежність ентальпії утворення Н-зв'язку відносно енергії взаємодії вода-вода ( $\Delta H$ ) від частотного зсуву карбонільного коливання, знаходимо, що енергія міжмолекулярного Н-зв'язку в гетерокомплексі FMN-EB буде  $|\Delta H| = 8,4$  кДж/моль, що становить приблизно 25% від експериментально вимірної загальної ентальпії формування гетероасоціату. Провівши такі ж розрахунки для гетероасоціату FMN-PRF, отримуємо ентальпію Н-зв'язку типу C<sub>4</sub>=O(FMN)...H-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. Звідси випливає, що міжмолекулярні водневі зв'язки в гетерокомплексах FMN-EB і FMN-PRF дають  $\sim 25-30\%$ -вий 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 етидія показано роль Н-зв'язку в стабілізації комплексу EB-ДНК.

Було проведено порівняльне дослідження спектрів КР для полікристалічного зразку EB та EB у буферному розчині з концентраціями  $C_{EB} \approx 10^{-2}$  М і  $C_{EB} \approx 10^{-4} \div 10^{-5}$  М. Нами виявлено, що при великій концентрації бромистого етидія ( $\approx 10^{-2}$  М, коли в розчині переважає концентрація димерної форми EB) спостерігається смуга коливань С–С-, С–N-груп фенантридинового хромофору з максимумом при  $\nu = 1372$   $cm^{-1}$ . Для розчинів ліганду з меншими концентраціями ( $\approx 10^{-4} \div 10^{-5}$  М, коли переважає концентрація мономерної форми EB) цей максимум зміщується у височастотну область до  $\nu = 1377$   $cm^{-1}$ . Низькочастотний зсув смуги до  $\nu = 1372$   $cm^{-1}$  слід пов'язати зі взаємодією ароматичних кілець ліганду в димері.

На рис. 12 наведено спектри КР для вільного EB та його сумішей з ДНК у двох спектральних областях 1340-1470  $cm^{-1}$  і 1600-1660  $cm^{-1}$ .

