

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ФІЗИКО-ТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР
імені Б. І. ВЕРКІНА**

СТЕПАНЬЯН Степан Григорович



УДК 539.193, 539.194, 539.196

**МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА КОНФОРМАЦІЙНО ЛАБІЛЬНИХ
БІОЛОГІЧНИХ СПОЛУК ІЗОЛЬОВАНИХ В НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНИХ
МАТРИЦЯХ ІНЕРТНИХ ГАЗІВ**

01.04.14 – теплофізика та молекулярна фізика
104 - Фізика та астрономія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі молекулярної біофізики Фізико-технічного інституту низьких температур імені Б. І. Веркіна Національної академії наук України, м. Харків.

Офіційні опоненти:

член-кореспондент НАН України,
доктор фізико-математичних наук, професор
Петров Эльмар Григорович,
Інститут теоретичної фізики
імені М. М. Боголюбова НАН України,
завідувач відділу теорії квантових процесів у
наносистемах;

доктор фізико-математичних наук, професор
Лисецький Лонгін Миколайович,
Інститут сцинтиляційних матеріалів НТК „Інститут
монокристалів” НАН України,
провідний науковий співробітник відділу
молекулярних та гетероструктурованих матеріалів;

доктор фізико-математичних наук
Дорошенко Ірина Юрївна,
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка МОН України,
старший науковий співробітник кафедри
експериментальної фізики.

Захист відбудеться « 20 » листопада 2018 р. о 15 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.175.03 при Фізико-технічному інституті низьких температур імені Б. І. Веркіна НАН України за адресою: 61103 м. Харків, пр. Науки, 47.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Фізико-технічного інституту низьких температур імені Б. І. Веркіна НАН України за адресою: 61103 м. Харків, пр. Науки, 47.

Автореферат розісланий « 8 » лютого 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.175.03



О. І. Юзефович

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним з традиційних завдань молекулярної фізики є визначення структури систем різної складності, а також впливу на цю структуру внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій. Особливе місце в цій галузі досліджень займає визначення структури конформаційно лабільних молекул. До цього типу належать молекули, значна деформація яких потребує невеликої (у багатьох випадках менше 10 кДж/моль) енергії. Для таких молекул характерна складна поверхня потенційної енергії з великою кількістю локальних мінімумів, які відповідають різним конформаціям, і низькими енергетичними бар'єрами, які розділяють ці конформації. Актуальність подібних досліджень в першу чергу пов'язана з тим, що більшість найважливіших біомолекул мають високу конформаційну лабільність. Це стосується не тільки біополімерів - білків і нуклеїнових кислот, але і невеликих молекул, таких як короткі пептиди та окремі амінокислоти, які виконують важливі біологічні функції в живих організмах, а також використовуються для створення лікарських препаратів. Особливо важливою обставиною, що стимулює дослідження в даній області, є те, що біологічна активність таких молекул істотно залежить від їх конформаційної структури. Просторова структура білків і коротких пептидів визначається цілою низкою чинників, серед яких одним з основних є конформаційна структура амінокислотних фрагментів цих біополімерів. Відомо, що молекули амінокислот в конденсованому стані знаходяться в біполярній (цвіттеріонній) формі. У той же час структура амінокислотних фрагментів поліпептидного ланцюга відповідає нейтральній (молекулярній) формі амінокислот. У молекулярній формі амінокислоти існують в газовій фазі. Дослідження амінокислот в газовій фазі надзвичайно утруднені внаслідок їх низької термічної стабільності, що перешкоджає отриманню амінокислот у газової фази з концентрацією достатньою для проведення спектральних і структурних досліджень. Рішення даної проблеми можливе при використанні методу ізоляції одиночних молекул в низькотемпературних кристалах (матрицях) інертних газів. Особливості отримання зразків в методі матричної ізоляції дозволяють досліджувати молекулярну структуру одиночних молекул з низькою термічною стабільністю.

Актуальність дослідження ізольованих молекул амінокислот пов'язана також з їх виявленням в метеоритах і в зразках комет і астероїдів, доставлених на Землю космічними апаратами. Це стимулювало інтенсивні дослідження в рамках міжнародних програм з вивчення походження життя, що включають спектральні дослідження в різних діапазонах, в тому числі і в інфрачервоному. Метою цих досліджень є ідентифікація в космічному просторі найпростіших біомолекул, в тому числі і амінокислот. Визначення в лабораторних дослідженнях ІЧ-спектральних параметрів (характеристичних смуг поглинання в ІЧ діапазоні) конформерів амінокислот є важливим для таких досліджень.

Характерною особливістю конформаційно лабільних молекул є те, що на їх структуру істотно впливають міжмолекулярні взаємодії, в тому числі взаємодія з атомами інертних газів матриць. Це пов'язано з тим, що енергії, необхідні для деформації структури таких молекул, порівняні з енергіями взаємодії молекул з

матричним оточенням. В ІЧ-спектрах взаємодія з матричним оточенням призводить до зсуву смуг відносно спектрів, що зареєстровані у газовій фазі (матричні зрушення). У разі реалізації кількох способів вбудовування досліджуваних молекул в матрицю, для більшості коливань величини зрушень відрізняються для різних матричних сайтів. В експериментальних спектрах це проявляється як додаткове розщеплення смуг (матричне розщеплення). При цьому відмінності частот різних конформерів лабільних молекул і величини матричного розщеплення близькі. Тому є актуальною розробка методики, що дозволяє розділяти конформаційне і матричне розщеплення смуг поглинання в ІЧ-спектрах. Це дозволить істотно підвищити надійність визначення структури досліджуваних молекул. Основним в такій методиці є пряме квантово-механічне моделювання фрагментів матриць, що включають крім досліджуваної молекули, як мінімум 100-200 атомів інертного газу.

Встановлення структури ізолюваних молекул потребує поєднання експериментальних досліджень та квантово-механічного моделювання. Для молекул, ізолюваних у матрицях інертних газів такий комплексний підхід є особливо ефективним. Це пов'язано з тим, що результати розрахунків отримані для окремих молекул можуть безпосередньо порівнюватися з експериментальними даними отриманими для ізолюваних молекул. Точність сучасних неемпіричних методів у розрахунках структури та енергетичних параметрів молекул порівняна з експериментальною, а точність розрахунків коливальних спектрів обмежується гармонічним наближенням. Тому актуальною є розробка методу який дозволяє підвищити точність розрахунку ангармонічних частот для окремих коливань при використанні змінної матриці Вільсона (матриці кінематичних коефіцієнтів). Особливо важливим це є для молекул з сильним внутрішньомолекулярним водневим зв'язком (в тому числі для амінокислот), який істотно підвищує ангармонізм нормальних коливань і, відповідно, збільшує амплітуди коливань. При цьому використання постійної матриці Вільсона, яка розраховується для рівноважної конфігурації системи, призводить до зниження точності розрахунку ангармонічні частот коливань. Комбінація ІЧ-спектроскопії в низькотемпературних матрицях інертних газів і розрахунків високої точності значно підвищує надійність одержуваних результатів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біофізики Фізико-технічного інституту низьких температур імені Б.І. Веркіна НАН України згідно з відомчими тематичними програмами Національної Академії Наук України:

"Дослідження впливу міжмолекулярних взаємодій на структуру й властивості комплексів нуклеїнових кислот з біологічно активними речовинами з використанням низькотемпературних фізичних методик" (номер державної реєстрації 0100U004484 термін виконання 2000-2002 рр.);

"Дослідження взаємодії біоактивних металокомплексів та хромофорів з біомолекулами та вуглецевими нанотрубками" (номер державної реєстрації 0102U003100, термін виконання 2002-2006 рр.);

“Дослідження міжмолекулярних взаємодій та конформаційних переходів в комплексах біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами різного рівня структурної організації та їх компонентами” (номер державної реєстрації 0103U000312, термін виконання 2003-2005 рр.);

“Дослідження взаємодії між біополімерами, біологічно активними речовинами та вуглецевими нанотрубками як функціональними складовими біосенсорів” (номер державної реєстрації 0106U002560, термін виконання 2006-2010 рр.);

“Дослідження структури і визначення енергетичних характеристик нанобіогібридів, сформованих біополімерами та їх компонентами з вуглецевими нанотрубками, хромофорами та іонами металів” (номер державної реєстрації 0110U007895, термін виконання 2011-2013 рр.);

“Біофізичні властивості складних нанобіоструктур, сформованих вуглецевими нанотрубками, біополімерами та біоактивними лігандами” (номер державної реєстрації 0114U001070, термін виконання 2014-2016 рр.);

“Нанобіоструктури вуглецевих нанотрубок, оксиду графену з біомолекулами: створення, дослідження фізичних властивостей та можливості їх практичного застосування” (номер державної реєстрації 0117U002287, термін виконання 2017-2019 рр.);

та в рамках проектів:

науково-дослідний проект НАТО “Characterization of small biomolecules in isolated state” (NATO CRG.CRG.973389, термін виконання 1999-2001 рр.);

науково-дослідний проект НАТО “Matrix effects and structure of flexible molecules isolated in solid inert gases” (NATO PST.CLG.978377, термін виконання 2002-2003 рр.)

Мета та завдання дослідження. Основною *метою* дисертації є встановлення залежності між молекулярною структурою конформаційно лабільних біологічних молекул, зокрема амінокислот та їх похідних, та їх енергетичними і ІЧ спектральними характеристиками за допомогою зіставлення експериментальних та теоретичних результатів дослідження.

Мета роботи та стан проблеми, що вивчається, визначили наступні конкретні *завдання дослідження*:

1. На підставі вичерпного аналізу поверхней потенційної енергії визначити повний набір конформерів досліджуваних сполук у газовій фазі, та в низькотемпературних матрицях інертних газів.
2. Встановити залежність між конформаційною структурою досліджуваних сполук та їх ІЧ-спектральними характеристиками і енергетичними параметрами (відносними стабільностями).
3. Встановити вплив міжмолекулярних взаємодій на структуру та ІЧ спектри досліджуваних сполук.
4. Встановити зв'язок між структурою конформерів амінокислот та амінокислотними фрагментами пептидів.
5. Визначити причині різниці у структурі конформаційно лабільних молекул у газовій фазі та у матрицях інертних газів.

Об'єктом дослідження є конформаційна структура молекулярної форми амінокислот та їх похідних в ізольованому стані.

Предметом дослідження є вплив внутрішньомолекулярних водневих зв'язків та міжмолекулярних взаємодій на структуру конформаційно лабільних молекул.

Методи дослідження, які використані в роботі, включають комплекс експериментальних і чисельних підходів до рішення завдань дослідження. Для реєстрації експериментальних ІЧ-спектрів використовувалися розроблені у відділі молекулярної біофізики ФТІНТ НАН України установки для вивчення молекул, ізольованих в низькотемпературних матрицях інертних газів. Контроль концентрації досліджуваних речовин в матрицях здійснювався за допомогою унікальних низькотемпературних кварцових мікроваг. Розрахунки структури, відносних стабільностей і коливальних спектрів окремих молекул і фрагментів матриць проводився з використанням квантово-механічних методів теорії функціонала щільності (функціонали B3LYP і M06-2X), методів теорії збурень другого і четвертого порядків (MP2, MP4), теорії спарених кластерів (CCSD, CCSD (T)), а також методу молекулярної динаміки.

Наукова новизна отриманих результатів.

В дисертаційній роботі було вирішено важливу проблему молекулярної фізики, а саме: встановлено залежність між молекулярною структурою та термодинамічними і ІЧ спектральними характеристиками конформаційно лабільних біологічних молекул, зокрема амінокислот та їх похідних, у ізольованому стані. Вперше визначено повний набір конформерів низки аліфатичних амінокислот та їх похідних, а також визначені заселеності спостережуваних конформерів та величини енергетичних бар'єрів між ними. Встановлено визначальний вплив внутрішньомолекулярного водневого зв'язку на структуру і відносні стабільності конформерів амінокислот та показано, що термодинамічні та ІЧ-спектральні характеристики конформерів визначаються типом водневих зв'язків.

Вперше встановлено, що конформери ізольованих у матрицях інертних газів амінокислот відповідають структурі амінокислотних фрагментів пептидів. Зокрема показано, що в залежності від міста розташування фрагментів амінокислоти проліну в пептидній ланцюзі вони є структурними аналогами різних конформерів проліну. Також встановлено вплив оточення (кристалу інертного газу) на структурні та спектральні характеристики досліджуваних сполук та продемонстровано різницю між структурою лабільних молекул у газовій фазі та у матрицях інертних газів. Вперше встановлено суттєву різницю між заселеностями конформерів амінокислот у газовій фазі та у матрицях.

Також вперше показано, що вплив оточення на лабільні молекули призводить не тільки до кількісних змін їх структури та ІЧ-спектральних характеристик, але призводить також і до якісних змін їх поверхні потенційної енергії, таких як поява у матриці додаткових конформерів та реверсу стабільності конформерів в матриці у порівнянні з газовою фазою. Вперше показано ефективність запропонованого методу змінної G-матриці (матриці Вільсона) у розрахунках ангармонічних частот коливань і показано, що це є

особливо важливим для молекул з внутрішньомолекулярними водневими зв'язками.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримана інформація про ІЧ-спектральні характеристики різних конформерів амінокислот використовується в спектральних дослідженнях як окремих біологічних молекул, в тому числі коротких пептидів, так і в дослідженнях міжмолекулярних комплексів амінокислот, у тому числі у комплексах з вуглецевими наноматеріалами. Встановлені характеристичні смуги ІЧ-поглинання можуть бути використані для виявлення амінокислот в космічному просторі. Отримані ІЧ-спектральні дані амінокислоти гліцин та її дейтеропохідних були використані при розробці та тестуванні сучасних методів моделювання коливальних спектрів (V. Barone *et al*, Phys. Chem. Chem. Phys., 16 (2014) 1759-1787). Дані про конформаційний склад досліджених сполук використовуються при вивченні їх структури іншими методами, такими як мікрохвильова спектроскопія, спектроскопія надзвукових кластерів та електронографія. Точні дані про відносну стабільність конформерів і величину енергетичних бар'єрів, які розділяють ці конформери, можуть бути використані для поліпшення існуючих емпіричних силових полів пептидів в методах молекулярної динаміки та молекулярної механіки. Продемонстрована більш висока конформаційна лабільність β -аланіну (у порівнянні з α -аланіном) свідчить про потенційну більш високу стійкість пептидних антибіотиків на основі β -аланіну до дії ферментів та дозволяє отримувати більш ефективні антибіотики нового класу для використання у медицині. Метод змінної матриці Вільсона може використовуватися в розрахунках ангармонійних коливальних спектрів. Методика та результати моделювання фрагментів матриць можуть бути використані у дослідженнях інших конформаційно лабільних молекул.

Особистий внесок здобувача. Вклад автора в наукові публікації по темі дисертаційної роботи мав ключове значення і полягав в наступному. Роботи [15, 25, 34] є одноосібними. Ідея проведення досліджень, опублікованих в роботах [1-7, 10-12, 14-16, 18-19, 21-35], належить авторові. Ідея проведення досліджень, опублікованих в роботах [8, 9, 13, 17, 20] запропонована автором спільно із співавторами.

Постановка завдання в дослідженнях [1-7, 12, 14-16, 18-19, 21-35] належить авторові. Постановка завдання в дослідженнях [8] здійснювалася спільно з М.В. Косевіч та В.С. Шелковським. Постановка завдання в дослідженнях [10, 11] здійснювалася спільно з І. Рева. Постановка завдання в дослідженнях [13, 17] здійснювалася спільно з R.N. Compton та L. Adamowicz. Постановка завдання в дослідженнях [20] здійснювалася спільно з О.М. Плохотніченко.

