

Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова
НАН України

Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова
НАН України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Здоровський Олексій Олександрович

УДК 539.199; 577.323

ДИСЕРТАЦІЯ

Конкурентна взаємодія молекул пероксиду водню та води з центрами впізнавання макромолекули ДНК

01.04.02 – теоретична фізика

природничі науки

(104 – фізика та астрономія)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

підпис, ініціали та прізвище здобувача

Науковий керівник:

Волков Сергій Наумович
доктор фізико-математичних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2019

Анотація

Здорецький О.О. Конкурентна взаємодія молекул пероксиду водню та води з центрами впізнавання макромолекули ДНК – ІТФ ім. М.М. Боголюбова НАН України, Київ, 2019.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 01.04.02 – теоретична фізика (природничі науки, 104 - фізика та астрономія). – Рукопис.

Взаємодія біологічних макромолекул із молекулами середовища є надзвичайно важливим напрямком досліджень фізики біополімерів. Під дією зовнішніх факторів, таких як температура, тиск, а також іонізуюче випромінювання структура та функціонування біологічних макромолекул в клітині суттєво змінюється. Зокрема, макромолекула ДНК може переходити в інші форми подвійної спіралі, що, безумовно, повинно позначитися на її функціонуванні в клітині живого організму. Серед зовнішніх факторів впливу на функціонування ДНК особливу цікавість викликає дія іонізуючого випромінювання: гама-променів, рентгенівських променів, а також важких іонів. Дія цих факторів, в залежності від інтенсивності випромінювання, може мати лікувальні або пошкоджуючі властивості для організму.

Зараз у світі побудована велика кількість прискорювачів, де пучки важких іонів (протони, α -частинки, ядра $^{12}\text{C}^{6+}$) з початковими енергіями ~ 100 МеВ використовуються для лікування онкологічних захворювань. Цей метод дістав назву іонної терапії. Основна перевага даного методу над іншими видами променевої терапії полягає в так-званому ефекті Брегга, коли важкі іони основну частину своєї енергії передають середовищу на певній відстані від поверхні тіла. Цей ефект робить метод іонної терапії особливо ефективним для лікування утворень, які локалізовані вглибині організму. Всі параметри піку Брегга, такі як положення, його ширина та інтенсивність, можуть бути розраховані з достатньо великою точністю. Проте конкретного молекулярного механізму деактивації біо-

логічних клітин під час іонної терапії на сьогодні ще не встановлено. Відповідно, фізичні процеси, які мають місце під час іонної терапії, потребують фундаментального теоретичного дослідження.

Як відомо, центральною мішенню в радіаційній терапії є макромолекула ДНК опромінюваних клітин. У фізіологічних умовах макромолекула ДНК знаходиться у водному середовищі, яке визначає структуру та стабільність подвійної спіралі. Під дією іонізуючого випромінювання середовище клітини зазнає суттєвих змін (процес радіолізу), що може вплинути на стабільність подвійної спіралі, і, відповідно, на всі подальші процеси передачі генетичної інформації в клітині. Дослідження радіолізу води показують, що в середовищі клітини виникає велика кількість додаткових продуктів, таких як електрони (e^-), вільні радикали ($\text{HO}\bullet$, $\text{H}\bullet$, $\text{HO}_2\bullet$), іони (OH^- , H_3O^+), а також молекулярні продукти (H_2 , H_2O_2).

Загальновідомим механізмом деактивації ракових клітин під час іонної терапії є розриви хімічних зв'язків остову макромолекули ДНК під дією вторинних електронів та вільних радикалів. Проте добре відомо, що існують потужні фізичні механізми репарації одноланцюжкових розривів остову ДНК в клітині. В той же час, імовірність дволанцюжкових розривів, що не підлягають репарації, є вкрай низькою. В зв'язку з цим, реалізація даного процесу як основного механізму іонної терапії залишається під питанням.

З результатів моделювання методами Монте-Карло процесу радіолізу води відомо, що в середовищі опромінюваної клітини на фізіологічних часах життя (~ 1 мксек) в суттєвій кількості накопичуються молекули пероксиду водню (H_2O_2). Проте, в попередніх дослідженнях механізмів іонної терапії, роль цих молекул в деактивації ДНК клітин в достатній мірі не обговорювалася.

В дисертаційній роботі запропоновано механізм деактивації ДНК онкологічних клітин в процесі іонної терапії, який полягає в тому, що молекула пероксиду водню може утворювати певний стабільний комплекс з атомними групами макромолекули ДНК, і таким чином блокувати процеси передачі генетичної інформації в ракових клітинах. Оскільки моле-

кули води та пероксиду водню мають подібну структуру, вони можуть конкурувати в розчині за місця зв'язування з ДНК. В дисертаційній роботі досліджено конкурентну взаємодію молекул H_2O_2 і H_2O з центрами неспецифічного (фосфатні групи остову ДНК) і специфічного (нуклеїнові основи і пари основ) впізнавання макромолекули ДНК.

Сучасні методи молекулярної механіки, такі як метод атом-атомних потенціальних функцій зараз досягнули такого рівня, що вони можуть бути використані для розв'язку задач у складних біологічних системах. Це стало можливим через бурхливий розвиток експериментів з рентгеноструктурного аналізу, ядерного магнітного резонансу, а також молекулярної спектроскопії, які є основним джерелом інформації для вибору параметрів обчислень. Такі силові поля, як CHARMM та AMBER зараз широко використовуються для розрахунків енергетичних та динамічних параметрів молекулярних комплексів біологічних макромолекул. Також дуже важливим етапом є порівняння отриманих енергій взаємодії із результатами так-званих методів розрахунку 'із першопринципів' - методів квантової механіки молекул. Такий багатогранний аналіз дозволяє отримати повну інформацію про можливість формування тих чи інших молекулярних комплексів. У зв'язку з цим, в даній роботі для розрахунків енергій взаємодії досліджуваних комплексів використано методи атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул.

Перевірку результатів теоретичних розрахунків виконаної роботи може бути здійснено за допомогою методів мікроманіпулювання окремою молекулою. Ці методи дозволяють працювати з біологічними макромолекулами як з окремими системами. Можуть бути досліджені важливі властивості подвійної спіралі ДНК: кручення, згин, розтяг, а також послідовне розкриття пар нуклеїнових основ під дією зовнішньої сили в присутності значної кількості молекул пероксиду водню. В дисертаційній роботі показано можливість експериментального спостереження блокування молекулами пероксиду водню процесу розкриття пар основ ДНК.

В роботі поставлено наступні конкретні задачі.

1. Провести аналіз експериментальних даних та теоретичних розрахунків процесів радіолізу води і встановити співвідношення молекулярних фрагментів, що виникають у середовищі на фізіологічних часових масштабах.
2. Показати, що методи атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул можуть бути використані для розрахунку енергій взаємодії та просторової конфігурації комплексів молекули пероксиду з активними центрами подвійної спіралі ДНК. Проаналізувати, як врахування ефектів середовища впливає на отримані результати.
3. Розрахувати енергію та структуру комплексів фосфатної групи ДНК з молекулою пероксиду водню, та порівняти з відповідними комплексами з молекулою води.
4. Визначити атомні групи нуклеїнових основ ДНК, які є суттєво більш енергетично вигідними для утворення комплексів з молекулою пероксиду водню, ніж із молекулою води. Знайти просторові конфігурації пар нуклеїнових основ, стабілізованих молекулою пероксиду водню, та порівняти з відповідними комплексами з молекулою води.
5. Визначити можливість появи ‘привідкритих’ та ‘розтягнутих’ конфігурацій пар основ, стабілізованих молекулами пероксиду водню, на траєкторії розкриття макромолекули ДНК під дією зовнішньої сили.
6. Показати, що поява таких станів може призводити до зростання сили розкриття подвійної спіралі. Визначити імовірні параметри процесу розкриття стабілізованих пероксидом пар основ в ДНК у методі мікроманіпулювання структурою подвійної спіралі.
7. Показати можливість експериментальної перевірки блокування молекулами пероксиду водню процесу розкриття пар нуклеїнових основ макромолекули ДНК.

В дисертаційній роботі отримано такі нові наукові результати:

1. Вперше досліджено взаємодію молекул пероксиду водню з центрами неспецифічного (фосфатні групи остову) та специфічного (нуклеїнові основи) впізнавання подвійної спіралі ДНК.

2. Показано, що фосфатні групи ДНК можуть утворити стійкі комплекси з молекулами пероксиду водню, які є більш стабільними та більш довгоживучими, ніж аналогічні комплекси з молекулами води.
3. Визначено атомні групи нуклеїнових основ ДНК, з якими молекула пероксиду водню зв'язується суттєво краще за молекулу води.
4. Знайдено просторові конфігурації пар нуклеїнових основ, стабілізованих молекулами пероксиду водню, які можуть спостерігатися на експерименті з послідовного розкриття пар нуклеїнових основ ДНК за допомогою методів мікроманіпулювання.
5. Вперше запропоновано метод експериментальної перевірки можливості блокування молекулами пероксиду водню процесу розкриття пар нуклеїнових основ макромолекули ДНК під дією зовнішньої сили.

Дослідження процесу взаємодії молекул пероксиду водню з активними центрами макромолекули ДНК веде до розуміння молекулярних процесів, що мають місце в живих клітинах під дією іонізуючого випромінювання. Запропонований у даній роботі молекулярний механізм деактивації ДНК ракових клітин дозволяє підвищити ефективність лікування онкологічних захворювань пучками важких іонів.

Результати дослідження опубліковано в провідних зарубіжних та українських реферованих журналах [1—5].

Структура дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, висновків, переліку використаних літературних джерел та додатків. Повний обсяг дисертації складає 119 сторінок, дисертація містить 26 рисунків, 15 таблиць, 10 з яких займають окремі сторінки. Список використаних джерел складається зі 107 найменувань та займає 12 сторінок.

Ключові слова: ДНК, пероксид водню, нуклеїнові основи, фосфатні групи, іонна терапія.

Список публікацій здобувача:

- [1] D. V. Piatnytskyi, O. O. Zdorevskyi, S. M. Perepelytsya, and S. N. Volkov, «Understanding the mechanism of DNA deactivation in ion

- therapy of cancer cells: hydrogen peroxide action», *The European Physical Journal D* **69**, 255 (2015).
- [2] D. Piatnytskyi, O. Zdorevskyi, S. Perepelytsya, and S. Volkov, «Formation of complexes of hydrogen peroxide molecules with DNA», *Ukrainian journal of physics* **61**, 219–225 (2016).
- [3] O. Zdorevskyi, D. Piatnytskyi, and S. Volkov, «Blocking of DNA specific recognition sites by hydrogen peroxide molecules in the process of ion beam therapy of cancer cells», *Dopov. nac. akad. nauk. Ukr.*, 82–89 (2019).
- [4] O. Zdorevskyi and S. Volkov, «The Possibility of Blocking the Process of DNA Base Pairs Opening by Hydrogen Peroxide», *Ukrainian journal of physics* **64**, 500 (2019).
- [5] O. Zdorevskyi and S. N. Volkov, «Possible scenarios of DNA double-helix unzipping process in single-molecule manipulation experiments», *European Biophysics Journal* **47**, 917–924 (2018).

Abstract

Zdorevskyi O.O. Competitive interaction of hydrogen peroxide and water molecules with recognition sites of DNA macromolecule – Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

Thesis for the Candidate of Science in Physics and Mathematics degree in speciality 01.04.02 – theoretical physics (natural sciences, 104 - physics and astronomy). – Manuscript.

The interaction of biological macromolecules with the medium is an extremely important area of research in the physics of biopolymers. Under the influence of external factors, such as temperature, pressure, as well as ionizing radiation, the structure and functions of biological macromolecules in the cell change significantly. In particular, DNA macromolecule can transit into other forms of double helix, which should certainly affect its functioning in a cell of living organism. Among the external factors affecting the DNA functioning, the action of ionizing radiation is especially important: action of gamma rays, x-rays, and heavy ions. The action of these factors, depending on the intensity of the radiation, may give healing or damaging impact to the body.

A large number of accelerators are now being built in the world, where beams of heavy ions (protons, α -particles, carbon ions) with initial energies of ~ 100 MeV are used to treat oncological diseases. This method is called ion therapy. The main advantage of this method over other types of radiation therapy lies in the so-called Bragg effect, when heavy ions transfer the most amount of their energy to the medium at a certain distance from the surface of the body. This effect makes the method of ion beam therapy especially effective for the treatment of tumors that are localized deep enough in the body. All Bragg peak parameters, such as position, width and intensity, can be calculated with sufficient accuracy. However, no specific molecular mechanism of the deactivation of biological cells during ion therapy has yet been

determined. Consequently, the physical processes that take place under the action of ionizing irradiation require a fundamental theoretical study.

It is known that the central target in radiation therapy is DNA macromolecule of the irradiated cells. Under physiological conditions, the DNA macromolecule is situated in water medium that determines the structure and stability of the double helix. Under the influence of ionizing radiation, the intracellular medium undergoes significant changes (the process of water radiolysis), which can affect the stability of the double helix, and, therefore, all subsequent genetic information transfer processes in the cell. Studies of water radiolysis show that in the intracellular medium many additional products occur such as electrons (e^-), free radicals ($HO\bullet$, $H\bullet$, $HO_2\bullet$), ions (OH^- , H_3O^+), as well as molecular products (H_2 , H_2O_2).

A commonly known mechanism of the deactivation of cancer cells during ion therapy is the rupture of chemical bonds of the DNA backbone under the influence of secondary electrons and free radicals. However, it is well known that the powerful reparation mechanisms for the DNA single-strand breaks are present in a cell. At the same time, the probability of non-repairable double-strand breaks is extremely low. In this regard, the implementation of this process as the main mechanism of ion beam therapy remains debatable.

Results of Monte Carlo simulations of the water radiolysis process show that at physiological timescales ($\sim 1 \mu\text{sec}$), hydrogen peroxide molecules (H_2O_2) accumulate in the medium of the irradiated cell. However, in the previous studies, the role of these molecules in the deactivation of DNA of cancer cells has not been discussed properly.

The present work proposes a mechanism of the DNA deactivation of cancer cells in the process of ion beam therapy. According to this mechanism, hydrogen peroxide molecules can form stable complexes with the atomic groups of the DNA macromolecule, and in this way block the genetic information transfer processes in cancer cells. As water and hydrogen peroxide molecules have a similar structure, they can compete for binding with DNA sites in solution. In the present work, the competitive interaction of H_2O_2 and H_2O molecules with nonspecific (phosphate groups of DNA backbone) and specific (nucleic bases and base pairs) DNA recognition sites is investigated.

Modern molecular mechanics methods, such as the atomic-atomic potential functions method, have now reached such a level that they can be used to solve problems in complex biological systems. This became to be possible because of the rapid development of X-ray structural analysis experiments, nuclear magnetic resonance, and molecular spectroscopy, which are the main source of information for the choice of calculation parameters. Force fields such as CHARMM and AMBER are now widely used to calculate the energetical and dynamical properties of macromolecular complexes. It is also a very important step to compare the obtained interaction energies with the results of the so-called ‘ab initio’ calculation methods - methods of molecular quantum mechanics. Such multi-scale analysis allows to obtain complete information about the possibility of formation of certain molecular complexes. Therefore, in the present study the atomic-atomic potential functions method as well as molecular quantum mechanics are used for calculations of the interaction energies in the considered complexes.

The results of theoretical calculations of the performed work can be verified by single-molecule manipulation methods. These methods allow to work with biological macromolecules as separate systems. Important properties of DNA double helix such as torsion, bending, stretching, as well as sequential opening of nucleic base pairs under the action of an external force in the presence of a large number of hydrogen peroxide molecules can be investigated. The dissertation presents the possibility of the experimental observation of blocking the process of DNA base pairs opening by hydrogen peroxide molecules.

To achieve the goal of the present study, the following tasks were set.

1. To carry out the analysis of the experimental data and theoretical calculations of water radiolysis processes and to establish the ratio of molecular fragments occurring in the medium on physiological time scales.
2. To show that the methods of atomic-atomic potential functions and molecular quantum mechanics can be used to calculate the interaction energies and spatial configuration of complexes of hydrogen peroxide molecule with DNA active sites. To analyze how consideration of the effects of surrounding environment affects the obtained results.

3. To calculate the interaction energy and structure of complexes consisting of DNA phosphate group with hydrogen peroxide molecule, and to compare with the corresponding complexes with water molecule.
4. To determine the atomic groups of the DNA nucleic bases that are more energetically favorable to be bound by hydrogen peroxide than by water molecule. To find the spatial configurations of nucleic acid base pairs stabilized by hydrogen peroxide molecule and to compare with the corresponding complexes with water molecule.
5. To determine the possibility of occurrence of 'preopened' and 'stretched' configurations of base pairs stabilized by hydrogen peroxide molecules on the pathway of opening of DNA base pairs under the action of an external force. To show that the appearance of such states can lead to increase of the opening force.
6. To determine the probable parameters of the process of opening of peroxide-stabilized DNA base pairs in the double helix structure manipulation method.
7. To demonstrate the possibility of the experimental verification of the blocking of the process of nucleic base pairs opening by hydrogen peroxide molecules.

The following new scientific results are obtained in the present work:

1. The interaction of hydrogen peroxide molecules with nonspecific (phosphate groups of DNA backbone) and specific (nucleic bases) DNA recognition sites was investigated.
2. It has been shown that DNA phosphate groups can form stable complexes with hydrogen peroxide molecules that are more stable and more long-living than similar complexes with water molecules.
3. The atomic groups of the DNA nucleic bases where hydrogen peroxide molecule binds better than the water molecule are determined.
4. The spatial configurations of nucleic acid base pairs stabilized by hydrogen peroxide molecules have been found. These configurations can be observed in the experiment of sequential opening of DNA nucleic base pairs (DNA unzipping) by single-molecule manipulation method.
5. The experimental verification method of the possibility of blocking of the DNA unzipping process by hydrogen peroxide molecules is proposed.

The study of the interaction of hydrogen peroxide molecules with the active sites of DNA macromolecule leads to the understanding of the molecular processes that take place in living cells under the action of ionizing radiation. The molecular mechanism of the DNA deactivation of cancer cells proposed in this work allows to increase the efficiency of treatment of oncological diseases by heavy ion beams.

The results of the study are published in the leading foreign and Ukrainian refereed journals [1–5].

Structure of the thesis. The thesis consists of an introduction, 5 sections, conclusions, a list of used literature references and appendix. Overall volume of the thesis is 119 pages, the thesis contains 26 figures, 15 tables, 10 of which occupy separate pages. The list of references consists of 107 titles and covers 12 pages.

Keywords: DNA, hydrogen peroxide, nucleic bases, phosphate groups, ion therapy

List of publications:

- [1] D. V. Piatnytskyi, O. O. Zdorevskyi, S. M. Perepelytsya, and S. N. Volkov, «Understanding the mechanism of DNA deactivation in ion therapy of cancer cells: hydrogen peroxide action», *The European Physical Journal D* **69**, 255 (2015).
- [2] D. Piatnytskyi, O. Zdorevskyi, S. Perepelytsya, and S. Volkov, «Formation of complexes of hydrogen peroxide molecules with DNA», *Ukrainian journal of physics* **61**, 219–225 (2016).
- [3] O. Zdorevskyi, D. Piatnytskyi, and S. Volkov, «Blocking of DNA specific recognition sites by hydrogen peroxide molecules in the process of ion beam therapy of cancer cells», *Dopov. nac. akad. nauk. Ukr.*, 82–89 (2019).
- [4] O. Zdorevskyi and S. Volkov, «The Possibility of Blocking the Process of DNA Base Pairs Opening by Hydrogen Peroxide», *Ukrainian journal of physics* **64**, 500 (2019).

- [5] O. Zdorevskyi and S. N. Volkov, «Possible scenarios of DNA double-helix unzipping process in single-molecule manipulation experiments», *European Biophysics Journal* **47**, 917–924 (2018).

