

УДК 577.322

**САМОАССОЦІАЦІЯ І ГІДРАТАЦІЯ ФЛАВІН-МОНОНУКЛЕОТИДА  
В РАСТВОРАХ І ПЛІНКАХ****Ю. Н. Близнюк, Д. М. Глибицкий, М. А. Семёнов, А. В. Шестопалова,  
В. Я. Малеев***Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12,  
Харьков, 61085, Украина*

e-mail: julia-blyzniuk@yandex.ru

Поступила в редакцию 4 июня 2014 года

Принята 18 августа 2014 года

В работе методами ИК спектроскопии и пьезограмметрии проведено сравнительное исследование самоассоциации и гидратации флавин-мононуклеотида (FMN) в нейтральных и слабокислых растворах и пленках, выращенных из растворов с разным значением pH (7 и 6,2). ИК спектры получены в области поглощения внутрикольцевых и карбонильных колебаний, чувствительных к образованию стэкинг-ассоциатов. Обнаружено высокочастотное смещение полос поглощения карбонильных групп  $C_2=O$  и  $C_4=O$  изоаллоксазиновых колец FMN в пленках, выращенных из слабокислых растворов (pH=6,2), которое объясняется динамическим взаимодействием моментов перехода карбонильных групп. На основании теоретических расчетов в диполь-дипольном приближении построена  $n$ -мерная модель самоассоциатов FMN. Показано, что стэкинг-ассоциаты FMN в пленках стабилизируются межплоскостными взаимодействиями и водным окружением.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** флавин-мононуклеотид, самоассоциация, гидратация, карбонильные группы, структурная модель.

**САМОАССОЦІАЦІЯ ТА ГІДРАТАЦІЯ ФЛАВІН-МОНОНУКЛЕОТИДА В РОЗЧИНАХ І ПЛІВКАХ****Ю. М. Близнюк, Д. М. Глибицький, М. О. Семенов, Г. В. Шестопалова, В. Я. Малеев***Институт радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085,  
Україна*

У роботі методами ІЧ спектроскопії та п'єзограметрії проведено порівняльне дослідження самоасоціації і гідратації флавін-мононуклеотида (FMN) в нейтральних і слабокислих розчинах і плівках, вирощених із розчинів з різним значенням pH (7 та 6,2). ІЧ спектри отримані в області поглинання внутрикільцевих та карбонільних коливань, чутливих до утворення стекінг-асоціатів. Виявлено високочастотне зміщення смуг поглинання карбонільних груп  $C_2=O$  та  $C_4=O$  ізоаллоксазинових кілець FMN в плівках, вирощених зі слабокислих розчинів (pH=6,2), яке пояснюється динамічною взаємодією моментів переходу карбонільних груп. На підставі теоретичних розрахунків у диполь-дипольному наближенні побудовано  $n$ -мерну модель самоасоціатів FMN. Показано, що стекінг-асоціати FMN в плівках стабілізуються міжплосинними взаємодіями та водним оточенням.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** флавін-мононуклеотид, самоасоціація, гідратація, карбонільні групи, структурна модель.

**SELF-ASSOCIATION AND HYDRATION OF FLAVIN-MONONUCLEOTIDE IN SOLUTIONS AND FILMS****Iu. N. Blyzniuk, D. M. Glibitsky, M. A. Semenov, A. V. Shestopalova, V. Ya. Maleev***A. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine, 12 Akad. Proskury Str., Kharkiv, 61085,  
Ukraine*

In this paper a comparative study of self-association and hydration of flavin-monomonucleotide (FMN) in neutral and weakly acidic solutions, and in films grown from solutions with different pH (7 and 6,2), was carried out using IR spectroscopy and piezogravimetry methods. The IR spectra were obtained in the absorption region of intraring and carbonyl vibrations, which are sensitive to the formation of stacking associates. There was detected a high frequency shift of the absorption bands of the  $C_2=O$  and  $C_4=O$  carbonyl groups of FMN isoalloxazine rings in films grown from weakly acidic solutions (pH=6,2); this shift is attributed to the dynamic interaction of transition moments of the carbonyl groups. On the basis of theoretical calculations in the dipole-dipole approximation a  $n$ -mer model of FMN self-associates was

built. It is shown that the stacking-associates of FMN in films are stabilized by interplanar interactions and the aqueous environment.

**KEY WORDS:** flavin-mononucleotide, self-association, hydration, carbonyl groups, structural model.

Флавин-моноклеотид (FMN) – аналог витамина В<sub>2</sub> (рибофлавина), который выполняет каталитическую функцию в клетках в составе многих окислительно-восстановительных ферментов, таких как оксидоредуктазы, в частности, аэробные дегидрогеназы. Рибофлавин-моноклеотид входит в простетическую группу флавинопротеинов, участвует в регулировании окислительно-восстановительных процессов и в переносе водорода. Флавин-моноклеотид, в отличие от рибофлавина, хорошо растворим в воде, поэтому его часто используют в качестве модели витамина В<sub>2</sub> в биофизических исследованиях [1–4]. Изучение структурного состояния FMN в увлажненных пленках необходимо, поскольку именно такое конденсированное состояние максимально приближено к естественным условиям функционирования FMN в живых системах.

Исследование структуры FMN в водных растворах методом ЯМР-спектроскопии показало, что в нейтральных средах (pH = 7) его молекулы агрегируют с константой самоассоциации  $265 \text{ M}^{-1}$  [2, 3]. Это позволило определить термодинамические параметры самоассоциации (свободную энергию, энтальпию и энтропию) и рассчитать пространственную структуру димера FMN [3, 4], который образуется в результате стэкинг-взаимодействий между хромофорами FMN – изоаллоксазиновыми кольцами. В работе [3] на основе анализа ЯМР спектров предложена параллельная укладка изоаллоксазиновых колец в стопкообразных самоассоциатах FMN. Методом молекулярной динамики получено иное, антипараллельное расположение колец в стэкинг-димере FMN [4].

Образование вертикальных стэкинг-ассоциатов (стопок) из гетероциклов азотистых оснований ранее было обнаружено в водных растворах и пленках нуклеотидов, а также при связывании молекул воды в пленках полинуклеотидов [5–8]. Межплоскостные взаимодействия гетероциклов азотистых оснований сопровождаются в УФ спектре гипохромизмом полосы поглощения при  $\lambda = 260 \text{ nm}$  [9], а в инфракрасном спектре – гипохромизмом полос поглощения внутрикольцевых C=N колебаний и высокочастотными сдвигами полос поглощения колебаний карбонильных групп C=O [10, 11]. Формирование стопок молекул кофеина также сопровождается высокочастотным сдвигом полос поглощения колебаний карбонильных групп [12]. Эти спектральные эффекты, зафиксированные методом ИК-спектроскопии, – высокочастотный сдвиг и гипохромизм полос поглощений, возникающие в результате взаимодействий моментов переходов карбонильных и внутрикольцевых колебаний в стопках различных гетероциклов, – нашли объяснение в рамках использования диполь-дипольного приближения теории молекулярных экситонов [13, 14].

Исследования самоассоциации нуклеозидов, нуклеотидов и ароматических противоопухолевых антибиотиков, выполненные различными физическими методами (ЯМР, ИК-, УФ-спектроскопия и др.), показали, что стабильность их стопочных структур зависит от многих факторов, в том числе – от уровня гидратации [10, 11] и электростатических взаимодействий, изменяющихся при протонировании гетероциклов и фосфатных групп нуклеотидов [6, 10, 15–17, 18]. Поскольку в молекуле FMN имеется фосфатная группа и возможно протонирование по атомам азота N<sub>1</sub> и N<sub>5</sub> изоаллоксазинового кольца (рис. 1), то перечисленные выше факторы также могут оказать существенное влияние на формирование и стабильность стэкинг-ассоциатов FMN в нейтральных и слабокислых водных средах. Но, насколько нам известно, влияние протонирования изоаллоксазинового кольца и состояния фосфатной группы на самоассоциацию FMN ранее не исследовалось.