Всі квантово-механічні розрахунки, результати яких опубліковані в роботах [1-35], виконані автором самостійно. Експерименти, результати яких опубліковані в роботах [1-2, 4-7, 10, 11, 14, 27-29, 31-32], виконані автором дисертації спільно з І. Рева. Експерименти, результати яких опубліковані в роботі [8], виконані М.В. Косевіч та В.С. Шелковським. Експерименти, результати яких опубліковані в роботах [13, 17], виконані N.I. Hammer та R.N. Compton. Експерименти, результати яких опубліковані в роботах [20, 33],

виконані автором спільно з О.М. Плохотніченко. Експерименти, результати яких опубліковані в роботах [22-24, 26, 35], виконані автором спільно з О.Ю. Івановим. Обговорення результатів досліджень проводилася спільно із співавторами робіт.

Автором сформульовано та обґрунтовано висновки та положення окремих розділів дисертації, сумарні висновки та узагальнення. Таким чином, особистий внесок дисертанта є визначальним.

Апробація результатів роботи. Результати роботи були представлені на багатьох вітчизняних і міжнародних наукових конференціях, у тому числі:

- XX International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals” (Beregove, Crimea, Ukraine, September 20-27, 2011);
- 6th International Conference on Cryocrystals and Quantum Crystals (Kharkiv, Ukraine, September 3-7, 2006);
- XXI International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals” (Beregove, Crimea, Ukraine, September 22-29, 2013);
- 22nd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS XXII) (Essen, Germany, September 11-16, 1994);
- International conference “Hydrogen bond” (Kyiv, Ukraine, May 10-15, 1998);
- Conference of NATO Advanced Study Institute “Low Temperature Molecular Spectroscopy” (Sintra, Portugal, September 3-15, 1995);
- 1st National Conference on Molecular Spectroscopy with international participation (Wroclaw, Poland, October 28-30, 1991);
- 1-й Українсько-польський симпозиум по водородной связи (Одесса, Украина, 4-13 сентября, 1992);
- Международная конференция по колебательной спектроскопии (Минск, Беларусь, 3-5 октября, 1993);
- XVI International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals” (Sevastopol, Ukraine, May 25 – June 1, 1993);
- XVIII International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals” (Beregove, Crimea, September 20-28, 2007);
- XIX International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals” (Beregove, Crimea, September 20-27, 2009).

Результати, викладені в дисертації, доповідались і обговорювались на наукових семінарах ФТІНТ імені Б. І. Веркіна НАН України

Публікації. Результати, що представлені у дисертації, опубліковано в 35 наукових працях, з них 23 статті у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових журналах [1-23], і в 12 тезах доповідей на наукових вітчизняних та міжнародних конференціях [24-35].

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, шести розділів, висновків, списку використаних джерел та двох додатків. Дисертація містить 86 рисунків та 32 таблиці. Список використаних джерел включає 225 посилань. Додатки А (список публікацій здобувача) та Б (повні експериментальні та розраховані ІЧ-спектральні дані для усіх досліджених

сполук) займають 38 сторінок. Обсяг основної частини – 263 стор. Повний обсяг – 348 стор.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В **анотації** стисло представлено основні результати дослідження, зазначено їхню наукову новизну та практичне значення, наведено ключові слова, а також список публікацій здобувача за темою дисертації.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, наведено інформацію про наукові програми та проекти, в рамках яких виконувалась дисертаційна робота, сформульовано мету та задачі дослідження, відзначено новизну отриманих результатів та їх практичну цінність. Приведено перелік основних методів, які використовувались для проведення досліджень, позначено особистий внесок дисертанта, наведено відомості щодо апробації отриманих результатів і дані про структуру та обсяг дисертації.

Перший розділ дисертації «Дослідження структури конформаційно лабільних багатоатомних молекул в ізольованому стані» присвячений аналізу результатів досліджень конформаційної структури лабільних молекул, отриманих різними експериментальними і розрахунковими методами. При цьому основна увага приділяється з'єднанням, які досліджуються в даній дисертаційній роботі. Коротко розглянуті можливості та обмеження кожного методу. Детально розглянуті ті методи, які використовуються в даній роботі. Зазначено, що на момент початку наших досліджень експериментальні дані про структуру амінокислот і їх похідних в ізольованому стані, були вкрай нечисленні. Аналіз літератури показав, що дослідження структури амінокислот в матрицях інертних газів стимулювали їх активні експериментальні дослідження іншими методами. Авторами цих робіт широко використовувалися результати наших досліджень.

Приводяться та обговорюються результати досліджень конформерів амінокислот у газовій фазі методом мікрохвильової спектроскопії. Зазначено, що на момент початку наших досліджень конформаційної структури амінокислот

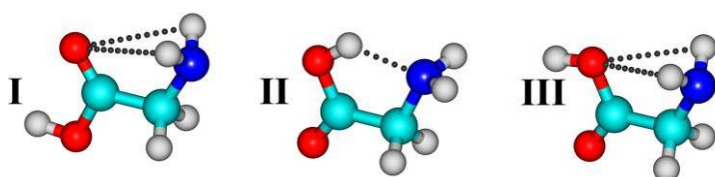


Рис. 1. Структура трьох найбільш стабільних конформерів гліцину.

методом матричної ізоляції, мікрохвильові дослідження були проведені лише для двох найпростіших амінокислот - гліцину і аланіну. В результаті дослідження структури гліцину в газовій фазі було виявлено тільки один конформер гліцину

- конформер II (Рис. 1). Слід відзначити, що цей результат був у протиріччі з результатами неемпіричних розрахунків відносних стабільностей конформерів гліцину, які показували, що найбільш стабільною формою є конформер I. В мікрохвильових дослідженнях цей конформер вдалося ідентифікувати пізніше.

Показано, що труднощі з ідентифікацією найбільш стабільного конформеру I були викликані тим, що дипольний момент цього конформеру істотно нижче, ніж у конформеру II при тому що інтенсивність обертальних

переходів, які реєструються в мікрохвильових спектрах, залежить від дипольного моменту молекули. Оскільки для інших конформерів гліцину розрахунки також показували низькі значення дипольних моментів, їх ідентифікація в мікрохвильових спектрах істотно утруднена. Це демонструє важливі обмеження методу мікрохвильової спектроскопії. По-перше, можливість ідентифікації конформерів залежить від величини їх дипольного моменту. По-друге, цей метод не дозволяє визначати заселеності конформерів, так як відносна інтенсивність їх смуг в мікрохвильових спектрах залежить не тільки від їх концентрації в газовій фазі, але і від їх дипольних моментів. Для аланіну також було показано, що відносна інтенсивність смуг конформеру II вище через значний дипольний момент цього конформеру і не відповідає його заселеності. При цьому ідентифікація інших можливих конформерів аланіну за допомогою методу мікрохвильової спектроскопії неможлива через їх низькі дипольні моменти і низькі заселеності. З цього можна зробити висновок, що і для інших амінокислот спостерігатиметься така ж ситуація.

Показано, що публікація результатів наших досліджень конформаційної структури різних амінокислот стимулювали їх подальші дослідження методом мікрохвильової спектроскопії. Були досліджені амінокислоти валін, пролін, ізолейцин і лейцин. У цих роботах авторам не вдалося виявити конформери з низькою заселеністю, які були зареєстровані в матрицях інертних газів. В цілому аналіз результатів дослідження конформаційної структури амінокислот за допомогою методу мікрохвильової спектроскопії пояснює обмеження цього методу у визначенні структури молекул з високою конформаційною лабільністю.

Зазначено, що експериментальні дослідження структури ізольованих амінокислот іншими методами вкрай обмежені і, зазвичай, обмежуються лише найпростішими амінокислотами. Так, були проведені дослідження гліцину і аланіну за допомогою методу електронної дифракції. Було встановлено, що в газовій фазі молекули цих амінокислот існують в молекулярній формі. Також була визначена структура конформерів типу I, і було висловлено припущення, що в газовій фазі можуть бути присутні й інші конформери. Однак ідентифікувати їх не вдалося. Причина цього полягає в тому, що в методі електронної дифракції точність визначення положень атомів водню для молекул, що знаходяться в газовій фазі істотно нижче, ніж інших атомів. Але, як видно на Рис. 1, відмінності в структурі найбільш стабільних конформерів амінокислот полягають саме в положенні атомів водню і це пояснює, чому за допомогою методу електронної дифракції не вдалося ідентифікувати конформери навіть найпростіших амінокислот. Також проаналізовано результати досліджень аліфатичних амінокислот у газовій фазі методом ІЧ-спектроскопії. З'ясовано, що отримані ІЧ-спектри суттєво ускладнені обертальним розщепленням коливальних смуг. Це унеможливило отримання будь-якої інформації про конформаційну структуру амінокислот. Як зазначено авторами цього дослідження, газофазні ІЧ-спектри амінокислот є конформаційно нечутливими.

Далі розглянуто результати досліджень амінокислот ізольованих у матрицях інертних газів. Приведена загальна характеристика та історія

застосування методу матричної ізоляції, а також переважні особливості цього методу. Зазначено, що до початку наших досліджень, як і у випадку інших методів, були отримані дані про структуру лише простіших амінокислот (гліцину, аланіну, проліну). Було показано, що в матрицях присутні молекулярні форми амінокислот. Також була з'ясована можливість існування різних конформерів. При цьому встановити повний набір існуючих конформерів не вдалось. Причини цього полягали у наступному. Конформери амінокислот в багатьох випадках мають близькі ІЧ-спектральні характеристики. Присутність декількох конформерів у матриці проявляється в спектрах як так зване «конформаційне розщеплення». Його прояви подібні до матричного розщеплення, яке пов'язано з можливістю існування різних по структурі міст вбудовування молекул у матрицю. Розділення конформаційного та матричного розщеплення потребує використання додаткових експериментальних підходів, які дозволяють змінювати заселеність конформерів у матриці (термічний отжиг та УФ опромінення матриць, варіювання температури випаровування сполук) або дозволяють змінювати спектральні характеристики зразків (використання ізотопозаміщених сполук або використання різних матричних газів).

В цілому зазначено невелику кількість досліджень ізольованих амінокислот, що пояснюється двома причинами. По-перше, це термічна нестабільність амінокислот, яка утруднює їх переведення у газову фазу, і, по-друге, це висока конформаційна лабільність амінокислот, яка значно ускладнює аналіз результатів експериментальних досліджень.

У той же час, великий інтерес до структури ізольованих амінокислот стимулював їх активні дослідження за допомогою розрахункових квантово-механічних методів. Характерною особливістю теоретичних робіт є постійне підвищення точності розрахунків, яке забезпечувалося протягом останніх 30 років як безперервним і дуже швидким зростанням можливостей обчислювальної техніки, так і появою нових, все більш точних, обчислювальних методів. Наведено загальну характеристику розрахункових методів та показано, які методи є оптимальними для отримання інформації про відносну стабільність конформерів, енергетичні бар'єри які розділяють конформери на поверхні потенційної енергії (ППЕ), частоти та інтенсивності коливань. Показано, що у дослідженнях конформаційно лабільних молекул вкрай необхідно проведення вичерпного пошуку усіх можливих конформерів.

В заключному підрозділі першого розділу сформульовано постановку задач дисертаційної роботи.

Таким чином, у першому розділі продемонстровано, що важливість такого класу сполук як амінокислоти та їх похідні, постійно стимулювала дослідження їх молекулярних форм, які існують у газовій фазі та у матрицях інертних газів. Незважаючи на це, кількість отриманої інформації про структуру амінокислот була дуже обмеженою, що пояснено низькою термічною стабільністю амінокислот. Зроблено висновок про те, що найбільш детальну інформацію про структуру амінокислот можливо отримати при використанні методу ІЧ-спектроскопії у матрицях інертних газів. Також показана надзвичайна ефективність поєднання експериментального методу матричної ізоляції та

неемпіричних квантово-механічних розрахунків. Особливо відзначено необхідність моделювання вбудовування молекул у матрицю за допомогою сучасних квантово-механічних методів.

Другий розділ «Особливості комбінованого експериментально-розрахункового методу досліджень структури конформаційно-лабільних молекул» присвячено детальному опису експериментальних та розрахункових методик, які використані у дисертаційній роботі. Особливу увагу приділено спільному використанню експериментального методу матричної ізоляції та різних методів квантово-хімічних розрахунків на всіх етапах дослідження. Показано, що така комбінація експерименту і розрахунків дозволяє отримувати більш детальну інформацію про структуру молекул і істотно підвищує надійність одержуваних результатів. В першому підрозділі наведено та обговорено загальну схему всіх етапів дослідження. Далі розглянуто особливості експериментального обладнання, яке використовувалось для отримання зразків матриць інертних газів та для реєстрації ІЧ-спектрів цих зразків. Відмічено особливості унікальної системи контролю концентрації молекул, що досліджуються, у матричних зразках. Відзначено, що для отримання детальної інформації про структуру конформаційно лабільних молекул необхідна реєстрація ІЧ-спектрів звязків з різною заселеністю конформерів у матриці. Наведено опис методів, які дозволяють змінювати заселеність. Це термічний отжиг матриць, який призводить в багатьох випадках до інтерконверсії конформерів, УФ опромінення матриць та варіювання температури випаровування сполук. Також пояснено необхідність використання підходів, які дозволяють змінювати спектральні характеристики зразків (використання ізотопозаміщених сполук або використання різних матричних газів). У наступному підрозділі наведено опис розрахункових методів, які використовуються для отримання інформації, що необхідна для аналізу експериментальних даних. Розглянуто переваги та обмеження методів, що використовуються. Також проаналізовано точність різних методів квантово-механічних розрахунків. Зокрема відмічено, що сучасні методи дозволяють отримувати дані про структуру та відносні стабільності різних конфігурацій молекул з точністю, яка порівняна з точністю експериментальних вимірювань. Далі описано процедуру вичерпного сканування багатовимірної поверхні потенційної енергії молекул, яка дозволяє встановити повний набір конформерів лабільних молекул. Наведено деталі використання теоретичних методів, які враховують особливості проведення розрахунків у дослідженнях конформаційно лабільних сполук. Також наведено детальний опис методики квантово-механічного моделювання великих фрагментів кристалів інертних газів з вбудованими молекулами, що досліджуються. Відмічено, що така методика використовується вперше. Приведена коротка інформація про конфігурацію комп'ютерних кластерів Університета Арізони (США) та ФТІНТ НАН України, які використовувалися для проведення розрахунків.

Третій розділ «Конформаційна структура амінокислот: роль внутрішньомолекулярних водневих зв'язків» присвячено дослідженням структури найпростіших амінокислот з метою встановлення загальних залежностей між структурою конформерів та їх ІЧ-спектральними

Ізольовані молекули амінокислот включають протонодонорні і протоноакцепторні групи і, таким чином, здатні утворювати різні внутрішньо-молекулярні водневі зв'язки, які в значній мірі і визначають їх конформаційну структуру. У зв'язку з цим використання методу ІЧ-спектроскопії є досить ефективним, так як ІЧ-спектри надзвичайно чутливі до утворення водневих зв'язків. Водневі зв'язки відіграють визначальну роль в більшості процесів функціонування біомолекул. У зв'язку з цим особливу увагу було приділено впливу водневих зв'язків на структуру амінокислот, а також їх спектральним проявам.