Зміст

Перелік умовних позначень, скорочень і термінів	19
Вступ	21
Розділ 1 Молекулярні механізми іонної терапії. Роль молекул пероксиду водню в радіолізі середовища біологічної клітини	27
1.1 Пік Брегга. Формула Бете-Блоха	27
1.2 Дія іонного пучка на живі клітини та зміна молекулярного складу середовища в процесі іонної терапії	30
1.3 Фізичні властивості та хімічна структура молекул пероксиду водню та води	34
1.4 Можливий механізм деактивації ДНК під час іонної терапії	36
Розділ 2 Методика розрахунків енергії взаємодії в молекулярних комплексах	39
2.1 Метод атом-атомних потенціальних функцій	39
2.2 Метод квантової механіки молекул	42
2.3 Структурні параметри молекул, що розглядаються в даній роботі	45
2.3.1 Параметри обчислень методу атом-атомних потенціальних функцій	45
2.3.2 Структурні параметри молекул в рамках методу квантової механіки	47
2.4 Методологічні розрахунки енергії стабільності простих комплексів	48
2.4.1 Оптимізовані просторові структури молекул пероксиду водню та води	49
2.4.2 Комплекси, що складаються з молекул води та пероксиду водню	52
2.4.3 Взаємодія молекули H_2O_2 з гідратною оболонкою	53

Розділ 3	Утворення комплексів молекул пероксиду водню та води з центрами неспецифічного впізнавання ДНК — фосфатними групами	55
3.1	Комплекси фосфатної групи ДНК з молекулами H_2O_2 та H_2O	55
3.2	Комплекси фосфатної групи ДНК з молекулами H_2O_2 та H_2O в присутності протиіону Na^+	56
3.3	Про можливість спостереження взаємодії молекул пероксиду водню з центрами неспецифічного впізнавання ДНК	61
3.4	Порівняння часів життя молекул пероксиду водню та води біля фосфатної групи ДНК	62
Розділ 4	Утворення комплексів молекул пероксиду водню та води з центрами специфічного впізнавання ДНК — нуклеїновими основами	65
4.1	Взаємодія молекул H_2O_2 і H_2O з окремими нуклеїновими основами ДНК	65
4.1.1	Стабільні комплекси молекул пероксиду водню та води з окремими нуклеїновими основами ДНК	66
4.1.2	Про можливість блокування атомних груп нуклеїнових основ молекулами пероксиду водню . . .	69
4.2	Взаємодія молекул H_2O_2 і H_2O з нуклеїновими основами в комплементарних парах ДНК	70
4.2.1	Взаємодія нуклеїнових основ в комплементарних парах А·Т та G·C	71
4.2.2	Конфігурації пар нуклеїнових основ ДНК, стабілізовані молекулами пероксиду водню та води . .	72
4.2.3	Про можливість блокування молекулами пероксиду водню процесу розкриття пар нуклеїнових основ ДНК	76

Розділ 5	Можливість експериментального спостереження блокування пероксидом водню процесу розкриття макромолекули ДНК	85
5.1	Можливі сценарії процесу анзіпінгу ДНК	87
5.2	Розрахунок енергій розкриття за двома сценаріями . . .	90
5.3	Оцінка критичної сили	93
5.4	Можливість реалізації двох сценаріїв анзіпінгу	96
Висновки		99
Список використаних джерел		101
Додаток А	Список публікацій за темою та відомості про апробацію	113
Додаток Б	Таблиці та рисунки	117

Перелік умовних позначень, скорочень і термінів

ДНК	Дезоксирибонуклеїнова кислота
A	Аденін
T	Тимін
G	Гуанін
C	Цитозин
A·T	Комплементарна пара нуклеїнових основ Аденін-Тимін
G·C	Комплементарна пара нуклеїнових основ Гуанін-Цитозин
AAPF	Атом-атомні потенціальні функції
AAPFh	Атом-атомні потенціальні функції з використанням залежності 2.5
B3LYP	функціонал Becke, 3-параметричний, Lee–Yang–Parr
PCM	Модель поляризованого континууму (Polarizable continuum model)
ЯМР	Ядерний магнітний резонанс
bp	пара основ (base pair)
WC	уотсон-криківський (watson-crick)
dsDNA	дволанцюжкова ДНК
in vivo	всередині клітини
CP-корекція	корекція перекриття базисів (counterpoise correction)

Вступ

Актуальність теми. Вплив середовища на структуру та функціонування біологічних макромолекул є фундаментальною проблемою в дослідженнях фізичних властивостей біологічних систем. Взаємодія біологічних молекул з молекулами середовища визначає механізми ключових біологічних процесів збереження та передачі генетичної інформації. Структура ДНК у вигляді подвійної спіралі утворюється у фізіологічних умовах в середовищі живої клітини та стабілізується молекулами води та протиіонами. Від структури розчину залежить форма подвійної спіралі, наявність механічних напружень в її структурі, правильність та послідовність зчитування генетичної інформації. Під час онкологічних захворювань процеси передачі інформації відбуваються неконтрольовано, що призводить до утворення та росту пухлин.

Одним із найбільш перспективних методів лікування онкологічних захворювань є іонна терапія, де на спеціальних прискорювачах проходить опромінювання пацієнтів пучками важких іонів з енергіями ~ 100 МеВ. Побудовано велику кількість спеціалізованих ядерних центрів, де проводиться лікування. Проте конкретного фізичного механізму деактивації ракових клітин у методі іонної терапії ще не визначено. Відповідно, ефективність цього методу залишається недостатньо високою.

Дослідження процесу радіолізу води, що має місце під час іонної терапії, показують, що на біологічних часах життя серед усіх продуктів радіолізу найбільшу концентрацію мають молекули пероксиду водню (H_2O_2). Але визначенню ролі цих молекул в іонній терапії не приділялася достатня увага. У дисертації за допомогою комп'ютерного моделювання досліджено взаємодію молекул H_2O_2 з активними центрами макромолекули ДНК, та запропоновано новий механізм деактивації ракових клітин під час іонної терапії. Він полягає в тому, що молекула пероксиду водню може утворити стійкий комплекс з активними центрами ДНК, і тим самим заблокувати процеси передачі генетичної інформації в ракових клітинах. Дослідження даного процесу на молекулярному рівні, а

саме, комп'ютерне моделювання зв'язування молекули пероксиду водню з активними атомними групами ДНК, повинно суттєво поглибити розуміння фізичних процесів, що відбуваються під час іонної терапії, і, як наслідок, підвищити ефективність, та зменшити ресурсоемність такого лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проводились згідно з планом науково-дослідних робіт відділу теорії нелінійних процесів у конденсованих середовищах Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України в рамках фундаментальних держбюджетних НДР:

- ‘Особливості механічних, електронних та магнітних процесів у низьковимірних системах на наномасштабах’ (0116U003192);
- ‘Комп'ютерне моделювання структури та динаміки ДНК в різних зовнішніх умовах’ (0117U003429);
- ‘Моделювання конкурентного зв'язування молекул води і пероксиду водню з атомними групами ДНК’ (0118U000662).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було встановлення можливості блокування молекулами пероксиду водню, які в суттєвій кількості виникають під час іонної терапії, активних центрів макромолекули ДНК ракових клітин.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі основні задачі:

1. Провести аналіз експериментальних даних та теоретичних розрахунків процесів радіолізу води і встановити співвідношення молекулярних фрагментів, що виникають у середовищі на фізіологічних часових масштабах.
2. Показати, що методи атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул можуть бути використані для розрахунку енергій взаємодії та просторової конфігурації комплексів молекули пероксиду з активними центрами подвійної спіралі ДНК. Проаналізувати, як врахування ефектів середовища впливає на отримані результати.

3. Розрахувати енергію та структуру комплексів фосфатної групи ДНК з молекулою пероксиду водню, та порівняти з відповідними комплексами з молекулою води.
4. Визначити атомні групи нуклеїнових основ ДНК, які є суттєво більш енергетично вигідними для утворення комплексів з молекулою пероксиду водню, ніж із молекулою води. Знайти просторові конфігурації пар нуклеїнових основ, стабілізованих молекулою пероксиду водню, та порівняти з відповідними комплексами з молекулою води.
5. Визначити можливість появи ‘привідкритих’ та ‘розтягнутих’ конфігурацій пар основ, стабілізованих молекулами пероксиду водню, на траєкторії розкриття макромолекули ДНК під дією зовнішньої сили. Показати, що поява таких станів може призводити до зростання сили розкриття подвійної спіралі.
6. Показати можливість експериментальної перевірки взаємодії молекул пероксиду водню з макромолекулою ДНК. Визначити імовірні параметри процесу розкриття стабілізованих пероксидом пар основ ДНК у методі мікроманіпулювання структурою подвійної спіралі.

Об'єкт дослідження - взаємодія молекули пероксиду водню з активними центрами макромолекули ДНК.

Предмет дослідження - комплекси центрів неспецифічного та специфічного впізнавання макромолекули ДНК із молекулами пероксиду водню та води.

Методи дослідження - комп'ютерне моделювання методами атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул.

Наукова новизна отриманих результатів.

1. Запропоновано новий механізм деактивації ракових клітин в процесі іонної терапії - блокування процесів передачі генетичної інформації молекулами пероксиду водню.
2. Вперше досліджено взаємодію молекул пероксиду водню з центрами неспецифічного (фосфатні групи остову) та специфічного (нуклеїнові основи) впізнавання подвійної спіралі ДНК.

3. Знайдено комплекси фосфатної групи ДНК з молекулою пероксиду водню, які є більш стабільними та більш довгоживучими, ніж аналогічні комплекси з молекулою води.
4. Визначено атомні групи нуклеїнових основ ДНК, з якими молекула пероксиду водню зв'язується суттєво краще за молекулу води.
5. Знайдено просторові конфігурації пар нуклеїнових основ, стабілізованих молекулами пероксиду водню, які можуть спостерігатися на експерименті з послідовного розкриття пар нуклеїнових основ ДНК за допомогою методів мікрomanipування.
6. Вперше запропоновано метод експериментальної перевірки можливості блокування молекулами пероксиду водню процесу послідовного розкриття пар нуклеїнових основ макромолекули ДНК під дією зовнішньої сили.

Практичне значення отриманих результатів.

Запропонований у даній роботі молекулярний механізм деактивації ДНК ракових клітин в процесі терапії онкологічних захворювань пучками важких іонів дозволяє підвищити ефективність лікування методами іонної терапії.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз наукової літератури, методом атом-атомних потенціальних функцій проведено розрахунок енергій взаємодії та структури комплексів молекул води та пероксиду водню з фосфатною групою остову ДНК, з нуклеїновими основами (Аденіном, Тиміном, Гуаніном та Цитозином), а також з парами нуклеїнових основ (Аденін-Тимін та Гуанін-Цитозин). Автором особисто здійснено інтерпретацію попередніх результатів та сформульовано попередні висновки. Разом з науковим керівником д.ф.-м.н. Волковим С.Н. були визначені мета, задачі роботи та способи їх вирішення, здійснено інтерпретацію отриманих результатів та зроблено остаточні висновки. В опублікованих спільно зі співавторами працях особистий внесок здобувача полягає в наступному: у роботах [1, 2] проведено комп'ютерне моделювання та проаналізовано отримані результати; в роботах [3, 4] здійснено розрахунок енергій взаємодії молекул пероксиду водню та води з нуклеїновими основами та

парами основ методом атом-атомних потенціальних функцій та сформулювано висновки; в роботі [5] проведено аналіз літератури, здійснено комп'ютерні розрахунки розкриття пар основ А·Т та Г·С за різними сценаріями, оцінено середню силу розкриття А·Т- та Г·С-вмісного гомополімеру.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на таких міжнародних та вітчизняних конференціях:

- D.V. Piatnytskyi, O.O. Zdorevskyi, S.M. Perepelytsya, S.N. Volkov «Creation of stable complexes of DNA double helix with hydrogen peroxide», VI Young scientists conference 'Problems of Theoretical Physics', Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 13-15 December (2014);
- O.Zdorevskyi, S. N. Volkov «About the possible scenario of the DNA unzipping process», VII Young scientists conference 'Problems of Theoretical Physics', Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 13-15 December (2016);
- O. Zdorevskyi, S.N. Volkov «The mechanism of DNA deactivation by hydrogen peroxide action», 13th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, Split, Croatia, 1-10 September (2016);
- O. Zdorevskyi, S.N. Volkov «Role of water and hydrogen peroxide molecules in nucleic base pairs stabilization», VIII Young scientists conference 'Problems of Theoretical Physics' Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 12-14 December (2017);
- О. Здоревський, С.Н. Волков «Два сценарії процесу анзіпінгу подвійної спіралі ДНК», 17-а Всеукраїнська школа-семінар та Конкурс молодих вчених зі статистичної фізики та теорії конденсованої речовини, Львів, Україна, 8-9 червня (2017);
- O. Zdorevskyi, S.N. Volkov «Possible scenarios of DNA unzipping process», 19th IUPAB and 11th EBSA congress, Edinburgh, Scotland, 16-20 July (2017);
- O.Zdorevskyi, D.V.Piatnytskyi, S.N.Volkov «Blocking of DNA sites of specific recognition by hydrogen peroxide molecules in the process of ion beam

therapy», IX Young scientists conference 'Problems of Theoretical Physics', Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, 4-5 December (2018);

- O.Zdorevskiy, S.N.Volkov «Competitive interaction of water and hydrogen peroxide molecules with specific DNA recognition sites», 14th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, Split, Croatia, 23 August - 1 September (2018);
- O.Zdorevskiy, D.V.Piatnytskyi, S.N.Volkov «Competitive interaction of hydrogen peroxide and water molecules with specific DNA recognition sites», Final AMMODIT Conference 'Mathematics for Life Sciences', Kyiv, Ukraine, 18-22 March (2019);
- O.Zdorevskiy, S.N.Volkov «The Possibility of blocking the process of DNA base pairs opening by hydrogen peroxide», X International Conference for Professionals and Young Scientists 'Low Temperature Physics 2019' in memory of B.Verkin for his 100th birthday anniversary, 3-7 June (2019);
- O.Zdorevskiy, D. Piatnytskyi, S.N. Volkov «Competitive interaction of hydrogen peroxide and water molecules with specific DNA recognition sites in the process of ion beam therapy», Joint 12th EBSA 10th ICBP-IUPAP biophysics congress, Madrid, 20-24 July (2019).

Публікації. Основні результати дисертації опубліковано у 5 статтях у провідних фізичних журналах та 11 тезах доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, висновків, переліку використаних літературних джерел та додатків. Повний обсяг дисертації складає 119 сторінок, дисертація містить 26 рисунків, 15 таблиць, 10 з яких займають окремі сторінки. Список використаних джерел складається зі 107 найменувань та займає 12 сторінок.

Розділ 1 Молекулярні механізми іонної терапії. Роль молекул пероксиду водню в радіолізі середовища біологічної клітини

1.1 Пік Брегга. Формула Бете-Блоха

Онкологічні захворювання є однією з найбільших проблем людства XXI століття. Сучасні статистичні дані [6] показують, що протягом останніх десятиліть кількість нових ліків для боротьби з раком стрімко зростає, в той час як смертність від онкологічних захворювань майже не зменшується. Саме тому, в наш час все більшого розповсюдження набувають альтернативні до хіміотерапії методи боротьби з онкологією.

Одним із найбільш ефективних методів лікування онкологічних захворювань на сьогоднішній день є радіаційна терапія. Вона полягає в тому, що живі тканини пацієнта піддаються дії певного виду іонізуючого випромінювання (рентген, гамма промені, фотони, важкі іони). Випромінювання, маючи певну початкову енергію на етапі формування пучка ($\sim 100 \text{ MeV}$), при проходженні через середовище, внаслідок багатократної взаємодії з молекулами середовища, поступово втрачає її. Графік енергетичних втрат у водному середовищі, в залежності від відстані проходження, для різних видів іонізуючого випромінювання наведено на Рис. 1.1.

Як видно з графіка, на відміну від інших видів іонізуючого випромінювання, важкі іони на початку майже не взаємодіють з молекулами середовища, а потім віддають основну частину своєї енергії під кінець свого пробігу у досить вузькому діапазоні простору. Цей ефект є основною перевагою важких іонів над іншими видами випромінювання для лікування утворень, локалізованих на певній відстані від поверхні тіла. Цей ефект був відкритий сером Вільямом Генрі Бреггом у 1904 р. [7], у зв'язку з чим

дістав назву пік Брега. В залежності від типу іонів та початкової енергії, можна регулювати положення, висоту та ширину піку, суміщаючи локалізацію максимальних енергетичних втрат з просторовим положенням пухлини.

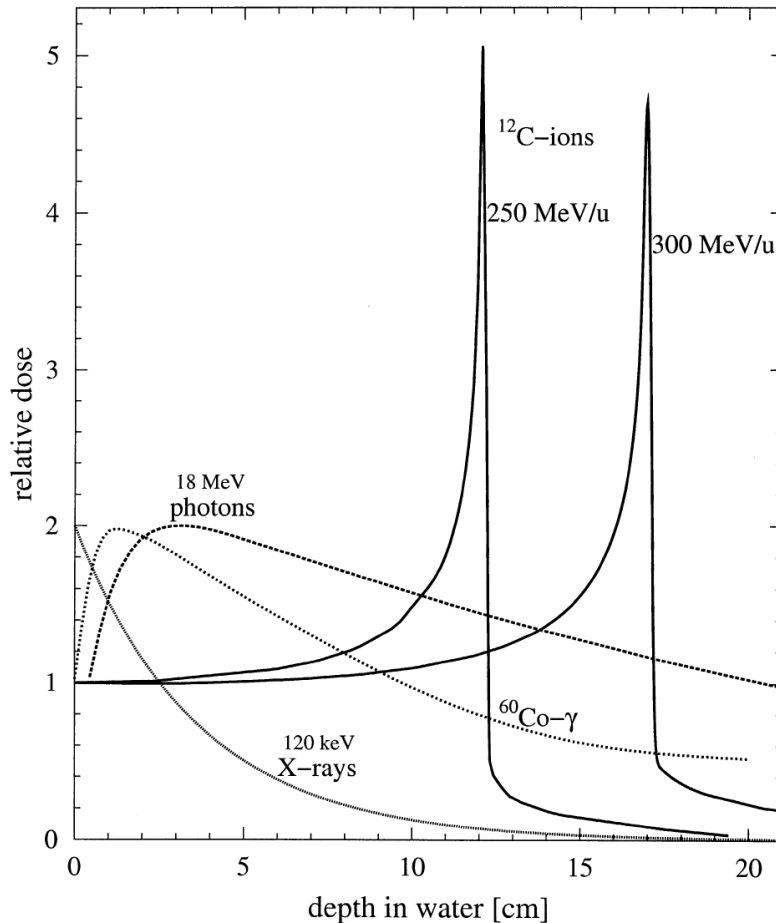


Рис. 1.1 Залежність поглинутої середовищем радіаційної дози від глибини проникнення для різних видів іонізуючого випромінювання (фотони з початковою енергією 18 MeV, рентгенівські промені 120 keV, γ -промені від ^{60}Co , а також іони ^{12}C 250 MeV/u та 300 MeV/u). Рис. взято з роботи [8].

Крива Брега (Рис. 1.1) описується формулою Бете-Блоха [9]. В нерелятивістському наближенні вона має наступний вигляд:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi Z^2 e^4 N_e}{m_e V^2} \ln\left(\frac{V^3}{\bar{\omega} Z e^2}\right), \quad (1.1)$$

де Z - заряд налітаючих іонів, V - швидкість налітаючих іонів, N_e - концентрація електронів на атомах середовища, $\bar{\omega}$ - середня частота обертання електронів на атомних орбітах, e - заряд електрона, m - маса електрона.

Розглянемо фізичні механізми проходження важких іонізуючих частинок через середовище. Нехай іон масою M пролітає на відстані b від електрона середовища масою m_e , причому $M \gg m_e$ (Рис. 1.2).

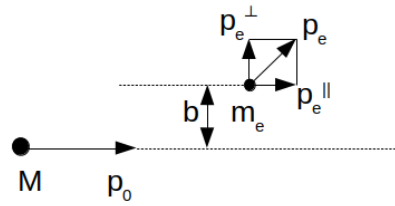


Рис. 1.2 Взаємодія налітаючого важкого іона масою M з електроном середовища масою m_e .

Тоді імпульс електрона, який він отримає внаслідок дії на нього кулонівської сили F з боку іона, матиме наступний вигляд:

$$\vec{p}_e = \vec{p}_e^{\parallel} + \vec{p}_e^{\perp} = \int_{-\infty}^{\infty} (\vec{F}^{\parallel} + \vec{F}^{\perp}) dt \quad (1.2)$$

Оскільки система симетрична, $\int_{-\infty}^{\infty} \vec{F}^{\parallel} dt = 0$. Вважаємо, що взаємодія є суттєвою лише на деякій відстані $2b$. Тоді:

$$p_e \approx F^{\perp} \Delta t, \quad (1.3)$$

де $\Delta t \approx \frac{2b}{v}$, $F^{\perp} = -\frac{Ze^2}{b^2}$. Відповідно, кінетична енергія електрона матиме вигляд:

$$K_e = \frac{(p_e^2)}{2m_e} = \frac{2Z^2e^4}{m_e v^2 b^2}, \quad (1.4)$$

Ця енергія за величиною дорівнює енергії, яку передає іон одному електрону. Якщо ж взяти до уваги енергії всіх електронів, які знаходяться в циліндричному шарі товщиною db на відстані b , та довжиною dx , то енергія, яку віддає іон середовищу, дорівнюватиме:

$$dE = -2\pi b K_e db dx N_e, \quad (1.5)$$

де N_e - концентрація електронів. Підставляючи сюди вираз (1.4), отримуємо:

$$-\frac{dE}{dx} = \int \frac{4\pi Z^2 e^4 N_e}{m_e V^2} \frac{db}{b}. \quad (1.6)$$

В загальному випадку, b може змінюватись від 0 до ∞ . Проте, оскільки інтеграл розбігається при $b=\infty$, необхідно визначити межі інтегрування: b_{max} та b_{min} .

Енергія електрона обмежена зверху енергією лобового зіткнення з іоном. В нерелятивістському наближенні, імпульс при лобовому зіткненні дорівнює $\vec{p}_{max} = \vec{p}_1 + \vec{p}_2 = 2m_e \vec{V}$. Звідси максимальна енергія становитиме $E_{max} = 2m_e V^2$. Прирівнюючи цей вираз до (1.4), знаходимо значення b_{min} : $b_{min} \approx \frac{Ze^2}{m_e V^2}$.

Значення b_{max} обирають з умови відсутності іонізації атомів середовища (час зіткнення більше за період обертання електронів на орбіті). Час зіткнення становить $t_{col} \approx \frac{2b}{V}$. Звідси $b_{max} \approx \frac{V}{\omega}$, ω - середня частота обертання електронів на атомних орбітах.

Звідси знаходимо залежність для енергетичних втрат у вигляді (1.1). З (1.1) видно, що енергетичні втрати не залежать від маси налітаючих іонів, а лише від їх заряду.

1.2 Дія іонного пучка на живі клітини та зміна молекулярного складу середовища в процесі іонної терапії

Метод іонної терапії зараз широко розповсюджений в Європі. Початком іонної терапії як лікувального методу можна вважати 2009 рік, коли у Гейдельберзі (корпорація GSI, Німеччина) почав функціонувати великий лікувальний центр, де на спеціальних прискорювачах почали проводити лікування пацієнтів. Після цього ціла низка компаній в Європі (CNAO, RKA, HIT, NRock, Etoile, ін.) почали займатися дослідже-

нням в цій області. На сьогоднішній день методами іонної терапії проходить лікування у великій кількості європейських країн (Англія, Франція, Німеччина, Італія, Австрія, Швеція, Швейцарія, Данія, Нідерланди, Чехія, Польща), країнах північної Америки (США, Канада), Азії (Китай, Індія, Японія, Росія, Південна Корея, Тайвань), а також у ПАР. Загалом, на вересень 2019 року в світі функціонує 96 лікувальних центрів методом важких іонів, і ще 44 знаходяться на стадії будівництва (<https://www.ptcog.ch/>). Найбільш ефективними для іонно-променевого лікування є атоми карбону ^{12}C , оскільки вони розсіюються набагато менше, ніж більш легкі частинки (протони, α -частинки) [10].

У лікувальних центрах перед тим, як перейти безпосередньо до лікування, спочатку проводяться попередні дослідження - починаючи від розрахунку необхідної початкової енергії та тривалості опромінення, і закінчуючи різноманітними біологічними ефектами, які мають місце під час іонної терапії. В результаті, складається так званий план лікування. Умовно, його можна поділити на декілька частин [10]:

1. Побудова фізичної моделі пучка.
2. Побудова радіобіологічної моделі.
3. Оптимізація та верифікація розподілу дози.

