

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

Інституту теоретичної фізики

ім. М.М. Боголюбова

Національної академії наук України



академік НАН України

Анатолій Загородній

«20» 06 2022 р.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації
Перепелиці Сергія Миколайовича «Структура та динаміка впорядкування
протийонів навколо подвійної спіралі ДНК», поданої на здобуття наукового
ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальностями 01.04.02 –
теоретична фізика та 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

Актуальність теми дослідження. У природних умовах ДНК має форму подвійної спіралі, ззовні якої знаходиться негативно заряджений цукрофосфатний остов, а всередині містяться пари нуклеотидів, що кодують генетичну інформацію. Для стабілізації структури подвійної спіралі необхідно, аби заряди фосфатних груп макромолекули нейтралізувалися позитивно зарядженими мобільними іонами розчину (протийонами), або позитивно зарядженими структурними елементами білкових молекул, з якими взаємодіє ДНК в клітині організму. Протийонами, як правило, є іони металів, наприклад, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , а також молекулярні іони, наприклад, поліаміни (путресцин²⁺, спермідин³⁺, спермін⁴⁺). Разом із молекулами води протийони формують іон-гідратну оболонку макромолекули, яка є необхідною структуроутворюючою складовою подвійної спіралі ДНК.

Розподіл протийонів навколо ДНК, зазвичай, характеризують у термінах поліелектролітних моделей, в яких іони представлені як позитивно заряджений континуум (іонна атмосфера), що нейтралізує поліаніон. Такий підхід вдало описує усереднені характеристики системи протийонів, проте не дає можливості врахування та розгляду низки ефектів, які пов'язані з розміром протийонів, характером їхньої гідратації, масою, а у випадку молекулярних протийонів також і конформаційною гнучкістю молекул. Як показано в багатьох дослідженнях і, зокрема, у представлений дисертації, всі ці властивості

суттєво впливають на характер взаємодії протийонів із ДНК та відіграють надзвичайно важливу роль у біологічних процесах. Для розуміння специфічних властивостей іон-гідратної оболонки ДНК у даній роботі розвивається концепція динамічної іон-фосфатної ґратки, у рамках якої протийони навколо ДНК розглядаються не як континуум, а як впорядкована система, подібна до іонної ґратки. Протийони у структурі динамічної іон-фосфатної ґратки ДНК знаходяться у стані динамічної рівноваги і можуть перебувати як у безпосередньому контакті з атомами макромолекули, так і на певній відстані навколо подвійної спіралі.

У рамках концепції динамічної іон-фосфатної ґратки можна пояснити ефекти, що спостерігаються в експериментах та комп'ютерних симуляціях. Зокрема, важливою є інтерпретація виявлених якісних змін форми низькочастотних спектрів КР розчинів ДНК ($<200 \text{ см}^{-1}$), які відбуваються під впливом іонів металів. Упорядкування протийонів ДНК може також спостерігатися в експериментах з електропровідності водних розчинів ДНК, а також в експериментах з дослідження текстур, що виникають у висушених плівках ДНК. Важливим для пояснення виявлених особливостей розподілу протийонів навколо подвійної спіралі є взаємозв'язок між молекулами води гідратних оболонок іонів і ДНК. Ефекти сольватації протийонів можуть значною мірою визначати їхнє впорядкування навколо подвійної спіралі ДНК і є мало дослідженими. Також залишається невизначеним вплив складу розчинника на характер взаємодії протийонів із ДНК. Зокрема, актуальним є розгляд системи, в якій присутні молекули пероксиду водню (H_2O_2), що за своїм складом ідентичні до молекул води, проте мають принципові відмінності в своїй структурі. Експериментальні прояви впорядкування молекулярних протийонів (поліамінів) навколо подвійної спіралі ДНК, що визначаються конформаційними властивостями цих молекул, є важливим для розуміння їхньої ролі у біологічних процесах та потребують окремого вивчення.