Результати досліджень викладено наступним чином. Спочатку була розглянута молекулярна структура двох найпростіших амінокислот - гліцину і аланіну. Їх бічні групи не мають внутрішніх обертальних ступенів свободи і повний набір можливих конформерів цих амінокислот визначається тільки зміною взаємної орієнтації карбоксильної і аміно груп, які однакові для всіх амінокислот (крім проліну). Таким чином, результати, отримані для гліцину і аланіну, потім були використані для визначення структури більш складних амінокислот. Далі була досліджена структура проліну - єдиного представника природних амінокислот, молекула якого містить п'ятичленний цикл, що з'єднує атом азоту аміногрупи і α -атом вуглецю. На підставі отриманих даних було встановлено вплив внутрішньомолекулярних водневих зв'язків на структуру амінокислот, відносні стабільності конформерів і їх ІЧ-спектральні характеристики. Також представлені результати досліджень зв'язку між конформаційною структурою ізольованих конформерів амінокислот та амінокислотних фрагментів у пептидах.

На Рис. 1 показана структура найбільш стабільних конформерів гліцину, яка характерна для усіх амінокислот. У всіх конформерах присутні внутрішньомолекулярні водневі зв'язки. В залежності від типу водневого зв'язку для конформерів, використовуються наступні позначення: конформер I з

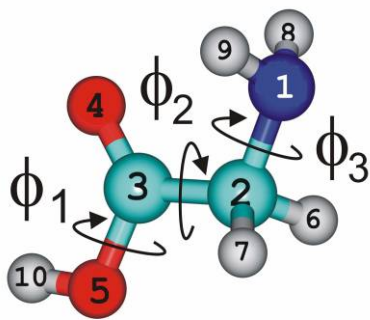


Рис. 2. Нумерація атомів і двогранні кути молекули гліцину.

біфуркаційним водневим зв'язком $\text{NH}_2 \cdots \text{O}=\text{C}$, конформер II з водневим зв'язком $\text{N} \cdots \text{H}-\text{O}$ і конформер III з біфуркаційним водневим зв'язком $\text{NH}_2 \cdots \text{O}-\text{C}$.

Для пошуку всіх можливих конформерів гліцину і α -аланіну та для визначення їх відносної стабільності і бар'єрів конформаційних переходів був проведений вичерпний аналіз поверхні потенційної енергії (ППЕ) цих сполук за допомогою неемпіричних квантово-механічних розрахунків. У структурних дослідженнях молекул поверхня ППЕ є графічним представленням повної енергії молекули розрахованої як функція від декількох внутрішніх координат. У разі амінокислот в якості таких координат використовують значення двогранні кутів, що відповідають обертанням навколо різних зв'язків і описують зміну взаємної орієнтації різних фрагментів молекули. Структура молекул гліцину і α -аланіну може бути визначена з використанням

всього трьох двогранні кутів, які показані на Рис. 2. Результати розрахунків ППЕ гліцину показано на Рис. 3. Проекції ППЕ α -аланіну мають аналогічний вид.

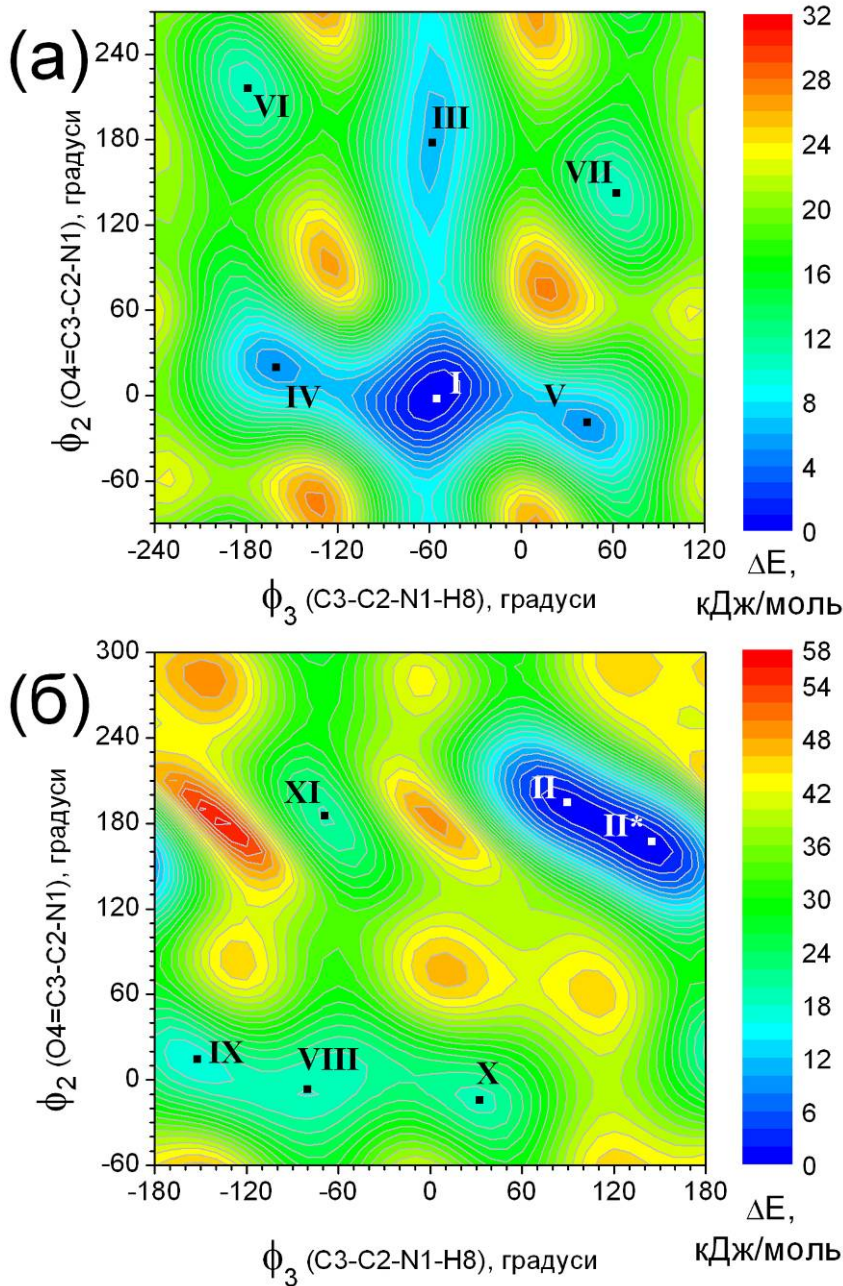


Рис. 3. Двовимірні проекції поверхні потенційної енергії гліцину, розраховані методом MP2/aug-cc-pVDZ. Скан 1 (а) та Скан 2 (б).

зв'язку з тим, що конфігурації I - XI амінокислотного фрагмента є загальними для всіх амінокислот. Точність розрахунків структури конформерів гліцину оцінювалась на підставі порівняння з експериментальними (електронографія) структурними параметрами. Були встановлені відносні енергії конформерів II і III по відношенню до конформеру I гліцину, які складають 3,60 і 6,84 кДж/моль (DFT/B3LYP/aug-cc-pVDZ) та 3,52 і 6,77 кДж/моль (MP2/aug-cc-pVDZ). Відносні енергії використовувались для встановлення заселеностей конформерів.

Розрахунки ППЕ проводилися окремо для цис і транс положень карбоксильної групи гліцину і α -аланіну. Такий поділ можливий тому, що цис і транс конформери амінокислот зазвичай розділені дуже високим енергетичним бар'єром, що становить близько 40 кДж/моль. Були проведені по два скани (Скан 1 і Скан 2) ППЕ. Конфігурації карбоксильної групи були цис ($\phi_1 \approx 0^\circ$) і транс ($\phi_1 \approx 180^\circ$) для Скана 1 і Скана 2, відповідно. Аналіз розрахованих ППЕ дозволив ідентифікувати по 11 конформерів гліцину і α -аланіну. Як вже зазначалось, характерною особливістю всіх конформерів є присутність в їх структурі різних водневих зв'язків. Встановлення повного набору конформерів є виключно важливим у

Висновки про конформаційний склад гліцину та аланіну біли зроблені при порівнянні розрахованих методом DFT/B3LYP/aug-cc-pVDZ коливальних спектрів конформерів та експериментальних ІЧ-спектрів у матрицях аргону. ІЧ-спектри були отримані для гліцину, α -аланіну і їх дейтерозаміщених: C,C-d₂-гліцин, N,N,O-d₃-гліцин, повністю дейтерованого гліцину і N,N,O-d₃- α -аланіну. Далі були розглянуті різні області ІЧ-спектрів гліцину і α -аланіну для ідентифікації в них смуг коливань різних конформерів.

Ідентифікація конформерів спочатку була проведена за допомогою найбільш інтенсивної смуги в спектрах, яка відповідає валентним коливанням C=O групи, розташованої в діапазоні 1800-1750 см⁻¹ (Рис. 4).

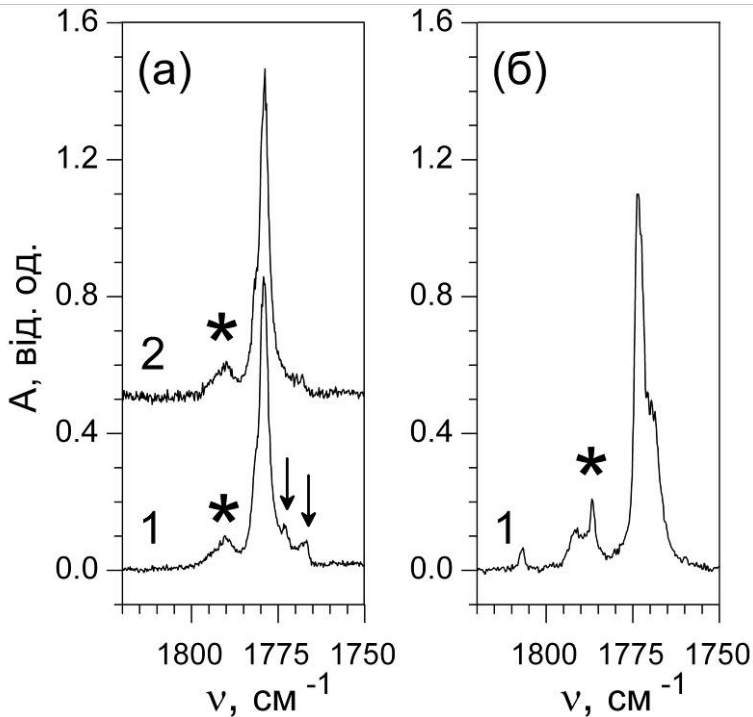


Рис. 4. Область C=O валентних коливань ІЧ-спектрів гліцину (а) і α -аланіну (б) (матриця Ar). 1 - спектр зареєстрований відразу після наплення зразка. 2 - спектр зареєстрований після отжигу зразка ($T_{отж} = 20$ К, 30 хв.). * - смуги конформера II. Стрілками відзначені смуги конформера III.

конформеру I. На підставі цього смуги 1790 см⁻¹ в ІЧ-спектрі гліцину і 1787 см⁻¹ в спектрі α -аланіну віднесені до коливань конформера II. Для конформерів III гліцину і α -аланіну розрахунки передбачають низькочастотний зсув на -8 і -6 см⁻¹, відповідно. В спектрі гліцину спостерігається низькочастотна розщеплена смуга з максимумами при +1773 і 1767 см⁻¹ (Рис. 3.6) яка віднесена до коливань конформера III. Експериментальні зсуви (-6 і -12 см⁻¹) також узгоджуються з результатами розрахунків. Важливим є той факт, що в спектрі гліцину, зареєстрованому після отжигу матриці, ця смуга не спостерігається. Також слід зазначити, що в спектрі α -аланіну відповідна смуга в цій області не

Як видно на Рис. 4, в цій області спектрів спостерігається ряд смуг, що прямо свідчить про присутність в матрицях декількох конформерів амінокислот. Найбільш інтенсивні смуги (1779 см⁻¹ в спектрі гліцину і 1773 см⁻¹ в спектрі α -аланіну) віднесені до C=O валентних коливань найбільш стабільного і, відповідно, найбільш заселеного конформера I. Віднесення менш інтенсивних смуг засновано на результатах розрахунку частот коливань мінорних конформерів. Розрахунки (B3LYP/aug-cc-pVDZ) передбачають високочастотний зсув смуги C=O валентних коливань для конформера II на +16 і +22 см⁻¹ для гліцину і α -аланіну, відповідно, по відношенню до найбільш інтенсивної смуги

спостерігається навіть в спектрі зареєстрованому до отжигу матриці. Це свідчить про те, що конформер **III** α -аланіну відсутній в зразках, що зареєстровані відразу після напилення матриці. Причиною такої різної поведінки конформерів гліцину і α -аланіну може бути істотна різниця енергетичних бар'єрів конформаційного переходу **III**→**I**. Для перевірки цього припущення було проведено розрахунки бар'єрів цього переходу з використанням методу B3LYP/6-31++G(d,p). Результати розрахунків показали, що, дійсно, величина бар'єра конформаційного переходу **III**→**I** становить 4,0 кДж/моль в гліцині і тільки 1,8 кДж/моль для α -аланіну. В результаті конформер **III** гліцину вдається зафіксувати в матриці, а аналогічний конформер α -аланіну не спостерігається через його перехід в конформер **I**.

Отримані дані дозволяють зробити дуже важливий висновок про порогову величину енергетичного бар'єру структурних переходів в конформаційно лабільних молекулах, при якій вдається зафіксувати конформер в матриці. Якщо величина бар'єра на ППЕ, що розділяє два конформера, перевищує приблизно 5 кДж/моль, то обидва конформера фіксуються в матриці. В іншому випадку відбувається конформаційний перехід менш стабільного конформера в більш стабільний. Зазначена величина є приблизною, оскільки вона отримана в результаті моделювання і може залежати від обраного розрахункового методу та базисного набору. Крім того, на переходи між конформаціями впливає температура матриці (як у випадку гліцину), а також просторова структура груп, обертання яких призводить до зміни конформації молекули. Незважаючи на це, розрахунки величини бар'єрів конформаційних переходів можуть бути дуже важливим інструментом для визначення набору конформерів більш складних молекул, які можуть бути присутніми в матриці і для більш точної оцінки заселеностей конформерів в матрицях, які повинні змінюватися в результаті конформаційних переходів.

Конформаційний перехід **III**→**I** був виявлений при аналізі області валентних коливань C=O групи. Очевидно, що і в інших областях ІЧ-спектра гліцину ізольованого в аргоновій матриці повинні спостерігатися аналогічні зміни, пов'язані зі зменшенням кількості конформера **III**. Аналіз спектрів зареєстрованих до і після отжигу матриці дозволив ідентифікувати більшість інтенсивних смуг конформера **III**. Відповідні ділянки спектрів гліцину представлені на Рис. 5. Зокрема, смуги конформера **III** виявлені для деформаційного коливання ОН групи (Рис. 5б), торсіонного коливання ОН групи (Рис. 5в) і деформаційного коливання NH₂ групи (Рис. 5г). У наведених на Рис. 5 спектральних діапазонах також ідентифіковані смуги конформера **II**.

Порівняння експериментальних і розрахованих інтенсивностей валентних коливань C=O групи дозволяє оцінити заселеності різних конформерів гліцину і α -аланіну. Для гліцину заселеність основного конформера **I** становить близько 70%, в той час як заселеності конформерів **II** і **III** приблизно однакові і рівні 15%.