В данной работе, с помощью разработанной ранее экспериментальной методики ИК-спектроскопического исследования стопочных структур нуклеотидов в пленках и растворах [5, 6], проведено сравнительное изучение самоассоциации и гидратации FMN в пленках, выращенных из нейтральных и слабокислых растворов, рН которых влияет на заряды атомов хромофора (изоаллоксазинового кольца) и фосфатных групп. Нами получены и проанализированы ИК-спектры FMN в области поглощения колебаний карбонильных (C<sub>4</sub>=O, C<sub>2</sub>=O) и внутримолекулярных (C=C, C=N) групп атомов (рис. 1) в растворе D<sub>2</sub>O и в увлажненных пленках.

Обнаруженные нами высокочастотные сдвиги карбонильных колебаний в пленках, выращенных из слабокислых растворов FMN, объяснены взаимодействием моментов перехода групп C<sub>4</sub>=O и C<sub>2</sub>=O при образовании стэкинг-ассоциатов FMN.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали флавин-мононуклеотид (7,8-диметилизоаллоксазин • Na, рис. 1) фирмы «Fluka» без дополнительной очистки.

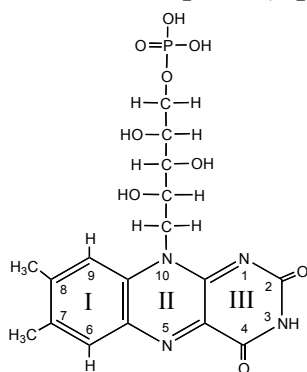


Рис. 1. Структурная формула флавин-мононуклеотида (FMN • Na).

Для получения ИК-спектров FMN готовили растворы с концентрацией  $C \approx 0,01$  М. Значения  $pH = 5,5 \div 6,4$  получали при добавлении паров раствора HCl, тогда как нейтральное значение ( $pH = 6,8 \div 7,1$ ) достигалось добавлением малого количества NaOH (для растворов FMN в D<sub>2</sub>O использовали DCl и NaOD, соответственно). pH растворов контролировали с помощью иономера И-115 (Antex, ООО, Россия) с точностью  $\pm 0,05$ . Для получения однородных по толщине пленок исходный раствор ( $V = 1$  мл) наносили на флюоритовое окошко и высушивали. Размещенный на строго горизонтальной поверхности раствор высыхал в течение 24–48 часов при  $+4^\circ$  С. Флюоритовое окошко с пленкой помещали в герметичную кювету.

Дейтерирование и увлажнение пленочных образцов до 86% относительной влажности (ОВ) производили с помощью насыщенных в D<sub>2</sub>O растворов набором солей, как описано в работах [7, 8, 10]. Равновесное состояние по влажности и дейтерирование достигались в течение 1–2 суток.

Запись ИК-спектров FMN проводилась с помощью автоматического двухлучевого спектрофотометра UR-20 (Германия) с призмой NaCl. Скорость сканирования составляла  $50 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$ . Для предохранения пленочного образца от разогрева использовался германиевый фильтр, помещенный в камеру глобара. Значения частоты  $\nu$  и оптической плотности  $D$  получали усреднением результатов двух-трех независимых экспериментов с несколькими измерениями в каждой точке. Достоверность определения частот проверялась по спектру эталонной пленки полистирола. Погрешность определения оптической плотности составляла не более 2%, а частот –  $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ . Обработка ИК-спектров проводилась с помощью стандартных компьютерных программ.

Для получения спектральных параметров полос поглощения карбонильных колебаний C<sub>2</sub>=O и C<sub>4</sub>=O проводили разложение спектра по стандартной методике [19]. Расчет резонансных частот карбонильных колебаний выполнялся так же, как в работе [14].

Изотермы гидратации FMN были получены на пьезографиметрической установке, описанной ранее [20].

Метод пьезографиметрии основан на определении зависимости изменения резонансной частоты кварцевого резонатора ( $\Delta f$ ) от массы вещества ( $m$ ), нанесенного на поверхность кварцевой пластины:

$$\Delta f = G_f \cdot m, \quad (1)$$

где  $G_f$  — константа кварцевой пластины, которая зависит от характеристик кварца.

Изотермы гидратации или зависимость числа молей воды на моль сорбента от относительной влажности получали по формуле:

$$n = \frac{M_{\text{вс-ва}} \cdot \delta f}{M_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \Delta f_m}, \quad (2)$$

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

$\Delta f_i$  — текущее значение разностной частоты между опорным и измерительным кварцевыми резонаторами при  $i$ -той влажности;

$\Delta f_m$  — изменение разностной частоты, вызванное сухим образцом;

$M_{\text{вс-ва}}$  — молекулярная масса исследуемого вещества;

$M_{\text{H}_2\text{O}}$  — молекулярная масса воды.

Пленки FMN для пьезограмметрии получали из концентрированного раствора с рН = 7,0 или 6,2, который наносили в виде микрокапли на контакты кварцевого резонатора и сушили при комнатной температуре. Погрешность определения количества сорбированной воды в интервале ОВ от 0 до 70% составляла 0,05 молекул воды на нуклеотид, выше 70% – 0,5 молекул воды.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИК-спектры FMN в растворах и во влажных пленках записаны в области 1450–1800  $\text{см}^{-1}$ . Растворы для получения пленок готовились при нейтральных (рН = 7) и слабокислых (рН = 6,2) средах.

На рис. 2 представлены ИК-спектры поглощения FMN в нейтральном водном растворе (рис. 2 а) в  $\text{D}_2\text{O}$  и во влажных пленках (рис. 2 б).

Видно, что в области поглощения 1600–1800  $\text{см}^{-1}$  имеются две компоненты. Используя отнесение полос поглощения, приведенных в работах [21–23], мы рассматриваем высокочастотную полосу поглощения с максимумом при  $\nu_1 = 1704 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) как обусловленную преимущественно колебаниями  $\text{C}_4=\text{O}$  группы атомов, а низкочастотную полосу при  $\nu_2 = 1653 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) связываем с колебаниями карбонильной группы  $\text{C}_2=\text{O}$ . Как видно из спектров, частоты колебаний карбонильных групп  $\text{C}_2=\text{O}$  и  $\text{C}_4=\text{O}$  в пределах экспериментальной ошибки ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) для образцов FMN в условиях раствора и влажных пленок практически совпадают.

Область поглощения 1450–1600  $\text{см}^{-1}$  изоаллоксазинового кольца более сложная из-за сильно перекрывающихся полос. Нами выполнено следующее отнесение полос в этой области. Согласно работе [24], полоса поглощения с максимумом  $\nu_3 = 1542 \text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям с участием  $\text{C}=\text{N}_5$  и  $\text{C}=\text{C}$  групп атомов; полоса поглощения при  $\nu = 1578 \text{ см}^{-1}$ , которая в спектре наблюдается в виде «плеча» (рис. 2 б), связана с колебаниями  $\text{C}=\text{C}$  и  $\text{C}=\text{N}_1$  групп.