Для інтерпретації наявних експериментальних даних і здійснення передбачень необхідно розробити нові фізичні моделі та провести низку комп'ютерних симуляцій різних систем ДНК із різними протийонами. Зокрема, для інтерпретації ефектів впливу протийонів на низькочастотний спектр ДНК необхідно розробити моделі конформаційних коливань ДНК із протийонами, а також метод розрахунку інтенсивностей мод низькочастотних спектрів КР ДНК. Для визначення фізичних механізмів, що обумовлюють вплив на

електропровідність водних розчинів ДНК та формування текстур у плівках ДНК, необхідно розробити нові фізичні моделі формування комплексів іонів із ДНК. Визначення ролі сольватації іонів металів для їхнього розподілу навколо подвійної спіралі необхідно провести молекулярно-динамічні симуляції ДНК з різними іонами металів у водному розчині та у розчині за присутності молекул пероксиду водню. Дослідження впорядкування молекулярних протийонів може бути ефективно виконано в рамках методу молекулярної динаміки для систем ДНК з природними поліамінами.

Таким чином, тема дисертації є новою і являє значний інтерес для розуміння фізичних механізмів взаємодії іонів металів і молекулярних іонів з подвійною спіраллю ДНК. В основу дисертаційного дослідження покладено концепцію динамічної іон-фосфатної ґратки ДНК, яка дає можливість дослідити принципово нові фізичні властивості системи ДНК з протийонами.

Достовірність та наукова новизна одержаних результатів. Основні результати, положення та висновки, що виносяться на захист, логічно пов'язані з матеріалом дисертації та опублікованих за темою дисертації наукових праць.

Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових положень і рекомендацій. У роботі використовувалася низка методів дослідження. Для побудови моделей конформаційної динаміки ДНК з протийонами було використано методи динамічної теорії кристалічної ґратки. Для побудови підходу до розрахунку інтенсивностей у низькочастотних спектрах комбінаційного розсіяння світла ДНК було використано напівкласичну теорію інтенсивностей коливальних спектрів. Числове моделювання систем ДНК з протийонами металів та молекулярними йонами здійснювалося методами класичної молекулярної динаміки. Комп'ютерні симуляції проводилися із застосуванням потужностей обчислювальних кластерів Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова Національної академії наук України, Університету Вісконсину (Wisconsin, USA), Університету імені П.Й. Шафарика в Кошиці (Košice, Slovak Republic), Шведської національної обчислювальної інфраструктури (SNIC, Sweden), Університету Кальярі (Cagliari, Italy). Дослідження електропровідності водних розчинів ДНК проводилися за допомогою методів кондуктометрії на кафедрі молекулярної фізики фізичного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Дослідження текстур висушених плівок ДНК із різними солями металів проводилися із застосуванням спеціальної експериментальної методики, розробленої в Інституті радіофізики і електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України (Харків).

Обґрунтованість і достовірність основних наукових положень, висновків роботи та одержаних результатів ґрунтується на застосуванні апробованих на світовому рівні експериментальних, теоретичних і числових методів, апробацією наукових результатів на міжнародних наукових школах, семінарах та конференціях. Все це свідчить про достовірність викладених в дисертації наукових положень та рекомендацій.

Наукова новизна одержаних результатів. У представленій дисертації вперше було одержано низку нових важливих наукових результатів, що стосуються взаємодії протийонів металів та молекулярних іонів із подвійною спіраллю ДНК.

1. Запропоновано нову концепцію динамічної іон-фосфатної ґратки ДНК, яка представляє протийони навколо подвійної спіралі у вигляді впорядкованої системи зарядів, подібної до ґратки іонного типу.

2. Побудовано нові моделі конформаційних коливань ДНК для випадку правих подвійних спіралей (*B*-, *A*- і *D*-форми) та лівих подвійних спіралей *Z*-ДНК з протийонами Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , що знаходяться в різних положеннях відносно фосфатних груп остова макромолекули.

3. Розвинуто новий підхід для описання інтенсивностей мод низькочастотних коливань ДНК з протийонами в спектрах комбінаційного розсіювання світла.

4. Вперше одержано модельні низькочастотні спектри комбінаційного розсіювання подвійної спіралі ДНК з протийонами і показано, що у випадку ДНК із легкими протийонами (Na^+ і K^+) моди розтягу водневих зв'язків та внутрішньонуклеозидних коливань характеризуються смугами поблизу 60, 80 та 100 см^{-1} , а у випадку ДНК з важкими протийонами (Rb^+ і Cs^+) у спектрі формується єдина інтенсивна смуга біля 115 см^{-1} за рахунок мод іон-фосфатних коливань.