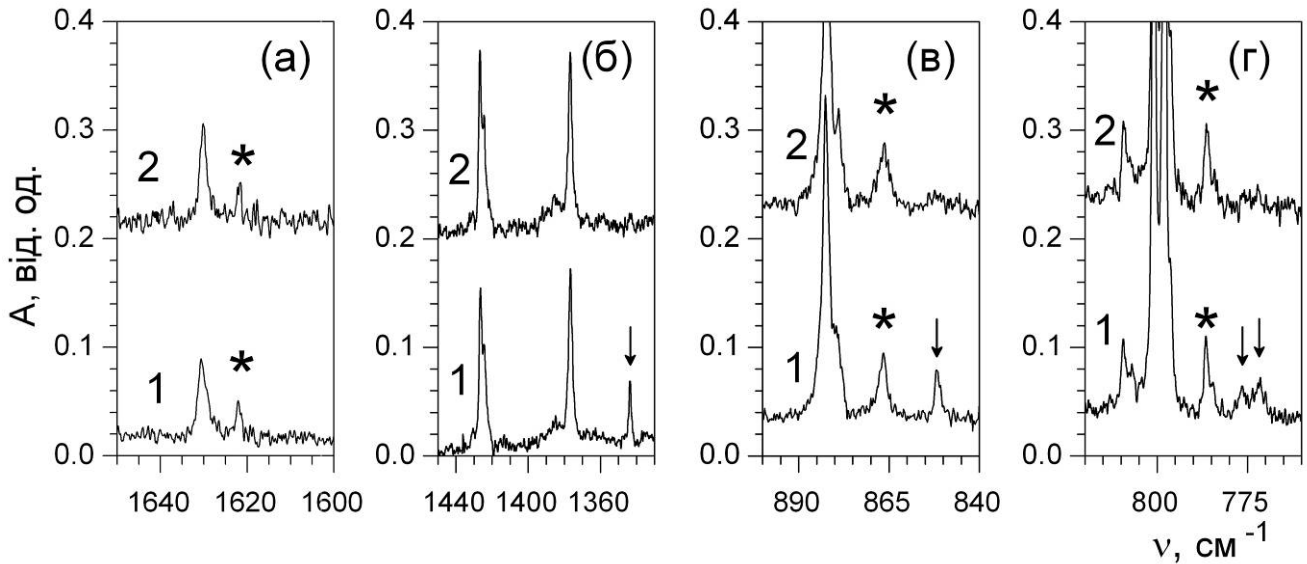


Рис. 5. Різні діапазони ІЧ-спектру гліцину (матриця Ar). 1- спектр зареєстрований відразу після наплення зразка. 2- спектр зареєстрований після отжигу зразка ($T_{\text{отж}} = 20 \text{ K}$, 30 хв.). * - смуги конформера II. Стрілками відзначені смуги конформера III.

У високочастотній області ІЧ-спектра гліцину ($3600\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$, Рис. 6) спостерігається інтенсивна смуга при 3560 cm^{-1} , яка віднесена до валентних коливань ОН групи конформера I. Розрахунки передбачають дуже близькі частоти для валентного ОН коливання конформерів гліцину I і III (3586 і 3584 cm^{-1} , відповідно), в результаті чого вони не можуть бути розділені у спектрі. У той же час, смуга валентного ОН коливання конформера II істотно зміщена в низькочастотну область через утворення сильного внутрішньомолекулярного водневого зв'язку $\text{N}\cdots\text{H}-\text{O}$. Величина низькочастотного зсуву становить 360 cm^{-1} . Розрахунки передбачають дуже сильне збільшення інтенсивності цього коливання конформеру II (до $277,8 \text{ km/mol}$) в порівнянні з конформером I ($58,2$

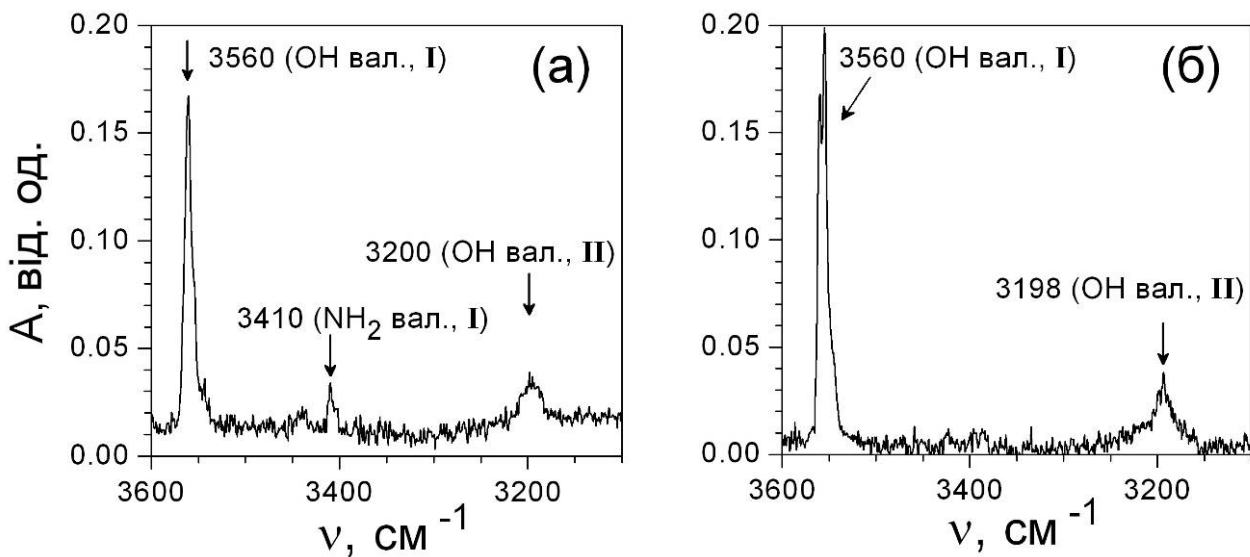


Рис. 6. Область О-Н валентних коливань ІЧ-спектрів гліцину (а) і α -аланіну (б) (матриця Ar).

км/моль) і це дозволяє легко ідентифікувати смугу цього коливання. В спектрі α -аланіну смуги ОН валентних коливань конформерів **I** і **II** виявлені при 3560 і 3193 cm^{-1} , відповідно. Їх положення практично збігається з відповідними смугами гліцину, що свідчить про високу характеристичність смуг ОН валентних коливань амінокислот. Крім того, присутність смуги поглинання близько 3200 cm^{-1} в ІЧ-спектрах матрично-ізольованих амінокислот є надійним індикатором існування в матриці конформеру типу **II** з внутрішньомолекулярним водневим зв'язком $\text{N}\cdots\text{H}-\text{O}$. Також смуги конформерів **I**, **II** і **III** зареєстровані в спектрах ізотопозаміщених сполук.

Порівняння експериментальних і розрахованих в гармонійному наближенні частот ОН, NH і CH валентних коливань гліцину і α -аланіну показує для цих коливань істотну різницю між розрахунком і експериментом. Ця різниця викликана сильним ангармонізмом цих коливань через їх великі амплітуди. Для ОН валентного коливання різниця між розрахунком і експериментом після масштабування частот перевищує 100 cm^{-1} . Можна припустити, що це викликано більш сильним ангармонізмом цього коливання через відносно сильніший водневий зв'язок $\text{N}\cdots\text{H}-\text{O}$ в конформері **II**.

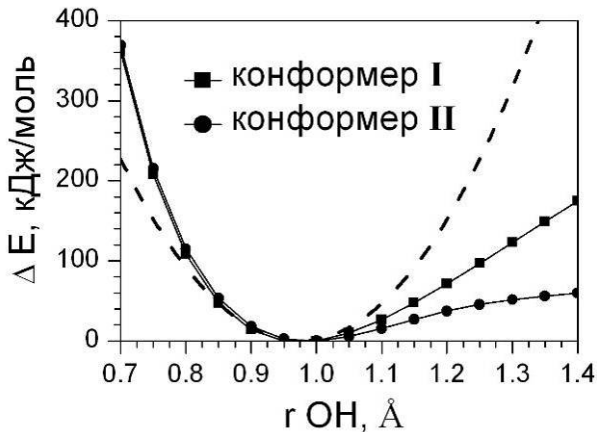


Рис. 7. Змінення енергії конформерів гліцину **I** і **II** при збільшенні довжини ОН зв'язку (розрахунок методом MP2/aug-cc-pVDZ). Пунктирна лінія - квадратичний поліном, що відповідає гармонійному наближенню.

відповідає гармонійному наближенню в стандартних розрахунках частот коливань. При цьому відмінність для конформера **II** виражена значно сильніше. В результаті цього, як вже зазначалося вище, різниця між експериментальним значенням частоти ОН валентного коливання і частотами, розрахованими в гармонійному наближенні, є досить значною.

Були проведені розрахунки ангармонійних частот ОН валентного коливання конформерів гліцину **I** і **II** з використанням різних методів в гармонійному і ангармонійному наближенні. З'ясовано, що розрахунки в гармонійному наближенні нездатні правильно передбачити частоту ОН валентного коливання конформера **II**. Відмінності від експериментального

На Рис. 7 приведено результати розрахунків залежності енергії конформерів гліцину **I** і **II** від довжини ОН зв'язку, які були проведені за допомогою методу MP2/aug-cc-pVDZ. Як видно, сильний внутрішньомолекулярний водневий зв'язок в конформері **II** призводить до значної зміни поверхні потенційної енергії цього конформера. При подовженні ОН зв'язку в конформері **II** відбувається менш сильне підвищення енергії завдяки взаємодії атома водню з атомом азоту аміногрупи (Рис. 1). На Рис. 7 також видно, що для обох конформерів спостерігається істотна відмінність збільшення відносної енергії від квадратичного полінома, який

значення (3200 cm^{-1}) перевищують 200 cm^{-1} для немасштабованих розрахункових частот і навіть використання для розрахунків частот високоточного методу CCSD/aug-cc-pVDZ не покращує збіг з експериментом. Масштабування гармонійних частот дозволяє суттєво покращити збіг для частоти ОН валентного коливання конформера **I**, однак, для конформера **II** відмінність між розрахунком і експериментом залишається значною. Врахування ангармонізму значно підвищує точність розрахунків, хоча для ОН валентного коливання конформера **II** точність розрахунку значно нижче, ніж для інших коливань. Найкращий збіг з експериментом спостерігається при використанні методу змінної G-матриці – різниця між експериментальною та розрахованою частотами ОН валентного коливання конформера **II** становить лише 7 cm^{-1} . Слід зазначити, що при використанні постійної G-матриці, а також у ангармонічних розрахунках за допомогою методу MP2/aug-cc-pVDZ, отримані значення частот значно відрізняються від експериментальної частоти коливання. Це демонструє важливість врахування зміни ефективної наведеної маси при використанні методу змінної G-матриці для коливань з великою амплітудою.

Проведені дослідження дозволили отримати дані про конформаційну структуру ряду ізольованих амінокислот та визначити молекулярні параметри для різних конформерів. Ці дані можуть бути використані для параметризації методів молекулярного моделювання структури біомолекул. Однак виникає питання про відповідність даних, отриманих для конформерів ізольованих амінокислот, структурі амінокислотних фрагментів пептидів. Це попребує проведення досліджень з метою встановлення ступеня відповідності структурних параметрів ізольованих конформерів проліну і структурних параметрів пролінових фрагментів в реальних пептидах. Як модельний пептид був обраний проліновмісний циклодекапептид антаманід: cyclo (-Ala1 - Pro2 - Pro3 - Val 4 - Phe5 - Phe6 - Pro7 - Pro8 - Phe9 - Phe10 -), первинна структура якого показана на Рис. 8. Цей пептид включає 4 пролінових фрагмента, 4 фенілаланінових фрагмента і по одному фрагменту валіну і аланіну. Структура пептиду та його комплексу з молекулами води була розрахована з використанням неемпіричного методу DFT/B3LYP/6-31++G** та напівемпіричного методу AM1. В якості стартової була використана експериментальна геометрія антаманіду. Метод AM1 використовувався для порівняння його точності з результатами DFT розрахунків. Цей метод вимагає значно менших витрат обчислювальних ресурсів і в подальшому може бути використаний для моделювання дуже великих пептидів, для яких проведення неемпіричних розрахунків вкрай ускладнено.

Молекула антаманіда (Рис. 8) може бути умовно розділена на три фрагменти: два β -вигина, які складаються з фрагментів Pro2-Pro3 і Pro7-Pro8, відповідно, а також β -лист, що складаються з паралельних ділянок пептидного ланцюга з чотирма міжланцюговими водневими зв'язками $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ (Рис. 8). Аналіз отриманих структурних параметрів пролінових фрагментів антаманіду і їх порівняння із структурними параметрами конформерів проліну **Ia** і **IIa** показує, що всі пролінові фрагменти в антаманіде (β -вигини) мають близькі значення довжин зв'язків і валентних кутів. Різниця досягає $0,01 \text{ \AA}$ для довжин зв'язків і 1°

для валентних кутів. У той же час спостерігаються значні відмінності торсіонних параметрів цих пролінових фрагментів.

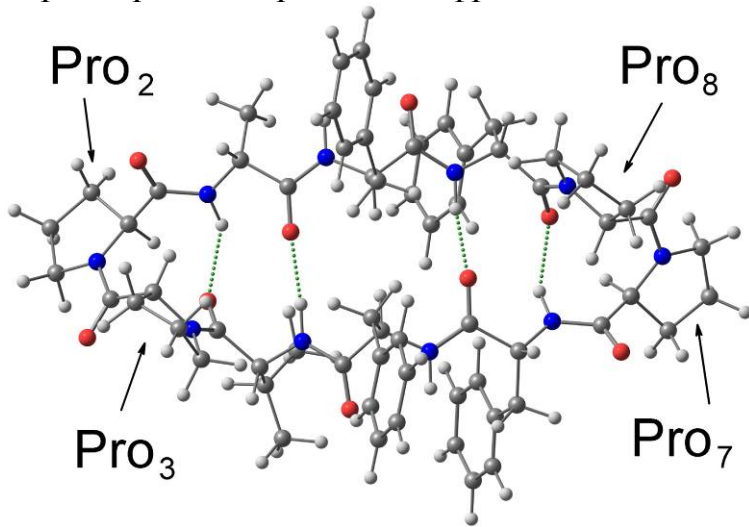


Рис. 8. Розрахована (DFT/B3LYP/6-31++G**) структура антаманіду.

С-С-N-С складають $47,9^\circ$ і $31,1^\circ$, відповідно. До другої групи віднесені фрагменти Pro3 і Pro8, для яких величини торсіонних кутів 1-2-3-4 складають $-142,7^\circ$ і $-118,1^\circ$. Аналогічні відмінності спостерігаються також для інших торсіонних кутів.

В Таблиці 1 наведені розраховані значення торсіонних кутів пролінових фрагментів антаманіду і відповідних їм торсіонних кутів двох найбільш стабільних конформерів проліну, які були зареєстровані в матрицях аргону. Як видно, пролінові фрагменти антаманіда можуть бути розділені на дві групи в залежності від значень їх торсіонних параметрів. До першої групи належать фрагменти Pro2 і Pro7. Величини їх торсіонних кутів

Таблиця 1						
Розраховані методом B3LYP/6-31++G** значення торсіонних кутів (градуси) пролінових фрагментів антаманіда і конформерів проліну						
Торс. кут	Фрагмент Pro ₂	Фрагмент Pro ₇	Конформер Ia	Фрагмент Pro ₃	Фрагмент Pro ₈	Конформер IIa
1-2-3-4	47,9	31,1	16,1	-142,7	-118,1	-169,9
1-2-3-5	-130,4	-144,7	-163,3	41,1	63,3	36,0
4-3-2-7	-83,3	-72,1	-98,1	32,0	31,9	13,8

Порівняння торсіонних параметрів пролінових фрагментів антаманіду конформерів проліну (Таблиця 1) показує, що фрагменти Pro2 і Pro7 є структурними аналогами конформеру проліну **Ia**, а фрагменти Pro3 і Pro8 є структурними аналогами конформеру проліну **IIa**. Це показує, що при моделюванні структури пептидів методами молекулярної динаміки або молекулярної механіки для різних фрагментів проліну на ділянках β-вигинів повинні використовуватися різні набори параметрів, які відповідають конформерам проліну **Ia** і **IIa**.

