

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Близнюк Юлії Миколаївни**

“Механізми асоціації біологічно активних речовин

та їх комплексоутворення з ДНК”,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

Вивчення взаємодії біологічно активних речовин (БАР) з ДНК є центральною проблемою сучасної молекулярної біофізики. Проводиться велика кількість досліджень з метою виявлення хімічних сполук, які мають властивість утворювати комплекси з ДНК і тому потенційно можуть використовуватися як лікарський засіб. Водночас, поряд з інформацією про безпосередню взаємодію БАР з ДНК важливим є також вивчення утворення комплексів молекул БАР між собою (самоасоціація або гетероасоціація). Результати таких досліджень поглиблюють розуміння основних механізмів комплексоутворення різних сполук з макромолекулою ДНК, що закладає основу для поліпшення методів терапії ракових захворювань. З огляду на це тема роботи дисертації Близнюк Юлії Миколаївни “Механізми асоціації біологічно активних речовин та їх комплексоутворення з ДНК” є актуальною і має велике практичне значення.

Задача, що ставиться в дисертації, головним чином, пов'язана з доведенням існування водневих зв'язків в комплексах само- та гетероасоціатів молекул біологічно активних речовин та визначення їхньої ролі в стабілізації макромолекулярних комплексів. Для розв'язання поставленої задачі досліджувалися системи, що склалися з таких молекул, як флавінмононуклеотид (FMN), етидіум бромід (EB), теофілін (TRH), профлавін (PRF), кофеїн (CAF), а також системи, що містили макромолекулу ДНК. Структура усіх цих молекул містить ароматичні кільця, тому внаслідок гідрофобних взаємодій у водних розчинах вони утворюють само- та гетероасоціати у вигляді стопок. Утворення стопко-подібних структур цих сполук було надійно зафіксовано методом ЯМР в роботах інших авторів. Водночас, питання виникнення водневих зв'язків та водних містків між донорно-акцепторними групами цих молекул залишалось невивченим. В представленій дисертації за допомогою методів інфрачервоної спектроскопії та спектроскопії комбінаційного розсіювання, а також методів комп'ютерного моделювання, а саме квантово-хімічних розрахунків та Монте-Карло, проведено детальне дослідження виникнення водневих зв'язків в комплексах само- та гетероасоціатів вищезазначених БАР та визначено ті комплекси, де внесок водневих зв'язків в енергію взаємодії є найбільшим.

Дослідження за темою дисертації Близнюк Ю.М. проводилися в рамках планів фундаментальних держбюджетних науково-дослідницьких робіт відділу біофізики Інституту радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України,

а саме НДР: «Молекулярні моделі комплексів біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами за умови мультимодального та конкурентного зв'язування» (№ держ. реєстрації 0107U001079), «Механізми впливу біологічно активних речовин і електромагнітних полів гіга- та терагерцового діапазонів на об'єкти різного рівню організації (біополімери, біомембрани, клітини)» (№ держ. реєстрації 0111U010475).

Дисертація оформлена згідно вимог МОН України і складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку літератури та додатків. Список використаних джерел містить 255 посилання. Об'єм основної частини дисертації складає 137 сторінок.

У вступі обґрунтовано актуальність обраної тематики досліджень, формулюється мета роботи, основні задачі, вказується новизна отриманих результатів та їхнє практичне значення.

У першому розділі дисертації наведено загальні відомості про ароматичні біологічно активні речовини, зокрема, FMN, PRF, EB, TRN і CAF. Проведено детальний аналіз існуючих експериментальних даних про структуру само- і гетероасоціатів цих молекул. Наведено наявні в літературі експериментальні свідчення про стабілізацію цих комплексів за допомогою водневих зв'язків. На основі зробленого огляду літературних даних обґрунтовано сформульовані у вступі дисертації задачі.