На першому етапі, застосовуючи методи Монте-Карло, здійснюється розрахунок положення піку Брегга, його висоти та ширини. Таким чином, розраховується кількість енергії, яка передається середовищу, а також область її локалізації. В ході лікування намагаються зробити так, щоб область цієї локалізації максимально співпала з раковою пухлиною. На другому етапі вивчаються різноманітні біологічні ефекти, які мають місце внаслідок передачі енергії від пучка іонів до середовища. Оскільки на сьогоднішній день існують потужні методи, які дозволяють з високою точністю розрахувати всі параметри піку Брегга, задача побудови фізичної моделі пучка не складає відчутних проблем. Проте, вже починаючи з другого етапу, побудова подальшого плану лікування стає досить нетривіальною задачею, оскільки конкретних фізичних механізмів дії пучків важких іонів на живі клітини не встановлено. Це було підкреслено у 2010 році в роботі [10]: “Unfortunately ab initio predictions of

cell survival and therapeutical RBE (Relative biological effectiveness) values based on ion track physics are neither reliable nor computationally feasible for years to come, due to lack of knowledge on the dominant biological processes associated with DNA damage and repair”. Варто також зазначити, що дана проблема не є вирішеною і до сьогоднішнього дня [11].

В радіобіології вважається, що для того, щоб зруйнувати ракову клітину, необхідно якимось чином деактивувати її ДНК. Згідно мультимасштабного підходу в іонній терапії [12], основними факторами впливу високоенергетичних іонів на живі клітини є розриви хімічних зв'язків остову ДНК внаслідок дії вторинних електронів та вільних радикалів, а також локального нагрівання середовища. Проте відомо [13], що в клітині існують потужні механізми репарації, здатні ліквідувати розриви хімічних зв'язків у ланцюжках подвійної спіралі. Саме тому необхідно досліджувати інші механізми деактивації ДНК ракових клітин в процесі іонної терапії.

Під час проходження високоенергетичних іонів через водне середовище, у ньому відбувається велика кількість хімічних реакцій — реакцій дисоціації молекул води. Цей процес дістав назву процесу радіолізу. Умовно, в залежності від часових масштабів, процес радіолізу поділяють на 3 етапи [14]:

1. Фізичний (до 10^{-15} сек). На цьому етапі відбуваються процеси іонізації молекул води, в результаті чого утворюються збуджені та іонізовані молекули води, а також електрони.

2. Фізико-хімічний етап (10^{-15} - 10^{-12} сек). Під час цього етапу відбуваються хімічні реакції, в результаті яких виникає велика кількість продуктів, таких як гідратовані електрони (e^-), вільні радикали ($HO\bullet$, $H\bullet$, $HO_2\bullet$), іони (OH^- , H_3O^+), а також молекулярні продукти (H_2 , H_2O_2).

3. Хімічний етап (10^{-12} - 10^{-6} сек). Відбувається рекомбінація новоутворених на попередньому етапі продуктів, а також їх дифузія у розчин. Рекомбінація припиняється після 10^{-6} сек, що вважається часовим масштабом фізіологічних процесів у живій клітині.

Дослідження радіолізу води [11, 15, 16] показують, що на фізико-хімічному етапі в області піку Брегга домінують вторинні електрони та

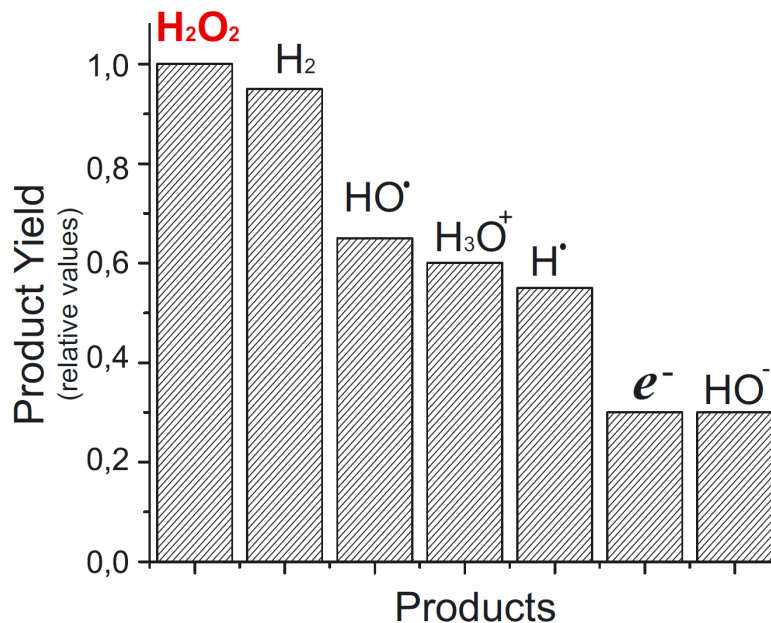
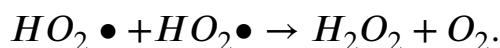


Рис. 1.3 Розподіл продуктів радіолізу води на фізіологічних часових масштабах (після 10^{-6} сек проходження іонів ^{12}C). Діаграма побудована використовуючи дані Монте-Карло моделювання [15].

вільні радикали. На часових масштабах $\sim 10^{-6}$ сек мають місце наступні реакції:



В результаті цих реакцій, концентрація масивних молекулярних продуктів стає більшою за концентрацію інших продуктів радіолізу. На Рис. 1.3 наведено розподіл продуктів радіолізу води внаслідок опромінення атомами ^{12}C на часових масштабах $\sim 10^{-6}$ сек [15].

Оскільки часові масштаби $\sim 10^{-6}$ сек є типовими для біологічних процесів, після проходження високоенергетичних іонів, у внутрішньоклітинному середовищі, серед усіх продуктів радіолізу найбільшу концентрацію мають молекулярні продукти, зокрема молекули пероксиду водню (H_2O_2).

Як відомо, молекули пероксиду водню присутні у живій клітині у певній концентрації за фізіологічних умов, але їх роль у функціонуванні клітини ще не вивчено належним чином [17]. Існують деякі методи лікува-

ння онкологічних захворювань (див. наприклад [18]), де молекули пероксиду водню вводяться в середовище клітини. Це призводить до загибелі ракових клітин, залишаючи при цьому здорові клітини неушкодженими [19]. Проте конкретних молекулярних механізмів цієї ‘селективної’ дії молекул пероксиду водню на ракові клітини на сьогоднішній день не встановлено. У зв'язку з цим, необхідно розглянути структуру та фізичні властивості молекули пероксиду водню більш детально.

1.3 Фізичні властивості та хімічна структура молекул пероксиду водню та води

Якщо поглянути на макроскопічні властивості води та пероксиду водню (Табл. 1.1), то деякі характеристики, такі як густина та температура плавлення, є дуже подібними. Це пов'язане з подібністю структури молекул H_2O_2 та H_2O (Рис. 1.4).

Табл. 1.1 Порівняння макроскопічних характеристик води та 100%-го розчину пероксиду водню [20].

Властивість	H_2O_2	H_2O
Агрегатний стан	рідина	рідина
Густина, $\cdot 10^3 \text{ кг/м}^3$	1.4	1.0
Кінематична в'язкість (при 20 °C), $\cdot 10^4 \text{ м}^2/\text{сек}$	1245,00	0,01
T плавлення, °C	−0,4	0,0

Молекула пероксиду водню складається з двох атомів кисню та двох атомів водню, які утворюють двогранний кут (Рис. 1.4). Значення цього двогранного кута суттєво залежить від зовнішніх умов і відрізняється для молекул у газовій фазі та в складі кристалічної структури [21, 22].

У той же час, величина кінематичної в'язкості води є суттєво меншою за відповідну величину для пероксиду водню. Відомо, що пероксид водню, як і вода в розчині утворює сітку водневих зв'язків. В силу своєї структури (додатковий атом кисню порівняно з молекулою води), молекула пероксиду може утворити більше водневих зв'язків із сусідніми

молекулами, ніж молекула води. Цим і пояснюється значно більша величина кінематичної в'язкості пероксиду водню порівняно з водою.

За відсутності впливу зовнішніх факторів молекула H_2O_2 є відносно стабільною молекулою [23]. Проте, вона може дисоціювати в присутності іонів перехідних металів або іонізуючого випромінювання. Енергія хімічного зв'язку O-H становить ≈ 100 ккал/моль, в той час як енергія зв'язку O-O є приблизно в 2 рази меншою (≈ 50 ккал/моль) [24].

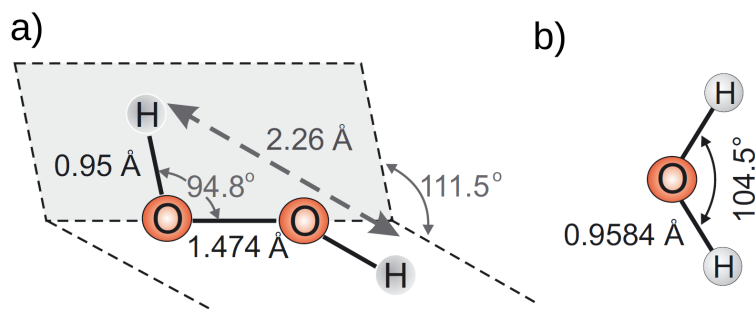


Рис. 1.4 Просторова структура молекул пероксиду водню [21, 25] (а) та води [26] (б) в газовій фазі.

В літературі, найбільш відомим механізмом дії пероксиду водню на ДНК ракових клітин вважається реакція Фентона, коли в присутності двовалентних іонів заліза найслабший ковалентний зв'язок (O-O) молекули H_2O_2 розривається, і пероксид розпадається до HO-радикалу ($HO\bullet$) та іона OH^- :



Вважається, що HO-радикали, як продукти реакції Фентона, спричинюють дволанцюжкові розриви ДНК, що призводить до загибелі ракових клітин [27]. Проте, не дивлячись на те, що в організмі людини міститься значна кількість іонів заліза (≈ 4 г), більша його частина знаходиться у стані, зв'язаному з білком [28]. Лише незначна частка ($< 5\%$) може вільно дифундувати через внутрішньоклітинне середовище та брати участь у окисно-відновних реакціях, таких як реакція Фентона. Такі іони прийнято називати лабільним залізом. У роботі [29] показано, що у випадку раку крові частка ракових клітин, які загинули внаслідок ліку-

вання молекулами пероксиду водню, суттєво залежить від концентрації лабільного заліза в ядрі клітини. Проте, оскільки відомо, що в клітинах інших органів концентрація іонів заліза є суттєво нижчою, ніж у клітинах крові [30], даний механізм деактивації ракових клітин молекулами пероксиду водню у випадку інших видів раку залишається під питанням.

1.4 Можливий механізм деактивації ДНК під час іонної терапії

Відомо, що макромолекула ДНК складається з цукрово-фосфатного остову та пар нуклеїнових основ [31]. Саме в послідовності цих пар основ і міститься вся генетична інформація, необхідна для життєдіяльності клітини: побудови білків, регуляції фізіологічних процесів, розмноження клітин. В ядрі клітини макромолекула ДНК знаходиться в розчині, що складається з молекул води та протиіонів (Na^+ , K^+ , Li^+), і являє собою подвійну спіраль. Характер цього розчину повністю визначає форму подвійної спіралі (А-, В-, С-, Z-форма) та, відповідно, впливає на її стабільність. Якщо ж характер розчину внаслідок певних факторів змінюється, змінюється і характер протікання фізіологічних процесів. Як було показано вище, в процесі іонної терапії у внутрішньоклітинному середовищі виникає суттєва частка молекул пероксиду водню. Тому необхідним є дослідження, чи може поява молекул пероксиду водню якимось чином вплинути на процеси життєдіяльності ракових клітин.

Процес передачі генетичної інформації розпочинається з того, що фермент взаємодіє з активними центрами подвійної спіралі ДНК і визначає те місце, з якого потрібно розпочинати зчитування генетичної інформації. Цей процес називається нуклеїно-білковим впізнаванням. Білкове впізнавання поділяється на неспецифічне та специфічне. Неспецифічне впізнавання - це взаємодія ферменту з активними центрами остову ДНК. Оскільки фосфатні групи (PO_4^-) мають таку просторову структуру, що два заряджені атоми кисню напружені безпосередньо в розчин, неспецифічне впізнавання проходить саме через взаємодію з фосфатними групами ДНК. Специфічне впізнавання проходить шляхом взаємодії

ферменту з нуклеїновими основами ДНК - Аденіном, Тиміном, Гуаніном та Цитозином.

У дисертації запропоновано механізм деактивації ДНК ракових клітин молекулами пероксиду водню. Він полягає в тому, що молекули пероксиду можуть утворити певні стійкі комплекси з активними центрами подвійної спіралі ДНК, заблокувавши тим самим процеси нуклеїно-білкового впізнавання. Оскільки молекули пероксиду водню та води мають схожу просторову структуру (Рис. 1.4), вони можуть конкурувати в розчині за місця зв'язування з ДНК.

Таким чином, для того, щоб перевірити коректність запропонованого механізму деактивації ракових клітин, в даній роботі розраховано енергії взаємодії та просторові конфігурації комплексів молекули пероксиду водню з активними центрами макромолекули ДНК, та порівняно з відповідними комплексами з молекулою води.

У Розділі 2 описано методи наших розрахунків. Для того, щоб встановити правильність обраних параметрів, здійснено розрахунок енергій простих комплексів, що складаються з молекул H_2O_2 та H_2O . Здійснено порівняння енергій та просторових конфігурацій, розрахованих в даній роботі, з наведеними в літературі. Також здійснено розрахунок просторових параметрів уотсон-криківських конфігурацій пар основ А·Т та G·C. У Розділі 3 розглянуто конкурентну взаємодію молекул пероксиду водню та води з центрами неспецифічного нуклеїно-білкового впізнавання - фосфатними групами. У розділі 4 розглянуто конкурентну взаємодію молекул H_2O_2 та H_2O з центрами специфічного нуклеїно-білкового впізнавання - нуклеїновими основами А, Т, G та C, а також комплементарними парами основ А·Т та G·C. У розділі 5 проаналізовано процес розкриття подвійної спіралі ДНК під дією зовнішньої сили (анзіпінг) на масштабах рухів нуклеїнових основ в комплементарній парі, а також запропоновано метод експериментальної перевірки блокування молекулами пероксиду водню процесу анзіпінгу подвійної спіралі ДНК за допомогою методів мікроманіпулювання.

Розділ 2 Методика розрахунків енергії взаємодії в молекулярних комплексах

Для аналізу енергії взаємодії та просторової структури досліджуваних молекулярних комплексів використовуються два обчислювальні підходи - методи атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул.

2.1 Метод атом-атомних потенціальних функцій

Метод атом-атомних потенціальних функцій (AAPF) [32] зараз широко використовується для опису взаємодій в міжмолекулярних структурах в методі молекулярної динаміки в таких силових полях, як CHARMM та AMBER [33, 34]. В рамках даного методу, енергія міжмолекулярної взаємодії складається з енергій водневих зв'язків, ван-дер-Ваальсових та кулонівських взаємодій:

$$E(r) = \sum_{i,j} (E_{vdW}(r_{ij}) + E_{HB}(r_{ij}) + E_{Coul}(r_{ij})). \quad (2.1)$$

Ван-дер-Ваальсова взаємодія описується потенціалом Леннард-Джонса '6-12':

$$E_{vdW}(r_{ij}) = -\frac{A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}}, \quad (2.2)$$

де r_{ij} - відстань між атомами i та j , A_{ij} , B_{ij} - параметри ван-дер-Ваальсової взаємодії між атомами i та j .

Енергія водневого зв'язку між атомами i та j моделюється модифікованим потенціалом Леннард-Джонса '10-12':

$$E_{HB}(r_{ij}) = \left[-\frac{A_{ij}^{(10)}}{r_{ij}^{10}} + \frac{B_{ij}^{(10)}}{r_{ij}^{12}} \right] \cos \varphi, \quad (2.3)$$

де $A_{ij}^{(10)}$, $B_{ij}^{(10)}$ - параметри водневого зв'язку між атомами i та j , φ - кут водневого зв'язку. Наприклад, коли водневим зв'язком є О-Н ... N, то φ - кут між лінією ковалентного зв'язку (О-Н) та водневим зв'язком (Н ... N).

Вирази (2.2) та (2.3) мають вигляд одно-ямних потенціалів, причому глибина ями модифікованого потенціалу Леннарда-Джонса є суттєво більшою (Рис. 2.1). Це моделює більш сильну взаємодію між атомами, що утворюють водневий зв'язок.

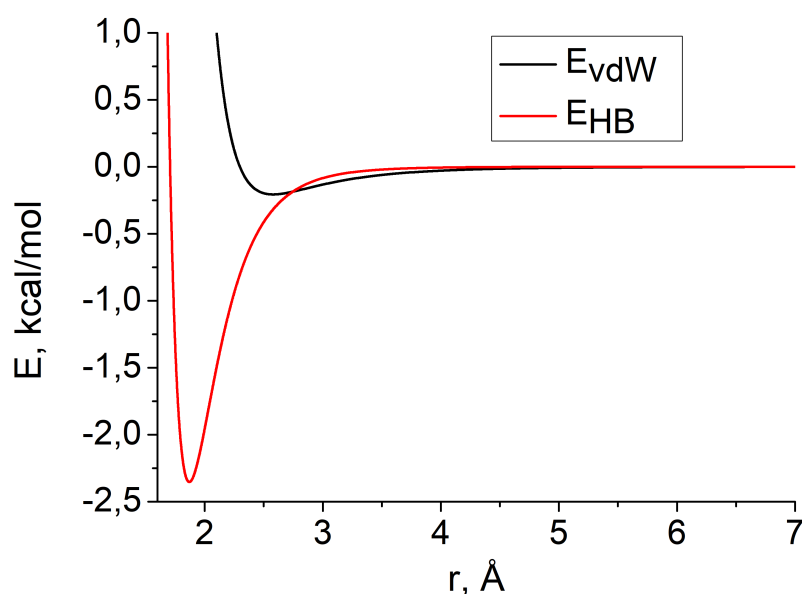


Рис. 2.1 Порівняння потенціалів Леннарда-Джонса '6-12' (2.2) для опису ван-дер-Ваальсової взаємодії та модифікованого потенціалу '10-12' (2.3) для опису водневих зв'язків, що використовуються в даній роботі.

Кулонівська взаємодія описується електростатичним потенціалом:

$$E_{Coul}(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon(r_{ij})} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}, \quad (2.4)$$

де q_i та q_j - заряди атомів i та j , розташованих на відстані r_{ij} , ϵ_0 - діелектрична проникність вакууму, а $\epsilon(r)$ - діелектрична проникність середовища.

Числові значення параметрів потенціалів (2.3-2.4) взято з робіт [35, 36] та наведено в п. 2.3.

Оскільки ДНК у живій клітині знаходиться в водно-іонному розчині, атоми, які взаємодіють, оточені молекулами води. Це призводить до послаблення кулонівської взаємодії між атомами, що знаходяться на далеких відстанях один відносно одного. Таким чином, ми враховуємо залежність діелектричної проникності від відстані ($\epsilon(r)$) у явному вигляді [37]:

$$\epsilon(r) = 78 - 77 (r_p)^2 \frac{e^{r_p}}{(e^{r_p} - 1)^2}, \quad (2.5)$$

де $r_p = r/2.5$. При невеликих відстанях $\epsilon(r) \approx 1$, а при збільшенні r $\epsilon(r) \rightarrow 80$, що відповідає значенню діелектричної проникності водного середовища [20] (Рис. 2.2).

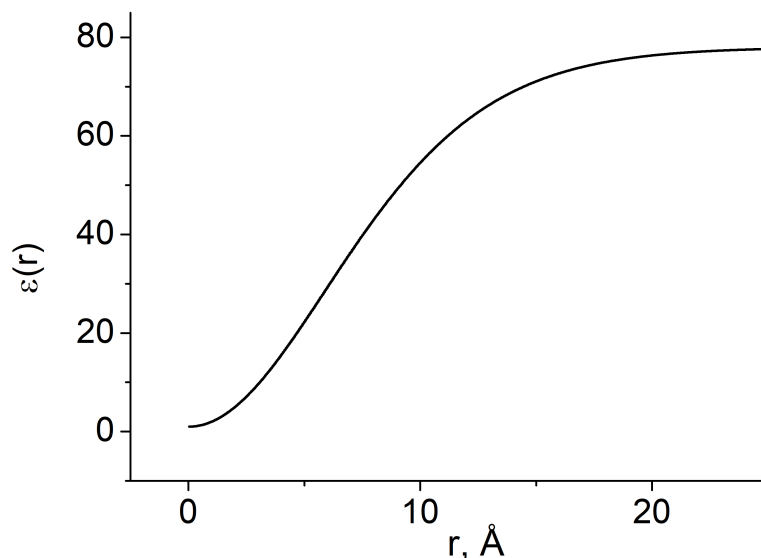


Рис. 2.2 Залежність значення діелектричної проникності (ϵ) від відстані (r) згідно формули (2.5).

Далі метод AARF з використанням формули Hingerty et al. (2.5) буде скорочено називати AARFh. Всі розрахунки в рамках методу атомних потенціальних функцій проведено за допомогою програмного пакету Octave [38].

2.2 Метод квантової механіки молекул

Метод квантової механіки молекул полягає в тому, що для молекулярного комплексу розв'язується стаціонарне рівняння Шредінгера:

$$\hat{H}\psi = E\psi. \quad (2.6)$$

Гамільтоніан системи являє собою суму операторів кінетичної енергії електронів, потенціальної енергії електронів у полі ядер усіх атомів системи ($V(\vec{r})$) та енергії електрон-електронної взаємодії ($U(\vec{r}_1, \vec{r}_2)$):

$$\hat{H} = \sum_i^N \left(-\frac{\hbar^2}{2m_e} \Delta \right) + \sum_i^N V(\vec{r}_i) + \sum_{i<j}^N U(\vec{r}_i, \vec{r}_j), \quad (2.7)$$

де $\hbar$ - зведена стала Планка, N - кількість електронів у системі, m_e - маса електрона, Δ - оператор Лапласа. Тут використовується наближення Борна-Опенгеймера [39], в рамках якого всі ядра атомів знаходяться в стані спокою, у зв'язку з чим потенціал $V(\vec{r})$ залежить лише від координат електронів.