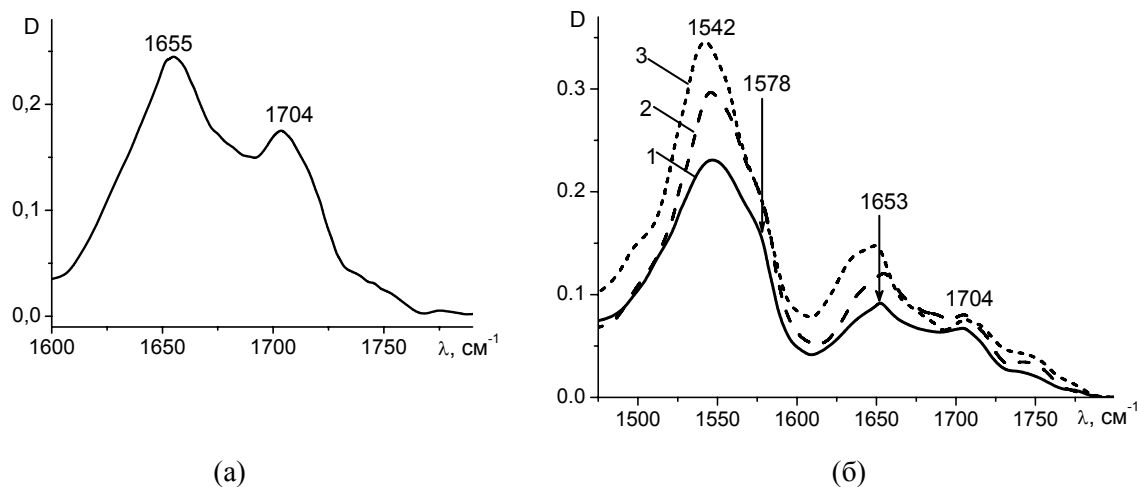


Рис. 2. ИК спектры поглощения FMN в  $D_2O$  растворе при  $pH = 7,0$  (а) и пленке (б), выращенной из раствора с  $pH = 6,9$ , при значениях ОВ 0 % (1), 32 % (2) и 86 % (3).

В неполярной жидкости (хлороформе) полосы поглощения  $C_4=O$  и  $C_2=O$  сдвигаются в высокочастотную область до  $1710\text{ см}^{-1}$  и  $1685\text{ см}^{-1}$ , соответственно [24]. В нейтральных водных растворах и в пленках FMN высокочастотных сдвигов полос поглощения этих карбонильных групп не обнаружено (рис. 2 а, б), в отличие от поведения полос поглощения карбонильных колебаний при образовании стопок азотистых оснований нуклеиновых кислот [5, 10, 11] и кофеина [12]. Очевидно, самоассоциация изоаллоксазиновых колец FMN прошла так, что оказалось невозможным динамическое взаимодействие дипольных моментов перехода карбонильных колебаний  $C_2=O$  и  $C_4=O$ . Этот вывод подтверждается результатами выполненного нами расчета динамического взаимодействия карбонильных колебаний в димерной модели [4], которые дали нулевое смещение полос поглощения  $C_2=O$  и  $C_4=O$  групп атомов (см. ниже).

В спектрах, полученных в условиях водных растворов, в отличие от условий неполярной среды, наблюдаются низкочастотные смещения полос поглощения  $C_2=O$  и  $C_4=O$  (рис. 2 а) на  $\Delta\nu_2 = 6\text{ см}^{-1}$  и  $\Delta\nu_1 = 30\text{ см}^{-1}$  [24], которые указывают на возможность образования водородных связей между карбонильными группами изоаллоксазиновых колец FMN и молекулами воды.

Отметим также, что в нейтральном водном растворе, по аналогии с нуклеотидами, натрий-фосфатная группа молекулы FMN диссоциирует, и отрицательный заряд на атомах кислорода фосфатных групп, по-видимому, оказывает влияние на структуру самоассоциатов. В димерной модели [4] это обстоятельство привело к антипараллельной укладке изоаллоксазиновых колец с разнесением фосфатных групп. Такое расположение фосфатных групп практически исключает влияние их кулоновского взаимодействия (электростатического отталкивания) на стабильность самоассоциатов FMN. Поэтому мы полагаем, что приведенная в работе [4] структура самоассоциата

FMN, в которой не реализуются динамические взаимодействия карбонильных колебаний и учтено уменьшение электростатического отталкивания фосфатных групп, может быть корректной моделью самоассоциации молекул FMN в нейтральном растворе.

Но остается вопрос о факторах, стабилизирующих такие стэкинг-ассоциаты. Известно, что стопкообразное расположение азотистых оснований в нуклеиновых кислотах существенным образом стабилизируется молекулами воды [8], которые занимают мостиковые положения между донорно-акцепторными группами оснований и сахарофосфатного остова. Чтобы установить, возможна ли стабилизация стэкинг-ассоциатов FMN за счет аналогичных водных мостиков, нами, с использованием ранее разработанной методики для пленок нуклеиновых кислот [5, 10, 11], проведено исследование зависимости спектральных параметров: частот  $\nu$  и интенсивностей  $R$  полос поглощения колебаний карбонильных групп  $C_2=O$ ,  $C_4=O$  и внутрикольцевых  $C=N$  колебаний (в относительных единицах  $R = D_i/D_{\text{сух}}$ , где  $D_i$  и  $D_{\text{сух}}$  – оптические плотности в максимуме поглощения для влажной и сухой пленок, соответственно) от числа сорбированных молекул воды  $n$  на моль FMN. Значения  $n$  взяты из полученных нами изотерм гидратации (рис. 3).

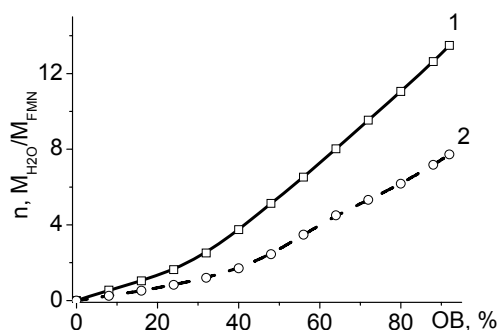


Рис. 3. Изотермы гидратации пленок FMN, выращенных из нейтрального рН=7,0 (1) и слабокислого рН=6,2 (2) растворов.

На рис. 4 представлены зависимости  $R$  от  $n$  для полос поглощения колебаний карбонильных групп  $C_2=O$ ,  $C_4=O$  и внутрикольцевых  $C=N$  колебаний. Видно, что частоты рассматриваемых полос  $\nu(n)$  уменьшаются, а их интенсивность  $R(n)$  увеличивается.

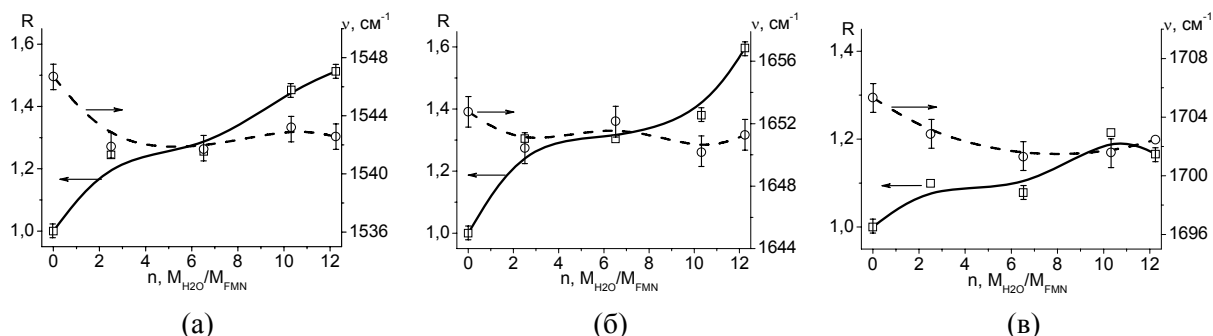


Рис. 4. Зависимость частоты ( $\nu$ ) и относительной интенсивности ( $R$ ) от количества молекул воды ( $n$ ) для полос поглощения внутрикольцевых  $\text{C}=\text{N}_5$ ,  $\text{C}=\text{C}$  групп (а) и карбонильных  $\text{C}_2=\text{O}$  (б) и  $\text{C}_4=\text{O}$  (в) групп атомов изоаллоксазинового кольца FMN ( $\text{pH}=7,0$ ).

Такой характер изменения зависимостей  $R(n)$  и  $\nu(n)$  для полос поглощения FMN свидетельствует о поляризации связей атомов при формировании водородных связей с молекулами воды. Одновременный рост интенсивностей полос поглощения колебаний  $\text{C}_2=\text{O}$ ,  $\text{C}_4=\text{O}$  и колебаний с участием внутрикольцевого атома азота  $\text{N}_5$  позволяет предположить возможность образования водных «мостиков» между донорно-акцепторными группами FMN и молекулами воды, которые, вместе со стэкинг-взаимодействиями могут стабилизировать самоассоциаты FMN.