У другому розділі описано експериментальні методи дослідження, які використовувалися в дисертації. Серед експериментальних методів – інфрачервона (ІЧ) спектроскопія, спектроскопія комбінаційного розсіяння (КР) та метод п'єзограметрії. Серед розрахункових методів – метод Монте-Карло та квантово-хімічні методи. Окремо описано методику, за якою авторка готувала зразки для експерименту.

В третьому, четвертому і п'ятому розділах дисертації представлено оригінальні результати.

У третьому розділі описуються результати дослідження самоасоціації флавінмононуклеотиду. Проведено порівняння ІЧ спектрів FMN у нейтральному та у слабкокислому середовищі для випадку розчинів та вологих плівок. У випадку зволжених плівок зафіксовано суттєві високочастотні зсуви коливань карбонільних груп  $1656\text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}_2=\text{O}$ ) і  $1704\text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}_4=\text{O}$ ). Для пояснення цього ефекту досліджено резонансні взаємодії карбонільних коливань у стопках FMN на основі теорії молекулярних екситонів О.С. Давидова. Побудовано залежності частотних зсувів карбонільних груп від кількості молекул у самоасоціаті, які показали, що спостережуване зміщення частоти може відбуватися у випадку як мінімум трьох молекул у стопці. В діапазоні коливань ізоалоксазинового кільця FMN зафіксовано високочастотні зсуви характерних смуг коливань мод, що свідчить про протонування атомів азоту  $\text{N}_1$  і  $\text{N}_5$ . Квантово-хімічний розрахунок зарядів на атомах і порядків зв'язків протонowanego і непротонowanego ізоалоксазинового кільця дозволив зробити якісний висновок про можливі зміни в константах коливань, які можуть бути викликані протонуванням саме цих атомів.

Для визначення ролі води в стабілізації комплексів молекул FMN проведено дослідження залежності частот і інтенсивностей мод коливань за участі атомів азоту і карбонільних груп  $C_2=O$  і  $C_4=O$  від кількості молекул води у плівках. Результати виявили низькочастотні зсуви та збільшення інтенсивностей відповідних смуг коливань, що свідчить про утворення водних містків між донорно-акцепторними групами ізоалоксазинових кілець. Показано, що у нейтральному середовищі ці водні містки формуються у всьому інтервалі сорбції води, а у випадку слабокислого середовища вони утворюються, головним чином, на початку процесу гідратації.

У четвертому розділі описуються результати дослідження утворення гетерокомплексів FMN-TRH, TRH-EB, TRH-PRF та EB-CAF. В ІЧ спектрах системи FMN-TRH виявлено високочастотні зміщення коливань карбонільних груп цих молекул, що пояснено виникненням резонансної взаємодії коливань відповідних карбонільних груп  $C_2=O$  (FMN) –  $C_6=O$  (TRH) і  $C_4=O$  (FMN) –  $C_2=O$  (TRH). При цьому показано, що спостережуваний в експерименті частотний зсув може виникати тільки у випадку, коли комплекс формується як мінімум з 3 молекул. У випадку системи TRH-EB виявлено низькочастотні зміщення коливань карбонільних груп TRH в ІЧ спектрах і високочастотні зміщення деформаційних коливань аміногрупи EB в спектрах КР. Такі зміни в спектрах вказують на можливе утворення водневих зв'язків між донорно-акцепторними групами цих молекул. Проте, враховуючи дані ЯМР про структури цих гетеродимерів, було зроблено висновок, що найбільш імовірно ці зв'язки формуються через молекули води – «водні містки». У випадку комплексів TRH-PRF і CAF-EB досліджені ІЧ і КР спектри показали відсутність міжмолекулярних водневих зв'язків, що також узгоджується з літературними даними.