В останньому параграфі сформульовано висновки з результатів досліджень.

Для ряду аліфатичних амінокислот (гліцину, α-аланіну, валіну та проліну) вперше визначено повний набір конформерів, які фіксуються в низькотемпературних матрицях.

Показано, що при підвищенні температури аргонної матриці від 13К до 20К в ІЧ-спектрах гліцину спостерігаються зміни пов'язані з конформаційним переходом III \rightarrow I.

Встановлено визначальний вплив внутрішньомолекулярного водневого зв'язування на структуру і відносні стабільності конформерів амінокислот. Всі без винятку конформери стабілізовані водневими зв'язками різного типу, які мають істотний вплив на частоти коливань конформерів. Зсуви смуг коливань при утворенні водневих зв'язків складають зазвичай десятки, а в деяких випадках сотні зворотних сантиметрів і це значно полегшує аналіз ІЧ-спектрів та ідентифікацію в них смуг різних конформерів.

Присутність в структурі конформерів водневих зв'язків істотно підсилює ангармонізм коливань тих структурних груп, які безпосередньо беруть участь в утворенні цих водневих зв'язків. Це визначає необхідність врахування ангармонізму при моделюванні ІЧ-спектрів конформерів. На прикладі гліцину показано, що запропонований метод змінної G-матриці дозволяє розраховувати ангармонійні частоти коливань з високою точністю.

Слід зазначити, що в отриманих ІЧ-спектрах спостерігається розщеплення деяких смуг коливань, яке не може бути пояснено присутністю різних конформерів, а також резонансом Фермі. Можливо, це є проявом так званого матричного розщеплення, яке викликане існуванням різних способів вбудовування досліджуваних молекул в кристал інертного газу. Ця проблема потребує окремого розгляду, і результати досліджень матричного розщеплення представлені в Розділі 5.

Четвертий розділ «Конформаційне охолодження в низькотемпературних матрицях» присвячено аналізу структури амінокислот, які мають значно складнішу конформаційну структуру, дослідження якої потребують використання додаткових підходів. У цьому розділі для визначення структури таких об'єктів (амінокислоти лейцину і β -аланіну, а також найпростішого пептиду N-ацетилгліцину) на додаток до методів які використовувались у попередньому розділі, були також застосовані УФ опромінення зразків і проведення вимірювань в різних матрицях. УФ опромінення дозволяє змінювати заселеності різних конформерів в матрицях і це істотно спрощує інтерпретацію ІЧ-спектрів.

Проведення вимірювань в матрицях різних інертних газів дозволяє розділяти спектральні прояви матричного ефекту і спектральні прояви присутності в матриці різних конформерів.

Перший підрозділ присвячено дослідженню конформаційної структури амінокислоти лейцину (Рис. 9), яка має найбільш лабільною серед усіх амінокислот. Структура молекули лейцину може бути охарактеризована п'ятьма двогранними кутами (Рис. 9). Двогранні кути ϕ_1 - ϕ_3 лейцину аналогічні гліцину, а двогранні кути ϕ_4 і ϕ_5

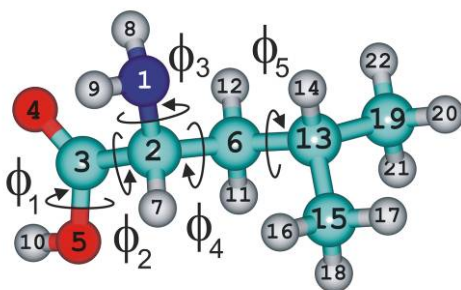


Рис. 9. Нумерація атомів і двогранні кути в молекулі лейцину.

описують конфігурацію бічний групи лейцину. Одночасне сканування усіх двограних кутів є неможливим через велику кількість точок на такій ППЕ (36^5). Тому було використано процедуру розділення ППЕ на поверхні меншої розмірності. Спочатку були проведені розрахунки ППЕ повністю аналогічні Сканам 1 і 2 гліцину та було знайдено 13 конфігурацій амінокислотного фрагменту молекули лейцину. Після цього для кожної конфігурації були проведені додаткові скани ППЕ (Скан 3). Метою цих розрахунків було визначення всіх можливих конфігурацій бічної групи для кожної з конфігурацій, амінокислотного фрагменту. Найбільш важливі ППЕ, отримані в цих розрахунках, показано на Рис. 10.

Всього було виявлено 105 конформерів лейцину. У порівнянні з попереднім дослідженням використовувана методика аналізу ППЕ молекул з високою конформаційною лабільністю дозволила ідентифікувати 28 нових конформерів. Слід зазначити що деякі з цих конформерів мають низькі відносні стабільності і це є важливим для визначення правильного конформаційного складу лейцину.

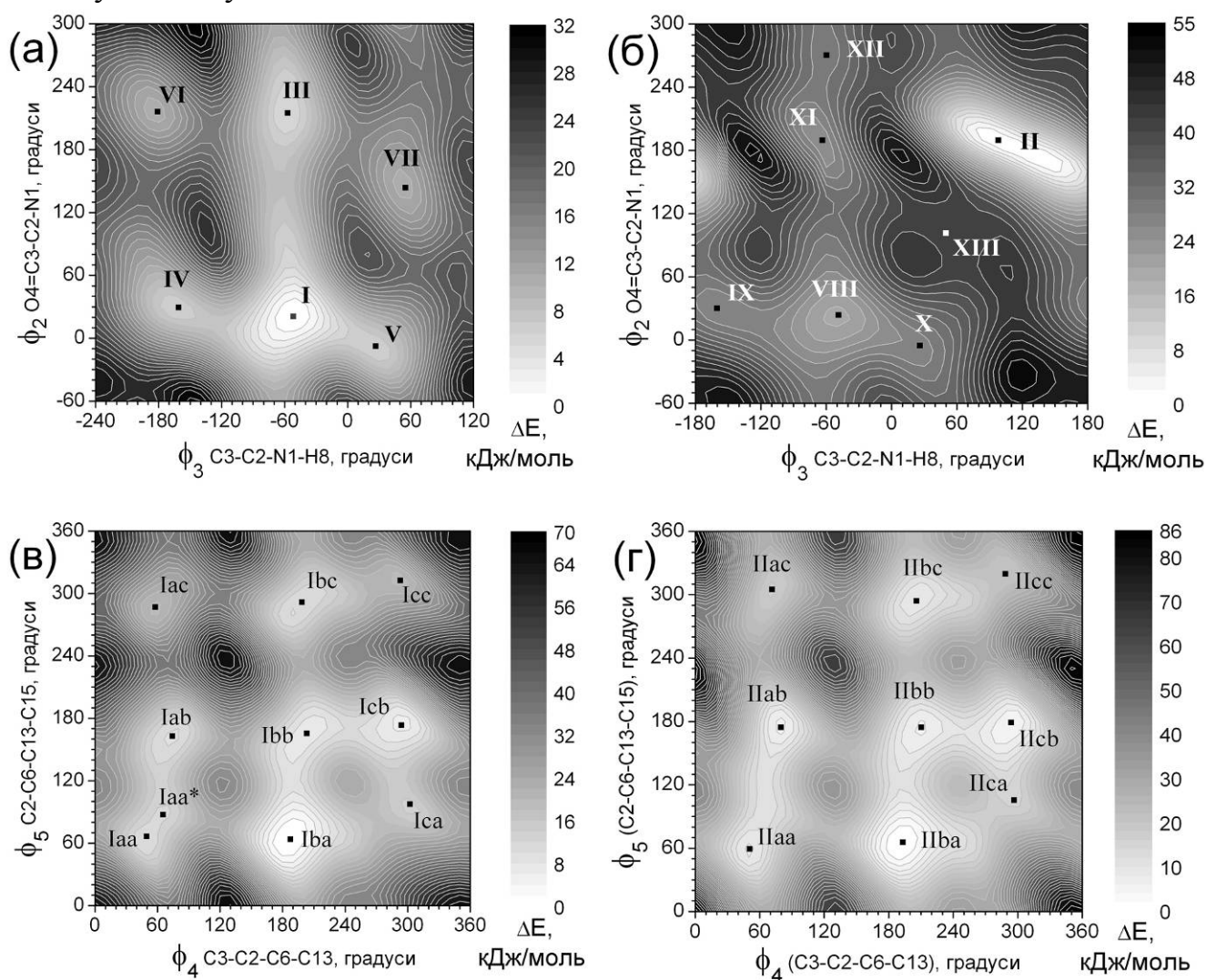


Рис. 10. Проекції ППЕ лейцину (а - Скан 1, б - Скан 2, в - Скан 3 для конфігурації I, г - Скан 3 для конфігурації II) розраховані методом В3LYP/aug-cc-pVDZ.

Ґрунтуючись на вільних енергіях Гіббса були розраховані заселеності конформерів лейцину при температурі випаровування. Для визначення того, які конформери можуть бути присутніми в матрицях і оцінки відповідних матричних заселеностей, були проведені додаткові дослідження ППЕ лейцину. Заселеність кожного конформера з низькою відносною енергією збільшувалася за рахунок додавання заселеностей тих конформерів з більш високою енергією, які відокремлені низькими енергетичними бар'єрами на ППЕ. За допомогою методу MP2/aug-cc-pVDZ були проведені розрахунки величин енергетичних бар'єрів для всіх можливих конформаційних переходів лейцину і були побудовані відповідні схеми конформаційного охолодження лейцину, які

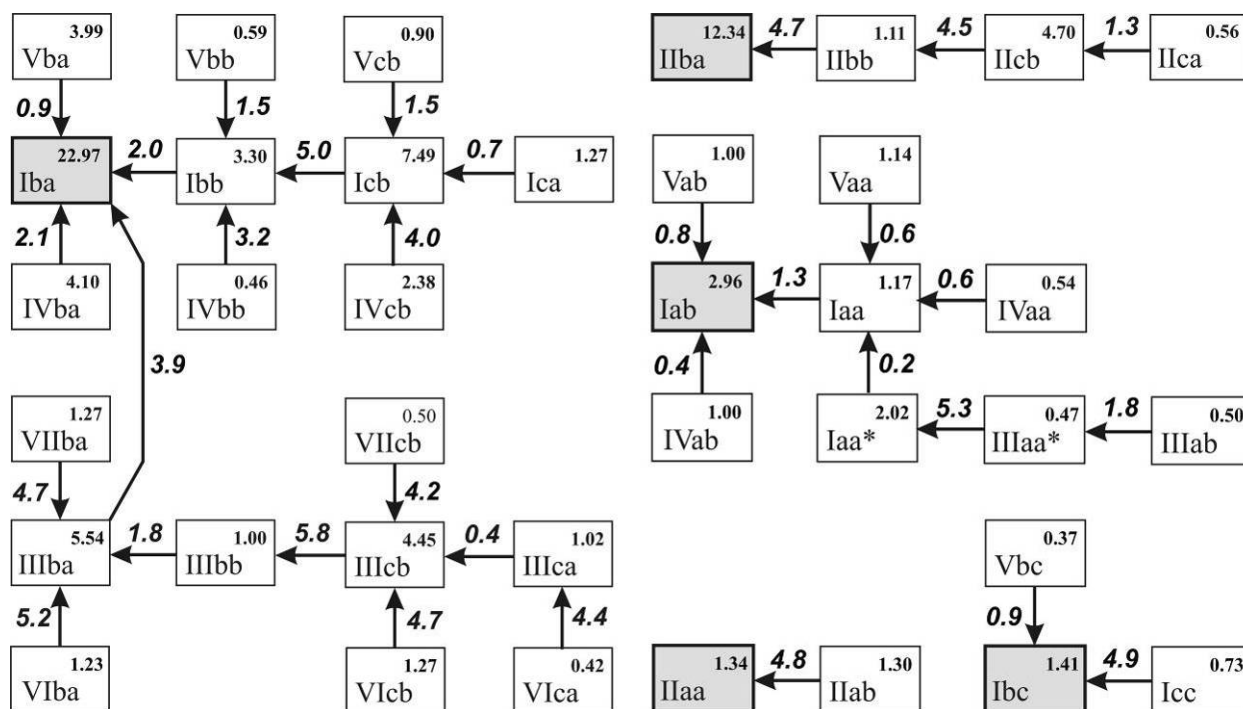


Рис. 11. Шляхи інтерконверсії конформерів лейцину. Величини енергетичних бар'єрів показані над або рядом зі стрілками. Наведено заселеності конформерів в газовій фазі.

Таблиця 2. Розраховані заселеності (n, %) конформерів лейцину в газовій фазі при 440 K та в матрицях інертних газів.

Конф.	n	
	Газова фаза	Матриця
Iba	22,97	64,15
IIba	12,34	18,71
Iab	2,96	10,80
IIaa	1,34	2,64
Ibc	1,41	2,51
IIbc	0,79	0,79
IIIcc	0,40	0,40

представлені на Рис. 11. У Таблиці 2 наведені заселеності конформерів в газовій фазі і в матрицях. Представлені результати показують, що тільки п'ять конформерів лейцину можуть бути присутніми в матрицях з заселеністю яка перевищує 2%. Важливим є те, що розраховані заселеності конформерів лейцину в матрицях інертних газів істотно відрізняються від заселеності в газовій фазі через інтерконверсію конформерів. Так, заселеність найбільш стабільного конформера **Iba** збільшується з приблизно 23% в газовій

фазі до понад 64% у матрицях. Аналіз отриманих даних показав, що два найбільш заселених конформера - **Iba** і **IIba** - могли бути легко ідентифіковані в матричних спектрах. Також можна було припустити, що вдасться виявити в спектрах найбільш інтенсивні смуги третього конформера, **Iab**, розрахована заселеність якого в матриці становить 10,8%. Ідентифікація спектральних проявів інших, менш заселених, конформерів мало ймовірна. Розраховані заселеності конформерів лейцину були використані для аналізу експериментальних ІЧ-спектрів.

Далі було досліджено вплив ультрафіолетового опромінювання на ІЧ-спектри матрично-ізолюваного лейцину. Смуги ОН і NH валентних коливань конформерів лейцину спостерігаються в діапазоні $3600\text{-}3100\text{ см}^{-1}$ (Рис. 12). Смуга ОН валентного коливання найбільш стабільного конформера лейцину **Iba** легко ідентифікується при $3565,7\text{ см}^{-1}$. Аналогічні смуги в спектрах інших амінокислот спостерігалися при 3560 см^{-1} для гліцину і α -аланіну. Менш інтенсивна смуга при $3568,9\text{ см}^{-1}$ віднесена до коливання мінорного конформера лейцину **Iab**. Широка смуга ОН валентного коливання конформера **IIba** сильно зрушена в низькочастотну область через сильний внутрішньомолекулярний водневий зв'язок і спостерігається при $3215,8\text{ см}^{-1}$. Аналогічні смуги спостерігалися для конформерів типу **II** в спектрах інших амінокислот.