З рівняння (2.6) можна знайти поверхню потенціальної енергії в залежності від просторових координат молекул. Локальні мінімуми відповідатимуть стійким оптимізованим конфігураціям відповідного молекулярного комплексу.

Рівняння (2.6) залежить від дуже великої кількості змінних. У зв'язку з цим, комп'ютерний розрахунок енергії такої системи може займати досить багато часу.

Оскільки для більшості випадків точний розв'язок рівняння (2.6) є неможливим, для розв'язку можуть використовуватися різні наближені методи. В даній роботі застосовується теорія функціоналу густини з 3-параметричним функціоналом Беке (B3LYP). Розрахунки проводяться в ба-

зисі B3LYP/6-311+G(d,p). Для обчислень використовується програмний пакет GAUSSIAN [40].

Теорія функціоналу густини полягає в тому, що замість того, щоб шукати комплексну хвильову функцію системи, яка залежить від координат усіх ядер та електронів, а також спінів атомів системи, шукають так звану функцію густини частинок, яка, так само, як і хвильова функція, містить в собі всю інформацію про стан системи, проте є дійсною та залежить лише від трьох просторових координат. Це дозволяє суттєво підвищити швидкість комп'ютерних обчислень.

Функція густини частинок $\rho(r)$ являє собою квадрат модуля хвильової функції, який обчислюється за наступним правилом:

$$\rho(r) = N \prod_{i=2}^N \left(\int d\vec{r}_i \right) \psi^*(\vec{r}, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \psi(\vec{r}, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N). \quad (2.8)$$

Тут $\psi(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N)$ - хвильова функція електронів системи, N - кількість електронів.

В основі теорії функціоналу густини лежать дві теореми Хоенберга — Кона [41]. Згідно першої теореми, енергія основного стану системи взаємодіючих між собою електронів, які рухаються в зовнішньому полі, є функцією лише густини електронів. Друга теорема стверджує, що функція густини електронів, яка мінімізує повну енергію системи, є функцією густини основного стану системи.

Згідно вищенаведених теорем, залежність (2.8) є взаємно-однозначною для ρ та ψ , тобто існує обернена залежність:

$$\psi = \psi[\rho]. \quad (2.9)$$

Відповідно, енергію системи з N взаємодіючих між собою електронів можна записати у вигляді суми функціоналів кінетичної ($T[\rho]$), потенціальної енергії електрон-електронної взаємодії ($U[\rho]$) та потенціальної енергії електронів у полі ядер усіх атомів системи ($V[\rho]$):

$$E[\rho] = T[\rho] + U[\rho] + V[\rho]. \quad (2.10)$$

Далі, використовуючи варіаційний принцип по функції $\rho(r)$, з виразу (2.10) можна знайти мінімум енергії системи.

Енергією взаємодії вважається різниця між енергією молекулярного комплексу XY та його компонентів X і Y :

$$\Delta E_{XY} = E_{XY}(XY) - E_X(X) - E_Y(Y). \quad (2.11)$$

В дужках вказано базис молекулярного комплексу XY (димер-центрований базисний набір) і ізольованих молекул X і Y (мономерно-центровані базисні набори). Для запобігання перекриття базисів було розраховано поправку на перекриття (counterpoise correction):

$$\Delta E_{XY}^{CP} = E_{XY}(XY) - E_X(XY) - E_Y(XY). \quad (2.12)$$

Розрахунок енергії взаємодії в окремих комплексах було додатково проведено з урахуванням неявного водного оточення. Дані ефекти було розраховано за допомогою моделі поляризованого континууму (Polarizable continuum model - PCM) [42].

В рамках моделі PCM, середовище моделюється у вигляді поляризованого діелектрика. Кожна молекула створює певну порожнину в межах цього континууму. Поверхня цієї порожнини розраховується наступним чином: навколо кожного атому молекули зображується сфера, радіус якої відповідає ван-дер-Ваальсовому радіусу даного атома. Повна поверхня являє собою сумарну поверхню відповідних сфер, що перекриваються (Рис. 2.3).

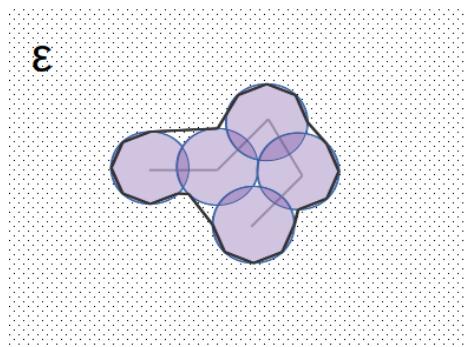


Рис. 2.3 Представлення молекули як порожнини в діелектричному континуумі в рамках PCM-моделі

Внаслідок утворення порожнини, діелектричне середовище певним чином поляризується, і створює додаткове електричне поле. Відповідно, гамільтоніан системи трансформується до наступного вигляду:

$$H = H_0 + V_{MS} + V'(t), \quad (2.13)$$

де H_0 - гамільтоніан у вакуумі, V_{MS} - потенціал взаємодії молекули з розчином, $V'(t)$ - потенціал збурення молекули, залежний від часу. Останній доданок описує ефект електричного поля від порожнини, а також реакцію розчину на це поле.

Оскільки окремі атомні групи центрів неспецифічного нуклеїно-білкового впізнавання (заряджені атоми кисню фосфатної групи) напрямлені безпосередньо в розчин, РСМ-модель використовується при розгляді комплексів молекул пероксиду водню та води з фосфатною групою.

2.3 Структурні параметри молекул, що розглядаються в даній роботі

В даному розділі наведено структурні параметри молекул, які є складовими комплексів взаємодії, що розраховуються в рамках нашого дослідження.

2.3.1 Параметри обчислень методу атом-атомних потенціальних функцій

Почнемо з геометричних параметрів центру неспецифічного нуклеїно-білкового впізнавання - фосфатної групи ДНК. Для обчислень за допомогою методу атом-атомних потенціальних функцій ці параметри взято з [31]. В рамках даного методу, враховується взаємодія лише із двома зарядженими атомами кисню, які напрямлені в розчин (Рис. 2.4). Оскільки остов макромолекули ДНК містить сумарний заряд $-e$ [31], будемо вважати, що кожному з цих атомів кисню відповідає заряд $-0.5e$ (тут e - заряд електрона).

Наведемо тепер структурні елементи центрів специфічного нуклеїно-білкового впізнавання - нуклеїнових основ Аденіну, Тиміну, Гуаніну та

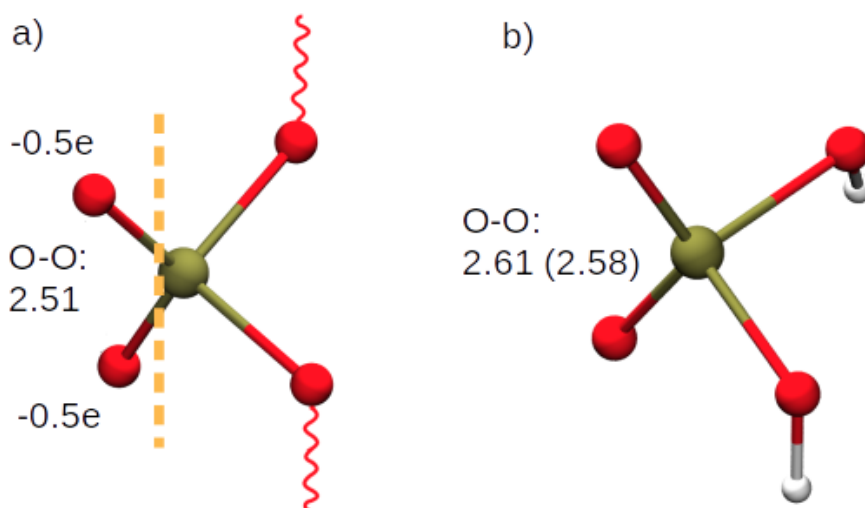


Рис. 2.4 а) Структурні параметри та заряди на атомах фосфатної групи ДНК, які використовуються для розрахунків методом атом-атомних потенціальних функцій. Тут e - заряд електрона; б) Оптимізована структура фосфатної групи в рамках квантово-механічного підходу. Цифрами позначено відстані (в Å) між відповідними атомами кисню. В дужках наведено значення, отримане за допомогою моделі РСМ.

Цитозину. Позначимо їхні атоми за стандартною номенклатурою [31] (Рис. 2.5).

Геометрію нуклеїнових основ було взято із кристалічної структури додекамеру Дікерсона-Дрю, отриманої методом рентгеноструктурного аналізу (4 та 5 пари нуклеїнових основ файлу 1bna.pdb [43]). Кулонівські заряди (Табл. Б.2) та параметри ван-дер-Ваальсової взаємодії (Табл. Б.3) взято з [35], а параметри водневих зв'язків (Табл. Б.4) - з роботи [36].

Заряди q_i , q_j для нуклеїнових основ взяті з робіт [35, 36]. Заряди молекул H_2O та H_2O_2 розраховувалися з умови, що дипольний момент молекули води повинен дорівнювати $d_{H_2O} = 1,86D$ [44], а молекули пероксиду водню $d_{H_2O_2} = 2,10D$ [45]. Звідси, для молекули H_2O ми отримуємо заряди $q_H = 0.33$, $q_O = -0.66$, і, відповідно, для H_2O_2 $q_H = 0.41e$, $q_O = -0.41e$. Значення зарядів на атомах молекули H_2O_2 добре узгоджуються з зарядами, отриманими квантово-механічними розрахунками в роботі [46]. Крім того, наведені значення заряду використовуються в нещодавно розробленому силовому полі для молекули пероксиду водню [47].

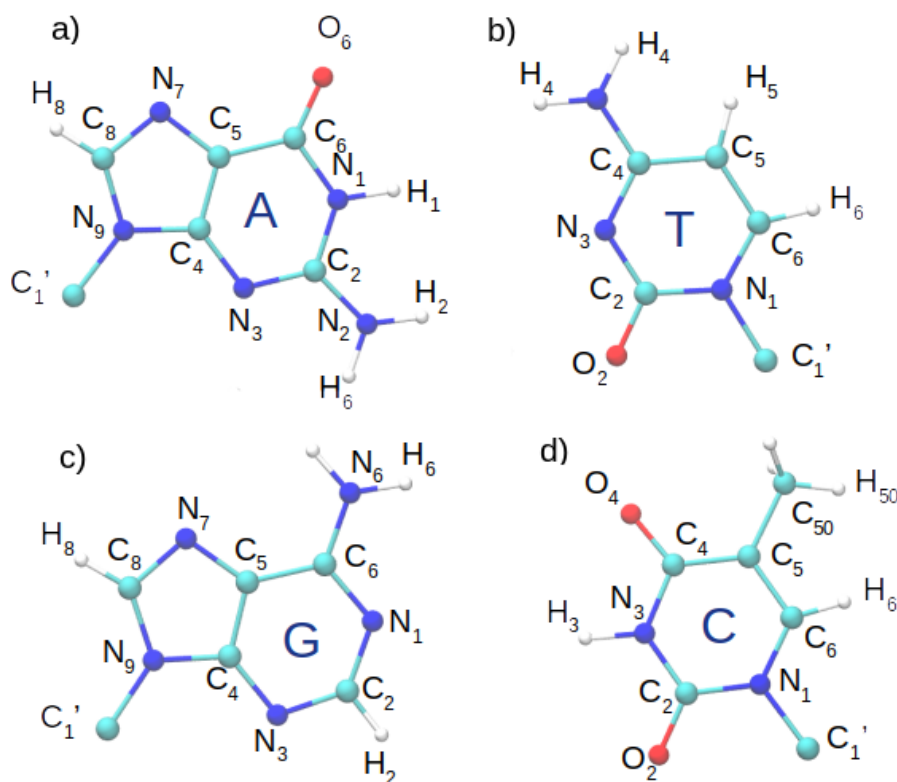


Рис. 2.5 Нуклеїнові основи Аденін (а), Тимін (b), Гуанін (с) та Цитозин (d), та канонічна нумерація їхніх атомів відповідно до [31].

В рамках даного підходу, всі молекули, які утворюють комплекси взаємодії, є жорсткими структурами, тобто значення відстаней хімічних зв'язків, валентних та двограних кутів є фіксованими.

2.3.2 Структурні параметри молекул в рамках методу квантової механіки

В рамках квантово-механічного підходу, для розрахунків використовуються такі самі геометрії нуклеїнових основ, що й для методу атом-атомних потенціальних функцій. Крім того, в рамках даного методу для отримання електростатично нейтральної структури, атоми C_1' , які утворюють глікозидні зв'язки нуклеїнової основи з остовом ДНК, замінені на атоми Н для Аденіну і Тиміну і на групу CH_3 для Гуаніну і Цитозину. Як і в методі атом-атомних потенціальних функцій, геометрії нуклеїнових основ є фіксованими.

Для досягнення електростатично нейтральної структури фосфатної групи (PO_4^-), до кожного з двох атомів кисню, які в макромолекулі ДНК

з'єднуються з остовом, було приєднано по атому водню. Цю структуру було оптимізовано. Результат оптимізації наведений на Рис. 2.4 б. У подальшому, для розгляду взаємодії у відповідних комплексах використовується отримана оптимізована геометрія, яка є фіксованою.

В рамках даного підходу вважається, що всі молекулярні складові розглянутих комплексів є жорсткими структурами, окрім молекул води та пероксиду водню. У зв'язку з цим, для молекул H_2O та H_2O_2 розраховано енергії деформації. Енергією деформації є різниця оптимізованих енергій молекули у складі комплексу та молекули в ізольованому стані:

$$E_{def} = E_{complex} - E_{isolated}. \quad (2.14)$$

Звідси випливає, що повна енергія взаємодії комплексу описується формулою:

$$\Delta E_{complete} = \Delta E^{CP} + E_{def}. \quad (2.15)$$

2.4 Методологічні розрахунки енергії стабільності простих комплексів

В даній частині дослідження обчислено оптимізовані структури молекул пероксиду водню та води в рамках квантово-механічного підходу. Розраховано спектри інфрачервоного поглинання та комбінаційного розсіяння молекули пероксиду водню, обчислено нормальні моди коливань її атомних груп. Також досліджено конформаційну стабільність молекули H_2O_2 .

Для того, щоб встановити коректність обчислень обраних методів, наведено результати розрахунку енергій взаємодії та просторових конфігурацій простих комплексів, що складаються з молекул води та пероксиду водню (Рис. 2.8), з'єднаних одним водневим зв'язком. Проаналізовано можливість утворення комплексу молекули пероксиду водню одночасно з кількома молекулами води ('кластер' пероксиду).

2.4.1 Оптимізовані просторові структури молекул пероксиду водню та води

Спочатку обчислимо оптимізовану просторову структуру молекули пероксиду водню. Результати оптимізації в рамках квантово-механічного підходу наведено в Табл. (2.1). В той час як відстані хімічних зв'язків та валентні кути не змінюються в залежності від врахування ефектів середовища (PCM), відмінності у величині двогранного кута є суттєвими, що збігається з експериментами [21, 22]. Для методу атом-атомних потенціальних функцій взяті фіксовані геометрії молекул H_2O_2 та H_2O . Їхні просторові параметри взяті з робіт [21, 25, 26] та наведені на Рис. 1.4.

Табл. 2.1 Оптимізовані геометрії молекули H_2O_2 в рамках квантово-механічного підходу. Відстані наведені в Å, кути в градусах.

Фаза	O-O	H-O	$\angle$ O-O-H	двогранний $\angle$
Газова фаза	1.45	0.97	100.5	121.1
PCM	1.45	0.97	101.6	105.7

В загальному, присутність молекул пероксиду в розчині може бути встановлена методами молекулярної спектроскопії. У зв'язку з цим, в даній роботі розраховано інфрачервоний спектр та спектр комбінаційного розсіяння молекули пероксиду водню в рамках квантово-механічного підходу в газовій фазі (Рис. 2.6).

Знайдені моди нормальних коливань є дуже близькими до значень, отриманих в експериментальній роботі [48] (Табл. 2.2). З графіків видно, що існує шість піків інтенсивності, які відповідають шести модам нормальних коливань атомних груп молекули H_2O_2 . Коливання з частотою ν_1 відповідають коливанням двогранного кута, з частотою ν_2 - коливанням розтягу зв'язку O-O, з частотами ν_3 та ν_4 - відповідно симетричним та асиметричним коливанням валентного кута O-O-H, частоти ν_5 та ν_6 - відповідно симетричним та асиметричним коливанням розтягу зв'язку O-H. Коливання, при яких змінюється дипольний момент системи (частоти ν_1 , ν_3 , ν_5), добре проявляють себе на графіку інфрачервоного поглинання

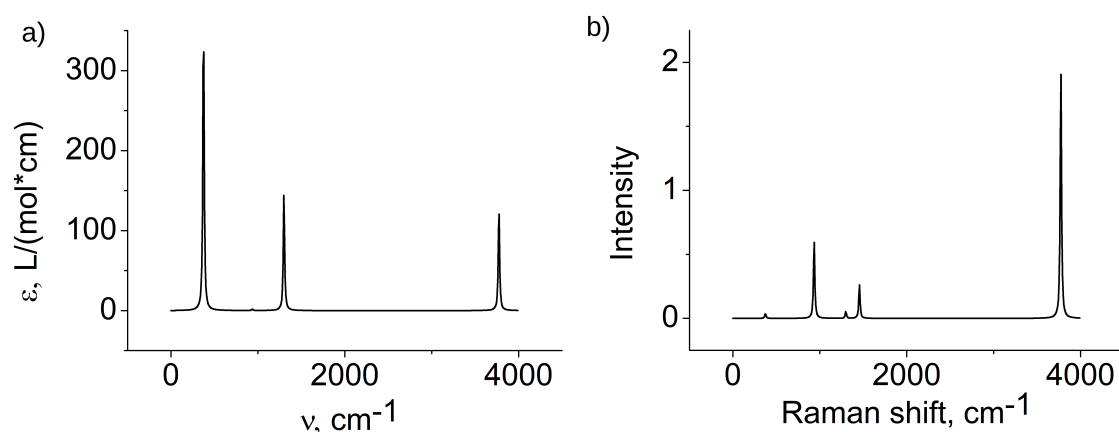


Рис. 2.6 Спектри інфрачервоного поглинання (а) та комбінаційного розсіяння (b) молекули пероксиду водню в рамках квантово-механічного підходу в газовій фазі.

(Рис. 2.6 а), в той час як коливання, в яких змінюється конфігурація електронної хмари молекули (поляризація) - частоти ν_2 , ν_4 , ν_5 та ν_6 , краще виражені на спектрі комбінаційного розсіяння (Рис. 2.6 b). Слід зазначити, що повністю симетричні коливання (ν_4 та ν_2) спостерігаються лише в спектрі комбінаційного розсіяння.

Поява отриманих частот (Табл. 2.2) у коливальних спектрах середовища дозволяє ідентифікувати наявність молекул пероксиду водню в розчині та визначити їхню концентрацію.

Табл. 2.2 Моді нормальних коливань молекули H_2O_2 , розраховані в даній роботі, а також отримані на експерименті [48]

	Наші розрахунки	Отримано в роботі [48]
ν_1	372	550
ν_2	933	877
ν_3	1298	1350
ν_4	1454	1421
ν_5	3773	3395
ν_6	3773	3400

Тепер встановимо, наскільки важливою є залежність енергії внутрішньої взаємодії в молекулі пероксиду водню від величини двогранного кута. Результати розрахунку як для газової фази, так і з врахуванням РСМ-моделі, наведені на Рис. 2.7. З результатів видно, що для обох ви-

падків існують мінімуми енергії для двох різних величин двогранного кута. Другий мінімум фактично відповідає тій самій конформації молекули H_2O_2 , що і перший, оскільки в цьому випадку гострий кут між площинами становитиме $\alpha_1 \approx 360^\circ - \alpha_2$, де α_1 , α_2 - положення першого та другого мінімумів відповідно. У газовій фазі, ці два мінімуми розділені порівняно невеликим енергетичним бар'єром (≈ 0.8 ккал/моль). Оскільки ця енергія є величиною порядку теплових флуктуаційних коливань (за кімнатної температури $kT \approx 0.6$ ккал/моль), в газовій фазі в області енергетичних мінімумів ($\approx$ від 110° до 250°) молекула пероксиду водню може мати певну конформаційну свободу. Врахування ж РСМ-моделі збільшує цей бар'єр майже вдвічі. Такий ефект має місце внаслідок того, що взаємодія з середовищем стабілізує конформацію молекули H_2O_2 .

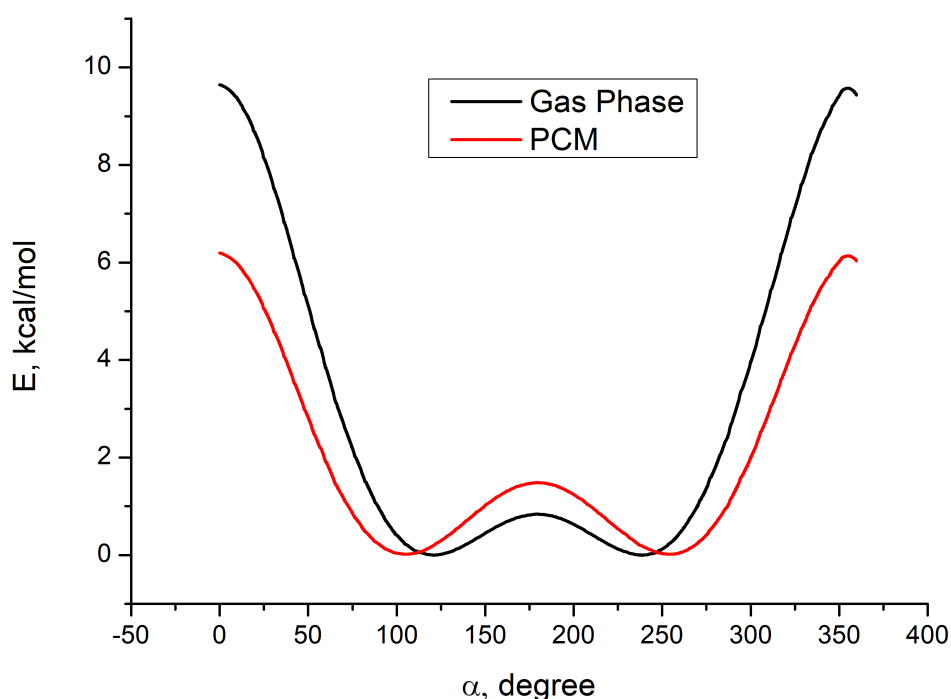


Рис. 2.7 Розрахована в даній роботі залежність енергії внутрішньої взаємодії в молекулі H_2O_2 від величини двогранного кута в рамках квантово-механічного підходу в газовій фазі. Криву згладжено методом Савітського-Голая [49].