В условиях слабокислой среды, как известно, происходит протонирование изоаллоксазинового кольца по атому  $\text{N}_5$  с  $\text{pK} = 5,2$  [25] и нейтрализация фосфатной группы. Поэтому с большой вероятностью можно ожидать образования иной структуры стэкинг-ассоциатов FMN, формирующихся в слабокислом водном растворе и в пленке, выращенной из слабокислых растворов, по сравнению с типами самоассоциатов, которые образуются в нейтральных средах [3, 4]. Насколько нам известно, в условиях слабокислой среды самоассоциация FMN не изучалась, как не исследовалось и влияние воды на стабилизацию стэкинг-ассоциатов FMN. Поэтому мы провели исследование ИК-спектров, полученных для слабокислых растворов FMN и пленок, выращенных из них, в той же спектральной области ( $1450\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$ ).

На рис. 5 а, б представлены спектры в слабокислом растворе ( $\text{pH} \approx 6,4$ ) и пленках, выращенных из раствора с  $\text{pH} = 6,2$ . Обращает на себя внимание высокочастотный сдвиг полос поглощения внутрикольцевых колебаний  $\text{C}=\text{C}$  и  $\text{C}=\text{N}_5$ :  $\Delta\nu_3 = 10 \text{ cm}^{-1} (\pm 2 \text{ cm}^{-1})$  от  $1542 \text{ cm}^{-1}$  (рис. 2 б) до  $1552 \text{ cm}^{-1}$  в дейтерированной пленке (рис. 5 б).



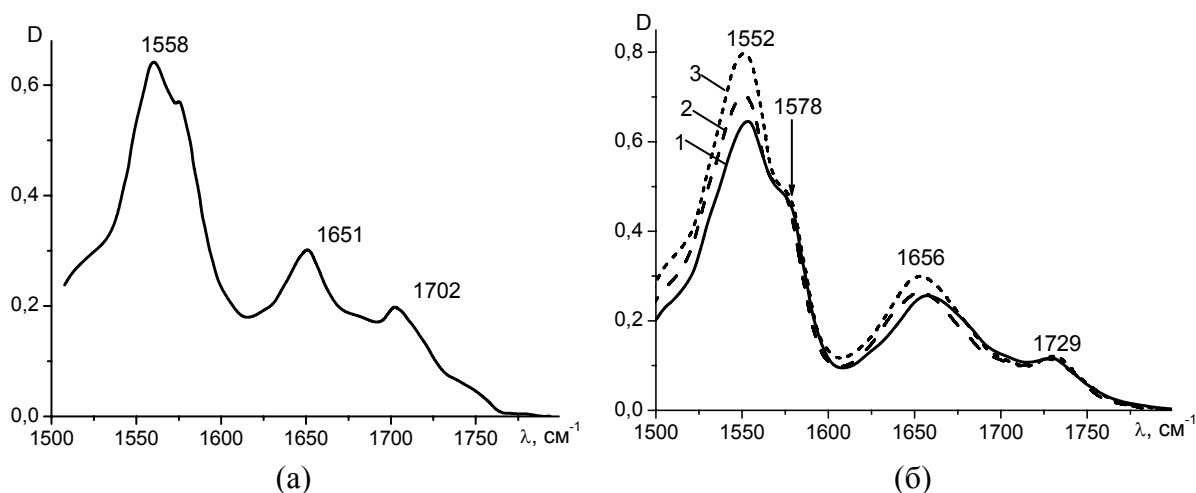


Рис. 5. ИК спектры поглощения FMN в D<sub>2</sub>O растворе при pH ≈ 6,4 (а) и пленке (б), выращенной из раствора с pH = 6,2, при значениях ОВ 0 % (1), 32 % (2) и 80 % (3).

Из теории колебания молекул [26] известно, что увеличение зарядов и порядков связей приводит к увеличению силовых постоянных колеблющихся атомов и, следовательно, к возрастанию частоты колебания. Обнаруженное нами высокочастотное смещение полосы  $\nu_3$  может быть объяснено протонированием изоаллоксазинового кольца.

Существенное изменение спектров зафиксировано в области поглощения карбонильных групп C<sub>2</sub>=O и C<sub>4</sub>=O и в пленках FMN, выращенных из слабокислых растворов (рис. 2 б и рис. 5 б). Если частота полосы поглощения карбонильной группы C<sub>2</sub>=O ( $\nu_2 = 1656 \text{ см}^{-1} \pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) изменилась незначительно, то полоса поглощения C<sub>4</sub>=O ( $\nu_1 = 1704 \text{ см}^{-1} \pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) сместилась в высокочастотную область до  $1729 \text{ см}^{-1}$ , и ее интенсивность уменьшилась, т.е. для этой полосы обнаружен гипохромизм.

Такой характер изменения спектральных параметров колебания C<sub>4</sub>=O, как и в случае поведения полос поглощения карбонильных колебаний в стопках гетероциклов азотистых оснований в полинуклеотидах [10, 11], может объясняться динамическим взаимодействием карбонильных колебаний C<sub>4</sub>=O, которое возникло в результате образования самоассоциатов, и стэкингом изоаллоксазиновых колец. Интересно отметить, что в слабокислых растворах мы не обнаружили высокочастотных сдвигов колебаний C<sub>2</sub>=O и C<sub>4</sub>=O групп атомов (рис. 5 а). Это свидетельствует о том, что в слабокислом растворе если и произошла самоассоциация FMN, то структура стэкинг-ассоциата и расположение изоаллоксазиновых колец – иного типа, чем в пленках.

Нами также выполнено изучение влияния воды на стабильность самоассоциатов FMN в пленках, выращенных из слабокислого раствора. На рис. 6 представлены зависимости  $R$  от  $n$  для изучаемых полос поглощения с

частотами  $\nu_1 = 1729 \text{ см}^{-1}$  и  $\nu_2 = 1656 \text{ см}^{-1}$  (колебания карбонильных  $\text{C}_4=\text{O}$  и  $\text{C}_2=\text{O}$  групп), а также  $\nu_3 = 1552 \text{ см}^{-1}$  (колебания внутрикольцевых  $\text{C}=\text{N}$ ,  $\text{C}=\text{C}$  групп).

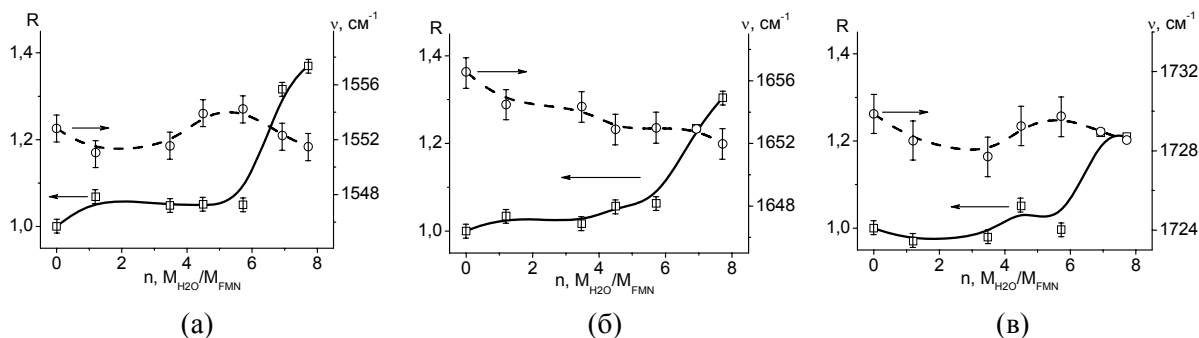


Рис. 6. Зависимость частоты ( $\nu$ ) относительной интенсивности ( $R$ ) от количества молекул воды ( $n$ ) для полос поглощения внутрикольцевых  $\text{C}=\text{N}_5$ ,  $\text{C}=\text{C}$  групп (а), карбонильных  $\text{C}_2=\text{O}$  (б) и  $\text{C}_4=\text{O}$  (в) групп атомов изоаллоксазинового кольца FMN ( $\text{pH}=6,2$ ).