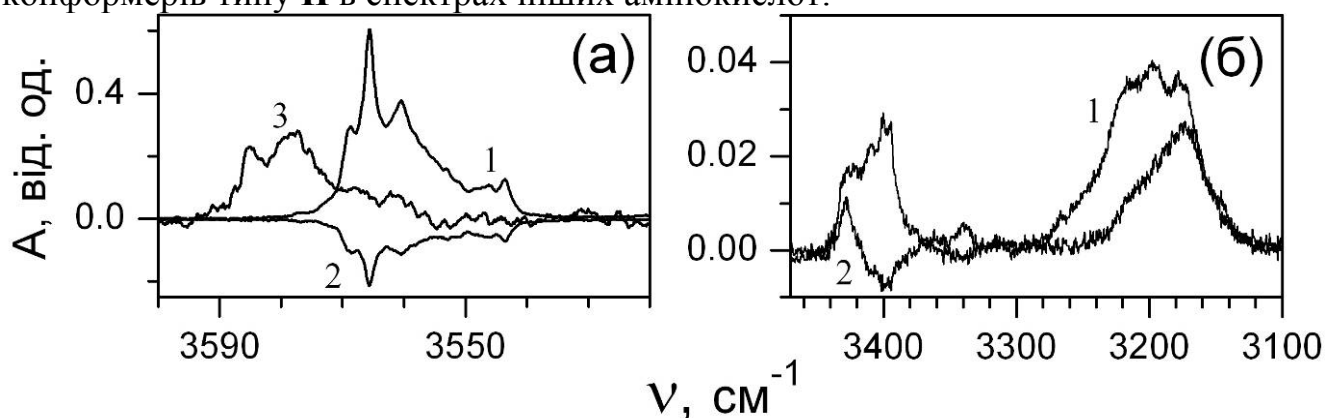


Рис. 12. (а) Область ОН валентних коливань ІЧ-спектру лейцину; (б) область валентних коливань NH_2 групи та Н-зв'язаної ОН групи. 1 – спектр в матриці Ar відразу після наплення. 2 – диференційний спектр після УФ опромінення ($t = 40$ хв.) 3 – ІЧ-спектр в матриці Ne відразу після наплення.

Надійне віднесення смуг $3568,9$ і $3215,8\text{ см}^{-1}$ до коливань конформерів лейцину з вільною і Н-зв'язаною ОН групою, відповідно, є дуже важливим через різну поведінку цих смуг при УФ опроміненні матриці. Як видно з Рис. 12 (крива 2) інтенсивність смуг, віднесених до коливань конформерів з вільною ОН групою (**Iba** і **Iab**) в ІЧ-спектрах, що зареєстровані після ультрафіолетового опромінювання, знижується. У той же час інтенсивність смуги конформера **IIba** зростає. З цього чітко видно, що УФ опромінення змінює заселеності конформерів. Очевидно, що інтенсивності всіх інших смуг відповідних конформерів повинні змінюватися аналогічним чином. Цей ефект використано для ідентифікації смуг конформерів в інших областях спектрів.

Використовуючи експериментальні та розраховані інтенсивності коливань конформерів лейцину можна оцінити експериментальні заселеності конформерів в матрицях інертних газів. Така оцінка зроблена не для окремих конформерів, а для двох груп, які включають конформери з конфігураціями амінокислотного фрагменту **I** і **II**. Це пов'язано з тим, що смуги цих двох груп конформерів можуть бути дуже точно розділені через різну поведінку їх інтенсивностей при УФ опроміненні. Оцінка заселеності заснована на аналізі даних, що отримані для валентних C=O коливань, які є найбільш інтенсивними в ІЧ-спектрах матрично-ізолюваного лейцину. Експериментальні заселеності були розраховані з використанням експериментальних інтегральних інтенсивностей і розрахованих інтенсивностей валентних C=O коливань конформерів. Деталі цих розрахунків наведені в розділі 2. Розрахунки показують, що приблизно 85% молекул лейцину в матрицях знаходяться в конфігурації **I**, а решта (15%) знаходяться в конфігурації **II**. Отримані експериментальні значення заселеностей двох груп конформерів лейцину добре узгоджуються з результатами розрахунків, які, як було показано вище, дають значення в 78% і 22% для конфігурацій **I** і **II**, відповідно.

Дослідження молекулярної структури лейцину дозволяють зробити висновок про те, що врахування інтерконверсії між конформерами, розділеними низькими енергетичними бар'єрами є критично важливим для визначення конформаційного складу лабільних молекулярних систем. У разі лейцину більшість низькоенергетичних конформерів, що мають значні заселеності при експериментальній температурі випаровування, в дійсності при попаданні в матриці інертних газів переходять в більш стабільні конфігурації. В результаті тільки невелике число конформерів лейцину спостерігається в експерименті.

В четвертому розділі також встановлено конформаційний состав β -аланіну і N-ацетилгліцину та встановлено зв'язок між їх структурою, та коливальним спектрами.

В цілому результати, представлені в даному розділі, демонструють високу ефективність розробленого комбінованого підходу для визначення структури молекул, що володіють високою конформаційною лабільністю. Вперше встановлена конформаційна структура важливих біологічних сполук - лейцину, β -аланіну і N-ацетилгліцину. Вичерпне сканування ППЕ дозволило визначити повний набір конформерів для кожної сполуки, їх відносні стабільності і заселеності в газовій фазі при температурі, що відповідає експериментальній температурі наплення. Розраховані енергетичні бар'єри, що розділяють конформери на ППЕ, дозволили визначити шляхи переходу конформерів в більш стабільні форми. Показано, що в результаті такого конформаційного охолодження заселеності конформерів в газовій фазі і в матрицях істотно відрізняються, що необхідно враховувати при аналізі експериментальних ІЧ-спектрів. Використання УФ-опромінення і температурного отжигу матриць дозволило змінювати заселеності конформерів в зразках.

П'ятий розділ «Вплив матриць на ІЧ-спектри і структуру ізолюваних молекул» присвячено детальному вивченню впливу матричного оточення на ізолювані молекули. На першому етапі було доцільним проведення дослідження структурно жорстких молекул, для того щоб виключити прояв конформаційного розщеплення спектральним смуг і, таким чином, розділити конформаційне та матричне розщеплення в ІЧ-спектрах. Цілями цього дослідження було визначення оптимального розміру фрагменту кристалу інертного газу для моделювання матричних ефектів, визначення енергетичних і структурних параметрів, які можуть використовуватися для локалізації оптимальних матричних сайтів для розміщення молекул. Одним з основних завдань, враховуючи, що систематичне моделювання матричних ефектів до теперішнього часу не проводилося, було встановлення принципової можливості врахування впливу матриць інертних газів на структуру і коливальні спектри ізолюваних молекул. Досягнення зазначених цілей при дослідженні структурно жорсткої молекули мурашиної кислоти дозволило в подальшому розширити використання в моделюванні підходи на конформаційно-лабільні молекули. Результати встановлення впливу матричного оточення на структуру амінокислоти β -аланіну і пептиду N-ацетилгліцину представлено в другій частині п'ятого розділу.

Різниця частот коливань молекули в газовій фазі та у матриці є матричним зсувом. В більшості випадків при ізоляції молекул в матрицях для валентних коливань спостерігається низькочастотний зсув смуг в ІЧ-спектрах, хоча в деяких випадках для деформаційних та торсіонних коливань відбувається зсуви в високочастотну область. На Рис. 13 на прикладі жорсткої молекули мурашиної кислоти показано графічне представлення матричних зсувів для валентних коливань ОН і С = О зв'язків.

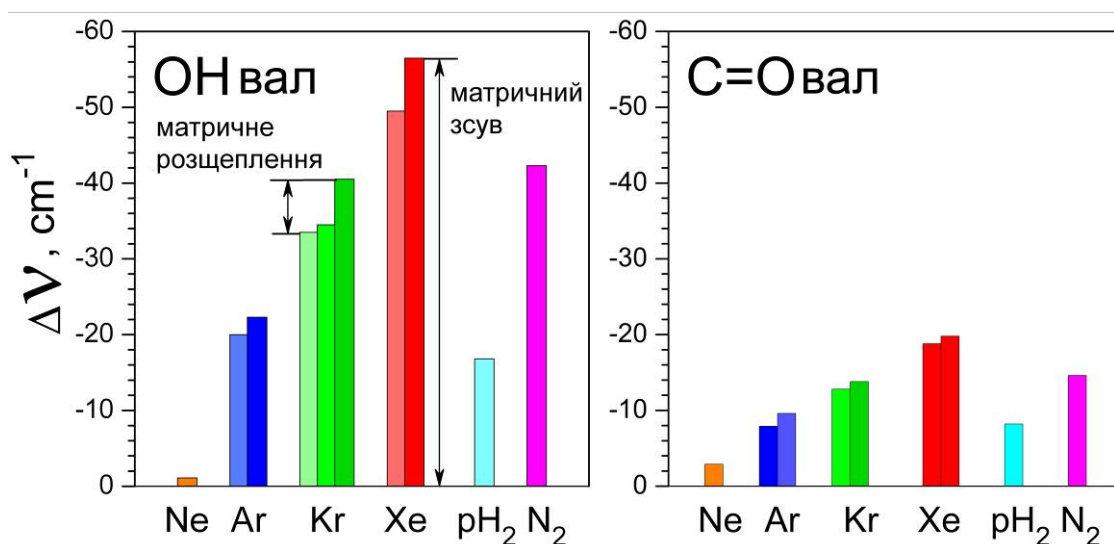


Рис. 13. Відмінності експериментальних значень фундаментальних частот коливань мурашиної кислоти зареєстрованих для газової фази і для матричних зразків. Негативні значення відповідають низькочастотному зсуву матричної смуги по відношенню до газової фази.

Наведені дані демонструють значне збільшення матричних зсувів при переході від неоновій матриці до ксеноновій. При цьому матричні зсуви відрізняються для різних способів вбудовування молекули в матрицю. Як показано на Рис. 13, відмінність матричних зсувів спостерігається в ІЧ-спектрах як матричне розщеплення. Спектральні прояви матричного розщеплення подібні проявам конформаційного розщеплення. Для підвищення загальної інформативності методу матричної ізоляції при визначенні структури молекул необхідно розрізняти ці спектральні ефекти. Це вимагає проведення моделювання систем, що максимально відповідають матрицям інертних газів. Дослідження комплексів мурашиної кислоти в матрицях інертних газів показало високу ефективність функціоналу щільності M06-2X у розрахунку подібних систем. Це дозволило встановити структуру матричних сайтів та їх відносні стабільності. Проведено моделювання коливальних спектрів кластерів та продемонстровано дуже гарний збіг з експериментальними ІЧ-спектрами, отриманими для мурашиної кислоти в матрицях інертних газів. Методика моделювання, протестована на прикладі мурашиної кислоти, була далі використана для встановлення структури біологічних молекул, ізольованих у матрицях.

В ІЧ-спектрах β -аланіну і його дейтероаналога спостерігається ряд смуг, які не були віднесені до коливань конформерів. Біло висловлено припущення, що це пов'язано з проявом матричного розщеплення спектральних смуг через існування різних способів вбудовування β -аланіну в матрицю аргону. При розміщенні жорсткої молекули мурашиної кислоти в матриці інертних газів, основною причиною зсуву спектральних смуг є взаємодія молекули з матричним оточенням. Для конформаційно лабільних молекул, таких як β -аланін, зсуви смуг можуть також відбуватися через зміну просторової структури молекули. Розрахунки матричних ефектів виконувалися для фрагментів кристалів аргону в які конформери β -аланіну вбудовувалися різними способами. В якості початкової моделі був використаний фрагмент ГЦК решітки аргону, що містить 171 атом. Кластер має кубічну форму розміром 15,4 Å. Розмір цього кластера достатній для розміщення конформерів β -аланіну (протяжність найдовшого конформера β -аланіну IV становить 6,4 Å). Порожнини всередині кластера аргону для включення в нього конформерів β -аланіну утворювалися видаленням кількох атомів аргону з центру кластера. Число видалених атомів і їх положення визначають розмір і форму порожнини. Моделювання було проведено для 7 кластерів з різним розміром та формою порожнин утворених видаленням від 5 до 8 атомів аргону. Для всіх кластерів були проведені розрахунки структури, енергії утворення та коливальних спектрів. Найбільш стабільними були кластери VAI@Ar164A та VAI@Ar164B . Порожнини у цих кластерах мають однаковий розмір (молекула заміщує 7 атомів аргону) та відрізняються формою. Їх енергії утворення складають -25,1 та -22,2 кДж/моль, відповідно. Структура найбільш стабільного кластера VAI@Ar164A (конформер VAI у кластері з 164 атомів аргону) показана на Рис. 14.

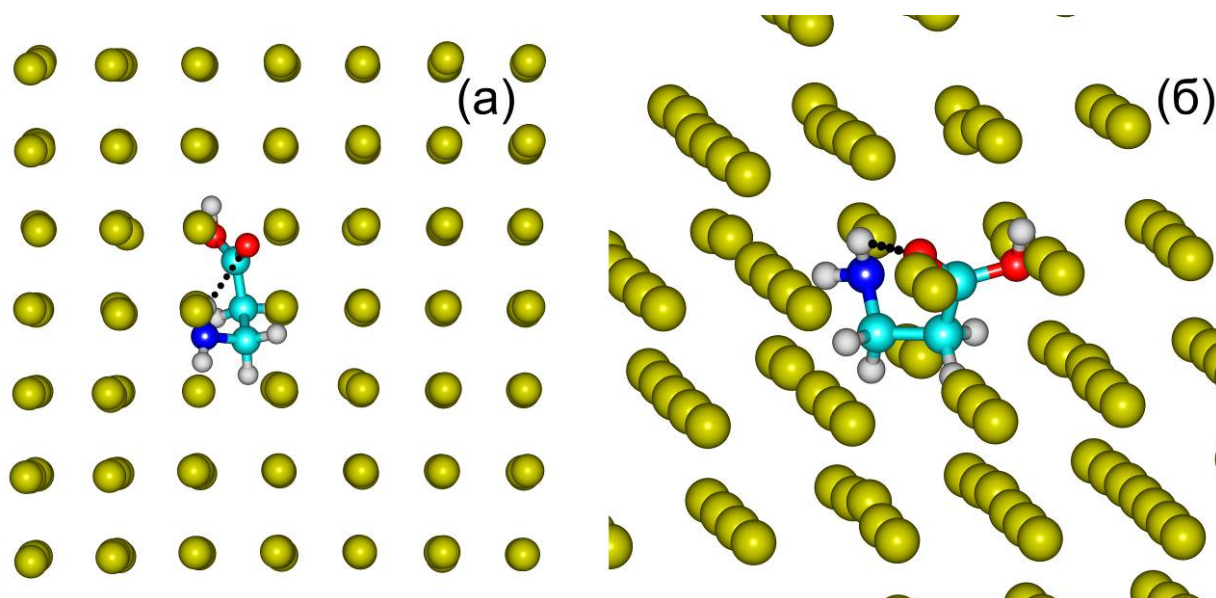


Рис. 14. Структура найбільш стабільного кластера $\text{BAI@Ar}_{164}\text{A}$ розрахована методом M06-2X. Вигляд спереду (а) та збоку (б).

Було проаналізовано зміни у структурі конформеру β -аланіну BAI в порівнянні зі структурою одиночної молекули. Ці дані демонструють значні зміни двогранні кутів, в той час як зміни довжин зв'язків і величин кутів між зв'язками менш помітні. Зміни двогранні кутів при встановленні молекули в матрицю в деяких випадках досягають декількох десятків градусів. Це особливо проявляється для двогранні кутів, які описують взаємну орієнтацію карбоксильної і аміногрупи і, таким чином, визначають загальну форму молекули. Такі значні зміни структури при вбудовуванні в матрицю характерні тільки для конформаційно лабільних молекул. Як показали розрахунки ППЕ β -аланіну, зміни внутрішньої енергії молекул при такій деформації молекул можна порівняти з енергією деформації матричного оточення. Структурні зміни дозволяють молекулам краще вписуватися в матричну порожнину. Саме зміни структури конформерів, а також взаємодія з атомами інертного газу є причиною матричних зрушень частот коливань. Порівняння експериментальних ІЧ-спектрів β -аланіну та β -аланіну- d_3 та спектрів, розрахованих для кластерів показано в Таблиці 3. Отримані дані дозволили ідентифікувати прояви матричного розщеплення в експериментальних ІЧ-спектрах. Відповідні полоси, які відповідають такому розщепленню, наведені в Таблиці 3 в квадратних дужках. Слід відзначити хороший збіг експериментального та розрахованого матричного розщеплення спектральних смуг. Аналогічне моделювання впливу матриць на структуру та ІЧ-спектри було проведено для N -ацетилгліцину. В результаті для цієї сполуки також було проведено розділення конформаційного та матричного розщеплення.