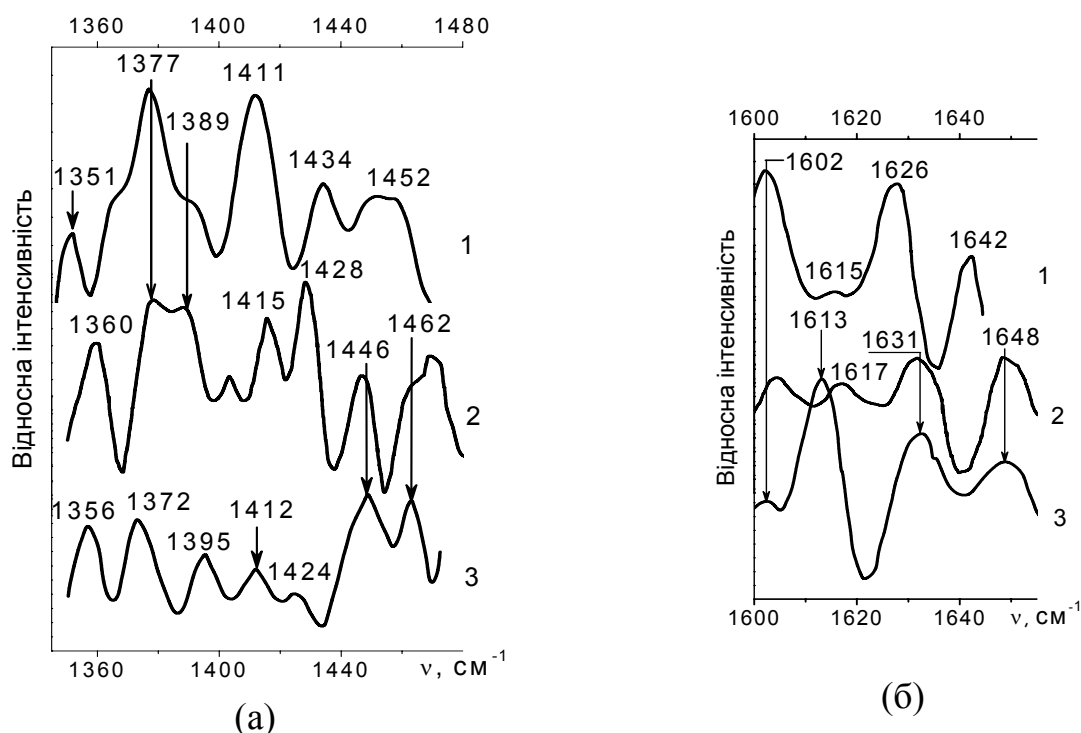


Рисунок 12 Спектри КР в інтервалах частот 1340-1470  $cm^{-1}$  (а) і 1600-1660  $cm^{-1}$  (б) для розчинів бромистого етидію (1) і комплексів EB-ДНК при  $P/D = 3$  (2) і  $P/D = 20$  (3);  $C_{EB} = 1,1 \times 10^{-4}$  М,  $pH = 6,86$

Як видно з рис.12 а, для комплексу EB-ДНК при  $P/D = 20$  коливання фенантридинового кільця з максимумом при  $\nu = 1377$   $cm^{-1}$  зсувається на  $5$   $cm^{-1}$  ( $\pm 2$   $cm^{-1}$ ) у низькочастотну область порівняно з вільним лігандом. Подібний низькочастотний зсув спостерігався також для димерів EB, що свідчить про

взаємодію ароматичних кілець ЕВ з азотистими основами ДНК. Тому такий зсув смуги фенантридинового кільця може бути критерієм інтеркаляції хромофору ЕВ між парами основ ДНК. Також видно, що в комплексі при  $P/D = 3$  смуга при  $\nu = 1377 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) не зазнає низькочастотного зсуву 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.

Утворення двох типів комплексів ЕВ-ДНК ( $P/D = 3$  і  $P/D = 20$ ) супроводжується високочастотним зсувом на  $\Delta\nu = 5 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) смуги деформаційних коливань  $\text{NH}_2$ -груп фенантридинового хромофору ліганду (рис. 12 б). Спостережувані високочастотні зсуви цих смуг свідчать про утворення водневих зв'язків між  $\text{NH}_2$ -групами ліганду і ДНК як у випадку інтеркальованого хромофору ЕВ, так і у випадку зовнішнього зв'язування на поверхні молекули ДНК. Ці водневі зв'язки поряд з міжплощинними взаємодіями ароматичних кілець хромофору ЕВ та азотистих основ (цитозину і гуаніну) додатково стабілізують комплекс ЕВ-ДНК, що призводить до збільшення його термостабільності.

Для того щоб встановити, в якому структурному стані знаходиться ДНК у комплексі з ЕВ при низьких і високих значеннях  $P/D$ , було отримано спектри КР комплексів у області маркерних смуг ДНК. На рис. 13 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 у В- та А-формах.

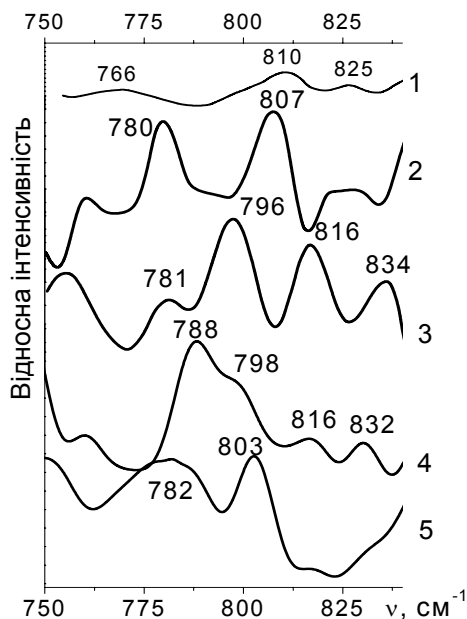


Рисунок 13 Спектри КР бромистого етидію (1), комплексів ЕВ-ДНК при  $P/D = 3$  (2) і  $P/D = 20$  (3) і спектри плівок ДНК при різних відносних вологостях: 96% ВВ – В-ДНК (4) і 76% ВВ – А-ДНК (5);  $C_{\text{ЕВ}} = 1,1 \times 10^{-4} \text{ М}$ ,  $\text{pH} = 6,86$