Видно, что во всем интервале сорбции воды ( $0 < n \leq 8$ ) частота внутрикольцевого колебания  $\nu_3$  (с участием групп атомов  $\text{C}=\text{N}_5$  и  $\text{C}=\text{C}$ ) практически не изменяется. Этот факт можно объяснить прочным связыванием протона с изоаллоксазиновым кольцом ( $\text{pK} = 5,2$ ) [25].

Из рис. 6 б видно, что частота карбонильного колебания  $\text{C}_2=\text{O}$  с ростом сорбции воды в интервале  $0 < n \leq 6$  практически не изменилась. Но интенсивности двух рассмотренных полос поглощения (колебания  $\text{C}_2=\text{O}$  группы и внутрикольцевых  $\text{C}=\text{N}$ ,  $\text{C}=\text{C}$  групп) незначительно возрастают в интервале сорбции воды  $0 < n \leq 6$  по сравнению с интенсивностями этих полос в ИК-спектрах, полученных для увлажненных пленок, выращенных из нейтральных растворов (рис. 4 а, б). Очевидно, в интервале сорбции воды  $0 < n \leq 6$  пленками, выращенными из слабокислых растворов FMN, происходит незначительная гидратация групп  $\text{C}_2=\text{O}$  и  $\text{C}=\text{N}_5$ . И только с повышением активности воды (при  $n > 6$ , рис. 6 а, б) происходит существенное увеличение интенсивности (на 30–40%), свидетельствующее об одновременном связывании молекул воды с карбонильной группой  $\text{C}_2=\text{O}$  и с атомами изоаллоксазинового кольца  $\text{C}=\text{N}_5$ . По-видимому, эти молекулы воды принимают участие в стабилизации самоассоциатов FMN в пленках, выращенных из слабокислых растворов, как это было отмечено в случае образования самоассоциатов FMN в пленках, выращенных из нейтрального раствора. Отметим также, что частота колебания  $\text{C}_4=\text{O}$  при  $\nu_1 = 1729 \text{ см}^{-1}$  во всем интервале сорбции воды ( $0 < n \leq 8$ ) не претерпевает сдвигов, что может свидетельствовать о сохранении пространственного расположения плоскостей изоаллоксазиновых колец в структуре самоассоциатов, которые образуются в пленках, выращенных из слабокислых растворов FMN.

Для объяснения высокочастотных сдвигов полос поглощения карбонильных колебаний  $C_4=O$  ( $\Delta\nu_1 = 25 \text{ см}^{-1}$ ) и  $C_2=O$  ( $\Delta\nu_2 \approx 3 - 4 \text{ см}^{-1}$ ), проявляющихся в условиях увлажненных пленок, выращенных из слабокислых растворов, по сравнению с поведением этих полос в спектрах пленок, полученных из нейтральных растворов, нами рассмотрено динамическое (резонансное) взаимодействие дипольных моментов переходов этих групп атомов.

### РАСЧЕТ РЕЗОНАНСНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КАРБОНИЛЬНЫХ КОЛЕБАНИЙ В СТРУКТУРЕ САМОАССОЦИАТОВ FMN

Теоретической основой динамического (резонансного) взаимодействия является теория молекулярных экситонов [27].

Энергия колебательного экситонного возбуждения равна:

$$\Delta E_0^f = \Delta E_0 + A + \varepsilon_{рез}^f, \quad (3)$$

где  $\Delta E_0$  – энергия возбуждения колебательной группы в изолированной молекуле,  $A$  – разность колебательной энергии взаимодействия возбужденной и нормальной колебательных групп со всеми остальными группами в молекуле,  $\varepsilon_{рез}^f$  – энергия резонансного взаимодействия для колебания с типом симметрии  $f$ .

Если допустить, что частота невозмущенного колебания:

$$\nu_0 = \frac{1}{h}(\Delta E_0 + A), \quad (4)$$

то, в соответствии с уравнением (3), частота перехода равна:

$$\nu^f = \nu_0 + \frac{1}{h}\varepsilon_{рез}^f, \quad (5)$$

где  $h$  – постоянная Планка, равная  $6,62 \cdot 10^{-34}$  Дж·с.

Если предположить, что в пленке FMN образовался  $n$ -мерный агрегат (неограниченный одномерный кристалл) с последовательно чередующимися изоаллоксазиновыми кольцами, то, согласно работе [28], активными в ИК-спектрах поглощения будут дважды вырожденные колебания типа  $E$  (поляризованные перпендикулярно оси агрегата).

В реальных условиях (например, в растворах воды) на частоту карбонильного колебания, кроме резонансного взаимодействия, оказывает влияние водородная связь, которая образуется между атомом кислорода  $C=O$  групп и атомом водорода (в составе молекул воды или других молекул). В рамках модели слабосвязанных осцилляторов [29], с учетом образования водородной связи и резонансного взаимодействия, частоту полосы поглощения  $C=O$  группы атомов в ИК-спектрах поглощения можно записать как:

$$\nu = \nu_0 - \Delta\nu_{H-cv} \pm \Delta\nu_{рез}, \quad (6)$$

где  $\nu_0$  – частота невозмущенного карбонильного колебания,  $\Delta\nu_{H-cv}$  – смещение частоты за счет образования H-связи,  $\Delta\nu_{рез}$  – резонансный сдвиг.

Резонансный сдвиг определяется так [30]:

$$\Delta \nu_{рез} = 2 (\Delta \nu_{11,12} \cos \varphi + \Delta \nu_{11,13} \cos 2\varphi + \dots + \Delta \nu_{11,1k} \cos k\varphi), \quad (7)$$

где  $k$  – число карбонильных групп в агрегате,  $\Delta \nu_{11,12}$  – смещение частоты С=О колебания за счет резонансного взаимодействия карбонильных групп в положении 11, 12 и т.д.;  $\varphi$  – угол поворота моментов перехода соседних карбонильных групп.

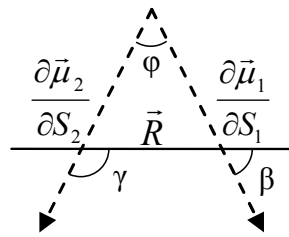


Рис. 7. Схема взаимодействия дипольных моментов перехода.

Обычно при расчете резонансного (динамического) взаимодействия колебательных моментов перехода используют диполь-дипольное приближение [14, 30, 31]. В свернутом виде резонансный частотный сдвиг в простом случае двух взаимодействующих колебательных групп (рис. 7) запишется так [30]:

$$\Delta \nu_{рез} = \frac{M}{h\varepsilon} \cdot \frac{\cos \varphi - 3 \cos \beta \cos \gamma}{R^3} = \frac{M}{h\varepsilon} \cdot G, \quad (8)$$

где  $G$  – геометрический фактор, зависящий от расположения диполей в агрегате;

$M = \left| \frac{\partial \bar{\mu}_1}{\partial S_1} \right| \cdot \left| \frac{\partial \bar{\mu}_2}{\partial S_2} \right|$  – произведение дипольных моментов перехода, которые определяются из абсолютных интенсивностей полос поглощения в инфракрасном спектре;  $S_1$  и  $S_2$  – валентные координаты;  $R$  – расстояние между диполями;  $\varepsilon$  – диэлектрическая постоянная.

Абсолютные интенсивности карбонильных колебаний FMN в водном растворе ( $D_2O$ ) определены из спектров (рис. 2 а), в которых видно хорошее разрешение компонентов. Значения частот и полуширин слабо перекрывающихся полос определяли с точностью  $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ , погрешность расчета абсолютных интенсивностей составляла 10%.

В табл. 1 приведены спектральные параметры полос поглощения карбонильных колебаний ( $C_2=O$  и  $C_4=O$ ) FMN, которые использовались нами при расчете резонансных сдвигов в агрегате самоассоциата FMN в пленке.

