

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Близнюк Юлії Миколаївни «Механізми асоціації біологічно активних речовин та їх комплексоутворення з ДНК», яку подано на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Дисертаційна робота Ю.М. Близнюк присвячена актуальній проблемі сучасної біофізики, а саме дослідженню гомо- та гетероасоціації ряду біологічно активних речовин (БАР), зокрема флавінмононуклеотиду (FMN), профлавіну (PRF), бромистого етидію (EB), кофеїну (CAF) та теофіліну (TPH), та визначенню впливу водного оточення та водневих зв'язків (Н-зв'язків) на стабільність асоціатів, що утворюються у водневих розчинах, плівках та при зв'язуванні з полінуклеотидною матрицею. *Актуальність* обраної теми зумовлена тим фактом, що сучасна хіміотерапія багатьох захворювань передбачає використання одночасно декількох активних лікарських засобів, у тому числі, антиоксидантів, вітамінів та інших БАР, які можуть послаблювати або підсилювати ефект активного лікарського засобу завдяки утворенню гомо- та гетероасоціатів, а також зв'язуванню з ланцюгом ДНК. Особливо актуальним це питання є в хіміотерапії онкозахворювань, оскільки використання багатьох протипухлинних антибіотиків, особливо під час комбінованої хіміотерапії, призводить до суттєвої інтоксикації організму, для зниження якої використовують різні антиоксиданти. Тому отримання нової інформації щодо молекулярних механізмів асоціації БАР та їх комплексоутворення з ДНК, як основної мішені багатьох лігандів, є вкрай важливою для прогнозування ефективності нових комбінованих препаратів, що містять БАР (антиоксиданти, вітаміни, компоненти продуктів харчування, тощо).

Треба зазначити, що дослідження само- та гетероасоціатів та взаємодій, що стабілізують такі асоціати, активно проводяться останні 20 років. За цей час виконано багато досліджень великої кількості різноманітних ароматичних сполук, які включають у себе антибіотики, вітаміни ті їх похідні, барвники та ін. Але результати, отримані такими методами, як ЯМР спектроскопія, спектрофотометрія в УФ- та видимій області, флюоресценція, здебільшого дають інформацію про термодинамічні параметри зв'язування асоціатів. Висновки про утворення міжмолекулярних водневих зв'язків зроблено опосередковано, тоді як Н-зв'язки відіграють істотну роль у формуванні стабільних стекінг-асоціатів. Крім того більшість проведених досліджень виконано у розчинах, тоді як конденсований стан деяких ароматичних сполук є найбільш наближеним до природних умов їх функціонування в клітині. Тобто

зрозуміло, що визначення ролі водневих зв'язків, інших міжмолекулярних взаємодій та молекул води у стабілізації асоціатів ароматичних БАР потребує подальшого дослідження за допомогою методів коливальної спектроскопії, яка дає пряме експериментальне підтвердження існування Н-зв'язків та дозволяє встановити атомні групи, які беруть участь у взаємодії. Запропоновані в дисертаційній роботі методики визначення міжмолекулярних механізмів взаємодії ароматичних БАР у подальшому можуть бути використані при прогнозуванні терапевтичної ефективності препаратів. Результати дисертаційної роботи, яка присвячена саме цій задачі, мають конкретні *перспективи практичного застосування* в молекулярній біофізиці, біотехнології та фармакології. Слід зазначити, що дисертаційна робота виконувалась відповідно до затверджених планів науково-дослідних робіт Інституту радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України в рамках двох держбюджетних тем. Важливо також відзначити, що тема дисертаційної роботи безпосередньо пов'язана з таким пріоритетним напрямком розвитку науки і техніки, визначеним Верховною Радою України, як здоров'я людини.

Отже, обрана тема дисертації та поставлені в роботі наукові завдання *є безумовно актуальними*.

Обґрунтованість наукових висновків дисертації та їх достовірність не викликає сумнівів завдяки використанню в роботі надійних та добре розвинутих спектроскопічних методів та всебічного глибокого аналізу експериментальних результатів. Безумовно, сильною стороною роботи є використання різних сучасних спектроскопічних методів для з'ясування структури та молекулярних механізмів формування самоасоціатів та гетероасоціатів та при зв'язуванні з ДНК, а також комп'ютерного моделювання для побудови адекватних моделей комплексів та визначення енергетичних характеристик асоціатів.