Для проведення додаткового аналізу структури отриманих гетероасоціатів було проведено моделювання цих систем методом Монте-Карло. Результати моделювання для комплексу FMN-TRH показали можливе виникнення водних містків, що вносять суттєвий внесок в стабілізацію комплексу, проте ці результати суперечать одержаним ІЧ-спектрам, де не зафіксовано відповідних низькочастотних зсувів коливань карбонільних груп. У випадку комплексів TRH-EB, TRH-PRF і CAF-EB в цілому результати моделювання підтвердили експериментальні дані і показали відсутність міжмолекулярних водневих зв'язків. Окремо обговорюється можливість утворення водних містків між донорно-акцепторними групами молекул гетерокомплексу, що складаються з ланцюжків довжиною від 1 до 6 молекул.

У п'ятому розділі окремо описуються прояви водневого зв'язку в коливальних спектрах комплексів досліджуваних молекул. Зокрема, у випадку комплексів FMN-EB в ІЧ спектрах зафіксовано низькочастотний зсув коливань карбонільної групи  $C_2=O$  молекули FMN і підвищення інтенсивності, а в КР спектрах зафіксовано високочастотний зсув аміногрупи EB. У випадку комплексів FMN-PRF в спектрах спостерігаються такі самі зміни для коливань карбонільної групи  $C_4=O$  FMN та аміногрупи EB. Одержані зміни коливальних спектрів свідчать про утворення міжмолекулярного водневого зв'язку між

однією з карбонільних груп FMN та аміногрупою EB. Обговорюється можливість утворення комплексу FMN-PRF-FMN, в якому комплекс стабілізується водневими зв'язками за участі двох різних карбонільних груп FMN ( $C_2=O$  і  $C_4=O$ ). На основі одержаних зсувів частот в коливальних спектрах досліджуваних гетерокомплексів виконано оцінку внеску, що дають водневі зв'язки в енергію стабілізації комплексу. Показано, що він може досягати 25-30% від загальної енергії комплексу. Для ілюстрації одержаних експериментальних даних було проведено моделювання методом МС. Результати показали, що між молекулами гетероасоціату можуть утворюватися водні містки, які є важливими для стабілізації комплексу.

Окрема увага приділена дослідженню утворення водневих зв'язків EB з подвійною спіраллю ДНК. Одержано КР спектри систем EB-ДНК при різних співвідношеннях концентрацій ліганду та ДНК. Виявлені зміни в спектрах при низькій концентрації ліганду вказують на формування водневих зв'язків між аміногрупами EB та атомами кисню O5' і O4' остова макромолекули ДНК. При високих концентраціях ліганду відбувається перехід подвійної спіралі з B-форми в A-форму, що супроводжується витісненням ліганду назовні макромолекули. У цьому випадку також утворюються водневі зв'язки між аміногрупами EB та цукро-фосфатним остовом ДНК.

Серед одержаних у дисертації результатів найбільшу наукову цінність, на мою думку, мають наступні:

- На основі результатів досліджень ІЧ і КР спектрів доведено існування водневих зв'язків в гетерокомплексах FMN-EB, FMN-PRF, і TRN-EB, які виникають між аміногрупами та карбонільними групами відповідних молекул комплексу.
- Показано, що внесок водневих зв'язків у загальну енергію стабілізації комплексів FMN-EB і FMN-PRF може досягати 30%.
- Показано відсутність водневих зв'язків між молекулами в гетероасоціатах FMN-TRN, TRN-PRF і CAF-EB.
- На основі спектрів КР показано, що при високих та низьких концентраціях ліганду в комплексах EB-ДНК утворюються водневі зв'язки між аміногрупами EB та донорно-акцепторними групами ДНК.

Усі одержані результати детально проаналізовано. Їх достовірність забезпечується застосуванням добре апробованих методів ІЧ та КР спектроскопії, методу п'езографіметрії та розрахункових методів (Монте-Карло та теорії функціоналу густини). Висновки та наукові положення, зроблені на основі проведеного дослідження, є новими та обґрунтованими.