Из таблицы видно, что дипольные моменты переходов карбонильных колебаний имеют значительную величину ( $\sim 0,4-0,6 \text{ Д}$ ), поэтому можно ожидать, что при определенной структуре самоассоциатов FMN возможно возникновение взаимодействий между колебаниями карбонильных групп изоаллоксазиновых колец.

Таблица 1.

Спектральные параметры полос поглощения карбонильных колебаний FMN: частота  $\nu_0$  и полуширина  $\Delta\nu_{1/2}$  полос поглощения, максимум поглощения  $\varepsilon_0$ , интегральные интенсивности  $B$  и моменты переходов  $\mu$ .

Отнесение	$\nu_0, \text{см}^{-1}$	$\Delta\nu_{1/2}, \text{см}^{-1}$	$\varepsilon_0 \cdot 10^{-3},$ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$B \cdot 10^{-4},$ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	$\mu, \text{Д}$
$\text{C}_2=\text{O}$	1655	58,7	9,3	12,8	0,56
$\text{C}_4=\text{O}$	1704	45,4	5,9	6,4	0,39

Проведенный нами расчет резонансных взаимодействий моментов переходов карбонильных групп  $\text{C}_2=\text{O}$  и  $\text{C}_4=\text{O}$  для моделей самоассоциатов FMN, представленных в работах [3, 4], с использованием данных табл. 1, показал отсутствие сдвига полос поглощения ( $\Delta\nu = 0 \text{ см}^{-1}$ ). Этот результат не согласуется с поведением этих полос в полученных нами ИК-спектрах. Вероятно, структура самоассоциатов FMN в этих моделях такова, что расстояние между карбонильными группами (см. формулу (8)) оказалось значительным – более  $4,5 \text{ \AA}$ , и, следовательно, взаимодействие моментов переходов этих карбонильных групп в таких структурах самоассоциатов невозможно. Очевидно, для объяснения наблюдаемых нами изменений в ИК-спектрах необходимо выполнить поиск иных структур стэкинг-ассоциатов FMN, который и был нами проведен.

Поскольку в формуле (8)  $M/h\varepsilon$  – постоянная величина (в предположении, что  $\varepsilon = 1$ ), то поиск возможной конфигурации стэкинг-ассоциатов FMN проводили, варьируя следующие структурные параметры: смещение молекулы вдоль большой оси ( $\text{C}_2 - \text{C}_8$ ) изоаллоксазинового кольца ( $x$ ), малой оси ( $\text{N}_{10} - \text{N}_5$ ) кольца ( $y$ ) и перпендикуляра к плоскости кольца ( $z$ ), соответственно;  $\theta$  – угол поворота вокруг оси  $Z$ , проходящей через центр кольца;  $\varphi_1, \varphi_2$  – углы отклонений (в плоскости кольца) колебательных моментов  $\text{C}_2=\text{O}$  и  $\text{C}_4=\text{O}$  от направлений соответствующих связей. На основании этих структурных параметров вычислялись расстояния  $R$  между средними точками моментов перехода и углы  $\varphi, \beta, \gamma$  – углы между направлениями диполей и линией, соединяющей их центры связей. В начале расчета мы предполагали, что моменты переходов направлены по связям атомов углерода и кислорода, а затем – для получения лучшего согласия рассчитанных высокочастотных сдвигов с экспериментально зафиксированными – изменяли направление моментов переходов (см. работы [10, 11]).

Критериями отбора «правильных» структур служили: (1) соответствие геометрии стэкинг-ассоциатов условиям сохранения дисперсионных взаимодействий между изоаллоксазиновыми кольцами (плоскости колец должны перекрываться), (2) незначительные отклонения колебательных моментов от направления связей и (3) отсутствие стерических препятствий.

Параметры варьировались в следующих пределах:  $x$  – до 2,45 Å (при таком смещении перекрываются два из трех циклов изоаллоксазиновых колец),  $y$  – до 0,6 Å (смещение, полученное для структуры стэкинг-димера FMN при молекулярном моделировании и в ЯМР-исследованиях [3, 4]),  $z$  – от 3,4 до 3,7 Å (диапазон межплоскостных расстояний, характерных для стэкинга ассоциатов большинства гетероциклических и ароматических молекул [10, 18]),  $\theta$  – до 30°,  $\varphi_1$  и  $\varphi_2$  – до 10°. Соответствие экспериментально наблюдаемому сдвигу частот для  $C_2=O$  и  $C_4=O$  достигается при  $x = 2,45$  Å,  $y = 0,6$  Å,  $z = 3,44$  Å,  $\theta = 4^\circ$ ,  $\varphi_1 = 0,6^\circ$ ,  $\varphi_2 = 9,9^\circ$ . Соответствующие этой конфигурации значения  $R$ ,  $\varphi$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  приведены в табл. 2.

Таблица 2.

Значения параметров геометрического фактора для  $C_2=O$  и  $C_4=O$ .

Отнесение	$R$ , Å	$\varphi$ , °	$\beta$ , °	$\gamma$ , °
$C_2=O$	4,27	4,0	123,3	124,3
$C_4=O$	4,16	4,0	91,5	89,1

На рис. 8 приведены рассчитанные зависимости сдвигов частот  $\Delta\nu$  для одной молекулы FMN от количества ее соседей вдоль  $n$ -мерного самоассоциата.

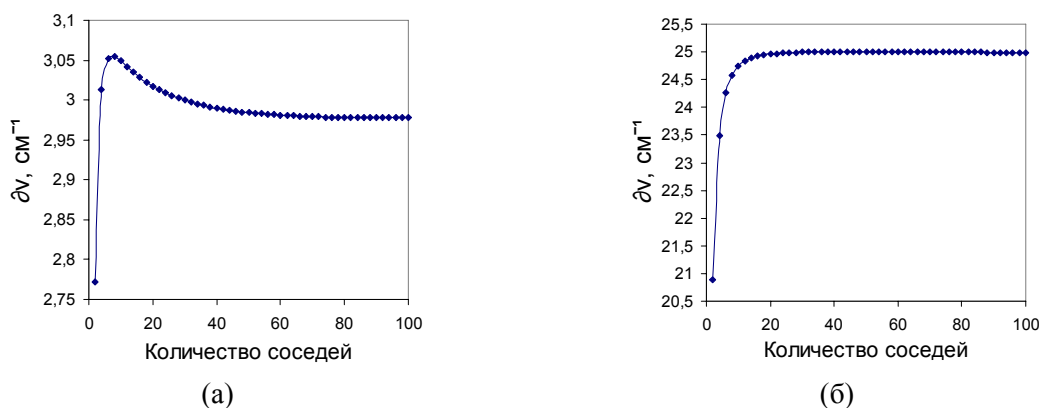


Рис. 8. Зависимость частотных сдвигов одной молекулы FMN от количества ее соседей (2, 4, 6, ... n) при взаимодействии моментов переходов для карбонильных колебаний  $C_2=O$  (а) и  $C_4=O$  (б).

Видно, что на ~90 % сдвиги по частоте полос поглощения карбонильных групп вызваны взаимодействиями с ближайшими соседями каждой молекулы FMN, входящей в состав  $n$ -мерного стэкинг-ассоциата. Отметим также, что соответствие расчетных сдвигов частот карбонильных колебаний с экспериментальными значениями ( $\Delta\nu_l = 25$  см<sup>-1</sup>) при  $n = 2$  (димер FMN) получено для самоассоциата FMN, у которого не наблюдается перекрывания плоскостей изоаллоксазиновых колец, то есть, при минимальном стэкинге и, следовательно, нестабильной структуре самоассоциата. Это означает, что

конфигурация самоассоциатов FMN содержит более двух молекул:  $n > 2$ . Действительно, именно для  $n$ -мерной структуры самоассоциата (согласно формуле (7)) мы получили расчетные сдвиги частот, согласующиеся с экспериментальными:  $\Delta\nu_2 \approx 3 \text{ см}^{-1} (\pm 2 \text{ см}^{-1})$  и  $\Delta\nu_1 \approx 25 \text{ см}^{-1} (\pm 2 \text{ см}^{-1})$ .