5. Вперше змодельовано низькочастотні спектри комбінаційного розсіювання лівої подвійної спіралі *Z*-ДНК з протийонами Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ і Mg^{2+} і визначено нову моду іон-фосфатних коливань *Z*-ДНК, яка знаходиться біля 150 см^{-1} і характеризує коливання протийонів Mg^{2+} відносно фосфатних груп різних тяжів подвійної спіралі.

6. Запропоновано новий фізичний механізм формування текстур у плівках ДНК із солями LiCl , NaCl , KCl , RbCl та CsCl , що ґрунтується на концепції динамічної іон-фосфатної ґратки ДНК. Показано, що ДНК є центром кристалізації для солей, здатність яких утворювати кристалічні структури у системах з ДНК визначається порядком: $\text{KCl} > \text{NaCl} > \text{RbCl} > \text{CsCl} > \text{LiCl}$.

7. Виявлено нові ефекти структурування протийонів ДНК, що проявляються в експериментах з електропровідності водних розчинів ДНК з додаванням солі КСІ. Показано, що при концентраціях солі $<0,4$ моль/л протийони є менш зв'язаними з ДНК, а при підвищенні концентрації солі вони конденсуються на макромолекулі з подальшим формуванням ДНК-сольових комплексів.

8. Вперше за допомогою методу молекулярної динаміки спостережено ефект плавлення ДНК під дією зовнішнього електричного поля ~ 2000 мВ (*field-induced melting*). Показано, що протийони всередині жолобів подвійної спіралі ДНК мають у шість разів нижчу рухливість, ніж у розчині. У випадку паралельної до макромолекули орієнтації електричного поля вони затримуються довше в областях з вужчим мінорним жолобом ДНК.

9. Розроблено нову модель для опису захоплення одновалентних протийонів усередині жолобів подвійної спіралі ДНК. Показано, що кількість захоплених протийонів знаходиться у діапазоні від 0,16 до 0,43 на одну фосфатну групу.

10. Вперше методом молекулярної динаміки досліджено вплив характеру гідратації протийонів металів на їхню взаємодію з подвійною спіраллю ДНК. Протийони з позитивним характером гідратації (Na^+ та Mg^{2+}) утворюють переважно опосередковані водою контакти з ДНК, а протийони з негативним характером гідратації (K^+ та Cs^+) проникають крізь гідратну оболонку ДНК вглиб подвійної спіралі, утворюючи регулярну структуру вздовж подвійної спіралі.

11. Вперше проведено систематичне дослідження методом молекулярної динаміки для подвійної спіралі ДНК у водному розчині з протийонами Na^+ та молекулами пероксиду водню. Виявлено характерні комплекси молекул пероксиду водню з фосфатними групами остова подвійної спіралі ДНК.

12. У рамках молекулярно-динамічного моделювання вперше показано, що молекули природних поліамінів путресцину²⁺, спермідину³⁺ та сперміну⁴⁺ переважно локалізуються у мінорному жолобі макромолекули ДНК з послідовністю нуклеотидів типу ААТТ, що обумовлено природним звуженням мінорного жолоба подвійної спіралі в цій області.

13. Вперше за допомогою методу молекулярної динаміки охарактеризовано динаміку молекул спермідину³⁺ в області між двома різними макромолекулами ДНК. Показано, що концентрація молекул спермідину³⁺ в міжспіральной області збільшується зі зменшенням відстані між ДНК, а на дуже коротких відстанях спермідин³⁺ формує міжспіральні зшивки, які стабілізують ДНК-ДНК контакти.

Теоретичне та практичне значення роботи. Одержані наукові результати мають практичне значення і застосовуються у різних сферах.

1. Побудований в дисертації підхід для розрахунку низькочастотних спектрів ДНК з протийонами може застосовуватися для інтерпретації експериментальних спектрів комбінаційного розсіяння.

2. Запропонований механізм формування ДНК-сольових комплексів, які виникають у висушених плівках ДНК з солями лужних металів, може бути взятий за основу для розробки біомедичних тестів на основі ДНК.