2.4.2 Комплекси, що складаються з молекул води та пероксиду водню

Встановимо, наскільки наші методи є застосовними для розгляду взаємодії між молекулами води та пероксиду водню. Для цього розглянемо комплекси, що складаються з молекул H_2O та H_2O_2 , з'єднаних одним водневим зв'язком (Рис. 2.8).

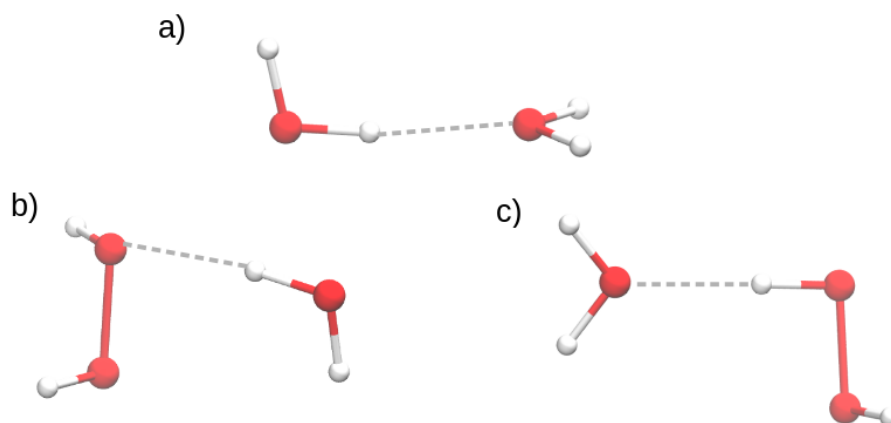


Рис. 2.8 Просторові конфігурації комплексів, що складаються з: а) двох молекул води; б), в) молекули пероксиду водню і молекули води.

Як видно з результатів розрахунків (Табл. 2.3 та 2.4), значення енергій взаємодії в рамках методу AAPFh узгоджуються з наведеними літературними даними набагато краще, ніж ті самі розрахунки, проведені в газовій фазі. Враховуючи отримані результати, всі подальші розрахунки, які стосуються взаємодії нуклеїнових основ у комплементарній парі, а також нуклеїнових основ з молекулами H_2O_2 та H_2O , буде проведено з врахуванням залежності (2.5), тобто методом AAPFh.

В квантово-механічному підході (B3LYP) отримані значення енергії для комплексу вода-вода досить добре збігаються з даними, обчисленими в інших роботах. Як видно з Табл. 2.3, отримані значення енергії взаємодії в газовій фазі, так само як і оптимізована геометрія комплексу, є дуже близькими до даних, отриманих у роботі [50]. Також наші результати досить добре корелюють зі значеннями, наведеними в огляді [51].

Оптимізовані просторові конфігурації для системи пероксид-вода (див. Табл. 2.4) досить добре узгоджуються з результатами, отриманими в роботах [46, 52, 53].

Табл. 2.3 Порівняння просторових конфігурацій та енергій взаємодії у комплексі вода-вода (Рис. 2.8а), розрахованих в даній роботі методом атом-атомних потенціальних функцій (AAPFh) та методом теорії функціоналу густини з функціоналом B3LYP, а також дані, розраховані для цього комплексу в інших роботах. Відстані наведені в Å, кути в градусах, енергії в ккал/моль.

$H_2O - H_2O (a)$				
Метод	Наші розрахунки			[50]
	AAPF	AAPFh	B3LYP	B3LYP
O...O	2.79	2.79	2.90	2.94
H...O	1.84	1.84	1.93	1.98
Кут	173.2	173.8	173.8	173.1
E	-7.25	-5.71	-5.08	-5.08

Підводячи підсумок, можна вважати, що використані підходи (AAPFh і квантова механіка) дають цілком реалістичні результати і можуть бути використані для аналізу взаємодій молекул H_2O_2 і H_2O з активними центрами подвійної спіралі ДНК.

2.4.3 Взаємодія молекули H_2O_2 з гідратною оболонкою

Оскільки ДНК у клітині знаходиться у водному розчині, кожна молекула пероксиду водню, що потрапляє у це середовище, починає взаємодіяти з молекулами води. У зв'язку з цим, молекула H_2O_2 утворює сітку водневих зв'язків з оточуючими молекулами води. Тобто утворюється так-званий 'кластер' пероксиду. В даній роботі методом AAPFh розраховано стійку конфігурацію комплексу, що складається з молекули H_2O_2 , оточеної шістьма молекулами води (Рис. Б.1).

Кожна молекула води утворює по одному водневому зв'язку з молекулою пероксиду водню. Також деякі молекули води утворюють водневий зв'язок між собою. Наші оцінки показують, що радіус гідратної оболонки навколо пероксиду водню є $\approx 6 \text{ Å}$ ('розмір' кластеру визначався як відстань між найбільш віддаленими атомами системи: атомом кисню мо-

Табл. 2.4 Порівняння просторових конфігурацій та енергій взаємодії у комплексах пероксид-вода (Рис. 2.8b та 2.8c), розрахованих в даній роботі методом атом-атомних потенціальних функцій (AAPFh) та методом теорії функціоналу густини з функціоналом B3LYP, а також дані, розраховані для цього комплексу в інших роботах. Відстані наведені в Å, кути в градусах, енергії в ккал/моль.

$H_2O_2 - H_2O$ (b)

Метод	Наші розрахунки			[46]	[52]	[53]
	AAPF	AAPFh	B3LYP	B3LYP	B3LYP	B3LYP
O...O	2.73	2.80	2.97	—	—	2.97
H...O	1.86	1.85	2.01	1.99	2.03	2.00
Кут	149.2	169.7	174.2	168.5	170.1	—
E	−6.95	−5.77	−3.90	−5.10	−3.56	−2.70

$H_2O_2 - H_2O$ (c)

Метод	Наші розрахунки			[46]	[52]	[53]
	AAPF	AAPFh	B3LYP	B3LYP	B3LYP	B3LYP
O...O	2.78	2.78	2.78	—	—	2.78
H...O	1.82	1.82	1.89	1.86	1.94	1.91
Кут	178.1	178.1	148.5	145.9	146.2	—
E	−9.17	−7.00	−6.37	−9.60	−6.31	−5.10

лекули W_1 , а також атомом водню молекули W_2 , який не бере участі в утворенні водневого зв'язку (Рис. Б.1)).

Відомо, що для В-форми ДНК ширина головного жолобу становить ≈ 12 Å, а мінорного ≈ 3 Å [31]. Отже, пероксид водню може спочатку увійти до головного жолобу разом з гідратною оболонкою і лише після цього ‘звільнитися’ від деяких молекул води. Тоді стане можливим утворення необхідних водневих зв'язків молекули H_2O_2 з нуклеїною основою. Що стосується А-форми ДНК, то ширина її мінорного жолобу становить ≈ 11 Å [31], тобто пероксид водню може ‘вбудовуватися’ до неї разом зі своєю гідратною оболонкою. Таким чином, залежно від форми подвійної спіралі, зв'язування з атомними групами ДНК у розчині може відбуватися як зі сторони головного, так і зі сторони мінорного жолобів. Відповідно, необхідним є енергетичний аналіз можливості утворення комплексів молекули H_2O_2 з атомними групами макромолекули ДНК.

Розділ 3 Утворення комплексів молекул пероксиду водню та води з центрами неспецифічного впізнавання ДНК — фосфатними групами

У даному розділі розглянуто конкурентну взаємодію молекул пероксиду водню та води з центрами неспецифічного нуклеїно-білкового впізнавання - фосфатними групами ДНК (PO_4^-). В силу того, що фосфатні групи є складовою частиною остову макромолекули ДНК та мають два заряджені атоми кисню, вони є особливо ‘доступними’ для взаємодії з молекулами середовища. Відомо, що в середовищі клітини, поряд із молекулами води, міститься значна концентрація протиіонів. У зв'язку з цим, в даному розділі також додатково розглянуто комплекси фосфатної групи з молекулами пероксиду водню та води в присутності протиіону. Розрахунки здійснено методами атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул. Для врахування впливу ефектів середовища також здійснено розрахунки методами AAPPFh та PCM.

3.1 Комплекси фосфатної групи ДНК з молекулами H_2O_2 та H_2O

Спочатку, розрахуємо комплекси молекул пероксиду водню та води з фосфатною групою. Їх оптимізовані геометрії показані на Рис. 3.1. Слід зазначити, що, оскільки група PO_4^- розглядається як складова частина остову ДНК (Рис. 3.1), ми враховуємо лише ті комплекси, де молекули H_2O_2 і H_2O розташовані поблизу двох заряджених атомів кисню, які є відкритими в розчин.

Як видно з Рис. 3.1, молекули пероксиду водню і води розташовані майже симетрично поблизу атомів кисню групи PO_4^- . Відповідні енергії взаємодії наведені в Табл. 3.1. У комплексі з молекулою пероксиду

водню існують два водневих зв'язки. В рамках квантово-механічного підходу, молекула пероксиду водню стискається - значення її двогранного кута стає близьким до 55° , що є меншим, ніж у ізолюваної молекули (Табл. 2.1). Таке зменшення двогранного кута дає внесок в енергію деформації (близько 3-4 ккал/моль). У той же час, оскільки молекула води має менший розмір (зв'язок O-O відсутній), у комплексі з молекулою води відповідні водневі зв'язки стають суттєво зігнутими (кути O-H-O близькі до 145° , Рис. 3.1 b), що призводить до послаблення енергії взаємодії комплексу (Табл. 3.1). Слід також зазначити, що різниця в енергіях взаємодії між комплексами з молекулами H_2O_2 і H_2O є достатньо великою (≈ 7 ккал/моль в газовій фазі і ≈ 3 ккал/моль в рамках моделі PCM). У методі AARF(AARFh) різниця в енергіях між відповідними комплексами значно нижча, оскільки двогранний кут молекули H_2O_2 в даному випадку є фіксованим.

Табл. 3.1 Енергії взаємодії у комплексах, що складаються з молекул H_2O_2 та H_2O та фосфатної групи PO_4^- . Значення енергій наведені в ккал/моль.

Метод		$\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$	$\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$
B3LYP	Газова фаза	-21.4	-14.8
	модель PCM	-7.7	-4.7
AARF		-11.0	-12.0
AARFh		-5.6	-4.9

3.2 Комплекси фосфатної групи ДНК з молекулами H_2O_2 та H_2O в присутності протиіону Na^+

Добре відомо, що фосфатні групи макромолекули ДНК в ядрі клітини нейтралізуються іонами лужних металів (Na^+ , K^+ , Li^+) [31]. Саме тому, цілком імовірною є взаємодія молекул розчину не напряду з атомними групами PO_4^- , а з комплексом протиіон-фосфатна група. Оскільки іон на-

трію є одним із найбільш поширених в живій клітині [31], в даній роботі буде розглянуто взаємодію лише з іоном Na^+ .

Спочатку розглянемо комплекс протиіону Na^+ з фосфатною групою. Оптимізовані геометрії цього комплексу показані на Рис. 3.2. Конфігурація (а) може бути отримана обома методами (AAPF(AAPFh) і квантово-механічний підхід) як у газовій фазі, так і у водному розчині, а геометрія (b) може бути отримана тільки в рамках квантової механіки молекул з використанням моделі РСМ. Відстані між протиіоном Na^+ і атомами кисню фосфатної групи показані на Рис. 3.2. Енергії взаємодії $\text{Na}^+ - \text{PO}_4^-$ представлені в Табл. 3.2. З результатів розрахунку також видно, що врахування розчину значно знижує енергію взаємодії.

Табл. 3.2 Енергії взаємодії у комплексах, що складаються з протиіону Na^+ та фосфатної групи PO_4^- . Значення енергії наведені в ккал/моль.

Метод			Na ⁺ -PO ₄ ⁻
B3LYP	Газова фаза		-127.2
	модель РСМ	(Рис. 3.2a)	-5.7
		(Рис. 3.2b)	-7.3
AAPF			-122.0
AAPFh			-21.8

Тепер розглянемо взаємодію в комплексах, що складаються з трьох молекул: молекули H_2O_2 або H_2O , фосфатної групи та протиіона Na^+ . Як видно з Рис. 3.3 та 3.4, метод AAPF(AAPFh) і квантово-механічний підхід дають різні конфігурації просторових структур.

В оптимізованій структурі, отриманій за допомогою методів AAPF (AAPFh) молекули H_2O_2 або H_2O розташовані симетрично до двох атомів кисню групи PO_4^- та протиіону Na^+ між ними (Рис. 3.3a, 3.4a). З Табл. 3.3 видно, що для всіх розрахунків, проведених як в газовій фазі, так і з врахуванням розчину, комплекс взаємодії з пероксидом водню є на ≈ 1 ккал/моль енергетично стабільнішим, ніж відповідний комплекс з молекулою води. Також варто додати, що, якщо не враховувати взаємодію з середовищем, отримуємо аномально великі значення енергії взаємодії (метод AAPF, Табл. 3.3).

Квантово-механічний підхід дає оптимізовану структуру, де протиіон Na^+ та молекула пероксиду водню або води знаходиться біля різних атомів кисню групи PO_4^- , які є відкритими в розчин (Рис. 3.4b, 3.3b). Іншими словами, додавання протиіону натрію до двомолекулярних комплексів $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$ і $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$ призводить до ‘витіснення’ молекули пероксиду або води у порівнянні з комплексами без протиіону (Рис. 3.1). Ці структури є дуже подібними для розрахунків, здійснених у газовій фазі і водному розчині (модель РСМ). В обох випадках молекула H_2O_2 або H_2O утворює один водневий зв'язок з фосфатною групою. Так само, як і в методі ААРФ, розрахунок в газовій фазі дає значення енергії взаємодії набагато більше, ніж з врахуванням моделі РСМ.

Табл. 3.3 Енергії взаємодії у комплексах, що складаються з молекул H_2O_2 та H_2O , фосфатної групи PO_4^- та протиіону Na^+ . Значення енергії наведені в ккал/моль.

Метод			Na-H ₂ O ₂ -PO ₄ ⁻	Na-H ₂ O-PO ₄ ⁻
ВЗLYP	Газова фаза	(Рис. 3.3 б, 3.4 б)	-149.3	-149.3
	модель РСМ		-15.6	-14.7
AAPF		(Рис. 3.3 а, 3.4 а)	-130.3	-129.2
AAPFh			-27.4	-26.5

Енергії взаємодії розглянутих комплексів представлені в Табл. 3.3. Видно, що врахування моделі РСМ значно знижує енергію взаємодії, але комплекс з H_2O_2 залишається більш енергетично стабільним, ніж аналогічний комплекс з молекулою води. Слід також зазначити, що комплекси, представлені на Рис. 3.3 b, 3.4 b є найбільш імовірними в для появи в кристалічних структурах, що спостерігаються на експерименті [54].

Підсумовуючи результати, отримані в даному пункті, можна також бачити, що при розгляді комплексів взаємодії з участю протиіону фізично достовірні результати дають методи, в яких враховані ефекти середовища: ААРФh та РСМ-модель.

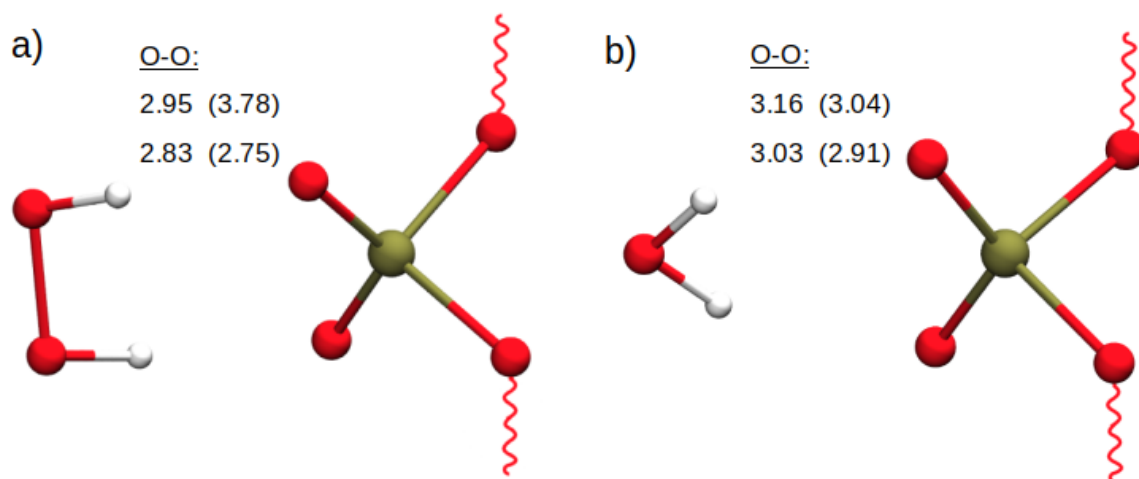


Рис. 3.1 Комплекси взаємодії молекул H_2O_2 (a) та H_2O (b) з фосфатною групою PO_4^- . Відстані, отримані за допомогою двох розрахункових методів, вказані у наступному порядку (згори донизу): AAPF, B3LYP. В дужках наведені значення, отримані з врахуванням розчину (формула (2.5) у методі AAPFh та PCM модель у квантово-механічних розрахунках. Значення відстаней наведені в Å.

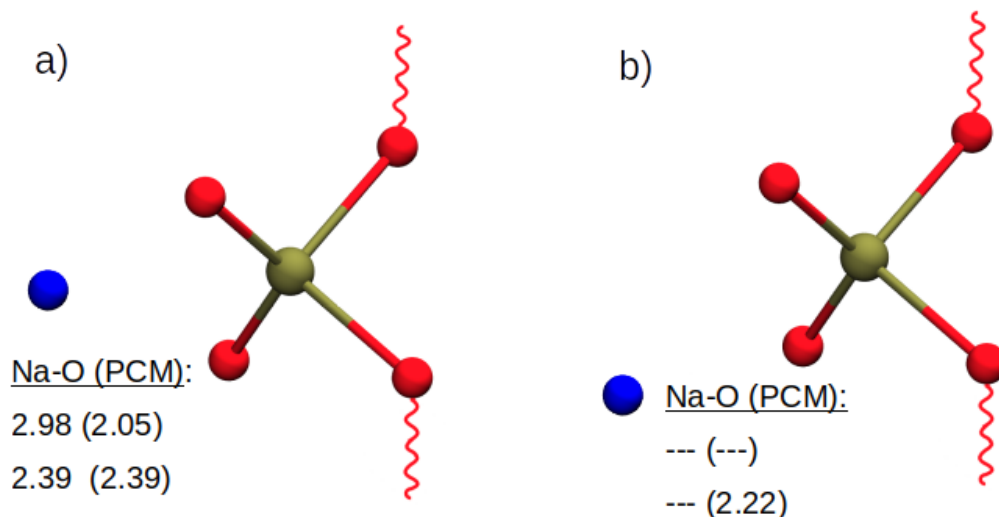


Рис. 3.2 Комплекси, що складаються з групи PO_4^- та протиіону Na^+ . Відстані, розраховані за допомогою різних методів, вказані в наступному порядку (зверху вниз): AAPF, B3LYP. В дужках наведені значення, отримані з врахуванням розчину (формула (2.5) у методі AAPFh та PCM модель у квантово-механічних розрахунках. Значення відстаней наведено в Å.

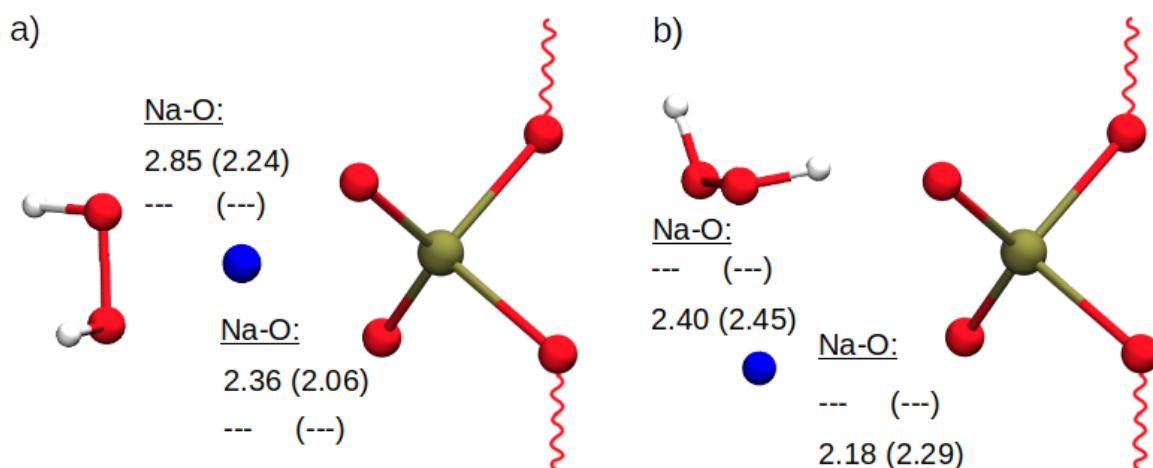


Рис. 3.3 Комплекси, що складаються з молекули H_2O_2 та групи PO_4^- у присутності протиіону натрію (Na^+). Відстані, розраховані за допомогою різних методів, вказані в наступному порядку (зверху вниз): AAPF, B3LYP. В дужках наведені значення, отримані з врахуванням розчину (формула (2.5) у методі AAPFh та PCM модель у квантово-механічних розрахунках. Значення відстаней наведено в Å.