На рис. 9 представлена пространственная структура самоассоциата FMN. Пунктиром указаны взаимодействующие карбонильные группы.

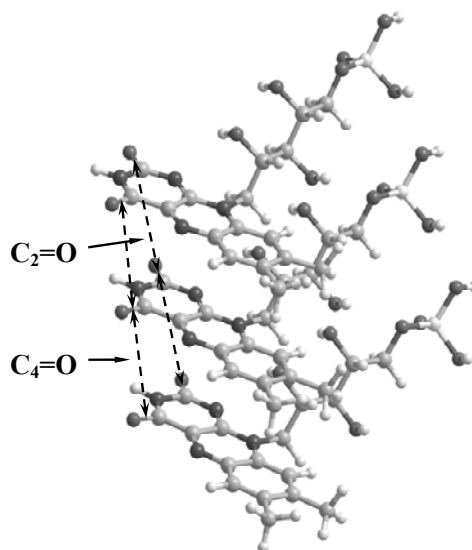


Рис. 9. Фрагмент пространственной структуры  $n$ -мерного самоассоциата FMN.

Каковы основные факторы, определяющие стабильность  $n$ -мерных самоассоциатов FMN, образующихся в условиях слабокислой среды? Проведенные нами исследования влияния воды на их стабильность позволили обнаружить высокочастотные сдвиги карбонильных колебаний (рис. 5 б) в пленке FMN. Можно предположить, что образование стэкинг-ассоциатов FMN и расположение изоаллоказоновых колец в них не определяется водным окружением. Поскольку в  $n$ -мерной структуре самоассоциатов FMN плоскости I-II и II-III колец (рис. 9) перекрываются, то, вероятно, стабилизация такой структуры в пленке достигается в результате стэкинг-взаимодействий между этими кольцами. Об этом свидетельствуют многочисленные расчеты по оценке вклада межплоскостных взаимодействий в стабильность стопкообразных ассоциатов различных гетероциклических соединений (см., например, [18]). Но, как показали наши исследования сорбции воды на пленках, выращенных из слабых растворов FMN, на первом этапе увлажнения вода практически не связывается с гидратно-активными группами изоаллоказинового кольца (рис. 6 а, б), и только при увеличении ее активности ( $n > 6$ ) гидратация существенно возрастает. Очевидно, молекулы воды так же могут влиять на

стабильность *n*-мерных самоассоциатов FMN, которые формируются в пленках, выращенных из слабокислых растворов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные ИК спектроскопические исследования растворов и пленок FMN и анализ поведения полос поглощения карбонильных колебаний FMN не выявили заметных изменений частот полос поглощения C<sub>2</sub>=O и C<sub>4</sub>=O в нейтральных растворах. Вероятно, в таких условиях образование самоассоциатов FMN происходит без возникновения динамического взаимодействия моментов перехода колебаний карбонильных групп изоаллоксазиновых колец. Расчеты спектральных параметров для известных структур самоассоциатов FMN [3, 4, 18], которые согласуются с экспериментальными данными (отсутствие в ИК-спектрах высокочастотного сдвига полос поглощения карбонильных групп в нейтральных растворах FMN), подтвердили этот вывод.

Сравнительный анализ спектров поглощения карбонильных колебаний изоаллоксазинового кольца в пленках, выращенных из нейтрального и слабокислого растворов FMN, выявил существенные различия. Спектры нейтральных растворов FMN и пленок, выращенных из них, практически не отличались, что свидетельствует об одинаковом типе самоассоциации FMN в нейтральных средах. Однако в пленках, полученных из слабокислого раствора FMN, полосы поглощения колебаний C<sub>4</sub>=O и C<sub>2</sub>=O групп атомов сместились в высокочастотную область на  $\Delta\nu_1 = 25 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ) и  $\Delta\nu_2 = 3 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 2 \text{ см}^{-1}$ ), соответственно, по сравнению с такими же полосами в пленках, полученных из нейтрального раствора. Проведенный расчет динамического (резонансного) взаимодействия карбонильных колебаний C<sub>4</sub>=O и C<sub>2</sub>=O групп в диполь-дипольном приближении позволил объяснить высокочастотные сдвиги их полос поглощения моделью *n*-мерной самоассоциации FMN. Мы предполагаем, что стабильность таких самоассоциатов FMN определяется межплоскостными взаимодействиями между перекрывающимися кольцами изоаллоксазинового хромофора. Изучение взаимодействия FMN с водным окружением в конденсированных условиях (пленки, выращенные из нейтральных и слабокислых растворов) показало, что молекулы воды могут дополнительно стабилизировать стэкинг-ассоциаты FMN.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Grajek H. Flavins as Photoreceptors of Blue Light and Their Spectroscopic Properties : review / H. Grajek // Current Topics Biophysics. – 2011. – Vol. 34. – P. 53–65.
2. Bastian M. The self-association of flavin mononucleotide (FMN<sup>2-</sup>) as determined by <sup>1</sup>H NMR shift measurements / M. Bastian, H. Sigel // Biophys. Chem. – 1997. – Vol. 67. – P. 27–34.
3. <sup>1</sup>H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-мононуклеотида и его комплексообразования с