Наукова новизна роботи полягає у тому, що більшість результатів дисертації отримано вперше. Серед отриманих результатів, найцікавішими, на мій погляд, є такі:

1. Вперше отримано інформацію щодо особливостей утворення самоасоціатів флавінмононуклеотиду (FMN) в плівках в умовах слабокислого ($pH=6,0$) середовища. За допомогою розрахунків резонансного зсуву карбонільних коливань у диполь-дипольному наближенні побудовано модель *n*-молекулярної структури асоціату.
2. Вперше за допомогою коливальної спектроскопії отримано прямий доказ існування водневих зв'язків у гетероасоціатах флавінмононуклеотиду з профлавіном та бромистим етидієм. Було виконано оцінку ентальпії міжмолекулярних Н-зв'язків у цих гетероасоціатах, та за допомогою моделювання методом Монте Карло підтверджено, що ці гетерокомплекси додатково стабілізуються Н-зв'язками.

3. При вивченні спектральних особливостей утворення гетерокомплексів у нейтральних розчинах вперше показано, що в асоціатах флавінмононуклеотид-теофілін, теофілін-профлавін та кофеїн-бромистий етидій (FMN-ТРН, ТРН-PRF і САF-ЕВ) не формуються Н-зв'язки. Комп'ютерне моделювання методом Монте Карло дозволило встановити, що додаткова стабілізація цих асоціатів досягається за рахунок утворення водних містків між атомними групами лігандів.
4. На прикладі бромистого етидію показана можливість коливальної спектроскопії визначити роль водневих зв'язків при комплексоутворенні біологічно активної речовини з ДНК.

В цілому дисертаційна робота справляє досить приємне враження. Рукопис складає 182 сторінки, містить 45 рисунків, 14 таблиць і 2 додатки. Список використаних джерел складається з 255 найменувань.

Згідно до вимог, дисертаційна робота *складається зі вступу, п'яти розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків*. Розділи добре структуровані, кожний розділ закінчується висновками. Матеріали дисертаційної роботи викладено послідовно і ясно, у відповідності до існуючих стандартів для наукової мови. Робота добре проілюстрована, більшість рисунків виконано якісно. Деякі експериментальні дані та виконання на їх основі розрахункові параметри наведено в таблицях, що покращує сприйняття результатів досліджень у цілому.

У вступі дисертаційної роботи Ю.М. Близнюк проаналізовано сучасний стан проблеми утворення стабільних стекінг-асоціатів біологічно активних речовин та їх вплив на фізико-хімічні властивості комплексів біомолекула-ліганд. У вступі також сформульовано мету та наукові завдання дисертаційної роботи, визначено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, а також наведено дані про апробацію роботи та публікації автора.

Перший розділ є оглядовим, у якому автором надано сучасні уявлення щодо структурних особливостей самоасоціатів та гетероасоціатів ряду БАР у водних розчинах та методів їх дослідження. Стисло описано досліджені в роботі БАР, а саме флавінмонунклеотид (FMN), бромистий етидій (ЕВ), профлавін (PRF), теофілін (ТРН) та кофеїн (CAF), та наведено їх основні характеристики. Наведено інформацію про значну роль водного оточення та міжмолекулярних взаємодій у формуванні стабільних асоціатів БАР та їх комплексів з ДНК. Надано критичний огляд робіт, присвячених проблемі дослідження структури та стабільності само- та гетероасоціатів, та зазначені їх переваги і недоліки.

Для вирішення завдань, що були поставлені у дисертаційній роботі, було використано декілька сучасних методів для дослідження структурних особливостей та молекулярних

механізмів утворення самоасоціатів та гетероасоціатів ряду БАР та при їх зв'язуванні з ДНК, а саме, інфрачервона спектроскопія (ІЧ) та спектроскопія комбінаційного розсіювання (КР), п'езографіметрія, квантово-хімічні розрахунки та комп'ютерне моделювання методом Монте Карло (МС), опису яких присвячено *другий розділ* роботи.