3. Виявлені властивості специфічної взаємодії молекул поліамінів (путресцину²⁺, спермідину³⁺ і сперміну⁴⁺) з подвійною спіраллю ДНК можуть бути застосовані в розробці біологічно активних молекул з терапевтичними властивостями, а також в розробці функціональних матеріалів з керованими властивостями.

4. Виявлені властивості комплексів молекул пероксиду водню з ДНК можуть бути використані для вдосконалення іонної терапії ракових захворювань.

5. Інформація про виявлений вплив гідратації іонів металів на динаміку протийонів та їхню взаємодію з подвійною спіраллю ДНК може бути використаною в підготовці експериментальних зразків та розробці лікарських засобів.

6. Спостережений в молекулярно-динамічних симуляціях відомий ефект плавлення подвійної спіралі ДНК під дією зовнішнього електричного поля може бути застосований для розробки технологій на основі ДНК, де можуть використовуватися сильні електричні поля.

Повнота викладення матеріалів у публікаціях положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Матеріали дисертації викладено в 54 наукових роботах: 2 розділи в колективній монографії видавництва Springer, 21 стаття, розділ підручника з грифом МОН та 30 матеріалів і тез доповідей на українських та міжнародних конференціях. 18 публікацій індексуються наукометричною базою даних Scopus. Зокрема, у профільних наукових журналах кuartилію Q1 опубліковано 4 статті, кuartилію Q2 – 2 статті, кuartилію Q3 – 3 статті, кuartилію Q4 – 5 статей, а також 6 статей в профільних журналах, які відносяться до фахових видань МОН України. Одна стаття опублікована у Віснику НАН України за результатами доповіді на засіданні Президії НАН України, що засвідчує високий рівень апробації роботи. Статті представлено у високорейтингових профільних наукових журналах, зокрема таких: Nucleic Acids Research (Q1), Frontiers in Chemistry (Q1), European Physical

Journal E (Q1), Biopolymers (Q1), Journal of Molecular Liquids (Q2), European Biophysics Journal (Q3), Journal of Molecular Modeling (Q3), Low Temperature Physics (Q3), Ukrainian Journal of Physics (Q4) та ін.

Особистий внесок здобувача до всіх наукових публікацій, опублікованих із співавторами та зарахованих за темою докторської дисертації. Представлена дисертаційна робота є науковою працею, в якій висвітлено самостійні оригінальні дослідження автора, що дозволило вирішити поставлені завдання. Робота містить теоретичні результати, результати комп'ютерних симуляцій, результати аналізу експериментів і висновки, отримані або сформульовані дисертантом особисто. Використані в дисертації ідеї, положення чи гіпотези інших авторів мають відповідні посилання і використані лише для підкріплення ідей здобувача. Усі наукові результати, положення і висновки, що виносяться на захист, отримані здобувачем особисто.

Аналіз публікацій здобувача за списком опублікованих робіт за темою дисертації (Додаток А дисертації Перепелиці С.М.) показав таке. Дослідження ролі гідrataції протийонів для їхнього впорядкування навколо подвійної спіралі ДНК виконані автором одноосібно і опубліковано без співавторів у трьох статтях [4,7,23] та у тезах доповідей на конференціях [33-36]. У роботах, опублікованих спільно із співавторами, внесок дисертанта полягав у такому. У роботах у співавторстві з д.ф.-м.н., с.н.с. Волковим С.Н. [11 – 16,25,37,38,41,44,45,47,49,50,52-54], здобувачем побудовано моделі конформаційної динаміки ДНК з протийонами та розроблено підхід до розрахунку інтенсивностей смуг коливань в низькочастотному спектрі комбінаційного розсіяння світла ДНК, спільно з співавтором написано тексти робіт. У публікаціях [8,40] здобувачем була поставлена задача з дослідження розподілу протийонів навколо подвійної спіралі ДНК методом молекулярної динаміки, здійснювалося наукове керівництво дослідженнями і підготовлено початкові рукописи робіт. У [9,18,39,43,48] дисертантом була запропонована задача з дослідження електропровідності водних розчинів ДНК, розроблено моделі для описання експериментальних результатів і підготовлено початкові рукописи робіт. У статтях [17,19,20] дисертант брав участь у постановці задачі з дослідження водних розчинів ДНК методом випаровування краплин, розробці методики приготування зразків і написанні тексту рукописів робіт. У роботах [10,42,46,51] здобувачем проведено аналіз експериментальних даних, побудовано моделі фізичного механізму формування ДНК-сольових комплексів для пояснення формування текстур у висушених плівках ДНК, спільно з