- никотинамидом в водном растворе / А. Н. Веселков, А. О. Лантушенко, А. С. Чубаров [и др.] // Журн. физ. химии. – 2002. – Т. 76., № 7. – С. 1313–1320. /<sup>1</sup>H JаMR analiz samoassociacii riboflavin-mononukleotida i ego kompleksoobrazovanija s nikotinamidom v vodnom rastvore / A. N. Veselkov, A. O. Lantushenko, A. S. Chubarov [i dr.] // Zhurn. fiz. himii. – 2002. – Т. 76., № 7. – С. 1313–1320./
4. Smyk B. Conformation of FMN dimer obtained by molecular modeling methods / B. Smyk, H. Grajek // *Curr. Topics Biophys.* – 2001. – Vol. 25. – P. 81–84.
  5. Исследование гидратации компонентов нуклеиновых кислот методами инфракрасной спектроскопии и сверхвысокой диэлектротметрии / М. А. Семенов, В. А. Кашпур, Т. В. Больбух, В. Я. Малеев // *Биополимеры и клетка.* – 1987. – Т. 3, № 1. – С. 18–22. /Issledovanie gidratatsii komponentov nukleinovykh kislot metodami infrakrasnoj spektroskopii i sverhvysokej dijelektrometrii / M. A. Semenov, V. A. Kashpur, T. V. Bol'buh, V. Ja. Maleev // *Biopolimery i kletka.* – 1987. – Т. 3, № 1. – С. 18–22./
  6. Семенов М. А. Исследование спектральных параметров полос поглощения нуклеотидов в области 1100-2400 см<sup>-1</sup> в D<sub>2</sub>O при различных температурах / М. А. Семенов, В. П. Суэтова // *Молекулярная генетика и биофизика.* – К. : Изд-во КГУ, 1979. – С. 24–31. /Semenov M. A. Issledovanie spektral'nykh parametrov polos pogloshhenija nukleotidov v oblasti 1100-2400 sm-1 v D2O pri razlichnykh temperaturah / M. A. Semenov, V. P. Sujetova // *Molekuljarnaja genetika i biofizika.* – К. : Izd-vo KGU, 1979. – С. 24–31./
  7. Физические свойства системы ДНК-вода / В. Я. Малеев, М. А. Семенов, А. И. Гасан, В. А. Кашпур // *Биофизика.* – 1993. – Т. 38, № 5. – С. 789–811. /Fizicheskie svojstva sistemy DNK-voda / V. Ja. Maleev, M. A. Semenov, A. I. Gasan, V. A. Kashpur // *Biofizika.* – 1993. – Т. 38, № 5. – С. 789–811./
  8. Semenov M. A. Hydration and Stability of Nucleic Acids in the Condensed State / M. A. Semenov, E. G. Bereznyak // *Comments Mol. Cel. Biophys.* – 2000. – Vol. 10, № 1. – P. 1–23.
  9. Vetzal R. Optical Anisotropy of Oriented Deoxyribonucleic Acid Films of Different Water Content / R. Vetzal, D. Zirwer, M. Berker // *Biopolymers.* – 1969. – Vol. 8. – P. 391.
  10. Семенов М. А. Исследование гидратации дуспирального комплекса поли А·поли У методами ИК-спектроскопии и пьезогравиетрии / М. А. Семенов, Т. В. Больбух, В. Я. Малеев // *Биофизика.* – 1985. – Т. 30, Вып. 4. – С. 571–577. /Semenov M. A. Issledovanie gidratatsii dvsipiral'nogo kompleksa poli A·poli U metodami IK-spektroskopii i p'ezogravimetrii / M. A. Semenov, T. V. Bol'buh, V. Ja. Maleev // *Biofizika.* – 1985. – Т. 30, Вып. 4. – С. 571–577./
  11. Гидратация и стабильность комплекса поли(гУ) поли(гЦ) / М. А. Семенов, В. Я. Малеев, Е. Г. Березняк [и др.] // *Молекулярная биология.* – 1991. – Т. 25. – С. 1626–1634. /Gidratatsija i stabil'nost' kompleksa poli(gU) poli(gC) / M. A. Semenov, V. Ja. Maleev, E. G. Bereznyak [i dr.] // *Molekuljarnaja biologija.* – 1991. – Т. 25. – С. 1626–1634./
  12. Исследование гидратации кофеина и комплекса ДНК-кофеин во влажных пленках методами ИК-спектроскопии и пьезогравиетрии / А. В. Шестопалова, Е. Б. Стариков, М. А. Семенов, Т. В. Больбух – Х. : ИРЭ, 1987. – 22 с. /Issledovanie gidratatsii kofeina i kompleksa DNK-kofein vo vlazhnykh plenkah metodami IK-spektroskopii i p'ezogravimetrii / A. V. Shestopalova, E. B. Starikov, M. A. Semenov, T. V. Bol'buh – H. : IRJe, 1987. – 22 s./
  13. Tinoco J. J. Hypochromism in Polynucleotides / J. J. Tinoco // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1960. – Vol. 82. – P. 4785–4790.
  14. Semenov M. A. Carbonyl vibration resonance interactions of helical polynucleotides Poly(dA)·Poly(dT) and Poly G·Poly C / M. A. Semenov, T. V. Bolbukh // *Studia Biophysica.* – 1984. – Vol. 102. – P. 215–220.
  15. Macrochelate formation in monomeric metal ion complexes of nucleoside 5'-triphosphates and the promotion of stacking by metal ions / K. H. Scheller, F. Hofstetter, P. R. Mitchell [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1981. – Vol. 103. – P. 247–260.
  16. Corfu N. A. Acid-base properties of nucleosides and nucleotides as a function of concentration / N. A. Corfu, H. Sigel // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – Vol. 199. – P. 659–669.
  17. Tribolet R. Self-association of adenosine 5'-monophosphate (5'-AMP) as a function of pH and in comparison with adenosine, 2'-AMP and 3'-AMP / R. Tribolet, H. Sigel // *Biophys. Chem.* – 1987. – Vol. 27. – P. 119–130.
  18. Костюков В. В. Энергетика комплексообразования биологически активных соединений и нуклеиновых кислот в водном растворе / В. В. Костюков, М. П. Евстигнеев – Севастополь : СевНТУ, 2012. – 475 с. /Kostjukov V. V. Jenergetika kompleksoobrazovanija biologicheski aktivnykh soedinenij i nukleinovykh kislot v vodnom rastvore / V. V. Kostjukov, M. P. Evstigneev – Sevastopol' : SevNTU, 2012. – 475 s./
  19. Березняк Е. Г. Спектральные параметры нуклеотидов и полинуклеотидов в D<sub>2</sub>O / Е. Г. Березняк, М. А. Семенов – Х. : ИРЭ, 1989. – 16 с. – Препринт № 89–379. /Bereznyak E. G. Spektral'nye parametry nukleotidov i polinukleotidov v D2O / E. G. Bereznyak, M. A. Semenov – H. : IRJe, 1989. – 16 s. – Preprint № 89–379./
  20. Использование метода кварцевого резонатора для получения изотерм гидратации полинуклеотидов / Т. В. Больбух, М. А. Семенов, В. Я. Малеев, В. В. Сечкин – Х. : ИРЭ, 1983. – 19 с. – Препринт ИРЭ АН УССР № 228. /Ispol'zovanie metoda kvarcevogo rezonatora dlja poluchenija izoterm

- gidratatsii polinukleotidov / T. V. Bol'buh, M. A. Semenov, V. Ja. Maleev, V. V. Sechkin – H. : IRJe, 1983. – 19 s. – Preprint IRJe AN USSR № 228./
21. Bowman W. D. Normal mode analysis of lumiflavin and interpretation of resonance Raman spectra of flavoproteins / W. D. Bowman, T. G. Spiro // *Biochemistry*. – 1981. – Vol. 20, № 11. – P. 3313–3318.
  22. Lee N. S. Fourier Transform Raman Spectroscopic Investigation of Silver ion – Flavin Mononucleotide complexation / N. S. Lee // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 1991. – Vol. 12, № 5. – P. 465–467.
  23. Kim M. Observation of a carbonyl feature for riboflavin bound to riboflavin-binding protein in the red-excited raman spectrum / M. Kim, P. R. Carey // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – Vol. 115, N 15. – P. 7015–7016.
  24. Ataka K. Vibrational Spectroscopy of an Algal Phot-LOV1 Domain Probes the Molecular Changes Associated with Blue-Light Reception / K. Ataka, P. Hegemann, J. Heberle // *Biophys J.* – 2003. – Vol. 84, № 1. – P. 466–474.
  25. Protonated triplet-excited flavin resolved by step-scan FTIR spectroscopy: implications for photosensory LOV domains / C. Thöing, A. Pfeifer, S. Kakorin, T. Kottke // *Phys. Chem.* – 2013. – Vol. 15, N 16. – P. 5916–5926.
  26. Колебания молекул / М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов, Л. А. Грибов. – М. : Наука, 1972. – 699 с. /Kolebanija molekul / M. V. Vol'kenshtejn, M. A. El'jashevich, B. I. Stepanov, L. A. Gribov. – M. : Nauka, 1972. – 699 s./
  27. Давыдов А. С. Теория поглощения света в молекулярных кристаллах / А. С. Давыдов. – К. : Изд-во АН УССР, 1951. – 141 с. /Davydov A. S. Teorija pogloshhenija sveta v molekulyarnyh kristallah / A. S. Davydov. – K. : Izd-vo AN USSR, 1951. – 141 s./
  28. Грибов А. А. Теория инфракрасных спектров полимеров / А. А. Грибов. – М. : Наука, 1977. – 240 с. /Gribov A. A. Teorija infrakrasnyh spektrov polimerov / A. A. Gribov. – M. : Nauka, 1977. – 240 s./
  29. Miyazawa T. Perturbation Treatment of the Characteristic Vibrations of Polypeptide Chains in Various Configurations / T. Miyazawa // *J. Chem. Phys.* – 1960. – Vol. 32, Is. 6. – P. 1647–1652.
  30. Мележик Е. П. Исследование тонкой структуры полосы амид I ИК-фурье спектра коллагена / Е. П. Мележик, М. А. Семёнов, А. Ю. Иванов // *Біофіз. вісн.* – 2005. – Т. 665, № 15. – С. 62–67. /Melezhik E. P. Issledovanie tonkoj struktury polosy amid I IK-fur'e spektra kollagena / E. P. Melezhik, M. A. Semenov, A. Ju. Ivanov // *Biofiz. visn.* – 2005. – Т. 665, № 15. – С. 62–67./
  31. Nevskaya N. A. Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of  $\alpha$ -helix / N. A. Nevskaya, Yu. N. Chirgadze // *Biopolymers*. – 1976. – Vol. 15, № 4. – P. 637–648.