Оцінюючи оригінальні розділи дисертації, хочу відзначити, що експериментальна частина роботи була добре спланована та систематизована, а комп'ютерні розрахунки добре доповнюють результати експериментальних вимірювань. Основним завданням роботи було встановлення молекулярних механізмів взаємодії ряду ароматичних БАР та визначення ролі Н-зв'язків та водного оточення у стабільності асоціатів, що утворюються. На першому етапі роботи, якому присвячено *третій розділ*, проводились дослідження структурного стану самоасоціатів флавінмононуклеотиду у плівкових зразках. На мій погляд, найбільш вагомим результатом цього дослідження є особливості утворення *n*-молекулярного агрегату FMN у слабкокислому середовищі (рН=6,0). Поєднання ІЧ-спектроскопічних досліджень з п'езографіметричними вимірюваннями сорбції молекул води, а також з комп'ютерними розрахунками резонансного зсуву карбонільних коливань дозволило встановити, що стабільність *n*-молекулярного агрегату FMN при рН=6,0 досягається за рахунок міжплощинних взаємодій між кільцями ізоалоксазинового хромофору та формування водних «містків» між атомними групами ізоалоксазинових кілець. Такі особливості утворення самоасоціатів FMN у нейтральному або слабкокислому середовищі мають важливе значення для застосування вітамінів групи В₂ у клінічній практиці.

Четвертий розділ дисертаційної роботи присвячено вивченню спектральних особливостей утворення гетероасоціатів у нейтральних водних розчинах. Так за допомогою ІЧ- та КР-спектроскопії було визначено, що гетерокомплекси FMN-ТРН, ТРН-PRF і САF-ЕВ формуються без утворення між лігандами Н-зв'язків, тоді як у комплексі ТРН-ЕВ було визначено існування Н-зв'язку. Моделювання методом Монте Карло дозволило встановити, що у цих гетерокомплексах додаткова стабілізація досягається за рахунок утворення між донорно-акцепторними групами лігандів водних містків, що може посилювати інтерцепторну дію досліджених БАР на ДНК. Крім того для гетерокомплексу FMN-ТРН було обчислено резонансний зсув карбонільних коливань у диполь-дипольному наближенні, що дозволило припустити утворення *n*-молекулярного агрегату FMN-ТРН.

На останньому етапі проводились дослідження флавінмононуклеотиду, профлавіну та бромистого етидію, які в нейтральних розчинах формують гетероасоціати з утворенням між ними міжмолекулярних Н-зв'язків, чому й присвячено *п'ятий розділ* дисертаційної роботи. На основі даних коливної спектроскопії, моделювання методом МС та обчислення ентальпії міжмолекулярних Н-зв'язків у гетероасоціатах можна зробити висновок, що FMN

проявляє достатньо сильні інтерцепторні властивості та може знижувати концентрацію мутагенів та канцерогенів. Також було проведено КР-спектроскопічне дослідження впливу Н-зв'язків на стабілізацію комплексу ЕВ-ДНК. Отримана інформація про здатність бромистого етидію формувати водневі зв'язки з ДНК, незалежно від співвідношення концентрацій ліганду та біомолекули, впливає на подальший розгляд комплексоутворення подібних ароматичних сполук з ДНК.

Зазначу, що дисертаційна робота виконана на високому науковому рівні і свідчить про високу фахову та кваліфікаційну підготовку здобувачки. Однак, при загальній позитивній оцінці роботи, *слід зробити наступні зауваження.*

(1). В роботі є деякі неточності. Розділ 1.3, стор. 42, авторка вказує: «У більшості випадків перехід від мономерної форми ароматичних сполук до агрегованої супроводжується спектральними змінами – гіпохромізмом і короткохвильовим зміщенням смуги поглинання в УФ- і видимій області спектру». Можу зауважити, що агрегація ароматичних сполук супроводжується появою нових смуг у спектрах оптичного поглинання, короткохвильової, довгохвильової або навіть двох одночасно, відносно мономерної смуги, інтенсивність якої зменшується. Поява короткохвильової або довгохвильової смуги пояснюється в рамках екситонної моделі Мак-Рея-Каши і залежить від взаємної орієнтації диполів переходу молекул у димері (агрегаті). Тому агрегація ароматичних сполук в розчинах може бути легко ідентифікована саме за цими смугами в спектрах поглинання у видимому діапазоні. Вказані авторкою спектральні зміни більш притаманні ДНК при здійсненні конформаційних переходів.

(2). Розділ 3.1, стор. 77. При дослідженні ІЧ спектрів поглинання флавінмононуклеотиду FMN у плівках авторка робить висновок про його самоасоціацію, порівнюючи спектр у плівці зі спектром у водному розчині і незважаючи на відсутність типових для цього змін в спектрах, на що вказує сама авторка на стор. 82. На мій погляд посилання на літературні данні є недостатнім. Можливо, відсутність змін в спектрах пов'язана саме с тим, що FMN присутній в мономерній формі? Якщо його агрегація це відомий факт, треба було для наочності привести ІЧ спектр поглинання FMN в мономерній формі.