Показано, що утворення комплексу ЕВ-ДНК при  $P/D = 3$  супроводжується появою смуг при  $\nu = 780$  і  $807 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ), які є характерними маркерами А-форми ДНК. Тому можна зробити висновок про те, що щільне заповнення матриці ДНК бромистим етидієм переводить її з В-форми до А-подібної конформації. При  $P/D = 20$  у спектрі КР спостерігаються смуги при  $\nu = 834$ ,  $796$  і  $781 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ), які характерні для В-форми ДНК.

Отже, при великих значеннях  $P/D (\geq 20)$  ДНК в комплексах з ЕВ знаходиться в 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

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 ( $\text{NH}_2$ ) та акцепторними ( $\text{C}=\text{O}$ ) 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 слабкокислих ( $\text{pH} \sim 6,0$ ) розчинів FMN, високочастотні зсуви смуг поглинання внутрішньокільцевих коливань атомів ізоалоксазинового кільця пов'язані з протонуванням атомів азоту  $\text{N}_1$  і  $\text{N}_5$ , 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-ТРН, ТРН-PRF і САФ-EB водневі зв'язки не утворюються, а стабілізація цих комплексів визначається міжплощинними взаємодіями. Виявлені високочастотні зсуви карбонільних коливань у гетерокомплексі FMN-ТРН 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-ТРН, ТРН-EB, ТРН-PRF і САФ-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 TRN 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  $\text{NH}_2$ -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.

#### Перелік опублікованих праць 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 бромидом 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 бромиды // Радиопизика и Электроника : тезисы докл. VI Харьковская конференция молодых ученых, 13–14 декаб. 2006 г. Харьков, 2006. С. 33–34.
9. **Близнюк Ю. Н.**, Большух 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 флавинов мононуклеотида, 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. 11<sup>th</sup> 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 научно-техническая конференция, 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. 5<sup>th</sup> International Symposium, 1–5 July 2013. Kharkiv, 2013. P. 107.
15. **Blyzniuk Iu. N.** pH-dependent self-association of flavin-monomonucleotide. [Электронный ресурс] // Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics : abstr. 13<sup>th</sup> 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 ізоалоксазинових кілець флавін-мононуклеотида у вологих плівках, вирощених з нейтральних і слабкокислих розчинів // УБФТ-2015 : тези доп. VI З'їзд Українського біофізичного товариства, 28–30 трав. 2015 р. Луцьк-Світязь, 2015. С. 40.

## 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. – 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 і молекул води у стабілізації самоасоціатів і гетероасоціатів ряду біологічно активних речовин і при їх зв'язуванні з ДНК.

Методами коливальної (ІЧ і КР) спектроскопії та комп'ютерного моделювання було досліджено самоасоціацію та гетероасоціацію біологічно активних речовин (БАР) і їх комплексоутворення з ДНК. Аналіз коливальних спектрів і комп'ютерні розрахунки дозволили встановити структурні особливості та молекулярні механізми само- і гетероасоціатів, що утворюються. Було побудовано моделі асоціатів, встановлено вклади різних видів міжмолекулярних взаємодій та молекул води в їх стабілізацію, обчислено енергетичні характеристики комплексів, що утворюються.

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

## ABSTRACT

Blyzniuk Yu. 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 03.00.02 – biophysics. – 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 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 films of flavin-mononucleotide (FMN) self-associate grown from neutral and weakly acidic solutions were obtained and analyzed. For the first time we found a high-frequency shift of the absorption bands of the  $C_4=O$  and  $C_2=O$  atom groups for the FMN film obtained from a weakly acid solution ( $pH \sim 6.0$ ). A model of the  $n$ -molecular self-association of the flavin-mononucleotide was built using calculations of the resonance interaction of the carbonyl  $C_4=O$  and  $C_2=O$  vibrations in the dipole-dipole approximation. The stability of such FMN self-associates is determined by interplanar interactions between overlapping

isoalloxazine chromophore rings. 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.