співавторами підготовлено рукописи робіт. У [5,29] дисертантом була поставлена задача, що стосується дослідження динаміки протийонів ДНК у зовнішньому електричному полі методом молекулярної динаміки, здійснювалося наукове керівництво роботою, спільно з співавтором написано тексти рукописів робіт. У роботі [2] здобувачем була поставлена задача, здійснювалося наукове керівництво дослідженнями, побудовано нову поліелектролітну модель ДНК, та підготовлено основний текст рукопису статті. У статті [3] дисертантом було проведено молекулярно-динамічні симуляції систем ДНК з протийонами та пероксидом водню, зроблено обробку промодельованих траєкторій, спільно зі співавторами підготовлено рукопис статті. У [6,30-32] здобувачем проведено молекулярно-динамічні симуляції систем ДНК з поліамінами, зроблено обробку промодельованих траєкторій, запропоновано модель взаємодії поліамінів з ДНК, спільно з співавторами підготовлено рукописи робіт; у роботах [1,21,22,26-28] дисертантом проведено аналіз молекулярно-динамічних траєкторій для визначення розподілу протийонів навколо макромолекули ДНК, запропоновано модель взаємодії поліамінів з подвійною спіраллю, спільно з співавторами підготовлено рукописи робіт. У підручнику з грифом МОН здобувачем оприлюднено підрозділ [24], що стосується дослідження низькочастотних спектрів ДНК.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота, виконана Перепелицею Сергієм Миколайовичем на тему «Структура та динаміка впорядкування протийонів навколо подвійної спіралі ДНК», є завершеною науково-дослідною роботою, в якій вирішується важлива наукова проблема, що полягає у визначенні структурних та динамічних властивостей впорядкування протийонів навколо подвійної спіралі ДНК. Отримані результати є новими та оригінальними і мають науково-теоретичну та практичну цінність. Зміст дисертації відповідає визначеній меті, поставлені здобувачем наукові завдання вирішені повністю, мети дослідження досягнуто. Основні положення та висновки дисертації, сформульовані здобувачем, мають незаперечну наукову новизну, повністю обґрунтовані й отримали необхідну апробацію на наукових конференціях, зібраннях та семінарах. Структура та обсяг роботи відповідають встановленим вимогам. У публікаціях здобувача відображені всі положення дисертації.

Вищевикладене дозволяє зробити висновок про те, що дисертаційне дослідження Перепелиці Сергія Миколайовича «Структура та динаміка впорядкування протийонів навколо подвійної спіралі ДНК» відповідає всім вимогам п. 7, 8 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17.11.2021 року №1197, які висуваються до докторських дисертацій, і рекомендується до захисту на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальностями 01.04.02 – теоретична фізика та 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки).

Результати дисертаційного дослідження обговорено і схвалено на розширеному засіданні відділу теорії нелінійних процесів в конденсованих середовищах Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова Національної академії наук України 2 червня 2022 року.

Головуючий на засіданні фахового семінару:
завідувач відділу теорії нелінійних процесів
в конденсованих середовищах,
ІТФ ім. М.М. Боголюбова НАН України
д.ф.-м.н., ст. н.с.



Лариса БРИЖИК

Рецензенти:

завідувач відділу синергетики
ІТФ ім. М.М. Боголюбова НАН України
акад. НАН України, д.ф.-м.н., проф.



Богдан ЛЕВ

завідувач відділу теорії квантових
процесів у наносистемах
ІТФ ім. М.М. Боголюбова НАН України
член-кор. НАН України, д.ф.-м.н., проф.



Ельмар ПЕТРОВ

завідувач відділу теорії нелінійних процесів
в конденсованих середовищах
ІТФ ім. М.М. Боголюбова НАН України
д.ф.-м.н., ст. н.с.



Лариса БРИЖИК

Учений секретар семінару
н.с. відділу теорії нелінійних процесів
в конденсованих середовищах
ІТФ ім. М.М. Боголюбова НАН України
к.ф.-м.н.



Дмитро П'ЯТНИЦЬКИЙ