Водночас аналіз дисертаційної роботи викликає ряд зауважень:

1. Усі досліджувані системи це водні розчини електролітів, що містять іони натрію. Наявність іонів металів може впливати на утворення комплексів досліджуваних молекул, особливо у випадку систем з FMN, молекула якого має фосфатну групу. У нейтральному середовищі фосфатна група негативно заряджена і, у випадку самоасоціату, що складається з багатьох молекул FMN, такий макромолекулярний комплекс може мати

поліелектролітні властивості. Враховуючи геометричні параметри комплексу самоасоціату FMN, за теорією Меннінга можна провести оцінки ступені нейтралізації поверхневого заряду. Така оцінка показує, що має відбуватися конденсація протіонів, яка призводитиме до екранування заряду фосфатної групи на 50%. В дисертації вплив протіонів не обговорюється.

2. Пояснення високочастотних зсувів, що спостерігається в ІЧ спектрах ізоалоксазинового кільця FMN при переході від нейтрального в слабокисле середовище, на основі квантово-хімічних розрахунків має протиріччя. У випадку коливальних мод  $1501\text{ cm}^{-1}$  і  $1541\text{ cm}^{-1}$  розрахункові дані дають, в основному, зменшення порядку зв'язків і абсолютних величин зарядів на атомах, а у випадку моди  $1575\text{ cm}^{-1}$  – навпаки збільшення. Однозначний висновок про вплив такого перерозподілу зарядів і порядків зв'язків на знак, а, тим більше, величину частотного зсуву зробити важко.
3. Деякі структури молекулярних комплексів у водному середовищі, які одержано за результатами моделювання методом Монте-Карло, не мають міжплощинного контакту (наприклад ТРН-ЕВ, рис. 4.10), що суперечить експериментальним даним. Також викликає питання щодо стабільності довгих водних ланцюжків між донорно-акцепторними групами молекул в комплексі, які було одержано методом Монте-Карло. Для роз'яснення даних питань було би добре провести моделювання цих систем методом молекулярної динаміки.
4. Серед технічних зауважень слід відзначити занадто стисле описання методики квантово-хімічних розрахунків. На рисунку 4.2. лінія, що зображає суму спектрів FMN+ТРН, проходить вище, ніж це можливо, що, вочевидь, пов'язано з технічною помилкою при побудові графіку. В тексті зустрічаються русизми та неточності: на стр. 57 «силова постійна» краще писати «силова стала», на стр. 61, 64, 106 та в інших місцях «постійна Планка» краще вживати «стала Планка», на стр. 68 «щільність» має бути «густина».

Однак, наведені зауваження не ставлять під сумнів ні достовірності основних результатів роботи, ані зроблених на їхній основі висновків, та не впливають загальну на істотно позитивну оцінку роботи.

Основні результати роботи повністю опубліковано в 6 статтях в провідних вітчизняних фахових наукових виданнях та апробовано на 11 наукових конференціях, симпозіумах та семінарах. Дисертація написана грамотною мовою і добре ілюстрована. Автореферат оформлено належним чином і дає повне уявлення про дослідження, що виконувалися в роботі. Зміст дисертації відповідає паспорту спеціальності 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки).

Враховуючи актуальність теми, новизну, наукове та практичне значення одержаних результатів, вважаю, що дисертаційна робота «Механізми асоціації біологічно активних речовин та їх комплексоутворення з ДНК» відповідає

вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затверджених Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013р. №567, щодо кандидатських дисертацій, а її авторка, Близнюк Юлія Миколаївна, без сумніву, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки).

Вчений секретар  
Інституту теоретичної фізики  
ім. М.М. Боголюбова НАН України,  
кандидат фізико-математичних наук

С.М. Перепелиця

Підпис С.М. Перепелиці засвідчує:  
Заступник директора з наукової роботи  
Інституту теоретичної фізики  
ім. М.М. Боголюбова НАН України,  
доктор фізико-математичних наук



В.І. Засенко

18 січня 2018 р.