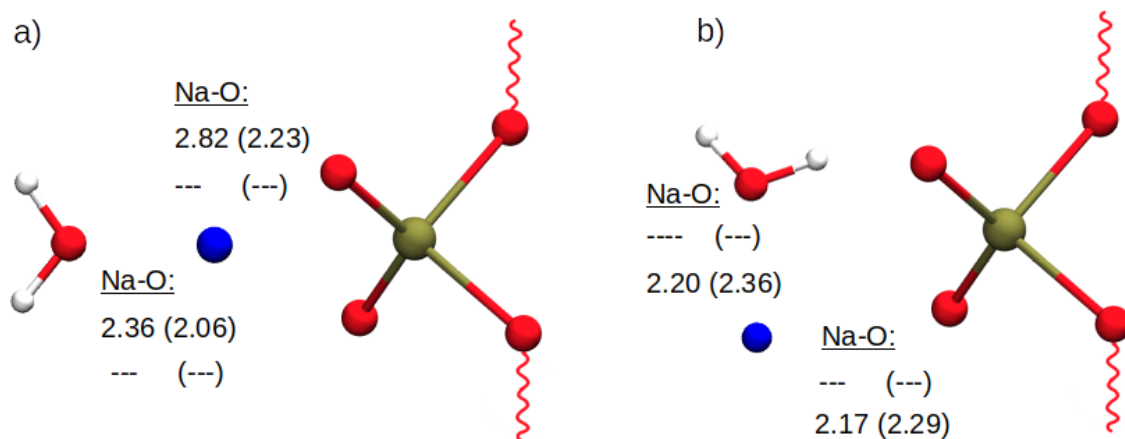


Рис. 3.4 Комплекси, що складаються з молекули H_2O та групи PO_4^- у присутності протиіону натрію (Na^+). Відстані, розраховані за допомогою різних методів, вказані в наступному порядку (зверху вниз): AAPF, B3LYP. В дужках наведені значення, отримані з врахуванням розчину (формула (2.5) у методі AAPFh та PCM модель у квантово-механічних розрахунках. Значення відстаней наведено в Å.

3.3 Про можливість спостереження взаємодії молекул пероксиду водню з центрами неспецифічного впізнавання ДНК

Утворення стійких комплексів молекули H_2O_2 з фосфатними групами ДНК повинно супроводжуватися появою конкретних мод коливань молекули пероксиду водню по відношенню до фосфатної групи у коливальних спектрах. Частоти коливань комплексу $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+\text{-PO}_4^-$ повинні знаходитися в низькочастотній області спектру ($<200\text{ см}^{-1}$), аналогічно до мод коливань протиіонів відносно фосфатних груп ДНК (іонно-фосфатні режими) [55—58]. Як відомо, низькочастотні спектри ДНК характеризуються конформаційними коливаннями структурних елементів подвійної спіралі як єдиного цілого (нуклеозиди, нуклеотиди, фосфатні групи) [59—61]. Коливання молекул пероксиду водню відносно фосфатних груп ДНК повинні змінити внутрішню динаміку подвійної спіралі, змінюючи тим самим форму низькочастотних спектрів поглинання.

Для визначення впливу молекул H_2O_2 на конформаційні коливання ДНК, використовувалася феноменологічна модель, яка описує низькочастотні спектри комбінаційного розсіяння ДНК із протиіонами [55—57]. В рамках цієї моделі подвійна спіраль ДНК представлена у вигляді подвійного ланцюжка нуклеотидів із протиіонами, приєднаними до фосфатних груп остову макромолекули.

Для того, щоб оцінити вплив молекул пероксиду водню, ця модель була модифікована шляхом збільшення маси кожного протиіона на величину маси однієї молекули H_2O_2 . Низькочастотні спектри коливань макромолекули ДНК із протиіонами також розраховувалися для випадку, коли молекула H_2O приєднана до іона. Рівняння, необхідні для обчислення частот коливальних мод та інтенсивностей комбінаційного розсіяння, використовуються ті ж самі, що й у оригінальних роботах [56, 57]. Параметри, що використовуються для обчислень, вибиралися для В-форми подвійної спіралі, що є природною для ДНК у фізіологічних умовах.

Розраховано низькочастотні спектри комбінаційного розсіяння макромолекули ДНК з приєднаними до неї комплексом $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+$, а також із комплексом $\text{H}_2\text{O-Na}^+$ (Рис. 3.5). Внутрішні коливання подвійної спіралі (нижчі за 120 см^{-1}) пов'язані з коливаннями розтягу водневих зв'язків у комплементарних парах нуклеїнових основ, а також із коливаннями нуклеозидів внаслідок зміни кута псевдообертання цукрового кільця. Присутність молекул пероксиду водню на ці моди суттєво не впливає. На більш високих частотах ті моди, які характеризують коливання відповідних комплексів по відношенню до фосфатних груп, становлять приблизно 140 см^{-1} (у випадку комплексу з молекулою H_2O_2) та 155 см^{-1} (у випадку комплексу з молекулою H_2O). Інтенсивність комбінаційного розсіяння є вищою для випадку комплексу з молекулою пероксиду водню. Таким чином, оцінки показують, що молекула пероксиду водню, приєднана до фосфатних груп ДНК, може індукувати відчутні зміни в низькочастотних спектрах комбінаційного розсіяння.

Поява даних мод в спектрі комбінаційного розсіяння макромолекули ДНК в розчині буде вказувати на можливість утворення стійких комплексів молекул пероксиду водню з атомними групами остову ДНК. За інтенсивністю даних піків можна також отримати інформацію про частку молекул пероксиду водню, що взаємодіють із подвійною спіраллю.

3.4 Порівняння часів життя молекул пероксиду водню та води біля фосфатної групи ДНК

Розрахунки, проведені в даній роботі, показують, що комплекси взаємодії молекул пероксиду водню та води з макромолекулою ДНК є найбільш стабільними в присутності протиіона натрію. Без Na^+ , стійкість комплексів знижується приблизно в 2-3 рази. Це пов'язано з тим, що кулонівська взаємодія відіграє домінуючу роль у формуванні відповідних комплексів. Енергії стабільності комплексів $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+\text{-PO}_4^-$ та $\text{H}_2\text{O-Na}^+\text{-PO}_4^-$ є приблизно однаковими. Тому цілком імовірним є включення молекули

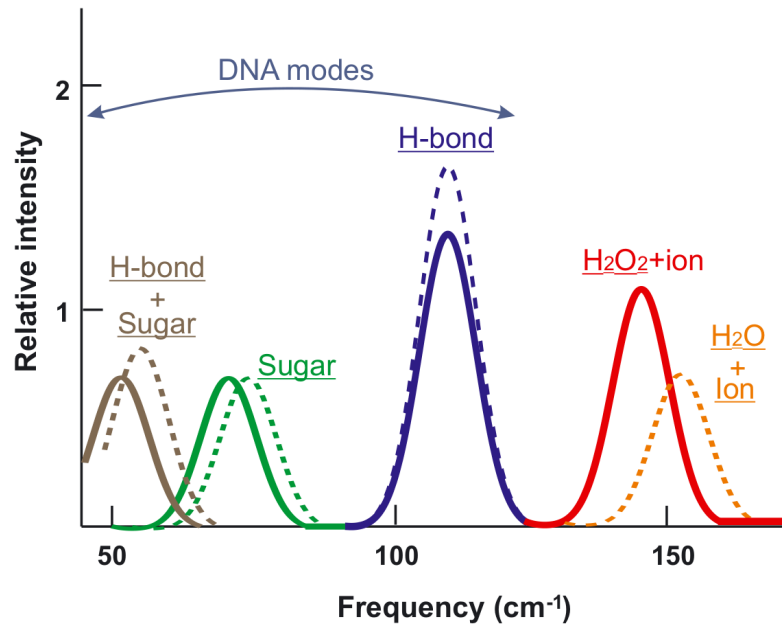


Рис. 3.5 Низькочастотні спектри комбінаційного розсіяння ДНК із комплексом $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+$ (суцільна лінія) та з комплексом $\text{H}_2\text{O-Na}^+$ (пунктирна лінія), оцінені в даній роботі.

пероксиду водню в гідратаційну оболонку протіона Na^+ , який взаємодіє з зарядженими атомами кисню фосфатної групи ДНК.

Утворення стійкого комплексу $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+$ з фосфатною групою ДНК може бути виявлена за низькочастотними спектрами комбінаційного розсіяння ДНК. За нашими оцінками, частота коливань комплексу протіону разом із молекулою пероксиду водню по відношенню до фосфатної групи остову подвійної спіралі повинна бути приблизно на 10 см^{-1} меншою, ніж частота коливань відповідного комплексу з молекулою води. Враховуючи знайдений зсув по частоті, можна порівняти часи життя комплексів $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+\text{-PO}_4^-$ та $\text{H}_2\text{O-Na}^+\text{-PO}_4^-$. Відповідно до рівняння типу Арреніуса [62], залежність часу життя комплексу від енергії взаємодії має експоненційний характер:

$$\tau \approx \tau_0 \exp\left(\frac{E}{k_b T}\right), \quad (3.1)$$

де E - величина енергії зв'язку комплексу, k_b - стала Больцмана, T - абсолютна температура. Константа τ_0 за величиною є обернено пропорцій-

ною до частоти коливань однієї молекули в складі комплексу відносно іншої.

Тепер візьмемо відношення часів життя комплексів з молекулою пероксиду (τ_1) та води (τ_2):

$$\frac{\tau_1}{\tau_2} = \frac{\omega_2}{\omega_1} \exp\left(\frac{E_1 - E_2}{kT}\right) \quad (3.2)$$

де ω_1, ω_2 - частоти коливань відповідних комплексів ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+$ та $\text{H}_2\text{O-Na}^+$) відносно групи PO_4^- ; E_1 і E_2 - енергії взаємодії в цих комплексах. Оскільки енергії взаємодії комплексів $\epsilon \sim 1$ ккал/моль (Табл. 3.3), отримуємо:

$$\frac{\tau_1}{\tau_2} \approx 5 \frac{\omega_2}{\omega_1} \quad (3.3)$$

В п. 3.3 було показано, що $\omega_2 > \omega_1$. В результаті, згідно (3.3), час життя комплексу з молекулою H_2O_2 є вищим, ніж відповідного комплексу з молекулою H_2O .

Внаслідок того, що комплекс $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Na}^+\text{-PO}_4^-$ має більший час життя, молекули пероксиду водню можуть накопичуватися поблизу подвійної спіралі ДНК. У значній кількості молекули H_2O_2 можуть впливати на біологічну функцію ДНК шляхом порушення процесу специфічного нуклеїново-білкового впізнавання, блокуючи процеси трансляції генетичної інформації з ДНК на РНК. Таким чином, молекула пероксиду водню, взаємодіючи з ДНК під час іонної терапії, може дезактивувати клітинний генетичний апарат та індукувати загибель ракових клітин.

Розділ 4 Утворення комплексів молекул пероксиду водню та води з центрами специфічного впізнавання ДНК — нуклеїновими основами

В попередньому розділі було встановлено, що молекули пероксиду водню можуть в значній кількості накопичуватися поблизу остову макромолекули ДНК. У зв'язку з цим, необхідним напрямком подальшого дослідження є встановлення можливості утворення стійких комплексів молекули пероксиду водню із тими складовими частинами макромолекули ДНК, в яких безпосередньо міститься генетична інформація - нуклеїновими основами (Аденін, Тимін, Гуанін та Цитозин). В першій частині розділу розглянуто взаємодію з окремими основами, а в другій частині - одночасно з двома нуклеїновими основами, що утворюють комплементарні пари (А·Т та G·C)).

4.1 Взаємодія молекул H_2O_2 і H_2O з окремими нуклеїновими основами ДНК

Взаємодію нуклеїнових основ з молекулами води досліджено в ряді робіт [63—66]. Проте взаємодія з молекулами пероксиду водню не розглядалася в достатній мірі. На даний момент відома лише робота [67], де за допомогою квантово-механічних розрахунків розглянуто взаємодію молекули пероксиду з нуклеїновою основою Аденін. У даній частині дослідження розглянуто усі можливі стабільні комплекси молекули пероксиду водню з нуклеїновими основами А, Т, G і C, встановлено їх оптимізовані просторові конфігурації та енергії взаємодії, та порівняно з аналогічними комплексами з молекулою води. Для розрахунків використано методи AAPFh та B3LYP.

Пероксид водню, як і вода, може утворювати водневі зв'язки з нуклеїновими основами. Як відомо [68], для розпізнавання конкретної ділянки ДНК, ферменту необхідно взаємодіяти з атомними групами цієї ділянки щонайменше двома водневими зв'язками. Крім того, внаслідок своєї просторової структури, молекулі пероксиду набагато вигідніше утворити водневі зв'язки таким чином, що у їх формуванні беруть участь два різних атоми кисню молекули H_2O_2 . На відміну від комплексу з одним водневим зв'язком, у комплексі з двома водневими зв'язками рухливість молекули пероксиду є більш обмеженою, вона не має можливості обертатися навколо водневих зв'язків. Тому, враховуючи усі наведені вище факти, в даній частині дослідження розглядаються лише комплекси з двома водневими зв'язками, не беручи до уваги комплекси з одним водневим зв'язком. Слід також зазначити, що таутомерні форми нуклеїнових основ не розглядаються в даній роботі.

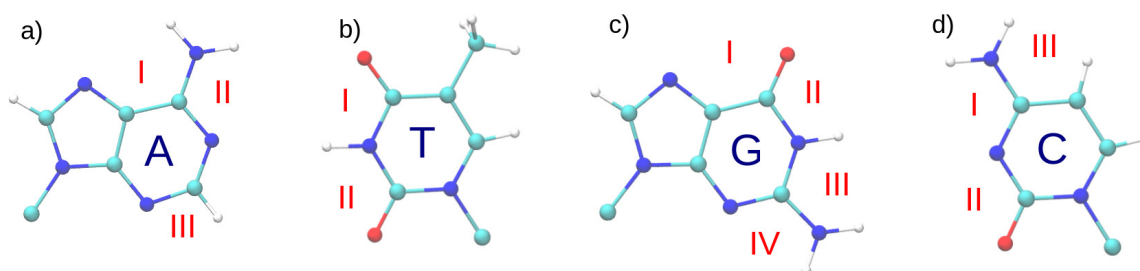


Рис. 4.1 Схематичне зображення ділянок Аденіну (а), Тиміну (б), Гуаніну (с) і Цитозину (д), де молекула пероксиду водню або води може утворювати стійкий комплекс з відповідною нуклеїновою основою з двома водневими зв'язками. Римські цифри позначають номер ділянки.

4.1.1 Стабільні комплекси молекул пероксиду водню та води з окремими нуклеїновими основами ДНК

Для кожної нуклеїнової основи існує певний набір ділянок, де, в силу своєї геометрії молекула пероксиду водню може утворити два водневі зв'язки з атомними групами нуклеїнової основи. Ці ділянки схематично показані на Рис. 4.1. Для кожної ділянки обчислюються відстані водневого зв'язку та мінімум енергії. Оскільки вважається, що нуклеїно-

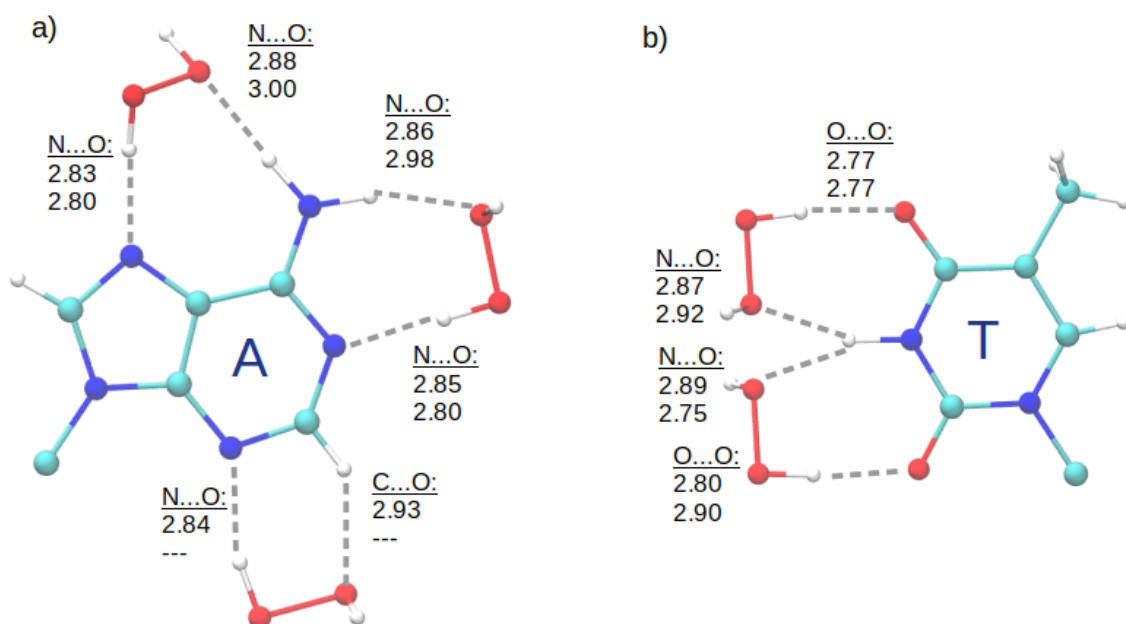


Рис. 4.2 Комплекси нуклеїнових основ з молекулами пероксиду водню: а) Аденін; б) Тимін. Цифрами позначено значення відповідних відстаней водневого зв'язку між важкими атомами. Верхнє число відповідає значенню, отриманому в методі AARFh, а нижнє число - в методі B3LYP.

ві основи знаходяться в складі подвійної спіралі, можливість утворення комплексів зі сторони остову макромолекули ДНК не розглядається.

Можна бачити, що у випадку Аденіну на ділянках А-I, А-II молекула пероксиду водню взаємодіє з цією нуклеїновою основою сильніше, ніж молекула води (див. Табл. 4.1). Для ділянок АI, А-II енергії взаємодії близькі до значень, отриманих в роботі [67]. Метод AARFh показує, що на ділянці А-III спостерігається утворення слабкого комплексу з молекулою H_2O_2 із вигнутими водневими зв'язками, в той же час в рамках методу B3LYP комплекс взагалі не утворюється. Слід також зазначити, що у випадку методу B3LYP молекули води та пероксиду водню несуттєво змінюють свою форму - енергія деформації не перевищує 0.5 ккал/моль.

Наші розрахунки показують, що у випадку Тиміну є два місця зв'язування: Т-I, Т-II (Рис. 4.1 б). Відповідні комплекси з молекулою пероксиду водню показані на Рис. 4.2 б. Для молекул води і пероксиду водню утворення комплексів відбувається на одних і тих самих ділянках тиміну, але зі значною різницею в енергії взаємодії (Табл. 4.1). Обидва наші підходи (AARF і B3LYP) дають енергетичну перевагу для комплексу з молеку-

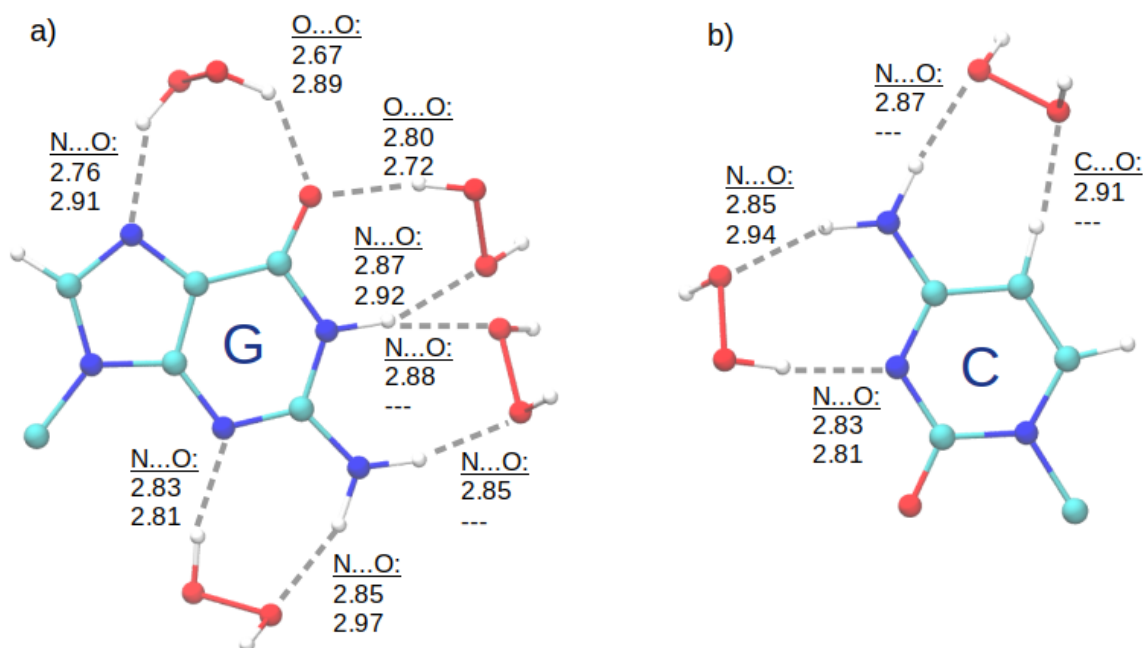


Рис. 4.3 Комплекси нуклеїнових основ з молекулами пероксиду водню: а) Гуанін; б) Цитозин. Цифрами позначено значення відповідних відстаней водневого зв'язку між важкими атомами. Верхнє число відповідає значенню, отриманому в методі AAPPf, а нижнє число - в методі B3LYP.

лою пероксиду порівняно з аналогічним комплексом з молекулою води. У випадку методу B3LYP енергія деформації молекул пероксиду і води відіграє незначну роль (<0.3 ккал/моль).

Комплекси взаємодії молекул пероксиду водню з Гуаніном (G-I, G-II, G-III, G-IV) показані на Рис. 4.1 с. Відмінності в енергіях взаємодії наведені в Табл. 4.1. Дослідження цих комплексів методом B3LYP показує, що в положенні I молекула пероксиду водню значно деформується (енергія деформації ≈ 2.5 ккал/моль), що є причиною відмінностей між відстанями водневих зв'язків у методах AAPPf та B3LYP (Рис. 4.3 а).