(3). В той же час, суттєві зміни в ІЧ-спектрі поглинання FMN, вирощених з розчинів з рН=6,9 при ВВ 32% (рис.3.1, стор. 78) не обговорюються. З чим вони пов'язані?

(4). Для дослідження особливостей утворення самоасоціатів FMN в плівках вирощених у слабкокислих середовищах, було обрано значення рН=6,2. Чому саме таке значення і чи неможливо було більш суттєво зменшити значення рН для спостереження більш помітних ефектів?

(5). Є також питання щодо даних отриманих в сухих плівках FMN (0% ВВ). Очевидно, що в таких плівках агрегатний стан FMN буде істотно відрізнятись від такого у розчині чи вологих плівках. Чи можна їх порівнювати?

(6). Не зовсім зрозуміло, чому при аналізі можливості утворення гетерокомплексів складу FMN-ТРН авторка наводить приклад високочастотного зсуву карбонільних коливань при утворенні стопок азотистих основ у нуклеїнових кислотах (стор.103, розділ 4.2.2). На мою думку, таке порівняння не є коректним, агрегація молекул FMN та ТРН може проходити зовсім за іншими механізмами. Чому саме порівняння з нуклеїновими кислотами?

(7). Розділ 4.2.2, стор. 107. Авторка робить висновок, що FMN та ТРН утворюють n-молекулярний агрегат ($n \geq 3$). Не розумію якого саме складу. n – число молекул FMN? Чи FMN-ТРН фрагментів? Чи 2 молекули FMN та 1 молекула ТРН? Якщо авторка має на увазі попередні висновки (розділ 3) стосовно того, що FMN утворює в водних розчинах та у вологих плівках асоціати з 3 молекул, то це зовсім не означає, що у присутності ТРН та його схильності до асоціації з FMN, склад гетероасоціату також буде містити 3 молекули FMN.

(8). На Рис. 5.1 та Рис. 5.2 не обговорюється поява нової смуги 1623 cm^{-1} у гетерокомплексі FMN-EB та смуги 1622 cm^{-1} у гетерокомплексі FMN-PRF (Рис.5.3).

Зазначу, що наведені зауваження не впливають на достовірність наукових висновків та не знижують загальної високої оцінки роботи.

Аналіз роботи та опублікованих здобувачкою зі співавторами наукових праць надає змогу зробити висновок, що дисертаційна робота Ю.М. Близнюк *є завершеним науковим дослідженням*, в якому успішно виконано поставленні задачі та отримано нові достовірні експериментальні результати, що в сукупності *вносять вагомий вклад* у розвиток галузі молекулярної біофізики, що пов'язана з вивченням механізму інтерцепторної дії ароматичних БАР на ДНК.

Наукова значущість дисертації полягає у отриманні науково обґрунтованих даних стосовно фізичних механізмів утворення самоасоціатів та гетероасоціатів ароматичних БАР і внеску Н-зв'язків та молекул води у стабільність таких асоціатів.

Практична значущість роботи полягає в тому, що отримані данні дозволяють запропонувати використані методики для прогнозування терапевтичної ефективності комбінованого використання лікарських препаратів або для розробки більш ефективних нових хіміотерапевтичних препаратів.

Основні результати роботи повністю викладено у **6 статтях** у міжнародних та вітчизняних фахових журналах та **11 тезах доповідей** на міжнародних і національних конференціях.

Тема дисертації **відповідає спеціальності** 03.00.02 – біофізика. **Автореферат** повністю відображає зміст дисертації.

Вважаю, що за обсягом проведених досліджень, їх високим науковим рівнем, новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота «Механізми асоціації біологічно активних речовин та їх комплексоутворення з ДНК» **повністю відповідає всім вимогам** п.9, 11 та 13 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567, які висовуються до кандидатських дисертацій. Авторка роботи **Близнюк Юлія Миколаївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.**

Офіційний опонент,

В.о. зав. відділу наноструктурних матеріалів

Інституту скінтіляційних матеріалів НАН України,

доктор фізико-математичних наук, с.н.с.

С.Л. Єфімова

15січня 2018 р.

Особистий підпис Єфімової С.Л.

ЗАСВІДЧУЮ

Учений секретар Інституту скінтіляційних матеріалів

Національної академії наук України

кандидат технічних наук



Ю.М. Дацько