Таблиця 3. Розраховані частоти коливань (cm^{-1}) конформерів β -аланіну (BA) і β -аланіну- d_3 (BAD) для поодиноких молекул (Од.) і для молекул в матриці аргону (Мат.). Експериментальні смуги показані в квадратних дужках. Розраховані матричні зрушення наведені в круглих дужках

Колебание	BAI@Ar166		BAI@Ar164A	BAI@Ar164B	BAV@Ar164A	
	Од.	Мат.	Мат.	Мат.	Од.	Мат.
OH str (BA)	3741	3745 (+4)	3730 (-11)	3733 (-8)	3227	3198 (-29)
OD str (BAD)	2721	2724 (+3)	2712 (-9)	2717 (-4)	2355	2333 (-22)
C=O str (BA)	1799	1801 (+2)	1791 (-8)	1795 (-4)	1814	1807 (-7)
C=O str (BAD)	1785	1787 (+2)	1777 (-8)	1780 (-5)	1803	1796 (-7)
			[3561,0]	[3564,2]		
			[2627,6]	[2630,1]		
			[1769,6]	[1771,3]		
			[1758,4]	[1761,5]		

В кінці розділу наведено висновки, зроблені на підставі отриманих результатів. Відзначено, що моделювання структури і коливальних спектрів кластерів інертних газів з конформаційно лабільними молекулами проведено вперше. Це дозволило не тільки встановити вплив матричного оточення на коливальні спектри ізолюваних молекул, а й визначити розмір і форму матричних сайтів, а також з'ясувати як змінюється структура самої ізолюваної молекули при ізоляції її у матриці. Показано, що визначення оптимального розміру матричного сайту може бути зроблено на підставі аналізу розрахованих для різних кластерів енергій деформації матричного оточення. Встановлено, що співвідношення об'єму вбудованої в матрицю молекули і об'єму атомів матричних газів дозволяє визначити лише мінімально можливий розмір матричного сайту. Практично для всіх розрахованих кластерів оптимальний розмір сайту, що необхідний для розміщення молекули, перевершує мінімальний розмір, визначений просто зі співвідношення об'ємів. Показано, що розмір сайту визначається також формою молекули, що вбудовується. Зокрема встановлено, що конформери N-ацетілгліцину, які мають приблизно однаковий об'єм, але різну просторову структуру, при вбудовуванні в аргоніву матрицю заміщають різну кількість атомів аргону.

Результати представлених в п'ятому розділі досліджень дозволили визначити особливості поведінки конформаційно лабільних молекул при їх ізоляції у матрицях інертних газів. Так, для β -аланіну показано, що взаємодія з матрицею призводить до істотної зміни торсійних параметрів, що описують взаємне розташування різних фрагментів молекули. Така зміна в деяких випадках досягає декількох десятків градусів і є додатковою причиною зміни частот коливань ізолюваних молекул. Відмінності в структурі матричного оточення для різних сайтів призводять до різних зрушень частот коливань, що і проявляється в спектрах як поява додаткових смуг. Для N-ацетілгліцину і β -аланіну в результаті проведеного моделювання ідентифіковані ІЧ-спектральні прояви такого матричного розщеплення. Показано високу точність мета-

гібридного функціонала щільності M06-2X для розрахунків комплексів з атомами інертних газів, для яких важливий точний облік дисперсійних взаємодій. Також показана висока ефективність цього функціоналу при розрахунках коливальних спектрів. Гарний збіг розрахованих і експериментальних величин матричних зсувів свідчить про відповідність розрахункового підходу реальним експериментальним умовам.

Шостий розділ «Різниця структури молекул в газовій фазі і в матрицях інертних газів» присвячено дослідженню структури молекул, для яких взаємодія з матрицею призводить до якісної зміни конформаційного складу у порівнянні з газовою фазою. У попередньому розділі було показано як взаємодія з матричним оточенням впливає на структуру та ІЧ-спектри ізольованих молекул. Слід відзначити, що розглянута зміна характеристик конформерів мала тільки кількісний характер. При взаємодії з матрицею змінювались структурні параметри конформерів, в першу чергу двогранні кути. Така зміна структури призводила до зсувів частот коливань. При цьому набір конформерів не змінювався. В даному розділі досліджена структура молекул, для яких взаємодія з матрицею призводить до якісних змін конформаційного складу у порівнянні з газовою фазою. Прикладом таких змін може бути фіксація в матрицях конформерів, які не існують в газовій фазі. Встановлення причин, які призводять до таких змін структури, є важливим тому що така інформація дозволяє розділити особливості структури, які притаманні безпосередньо молекулам, що досліджуються, та зміни структури за рахунок міжмолекулярних взаємодій.

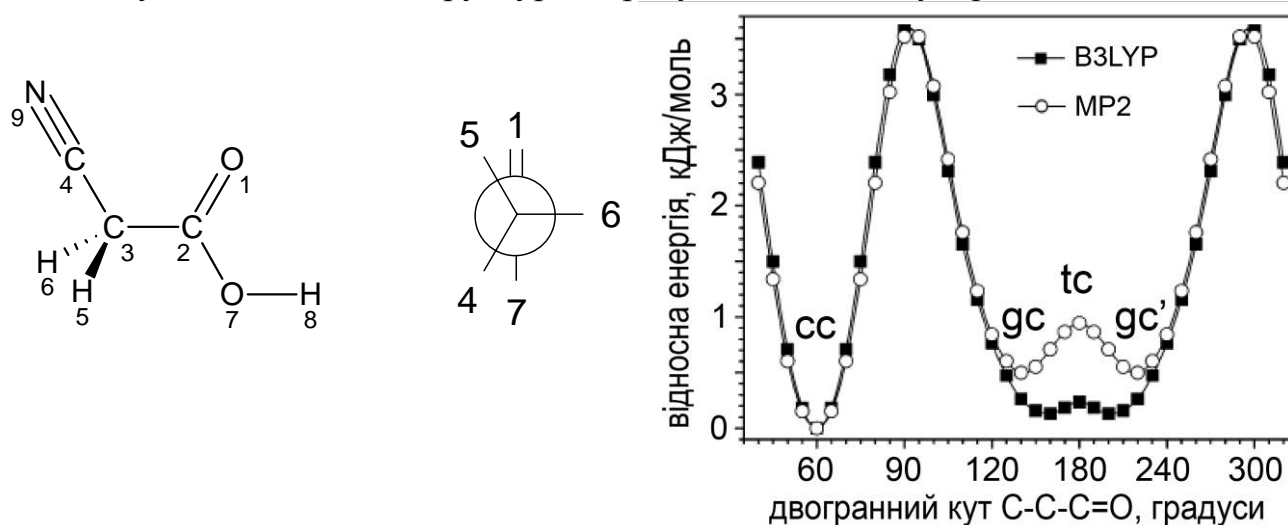


Рис. 15. Конформер *cc* ціанооцетової кислоти та Ньюманівська проекція уздовж осі C3-C2 для конформеру *gc* (зліва). Поверхня потенційної енергії для обертання карбоксильної групи (справа).

Розглянуто зміну структури молекули ціанооцетової кислоти (Рис. 15) при ізоляції в матрицях інертних газів у порівнянні з газовою фазою. Розрахунки ППЕ показують (Рис. 15) існування двох конформерів (*cc* та *gc*) у газовій фазі. У той же час аналіз ІЧ-спектрів ціанооцетової кислоти показали існування у матрицях ще одного конформеру (*tc*). Цей висновок зроблено на підставі аналізу ІЧ-спектрів у матрицях аргону, криптону та ксенону, та спектрів отриманих при

покроковому отжигу матриць в діапазоні від 8 до 30 К. Слід відзначити, що у газовій фазі плаский конформер **tc** є сідловою точкою на ППЕ молекули, що розділяє два дзеркально симетричних конформера **gc**. У матриці аргону конформер **tc** стає мінімумом на ППЕ кластеру завдяки низькій енергії деформації кристалу при вбудовуванні плаского конформера між {111} слоями аргону.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі було вирішено важливу проблему молекулярної фізики, а саме: встановлено залежність між молекулярною структурою та термодинамічними і ІЧ спектральними характеристиками конформаційно лабільних біологічних молекул, зокрема амінокислот та їх похідних у ізольованому стані. Для вирішення проблеми дослідження був використаний комплексний експериментально-розрахунковий підхід, що поєднував унікальну методика низькотемпературної ІЧ-спектроскопії матрично-ізольованих сполук та сучасні квантово-механічні методи розрахунків. Представлені результати дослідження структури амінокислот показали, що навіть такі невеликі молекули мають високу конформаційну лабільність і існують у вигляді різних конформерів. Встановлено, що термодинамічні та ІЧ-спектральні характеристики конформерів амінокислот визначаються типом внутрішньомолекулярних водневих зв'язків. Отримані загальні спектральні і структурні характеристики вивчених сполук є основою для дослідження структури лабільних сполук з аналогічними функціональними групами, багато з яких є важливими біологічними молекулами. Отримані дані сприяють розумінню функціонування білків в організмі людини і важливі для розробки нових лікарських препаратів та біологічно-активних речовин на основі амінокислот і пептидів.

Зроблені такі основні висновки:

1. Вперше встановлено залежність між молекулярною структурою та енергетичними і ІЧ спектральними характеристиками конформаційно лабільних біологічних молекул, зокрема амінокислот та їх похідних, в ізольованому стані.
2. Вперше визначено повний набір конформерів молекулярних форм низки аліфатичних амінокислот та їх похідних та визначені заселеності спостережуваних конформерів.
3. Встановлена відповідність конформерів молекулярної форми амінокислот структурі амінокислотних фрагментів пептидів. Зокрема на зразку амінокислоти проліну вперше показано, що в залежності від міста розташування амінокислотних фрагментів в пептидній ланцюзі вони є структурними аналогами різних конформерів.
4. Вперше встановлено визначальний вплив типу внутрішньомолекулярного водневого зв'язку на структуру і відносні стабільності конформерів амінокислот та показано, що використовуючи ІЧ-спектральні

характеристики конформерів можливо визначати тип водневих зв'язків у амінокислотах.

5. Вперше з'ясовано механізм впливу конформаційного охолодження у матрицях на суттєву різницю між конформаційним составом амінокислот у газовій фазі та в ізольованому стані.

6. Вперше показана висока ефективність запропонованого методу матриці Вільсона для точного врахування ангармонізму коливань та продемонстрована особлива важливість такого методу для молекул з сильними внутрішньо-молекулярними водневими зв'язками.

7. Вперше показана можливість розділення проявів матричних ефектів і конформаційного розщеплення в ІЧ-спектрах на підставі квантово-механічного моделювання фрагментів кристалів інертних газів.

8. Вперше з'ясовано причини якісних змін поверхні потенційної енергії лабільних молекул у матрицях, таких як поява додаткових конформерів та реверсу стабільності конформерів у порівнянні з газовою фазою.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Stepanian S.G. Matrix-isolation infrared and theoretical studies of the glycine conformers / **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, M.T.S. Rosado, M.L.T.S. Duatre, R. Fausto, E.D. Radchenko, L. Adamowicz // J. Phys. Chem. A. – 1998. – Vol. 102, No 6. – P. 1041-1054.
2. Stepanian S.G. Conformational behaviour of α -alanine. Matrix-isolation infrared and theoretical ab initio study/ **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, E.D. Radchenko, L. Adamowicz // J. Phys. Chem. A. – 1998. – Vol. 102A, No 24. – P. 4623-4629.
3. Alexandrov V. Theoretical ab initio study of OH vibrational band in gas-phase glycine conformers / V. Alexandrov, **S. Stepanian**, L. Adamowicz L. // Chem. Phys. Lett. – 1998. – Vol. 291, No 1-2. - P. 110-120.
4. Stepanian S.G. Combined matrix-isolation infrared and theoretical DFT and ab-initio study of the nonionized valine conformers / **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, E.D. Radchenko, L. Adamowicz // J. Phys. Chem. A. – 1999. – Vol. 103, No 22. – P. 4404-4412.
5. Stepanian S.G. Combined matrix isolation IR spectroscopic and ab-initio quantum chemical study of the molecular structure of aminomethylphosphinic acid / **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, E.D. Radchenko, Z. Latajka, M. Wierzejewska, H. Ratajczak // J. Mol. Struct. – 1999. – Vol. 484, No 1-3. – P. 19-30.
6. Reva I.D. Combined FTIR matrix isolation and ab initio studies of pyruvic acid: proof for existence of the second conformer / I.D. Reva, **S.G. Stepanian**, L. Adamowicz, R. Fausto // J. Phys. Chem. A. – 2001. – Vol. 105, No 19. – P. 4773-4780.
7. Stepanian S.G. Conformers of non-ionized proline. Matrix-isolation infrared and post-Hartree-Fock ab-initio study / **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, E.D. Radchenko, L. Adamowicz // J. Phys. Chem. A. – 2001. – Vol. 105, No 47. – P. 10664-10672.

8. Shelkovsky V.S. Modeling of recognition sites of nucleic acid bases and amide side chains of amino acids. Combination of experimental and theoretical approaches / V.S. Shelkovsky, **S.G. Stepanian**, I.K. Galetich, M.V. Kosevich, L. Adamowicz. // Eur. Phys. J. D. – 2002.- Vol. 20, No 3. – P. 421-430.
9. Pajak J. Matrix-Isolation FT-IR Studies and Theoretical Calculations of the Vibrational Properties of 4-methyl-2'-hydroxy-4'-alkyloxyazobenzenes / J. Pajak, R. Ramaekers, M. Rospenk, V. Alexandrov, **S. Stepanian**, L. Adamowicz, G. Maes // Chem. Phys. – 2003.- Vol. 286, No 2-3.- P. 193-204.
- 10.Reva I.D. Missing Conformers. Comparative Study of Conformational Cooling in Cyanoacetic Acid and Methyl Cyanoacetate Isolated in Low Temperature Inert Gas Matrixes / I.D. Reva, **S.G. Stepanian**, L. Adamowicz, R. Fausto R. // Chem. Phys. Lett. – 2003. – Vol. 374, No 5-6. – P. 631-638.
- 11.Reva I.D. Conformational behavior of cyanoacetic acid: a combined matrix isolation Fourier transform infrared spectroscopy and theoretical study / I.D. Reva, **S.G. Stepanian**, L. Adamowicz, R. Fausto // J. Phys. Chem. A – 2003. – Vol. 107, No 33. – P. 6351-6359.
- 12.Stepanian S.G. Uracil-adenine dimer connected by an excess electron / **S.G. Stepanian**, A.F. Jalbout, C.S. Hall, L. Adamowicz // J. Phys. Chem. A – 2003. – Vol. 107, No 39. – P. 7911-7914.
- 13.Hammer N.I. Isotope effects in dipole-bound anions of acetone / N.I. Hammer., R.N. Compton, **S.G. Stepanian**, L. Adamowicz // Phys. Rev. Lett. – 2005. – Vol. 94, No 15. – P. 153004-1 – 153004-4.
- 14.Pivovarov V.B. Infrared spectra and the structure of 1-methyladenine in an argon matrix and solutions / V.B. Pivovarov, **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, G.G. Sheina, Yu.P. Blagoi // Spectrochim. Acta A. – 1995. –Vol. 51, No 5. – P. 843-853.
- 15.Степаньян С.Г. Теоретическое *ab-initio* исследование барьеров внутримолекулярных конформационных переходов в глицине и α -аланине / **С.Г. Степаньян** // Биополимеры и клетка. – 1999. – Т. 15, № 5. – С. 374-382.
- 16.Степаньян С.Г. Квантовомеханическое исследование структуры пролинсодержащего циклодекапептида антаманита / **С.Г.Степаньян**, О.В.Дурнева // Вісник Харківського Національного Університету ім. В.Н. Каразіна. - № 488, Біофізичний Вісник. – 2000. – вип. 6(1). – С. 33-38.
- 17.Ard S. Rotational states of dipole-bound anions of hydrogen cyanide / S. Ard, W.R. Garrett, R.N. Compton, L. Adamowicz, **S.G. Stepanian** // Chem. Phys. Lett. – 2009. – Vol. 473, No 4-6. – P. 223-226.
- 18.Stepanian S.G. UV-induced isomerization of β -alanine isolated in argon matrices / **S.G. Stepanian**, A.Yu. Ivanov, D.A. Smyrnova, L. Adamowicz // J. Mol. Str. – 2012. – Vol. 1025, No 1. – P. 6-19.
- 19.Stepanian S.G. Conformational composition of neutral leucine. Matrix isolation infrared and ab initio study / **S.G. Stepanian**, A.Yu. Ivanov, L. Adamowicz // Chem. Phys. – 2013. – Vol. 423, No 1. – P. 20-29.
- 20.Plokhotnichenko A.M. Unusual behavior of the pyrimidine – 2-hydroxypyrimidine heterodimer / A.M. Plokhotnichenko, **S.G.Stepanian**, L. Adamowicz // Chem. Phys. Lett. – 2014. – Vol. 608. – P. 84-89.