Цитозин має дві ділянки зв'язування (Рис. 4.3 б). На ділянці C-I можливе утворення комплексів як з молекулою пероксиду водню, так і з молекулою води. Слід зазначити, що взаємодія з пероксидом водню є більш енергетично вигідною (Табл. 4.1). На ділянці C-III можливе утворення комплексу лише з молекулою пероксиду водню. Для ділянки C-II, в рамках методу AAPPf, через геометричні особливості молекули H_2O_2 , яка є жорсткою, не існує комплексу з молекулою пероксиду водню. Як

видно із геометричної структури комплексу, для методу B3LYP в положенні II молекула пероксиду водню різко зменшує свій двогранний кут (енергія деформації ≈ 4.2 ккал/моль), утворюючи два водневі зв'язки з Цитозином. Це дозволяє молекулі H_2O_2 утворити стабільний комплекс з Цитозином.

Підсумовуючи результати наших розрахунків, можна бачити, що для Аденину, Тиміну, Гуаніну і Цитозину існують місця, які є більш енергетично вигідними для утворення комплексу з молекулою пероксиду водню, ніж з молекулою води.

4.1.2 Про можливість блокування атомних груп нуклеїнових основ молекулами пероксиду водню

Отримано стабільні конфігурації молекули пероксиду водню з центрами специфічного впізнавання макромолекули ДНК. Обидва використані обчислювальні методи (метод атом-атомних потенціальних функцій та теорія функціоналу густини) дають подібні результати. З Рис. 4.2 та 4.3 можна бачити, що для випадку Тиміну найбільш імовірним є зв'язування молекули пероксиду водню зі сторони комплементарних водневих зв'язків. Для Аденину і Гуаніну - як з боку великого і малого жолобів, так і з боку комплементарних водневих зв'язків. А для Цитозину - з боку великого жолобу і комплементарних водневих зв'язків.

Як відомо [69], розпізнавання макромолекули ДНК білком може мати місце як із великого, так і з малого жолобів, в залежності від типу ферменту і форми подвійної спіралі. Тому, утворення комплексу нуклеїнової кислоти з молекулою пероксиду водню, яка зв'язується з нуклеїновою основою зі сторони великого (Рис. 4.1, А-I, С-III, G-I) або малого (Рис. 4.1, А-III, G-IV) жолобів, можуть запобігти впізнаванню цієї основи ферментом і, отже, заблокувати процес нуклеїново-білкового впізнавання.

Утворення таких самих комплексів з боку комплементарних водневих зв'язків (ТI, Т-II, А-II, СI, С-II, G-II, G-III) може мати місце на стадії про-

цесу транскрипції ДНК, коли подвійна спіраль вже є розкритою до двох окремих ланцюжків. У цьому випадку енергія блокування нуклеїнової основи молекулою пероксиду водню за порядком величини співпадає з енергією формування комплементарних пар 4.2.1.

Підводячи підсумок, залежно від форми ДНК, взаємодія з нуклеїновими основами ДНК в розчині може відбуватися як зі сторони великого, так і зі сторони малого жолобів. Таким чином, існують ділянки нуклеїнових основ, де взаємодія з пероксидом водню є суттєво більш енергетично вигідною, ніж взаємодія з молекулою води. Отже, формування таких комплексів є достатньо імовірним в клітині при лікуванні методом іонної терапії, внаслідок чого в ракових клітинах можуть бути заблоковані процеси передачі генетичної інформації.

4.2 Взаємодія молекул H_2O_2 і H_2O з нуклеїновими основами в комплементарних парах ДНК

Відомо, що нуклеїнові основи в складі макромолекули ДНК утворюють комплементарні пари: Аденін-Тимін та Гуанін-Цитозин. Тому, молекули пероксиду водню можуть взаємодіяти одночасно з двома нуклеїновими основами, що утворюють комплементарну пару. Таким чином, вони можуть запобігати процесу розкриття пар основ макромолекули ДНК, що є ключовим процесом передачі генетичної інформації в живих клітинах. В зв'язку з цим, необхідним є проведення розрахунків енергії взаємодії комплексів, що складаються з пар нуклеїнових основ А·Т і G·С з молекулами H_2O_2 та H_2O .

Для цілей даної роботи важливо проаналізувати можливість формування найпростіших 'не-Уотсон-Криківських' конфігурацій пар основ А·Т та G·С, стабілізованих молекулами пероксиду водню та води та встановити, чи може утворення цих комплексів блокувати процеси передачі генетичної інформації. В даному дослідженні враховуються лише ті комплекси, що включають одну молекулу пероксиду водню або води. Оскільки в попередніх розділах було показано, що методи атом-атомних

потенціальних функцій та квантової механіки молекул дають близькі результати, тут і далі розрахунки проведено лише методом атом-атомних потенціальних функцій.

Нуклеїнові основи в комплементарній парі мають багато ступенів вільності, які визначені стандартною номенклатурою [70]. Оскільки пари основ розташовані в подвійній спіралі, їх структура стабілізується стекінг-взаємодією між сусідніми парами. Це суттєво обмежує ті ступені вільності, які виводять основи з площини пари. Отже, в даному дослідженні враховуються лише ступені вільності основ у площині пари ('stretch', 'opening', 'shear'). Додатково, внаслідок особливостей просторової структури молекули H_2O_2 , враховується ступінь вільності 'propeller twist' (Рис. 4.4).

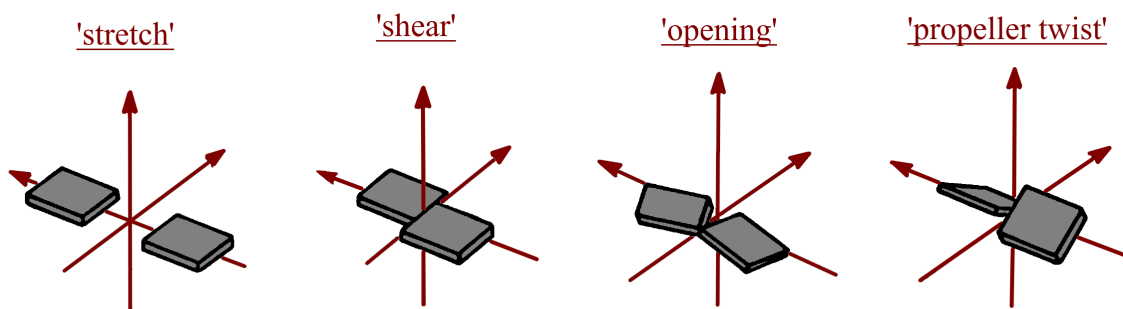


Рис. 4.4 Основні ступені вільності нуклеїнових основ у комплементарній парі, які були враховані при розрахунках молекулярних комплексів в даній роботі.

4.2.1 Взаємодія нуклеїнових основ в комплементарних парах А·Т та G·C

По-перше, здійснимо розрахунок енергії взаємодії в уотсон-криківських парах основ А·Т та G·C у газовій фазі (AAPF) та з використанням залежності діелектричної проникності від відстані у вигляді (2.5)(AAPFh). Результати розрахунків, а також енергетичні вклади від водневих зв'язків (2.3), ван-дер-Ваальсової (2.2) та кулонівської (2.4) взаємодій наведено в Табл. 4.2.

З результатів розрахунків видно, що для випадку, коли не враховується залежність (2.5), для пари G·C отримуємо аномально великий вклад

кулонівської взаємодії. Це пов'язано з тим, що, на відміну від пари А·Т, пара G·C має додаткову аміногрупу (Рис. 4.5), вклади кулонівської взаємодії якої з іншими атомами є суттєвою. Саме тому, необхідно ввести обмеження на кулонівську взаємодію атомів, що знаходяться на достатньо великій відстані один від одного. Результати обчислень методом AARFh (Табл. 4.2) суттєво зменшують як вклад кулонівської взаємодії в повну енергію пари G·C, так і різницю повних енергій взаємодії між парами А·Т та G·C.

Просторова структура пар А·Т та G·C (Рис. 4.5) майже не змінюється в залежності від того, чи використовується формула (2.5). В Табл. 4.5 наведено результати порівняння параметрів ступенів вільності нуклеїнових основ в комплементарній парі за стандартною номенклатурою [70]. Як видно з Табл. 4.3, ці параметри близькі до тих, які було отримано в експериментах з рентгеноструктурного аналізу і ядерного магнітного резонансу. Суттєві відмінності є лише в параметрі 'propeller twist', оскільки на експерименті отримують пари основ, які не є ізольованими, а знаходяться в складі подвійної спіралі.

Підсумовуючи отримані вище результати, можна стверджувати, що для розгляду взаємодій у парах нуклеїнових основ, врахування залежності (2.5) дає суттєво достовірніші фізичні результати енергій взаємодії за майже незмінної просторової структури.

4.2.2 Конфігурації пар нуклеїнових основ ДНК, стабілізовані молекулами пероксиду водню та води

У даній роботі ми розглянемо три конфігурації пар нуклеїнових основ з молекулами пероксиду водню та води. Комплекс, що складається з комплементарних пар А·Т і G·C та молекули пероксиду водню або води, що взаємодіє з однією із основ зі сторони головного жолобу, позначаємо як 'закритий' ('closed') (Рис. 4.6 а). Конфігурацію пари, де домінує траєкторія 'opening', позначимо як 'привідкриту' ('preopened') (Рис. 4.6 б) а ту,

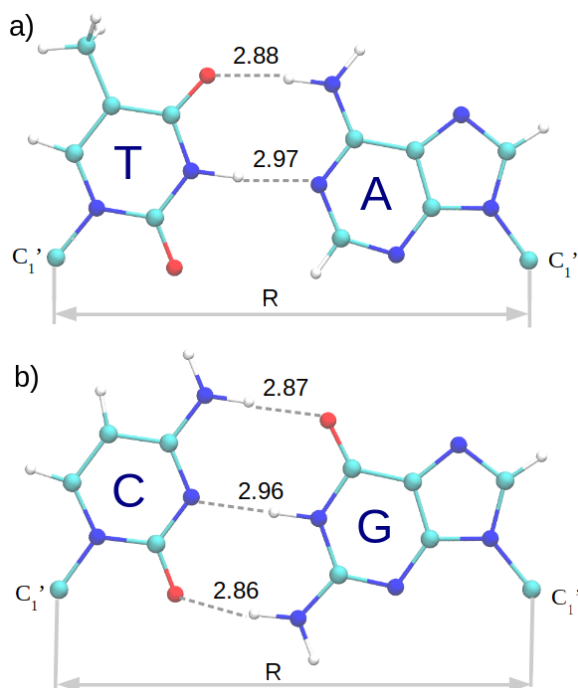


Рис. 4.5 Уотсон-криківські конфігурації пар А·Т (а) та G·С (b). Цифри позначають відстань (в Å) між важкими атомами у відповідних водневих зв'язках. R позначає відстань між атомами C_1' .

у якій домінує траєкторія 'stretch' позначимо як 'розтягнута' ('stretched') конфігурацію (Рис. 4.6 с).

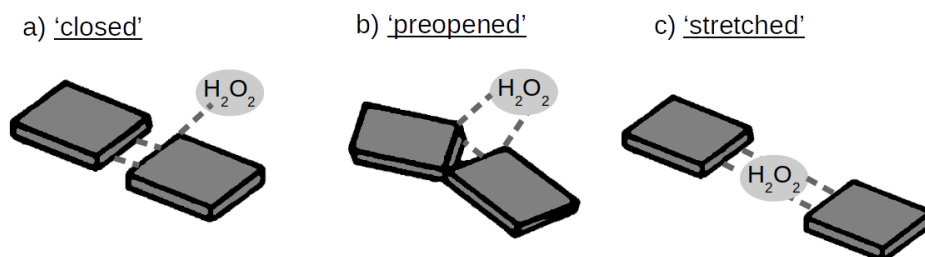


Рис. 4.6 Комплекси пар нуклеїнових основ з молекулами пероксиду водню, що розглядаються в даній роботі (і повинні виникати на шляху відкриття пар основ макромолекули ДНК): а) 'закрита' ('closed') конфігурація; б) 'привідкрита' ('preopened') конфігурація; с) 'розтягнута' ('stretched') конфігурація.

Спочатку обчислимо 'закриті' ('closed') конфігурації пар основ. З Рис. 4.7) видно, що взаємодія з цими молекулами майже не змінює уотсон-криківської геометрії пар (Табл. 4.4).

На Рис. 4.8 показані стабільні конфігурації 'привідкритих' пар А·Т і G·С з молекулами води та пероксиду водню. Для зручності аналізу, в

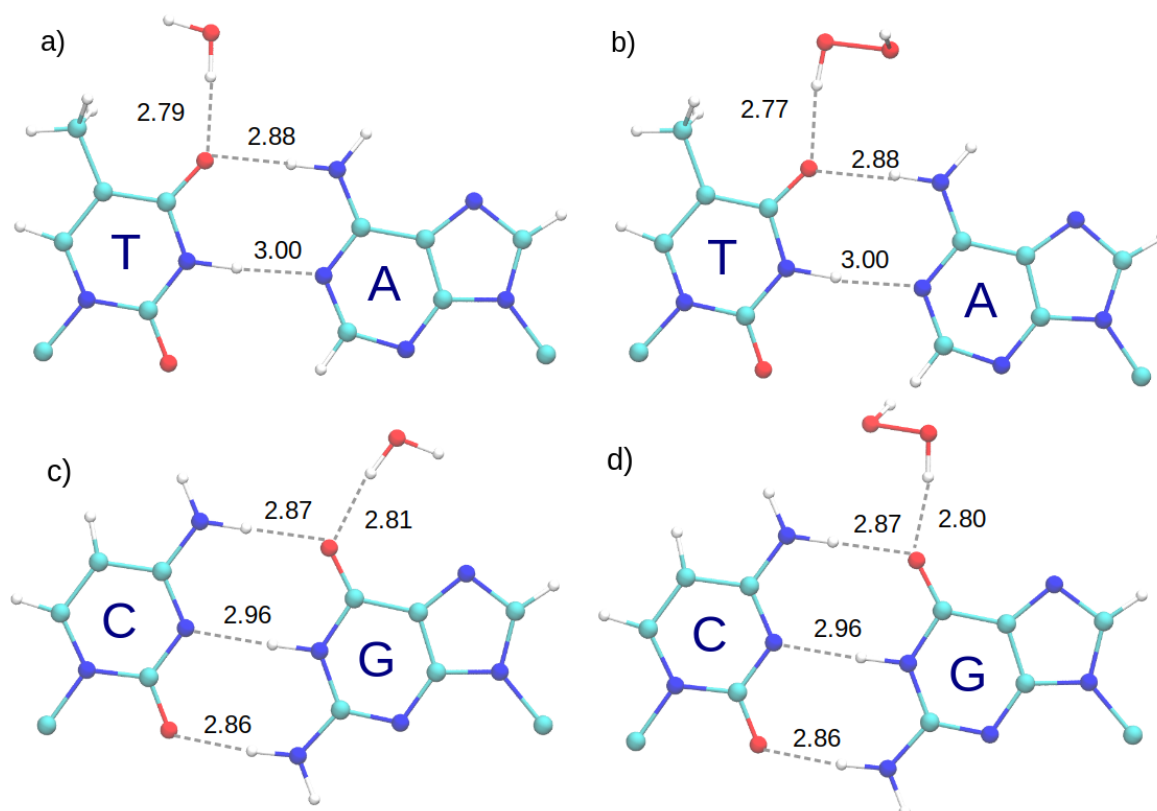


Рис. 4.7 Комплекси комплементарних пар А·Т і G·C з молекулами води та пероксиду водню, що взаємодіють зі сторони головного жолобу ('закрита' конфігурація): а) А·Т з молекулою H_2O ; б) А·Т з H_2O_2 ; в) G·C з H_2O ; д) G·C з H_2O_2 .

Табл. 4.4 наведено лише структурні параметри $\Delta R = R - R_{WC}$ (різниця у відстанях $C'_1C'_1$ (Рис. 4.5 а) у відповідній та уотсон-кріківській парах), параметри 'opening' та 'propeller', а також енергії взаємодії у відповідних комплексах. З табл. 4.4 видно, що конфігурації 'привідкритої' пари А·Т з молекулами води та пероксиду водню мають майже однакові параметри. Параметр 'opening' має максимальне значення, решта параметрів суттєво не відрізняються. Слід також зазначити, що параметр 'propeller twist' майже не виводить основи з площини пари. Більше того, конфігурації 'привідкритих' G·C пар з молекулами H_2O_2 і H_2O значно відрізняються, оскільки просторова структура пероксиду збільшує параметр 'propeller twist', виводячи основи з площини пари.

Слід також зазначити, що у випадку пари G·C існує така конфігурація з молекулою H_2O_2 (Рис. 4.9), яка, з одного боку, є подібною до 'привідкритої' конфігурації, оскільки параметр R майже не змінюється по-

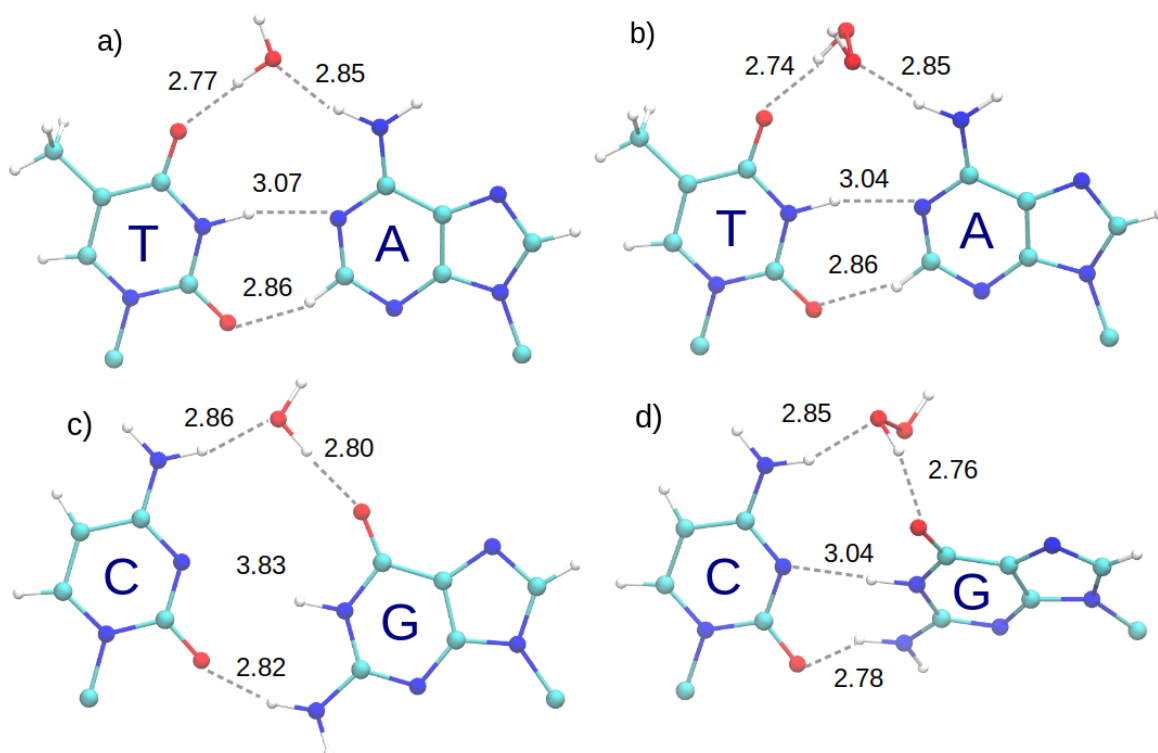


Рис. 4.8 Стабільні конфігурації ‘привідкритих’ пар основ, обчислених в даній роботі: А·Т з молекулами води (а) та пероксиду водню (b); G·C з молекулами води (c) та пероксиду водню (d). Цифри позначають відстань (в Å) між важкими атомами у відповідних водневих зв’язках.

рівняно з уотсон-криківською парою, а параметр ‘opening’ значно більший. Проте, оскільки молекула пероксиду в цьому випадку ніби ‘вбудовується’ до внутрішнього водневого зв’язку ($N_3 \dots N_1$), ми називаємо цей стан ‘відкритим’ (‘opened’). Зауважимо, що внаслідок геометричних особливостей молекул, ‘відкритий’ стан існує лише для пари G·C і лише з молекулою H_2O_2 .

Конфігурації ‘розтягнутих’ пар з водою та пероксидом водню значно відрізняються за своїми просторовими параметрами (Рис. 4.10). Слід зазначити, що як для пар А·Т, так і для пар G·C, значення енергії взаємодії ‘розтягнутих’ пар для комплексу з молекулою води є нижчим за відповідне значення для ‘привідкритих’ конфігурацій, а для комплексів з молекулою пероксиду водню, навпаки, значно більшим (Табл. 4.4).

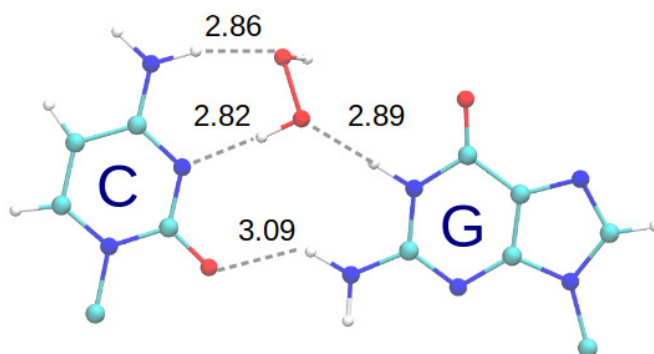


Рис. 4.9 ‘Відкрита’ конфігурація пари G·C з молекулою H_2O_2 , розрахована в даній роботі. Цифри позначають відстань (в Å) між важкими атомами у відповідних водневих зв’язках.

4.2.3 Про можливість блокування молекулами пероксиду водню процесу розкриття пар нуклеїнових основ ДНК

Досліджено просторові конфігурації комплексів, що складаються з пар нуклеїнових основ із молекулами пероксиду водню та води. Порівняння енергій взаємодії в цих комплексах схематично показано на діаграмі (Рис. 4.11). Як видно з результатів, існують конфігурації пар основ А·Т і G·C (‘привідкриті’ і ‘розтягнуті’), які стабілізуються молекулами пероксиду водню суттєво краще, ніж молекулами води.