The FMN hydration study showed that the additional stabilization of the neutral and protonated forms of the flavin-mononucleotide is achieved by forming water "bridges" between donor-acceptor groups of isoalloxazine ring atoms. We found that in the neutral form of FMN water "bridges" are formed throughout the water sorption interval ( $0 \leq N \leq 12$ ), whereas in the formed  $n$ -molecular associate of FMN in weakly acid environment, such "bridges" are formed at high water activity ( $6 \leq N \leq 8$ ).

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. For the first time we obtained direct evidence of the hydrogen bonds (H-bonds) formation in the hetero-complexes FMN-EB, FMN-PRF and TPH-EB based on the analysis of IR and Raman spectra. In neutral solutions in the stack structures of these hetero-associates, intermolecular H-bonds additionally stabilize these complexes, in conjunction with interplanar interactions between the chromophores of molecules in the complexes and their interaction with the water environment. For hetero-associates FMN-TPH, TPH-PRF and CAF-EB, the absence of intermolecular H-bonds in neutral solutions was shown. The observed high-frequency shifts of carbonyl vibrations in the FMN-TPH hetero-complex were explained by the resonant interactions of the carbonyl groups, which made possible to build the  $n$ -molecular structure of the hetero-associate. The enthalpy of H-bond was estimated for the hetero-associates FMN-EB and FMN-PRF and it was concluded that H-bonds contribute up to 30% to the total energy of stabilization of the complexes.

A detailed analysis of the energy and structural characteristics of systems containing hetero-associates of aromatic biologically active compounds and water clusters was performed by the MC modeling method. It was confirmed that intermolecular H-bonds are formed between the functional donor-acceptor groups (C=O and  $NH_2$ ) in FMN-EB, FMN-PRF hetero-complexes, additionally stabilizing the structures of hetero-dimers. The fact of additional stabilization of hetero-associates FMN-TPH, TPH-EB, TPH-PRF and CAF-EB was established consisting in the formation of water bridges between the donor-acceptor atomic groups of the ligands. The formation of an "ordered" water structure around hetero-associates can additionally stabilize hetero-dimers, limiting the mobility of molecules in stacking associates, as well as the mobility of their side chains.

Using the Raman spectroscopy a study of the EB-DNA complex was carried out in order to determine the effect of hydrogen bonds on the molecular mechanisms of binding of ethidium bromide to DNA during the complexes formation by the type of intercalation and external binding. It was shown 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<sub>4</sub>' and O<sub>5</sub>' deoxyribose. In this case the DNA stay 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:** IR spectroscopy, Raman spectroscopy, hydrogen bond, self-association, hetero-association, biologically active compound, interplanar interactions, stability of self- and hetero-associates, computer modeling.

## АННОТАЦИЯ

Близнюк Ю. Н. **Механизмы ассоциации биологически активных веществ и их комплексообразование с ДНК.** – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Министерства образования и науки Украины, Харьков, 2017.

Диссертационная работа посвящена решению одной из актуальных проблем современной молекулярной биофизики – выяснению роли водородных связей и молекул воды в стабилизации самоассоциатов и гетероассоциатов ряда биологически активных веществ и при их связывании с ДНК.

Методами колебательной (ИК и КР) спектроскопии и компьютерного моделирования были исследованы самоассоциация и гетероассоциация биологически активных веществ (БАВ) и их комплексообразование с ДНК. Анализ колебательных спектров и компьютерные расчеты позволили установить структурные особенности и молекулярные механизмы образующихся само- и гетероассоциатов. Были построены модели ассоциатов, установлены вклады различных видов межмолекулярных взаимодействий и молекул воды в их стабилизацию и вычислены энергетические характеристики образующихся комплексов.

**Ключевые слова:** ИК-спектроскопия, КР-спектроскопия, водородная связь, самоассоциация, гетероассоциация, биологически активное вещество, межплоскостные взаимодействия, стабильность само- и гетероассоциатов, компьютерное моделирование.