21. Stepanian S.G. Interactions of the Watson-Crick nucleic acid base pairs with carbon nanotubes and graphene: DFT and MP2 study / **S.G. Stepanian**, M.V. Karachevtsev, V.A. Karachevtsev V.A., L. Adamowicz // *Chem. Phys. Lett.* – 2014. – Vol. 610-611. – P. 186-191.
22. Stepanian S.G. FTIR spectra and conformational structure of deuterio-b-alanine isolated in argon matrices / **S.G. Stepanian**, A.Yu. Ivanov, L. Adamowicz // *J. Mol. Spectrosc.* – 2016. – Vol. 320, – P. 13-24.
23. Степаньян С.Г. Влияние низкотемпературной аргоновой матрицы на ИК спектры и структуру конформационно лабильных молекул N-ацетилглицина / **С.Г. Степаньян**, А.Ю. Иванов, Л. Адамович // *Физ. низких темп.* – 2016. – Т. 42, № 12. – С. 1492-1502.
24. Stepanian S.G. Structure and infrared spectra of aliphatic amino acids isolated in low temperature inert gas matrixes / **S.G. Stepanian**, A.Yu. Ivanov, L. Adamowicz // XX International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, Institute of Physics NAS of Ukraine, September 20-27 2011 book of abstracts. – Beregove, Crimea, 2011 – P. 79.
25. Stepanian S.G. Matrix effects and structure of flexible molecules isolated in solid inert gases / **S.G. Stepanian** // 6th International Conference on Cryocrystals and Quantum Crystals, ILTPE NAS of Ukraine, September 3-7, 2006: book of abstracts. – Kharkov, Ukraine, 2006. – P. 62.
26. Stepanian S.G. Infrared spectra and conformational behavior of amino acids isolated in low temperature inert gas matrixes / **S.G. Stepanian**, A.Yu. Ivanov, L. Adamowicz // XXI International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, Institute of Physics NAS of Ukraine, September 22-29, 2013: book of abstracts. – Beregove, Crimea, 2013. – P. 68.
27. Reva I.D. Vibrational spectra and structure of benzoic acid monomers and dimers isolated in argon matrix / I.D. Reva, **S.G. Stepanian** // 22nd European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS XXII), German Physical Society, September 11-16, 1994: book of abstracts. – Essen, Germany, 1994. – P. 420.
28. Stepanian S.G. Matrix-isolation infrared and theoretical ab-initio study of the intramolecular H-bonding in the aminoacid conformers / **S.G. Stepanian**, I.D. Reva, E.D. Radchenko, L. Adamowicz // International conference “Hydrogen bond”, Institute of Physics NAS of Ukraine, May 10-15, 1998: book of abstracts. – Kyiv, Ukraine, 1998. – P. 111.
29. Reva I.D. Study on associative ability of carboxylic acids by matrix isolation infrared spectroscopy / I.D. Reva, **S.G. Stepanian** // NATO Advanced Study Institute “Low Temperature Molecular Spectroscopy”, University of Coimbra, September 3-15, 1995: book of abstracts. – Sintra, Portugal, 1995. – P. 57.
30. Blagoi Yu.P. The matrix isolation spectroscopy of biological molecules (nucleic acid bases and amino acids) / Yu.P. Blagoi, E.D. Radchenko, **S.G. Stepanian**, G.G. Sheina // 1st National Conference on Molecular Spectroscopy with international participation: Vibrational Spectroscopy, Institute of Low Temperature and Structure Research, October 28-30, 1991: book of abstracts. – Wroclaw, Poland, 1991. – P. 1.
31. Рева И.Д. Внутримолекулярная водородная связь в пролине / И.Д. Рева, **С.Г. Степаньян** // 1-й Украинско-польский симпозиум по водородной связи,

- Институт физики АН Украины, 4-13 сентября, 1992: тезисы докладов. – Одесса, Украина, 1992. – С. 50.
32. Рева И.Д. Колебательные спектры и молекулярная структура алифатических аминокислот, изолированных в низкотемпературных инертных матрицах / И.Д. Рева, **С.Г. Степаньян**, Е.Д. Радченко, Г.Г. Шеина, Ю.П. Благой // Международная конференция по колебательной спектроскопии, Институт физика АН Беларуси, 3-5 октября, 1993: тезисы докладов. – Минск, Беларусь, 1993. – С. 83.
33. Stepanian S. Matrix-isolation infrared and ab-initio study of free base tetraphenylporphine (TPP) and Zn-TPP / **S. Stepanian**, A. Plokhotnichenko, L. Adamowicz // XVI International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, Institute of Physics NAS of Ukraine, May 25 – June 1, 2003: book of abstracts. – Sevastopol, Ukraine, 1993. – P. 244.
34. Stepanian S.G. IR spectroscopy of flexible molecules isolated in solid inert gases / **S.G. Stepanian** // XVIII International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, Institute of Physics NAS of Ukraine, September 20-28, 2007: book of abstracts. – Beregove, Crimea, 2007. – P. 31.
35. Stepanian S.G. Structure and infrared spectra of small biomolecules trapped in low temperature inert gas matrixes / **S.G. Stepanian**, A.Yu. Ivanov, A.M. Plokhotnichenko // XIX International School-Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, Institute of Physics NAS of Ukraine, September 20-27, 2009: book of abstracts. – Beregove, Crimea, 2009. – P. 61-62.

АНОТАЦІЯ

Степаньян С.Г. Молекулярна структура конформаційно лабільних біологічних сполук ізольованих в низькотемпературних матрицях інертних газів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.14 – теплофізика та молекулярна фізика. – Фізико-технічний інститут низьких температур імені Б. І. Веркіна НАН України, Харків, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню залежності між молекулярною структурою та термодинамічними і ІЧ спектральними характеристиками конформаційно лабільних біологічних молекул, зокрема амінокислот та їх похідних у ізольованому стані. Для вирішення проблеми дослідження був використаний комплексний експериментально-розрахунковий підхід, що поєднував унікальну методику низькотемпературної ІЧ-спектроскопії матрично-ізольованих сполук та сучасні квантово-механічні методи розрахунків. В результаті було визначено повний набір конформерів молекулярних форм низки аліфатичних амінокислот та їх похідних та визначені заселеності спостережуваних конформерів. Також встановлена відповідність конформерів молекулярної форми амінокислот структурі амінокислотних фрагментів пептидів та виявлено визначальний вплив типу внутрішньомолекулярного водневого

зв'язку на структуру і відносні стабільності конформерів амінокислот та показано, що використовуючи ІЧ-спектральні характеристики конформерів можливо визначати тип водневих зв'язків у амінокислотах. З'ясовано механізм впливу конформаційного охолодження у матрицях на суттєву різницю між конформаційним складом амінокислот у газовій фазі та в ізольованому стані. Показана можливість розділення проявів матричних ефектів і конформаційного розщеплення в ІЧ-спектрах на підставі квантово-механічного моделювання фрагментів кристалів інертних газів та з'ясовано причини якісних змін поверхні потенційної енергії лабільних молекул у матрицях, таких як поява додаткових конформерів та реверсу стабільності конформерів у порівнянні з газовою фазою. Отримані загальні спектральні і структурні характеристики вивчених сполук є основою для дослідження структури лабільних сполук з аналогічними функціональними групами, багато з яких є важливими біологічними молекулами. Отримані дані сприяють розумінню функціонування білків в організмі людини і важливі для розробки нових лікарських препаратів та біологічно-активних речовин на основі амінокислот і пептидів.

Ключові слова: ІЧ-спектроскопія, матрична ізоляція, квантово-механічні розрахунки, амінокислоти, пептиди, конформаційна структура, водневий зв'язок, ангармонізм.

АННОТАЦІЯ

Степаньян С. Молекулярная структура конформационно лабильных биологических соединений изолированных в низкотемпературных матрицах инертных газов. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.14 - теплофизика и молекулярная физика. - Физико-технический институт низких температур имени Б. И. Веркина НАН Украины, Харьков, 2018.

Диссертация посвящена исследованию зависимости между молекулярной структурой, термодинамическими и ИК спектральными характеристиками конформационно лабильных биологических молекул, в частности аминокислот и их производных в изолированном состоянии. Для решения проблемы исследования был использован комплексный экспериментально-расчетный подход, сочетавший уникальную методику низкотемпературной ИК-спектроскопии матрично-изолированных соединений и современные квантово-механические методы расчетов. В результате было определено полный набор конформеров молекулярных форм ряда алифатических аминокислот и их производных и определены заселенности наблюдаемых конформеров. Также установлено соответствие конформеров молекулярной формы аминокислот структуре аминокислотных фрагментов пептидов и выявлено определяющее влияние типа внутримолекулярного водородного связи на структуру и относительные стабильности конформеров аминокислот и показано, что используя ИК-спектральные характеристики конформеров возможно определять тип водородных связей в аминокислотах. Выяснен механизм влияния

конформационного охлаждения в матрицах на существенную разницу между конформационным составом аминокислот в газовой фазе и в изолированном состоянии. Показана возможность разделения проявлений матричных эффектов и конформационного расщепления в ИК-спектрах на основании квантово-механического моделирования фрагментов кристаллов инертных газов и выяснены причины качественных изменений поверхности потенциальной энергии лабильных молекул в матрицах, таких как появление дополнительных конформеров и реверса стабильности конформеров по сравнению с газовой фазой. Полученные общие спектральные и структурные характеристики изученных соединений является основой для исследования структуры лабильных соединений с аналогичными функциональными группами, многие из которых являются важными биологическими молекулами. Полученные данные способствуют пониманию функционирования белков в организме человека и важны для разработки новых лекарственных препаратов и биологически активных веществ на основе аминокислот и пептидов.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, матричная изоляция, квантово-механические расчеты, аминокислоты, пептиды, конформационная структура, водородная связь, ангармонизм.

SUMMARY

Stepanian S.G. Molecular structure of flexible biological compounds isolated in low temperature inert gas matrices. – Manuscript.

Thesis for the doctor's degree in physics and mathematics by specialty 01.04.14 – thermophysics and molecular physics. – B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, Kharkiv, 2018.

The thesis describes results of a combined experimental and computational study of molecular structure of highly flexible molecules of biological importance – natural amino acids and related compounds. The main aim of the research was to establish dependency between molecular structure, IR spectroscopic and thermodynamic characteristics of the molecules. To achieve the aim we used the IR spectroscopy of the molecules isolated in low temperature inert gas crystals (matrices) and high level *ab initio* computational methods,

A dependency was established between the molecular structure, thermodynamics and IR spectral characteristics of highly flexible biological molecules, in particular amino acids and their derivatives, in an isolated state. A complete set of conformers of the molecular forms of a number of aliphatic amino acids and their derivatives were determined. The populations of the observed conformers were defined. The correspondence of conformers of the molecular form of amino acids to the structure of the amino acid fragments of peptides is established. In particular, it was demonstrated that depending on the location of the proline fragments in the peptide chain, they are structural analogues of different conformers of matrix isolated proline. The decisive influence of the type of intramolecular hydrogen bond on the structure and relative stability of amino acid conformers has been established and it has been

shown that using the IR spectral characteristics of conformers it is possible to determine the type of hydrogen bonds in amino acid molecules.

The mechanism of the conformational cooling effect in the matrices was found out for the significant difference between the conformational composition of amino acids in the gas phase and in the matrix isolated state. Investigations of the molecular structure of amino acids demonstrated that accounting for the interconversion between conformers, which are separated by low energy barriers, is critical for determining the conformational composition of flexible molecular systems. In the case of leucine, most low-energy conformers with significant population at the experimental temperature of evaporation actually interconvert to more stable configurations during matrix deposition. As a result, only a small number of conformers of leucine is observed in the experiment. The high efficiency of the proposed method of the variable Wilson matrix for accurate computation of anharmonic vibrational frequencies is shown. The special importance of the method for molecules with strong intramolecular hydrogen bonds is demonstrated.

The possibility of separating the manifestations of matrix effects and conformational splitting in IR spectra is shown on the basis of quantum-mechanical modeling of fragments of inert gas crystals. The modeling of the structure and vibrational spectra of inert gas clusters with flexible molecules was carried out for the first time. This allowed not only to establish the influence of the matrix environment on the vibrational spectra of isolated molecules, but also to determine the size and shape of the matrix sites, as well as to find out how the structure of the isolated molecules changes when it is embedded in the matrix. It is shown that determination of the optimal size of a matrix site can be made based on the analysis of matrix environment deformations calculated for different clusters. It was established that the ratio of the volume of a matrix isolated molecule to the volume of atoms of matrix gases allows determining only the minimum possible size of the matrix site. For virtually all calculated clusters, the optimal size of the site required to accommodate a molecule exceeds the minimum size determined simply by the ratio of volumes. It is shown that the site size is also determined by the form of the embedded molecule. In particular, it has been found that N-acetyl glycine conformers, which have approximately the same volume but different spatial structure, replace different number of argon atoms when embedded in an argon matrix. The reasons for qualitative changes of the potential energy surface of flexible molecules in matrices, such as the appearance of additional conformers and the reverse of the conformer stability in comparison with the gas phase, were found.

The general spectral and structural characteristics of the compounds studied are the basis for studying the structure of flexible molecules with similar functional groups, many of which are important biological molecules. The data obtained contribute to understanding the functioning of proteins in the human body and are important for the development of new drugs and biologically active compounds based on amino acids and peptides.

Keywords: IR spectroscopy, matrix isolation, quantum-mechanical calculations, amino acids, peptides, conformational structure, hydrogen bond, anharmonicity.

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 1.9. Тир. 100 прим. Зам. № 458-18.
Підписано до друку 20.09.2018. Папір офсетний.

Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.
61022, м. Харків, вул. Трінклера, 2, корп.1, к.19. Т. (057) 758-01-08, (066) 822-71-30
Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру
видавців та виготовників видавничої продукції серія ДК 3587 від 23.09.09 р.

СТИЛЬ ®
ИЗДАТ 
ТИПОГРАФІЯ
www.stil-izdat.com