Взаємодія молекул H_2O_2 з парами нуклеїнових основ ДНК може мати місце в живій клітині. А саме - в процесі реплікації ДНК, коли з однієї подвійної спіралі утворюються дві макромолекули ДНК. На початковій стадії цього процесу фермент рухається уздовж подвійної спіралі [78], послідовно розкриваючи пари основ одна за одною (процес анзіпінгу ДНК). Нуклеїнові основи весь час взаємодіють з молекулами води. Але, як було сказано в Розділі 1, під час іонної терапії в середовищі виникає значна кількість молекул H_2O_2 . Якщо енергія взаємодії пари нуклеїнових основ з молекулою пероксиду водню досить велика порівняно з тією ж енергією взаємодії з молекулою води, процес анзіпінгу ДНК, що здійснюється ферментом, може бути заблоковано.

Як видно з отриманих результатів, найбільш суттєва різниця в енергіях взаємодії має місце для ‘розтягнутих’ конфігурацій пар. Тому можливість блокування ‘розтягнутих’ пар молекулами пероксиду водню є значно більш імовірною. У цьому випадку, різниця між енергіями розкриття становить $\approx 7 - 8$ ккал/моль (Табл. 4.4). Це пов’язано з тим, що молекула пероксиду водню завдяки своїй просторовій структурі утворює чотири водневі зв’язки з нуклеїновими основами (Рис. 4.10 b,d). При цьому молекула води утворює три водневі зв’язки, два з яких істотно вигнуті, тобто їх енергія послаблена (Рис. 4.10 a,c). Слід також зазначити, що в ‘розтягнутих’ конфігураціях параметр ‘propeller twist’ відіграє суттєву роль (Табл. 4.4). Оскільки в макромолекулі ДНК комплементарні пари основ стабілізовані стекінг-взаємодією, ‘розтягнуті’ конфігурації не можуть виникнути в результаті флуктуаційних коливань структури подвійної спіралі. Утворення таких конфігурацій можливе лише в процесі анзіпінгу ДНК в тій парі основ, яка знаходиться на межі між відкритими та закритими парами (так-звана вилка анзіпінгу). В цьому випадку в зазначеній парі з однієї сторони буде відсутня стекінг-взаємодія, що надасть основам додаткові ступені вільності в площині, перпендикулярній до площини пари.

Слід зазначити, що отримані значення енергій взаємодії, є лише значеннями ентальпії, ентропія не враховується. Однак, оскільки молекули пероксиду водню та води мають подібну структуру, внесок ентропії у взаємодію цієї молекули з нуклеїновими основами також повинен бути близьким для комплексів з молекулами H_2O_2 та H_2O . Тому наш підхід дозволяє отримати якісну картину формування комплексів молекули пероксиду водню з парами нуклеїнових основ і виявити істотну енергетичну перевагу порівняно з аналогічними комплексами з молекулою води.

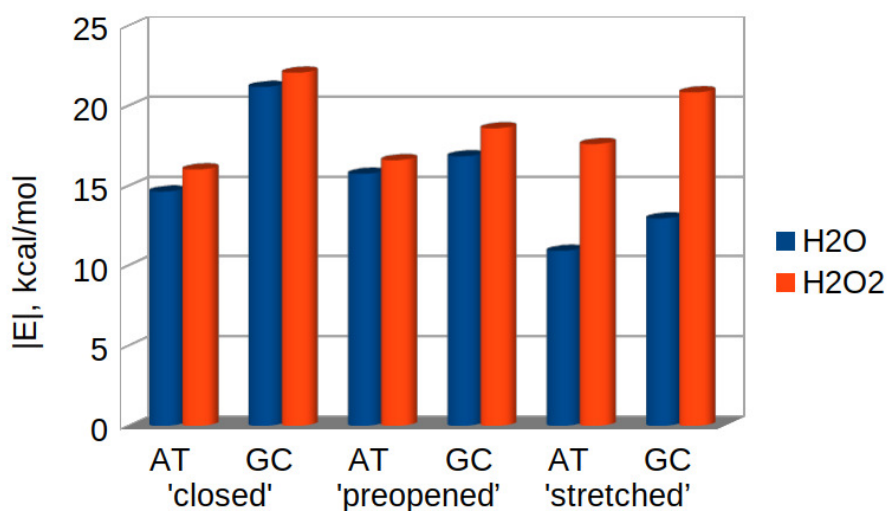


Рис. 4.11 Діаграма значень енергії взаємодії для комплексів, що складаються з молекул пероксиду водню та води із ‘закритою’, ‘привідкритою’ та ‘розтягнутою’ конфігураціями пар А·Т та G·С.

Утворення комплексів молекул H_2O_2 з парами нуклеїнових основ може повністю заблокувати процес розкриття макромолекули ДНК. Це може призвести до порушення процесів передачі генетичної інформації і бути ключовим фактором дії високоенергетичних іонів на онкологічні клітини в процесі іонної терапії.

Табл. 4.1 Енергії взаємодії комплексів, що складаються з нуклеїнової основи (Аденін, Тимін, Гуанін, Цитозин) та молекул H_2O_2 і H_2O , а також різниця між цими енергіями ($\Delta E = |E_{H_2O_2} - E_{H_2O}|$), розраховані методами AAPFh і B3LYP. Енергії наведені в ккал/моль. “–” означає, що на цій ділянці не існує мінімуму з двома водневими зв'язками.

		H_2O_2		H_2O		ΔE	
		AAPFh	(B3LYP)	AAPFh	(B3LYP)	AAPFh	(B3LYP)
A	I	–10.71	(–10.81)	–7.95	(–9.65)	2.76	(1.16)
	II	–9.22	(–11.19)	–5.65	(–9.00)	3.57	(2.19)
	III	–6.76	(–)	–	(–)	–	(–)
T	I	–9.26	(–10.39)	–5.54	(–8.64)	3.72	(1.75)
	II	–8.63	(–11.17)	–5.26	(–9.29)	3.37	(1.88)
G	I	–9.67	(–10.98)	–9.06	(–8.45)	0.61	(2.53)
	II	–9.56	(–13.43)	–5.99	(–11.62)	3.57	(1.81)
	III	–10.36	(–)	–6.35	(–)	4.01	(–)
	IV	–9.02	(–9.83)	–	(–7.83)	–	(2.00)
C	I	–11.22	(–12.92)	–6.82	(–11.11)	4.40	(1.81)
	II	–	(–10.39)	–7.40	(–)	–	(–)
	III	–7.62	(–)	–	(–)	–	(–)

Табл. 4.2 Оптимізовані значення енергії взаємодії (в ккал/моль), отримані в [36], розраховані в даній роботі методами (AAPF) та (AAPFh) для уотсон-криківських пар А·Т (E_{tot}^{AT}) та Г·С (E_{tot}^{GC}). Також наведені вклади від водневих зв'язків (E_{HB}), ван-дер-Ваальсової (E_{vdW}) та кулонівської (E_{Coul}) взаємодій.

		отримано в [36]	Наші результати	
			AAPF	AAPFh
	E_{tot}^{AT}	-11.3	-11.3	-9.72
	E_{tot}^{GC}	-25.5	-26.3	-15.82
А·Т	E_{HB}	-	-4.28	-4.34
	E_{vdW}	-	-1.89	-1.94
	E_{Coul}	-	-5.16	-3.44
Г·С	E_{HB}	-	-6.72	-6.99
	E_{vdW}	-	-1.60	-1.60
	E_{Coul}	-	-17.96	-7.21

Табл. 4.3 Параметри просторової структури уотсон-криківських пар основ А·Т та G·C згідно стандартної номенклатури [70]. Значення параметрів ‘shear’, ‘stretch’ наведено в Å; ‘propeller twist’, ‘opening’ - в градусах. Дані рентгеноструктурного аналізу взято з файлів 1bna.pdb [43], 7bna.pdb [71], 9bna.pdb [72], 436d.pdb [73]; дані ЯМР - відповідно з файлів 1duf.pdb [74], 1gir.pdb [75], 1naj.pdb [76], 2daa.pdb [77]. Всі ці файли представляють просторову структуру додекамера Дікерсона-Дрю, отриману відповідним експериментальним методом. Значення усереднено окремо по парам основ А·Т та G·C, та розраховано стандартні похибки.

Параметр	Рентген	ЯМР	Наші розрахунки	
			AAPF	AAPFh
<u>A·T</u>				
‘ <u>stretch</u> ’	-0.16 ± 0.02	-0.15 ± 0.04	-0.02	-0.01
‘ <u>shear</u> ’	0.12 ± 0.03	0.00 ± 0.04	0.16	0.18
‘ <u>opening</u> ’	2.62 ± 0.67	-0.54 ± 0.6	-4.79	-5.01
‘ <u>propeller twist</u> ’	-16.95 ± 0.34	-14.45 ± 2.41	-2.46	3.58
<u>G·C</u>				
‘ <u>stretch</u> ’	-0.24 ± 0.02	-0.3 ± 0.03	-0.14	-0.14
‘ <u>shear</u> ’	-0.08 ± 0.05	0 ± 0.07	0.16	0.23
‘ <u>opening</u> ’	-2.13 ± 0.4	0.66 ± 0.41	-1.70	-1.70
‘ <u>propeller twist</u> ’	-8.15 ± 1.49	-10.41 ± 1.53	-0.53	-0.44

Табл. 4.4 Значення різниці відстаней $\Delta R = R - R_{WC}$ (R - відстань (в Å) між атомами C_1' у відповідній парі (Рис. 4.5), R_{WC} - та ж сама відстань в уотсон-криківській парі); параметри ‘opening’ та ‘propeller twist’ (у градусах), а також енергії взаємодії E (у ккал/моль) для ‘закритої’, ‘привідкритої’, ‘відкритої’ і ‘розтягнутої’ конфігурації пар основ з молекулами H_2O_2 і H_2O . Усі значення округлено до десятих, враховуючи точність параметрів, які використовуються для обчислень відповідних структур.

State			ΔR	‘opening’	‘propeller twist’	E
<u>‘закрита’</u>	A·T	H ₂ O	0.1	−5.6	−2.6	−14.7
		H ₂ O ₂	0.1	−5.6	−2.7	−16.0
	G·C	H ₂ O	0.0	−1.7	−0.5	−21.2
		H ₂ O ₂	0.0	−1.7	0.0	−22.1
<u>‘привідкрита’</u>	A·T	H ₂ O	−1.7	36.0	3.7	−15.8
		H ₂ O ₂	−1.6	35.0	12.9	−16.6
	G·C	H ₂ O	−0.3	23.3	−0.8	−16.9
		H ₂ O ₂	−0.5	17.2	42.9	−18.6
<u>‘відкрита’</u>	G·C	H ₂ O ₂	−0.1	47.0	7.3	−19.0
<u>‘розтягнута’</u>	A·T	H ₂ O	3.4	−35.9	1.8	−10.9
		H ₂ O ₂	3.1	−11.7	−69.1	−17.6
	G·C	H ₂ O	3.1	−31.5	0.0	−13.0
		H ₂ O ₂	2.9	−7.0	−72.4	−20.9

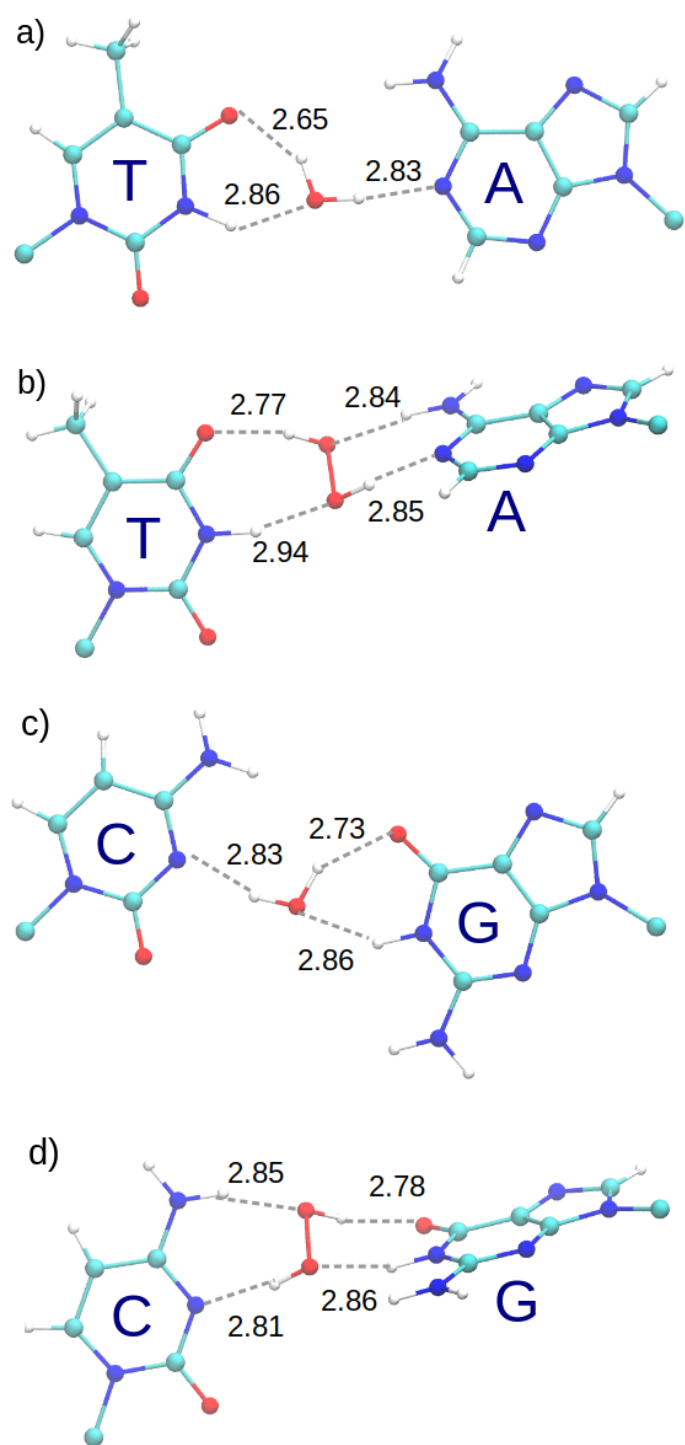


Рис. 4.10 Стабільні конфігурації ‘розтягнутих’ пар основ, обчислених в даній роботі: А·Т з молекулами води (а) та пероксиду водню (b); G·C з молекулами води (c) та пероксиду водню (d). Цифри позначають відстань (в Å) між важкими атомами у відповідних водневих зв’язках.

Розділ 5 Можливість експериментального спостереження блокування пероксидом водню процесу розкриття макромолекули ДНК

З появою методів мікроманіпулювання окремою молекулою [79—82] стало можливим дослідження біологічних макромолекул як окремої системи. Це дозволяє досліджувати всі основні механічні властивості ДНК, такі як розтяг, згин, скручування [83—86]. Серед них особливо цікавим є дослідження процесу послідовного розкриття пар нуклеїнових основ подвійної спіралі ДНК під дією зовнішньої сили (анзіпінг) [81, 87—91], оскільки він відіграє ключову роль в процесах передачі генетичної інформації.

У ранніх дослідженнях [92—94], процес розкриття пар нуклеїнових основ ДНК ототожнювався із процесом денатурації подвійної спіралі під впливом температури, що називається процесом плавлення ДНК. У цьому випадку розкриття пар основ не є послідовним. В першу чергу розкриваються ділянки ДНК, в яких домінують пари А·Т, а потім - G·C-насичені ділянки. Це відбувається внаслідок того, що пари А·Т мають нижчу енергію розкриття, ніж пари G·C. На відміну від процесу плавлення, методи мікроманіпулювання окремими молекулами дозволяють досліджувати процес послідовного розкриття пар основ ДНК таким самим чином, як це відбувається в клітинах *in vivo*.

У експерименті з анзіпінгу ДНК (Рис. 5.1), що проводиться методами мікроманіпулювання [81, 87—91, 95—97], вимірюється залежність сили від величини відстані розкриття подвійної спіралі. Для ДНК λ -фагу при низьких швидкостях розкриття (≤ 1 мкм/сек), процес розкриття подвійної спіралі починається після досягнення силою деякого критичного значення (≤ 15 пкН). У результаті, на кривій залежності сили від зміщення

утворюється плато. У даному випадку процес анзіпінгу протікає без значних коливань у силі розкриття. Для більших швидкостей (>1 мкм/сек), плато виникає при більшому значенні сили, а також спостерігається явище гістерезису [89]. В останньому випадку сила суттєво зростає, і процес анзіпінгу ДНК протікає як нерівноважний процес. Підводячи підсумок, процес анзіпінгу ДНК, в залежності від швидкості розкриття може протікати за двома різними сценаріями.

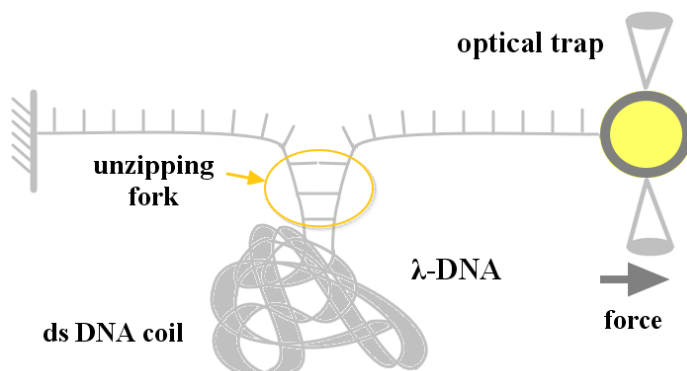


Рис. 5.1 Схема експерименту з дослідження процесу анзіпінгу ДНК, що проводиться методами мікроманіпулювання окремою молекулою [81, 87—91, 95]. F - сила, що діє на дволанцюжкову ДНК у вилиці анзіпінгу. Внаслідок геометричних особливостей експериментальної установки, прикладена сила повинна мати дві складові (F_x та F_y) - прямий розтяг однотяжєвих ланцюжків ДНК та витягання макромолекули з клубка. Сила прикладена до поліестеролової кульки, якою керує оптичний пінцет.

Процес анзіпінгу ДНК широко вивчався теоретично [81, 88, 96, 98—100]. В роботах [81, 88] було запропоновано модель процесу анзіпінгу ДНК, що враховує енергії розкриття пар основ, енергії розтягу одиночних тяжів, а також енергетичні параметри конструкційних особливостей приладів, що використовуються в експерименті (пружна енергія пастки, розтяг з'єднуючих елементів). Дана модель досить добре описує криву залежності сили від величини розкриття (крива анзіпінгу). В роботі [89] обговорювалися два сценарії анзіпінгу для двох різних швидкостей, проте конкретного фізичного механізму цього процесу на масштабі розкриття пар основ визначено не було. Спостережувані експериментальні дані та існуючі теоретичні моделі процесу анзіпінгу ДНК

дають інформацію про мезоскопічні параметри анзіпінгу, проте не дають інформації про реальні мікромеханічні процеси, що відбуваються на масштабах пар нуклеїнових основ - конкретні траєкторії розкриття пар А·Т та G·C.

Метою даного розділу є дослідження процесу анзіпінгу ДНК на масштабах рухів нуклеїнових основ у комплементарній парі. Буде показано, що внаслідок того, що нуклеїнові основи можуть розкриватися за різними траєкторіями, процес анзіпінгу ДНК може протікати за двома різними сценаріями. В рамках методу атом-атомних потенціальних функцій, обчислюються енергії розкриття пар А·Т та G·C за відповідними сценаріями. Показано, що під час процесу анзіпінгу ДНК, пари основ можуть розкриватися не лише напрямку вздовж водневих зв'язків, але, за деяких умов, вони можуть спочатку перейти в деякий 'привідкритий' метастабільний стан, після чого повністю розкритися. Також зроблено оцінку критичної сили, що відповідає сценарію розкриття пар через привідкритий стан. В кінці розділу, на основі отриманих результатів пояснено, яким чином методи мікроманіпулювання окремою молекулою можуть бути використані для експериментального спостереження явища блокування процесу анзіпінгу ДНК молекулами пероксиду водню.

5.1 Можливі сценарії процесу анзіпінгу ДНК

Варто підкреслити, що в експерименті з анзіпінгу частина макромолекули ДНК залишається без впливу дії сили, тому вона знаходиться в розчині в звичайному 'клубкоподібному' стані (див. Рис. 5.1). Як відомо з роботи [89], ефекти, пов'язані з гідродинамікою клубка, на експерименті з анзіпінгу проявляють себе як гідродинамічне тертя. Припускаємо, що сила, яка діє на вилку анзіпінгу, через наявність клубка повинна виконувати роботу двох типів: витягувати дволанцюжкову ДНК (dsDNA) з клубка та розкривати пари основ. Таким чином, сила анзіпінгу повинна мати дві складові: F_x та F_y (Рис. 5.1).

Між вилкою анзіпінгу і клубком розташована дволанцюжкова ДНК. На неї діє зовнішня сила (компонента F_y), що виникає внаслідок ефектів гідродинамічного тертя від клубка (так-званий ефект драги в розчині). Таким чином, безпосередньо перед початком розкриття згадана частина дволанцюжкової ДНК знаходиться в натягнутому стані. Інша частина ДНК складається з двох вже розкритих тяжів, які перебувають під дією зовнішньої сили (компонента F_x).

Процес анзіпінгу ДНК може проходити за різними траєкторіями, відповідно до загальноприйнятої номенклатури ступенів вільності нуклеїнових основ у комплементарній парі [70]. Найбільш ймовірною для процесу анзіпінгу ДНК є траєкторія 'stretch', коли основи в парі рухаються одна відносно одної вздовж лінії водневих зв'язків, а також траєкторія 'opening', коли пари основ розкриваються в жолоб [101]. Всі ці рухи можуть призвести до розтягу водневих зв'язків і, відповідно, до розкриття пари основ.

Аналіз цих траєкторій на стадії малих амплітудних зміщень, які реалізуються як конформаційні коливання, показує, що рухи основ у парі вздовж траєкторій 'stretch' та 'opening' виникають одночасно з коливаннями остову ДНК [102]. Саме тому, ці траєкторії мають домінувати над іншими ступенями вільності в експерименті з анзіпінгу. Відповідно, в даній частині дослідження, для розрахунку енергій розкриття пар основ, які мають місце в процесі анзіпінгу, обмежуємося лише ступенями вільності 'stretch' та 'opening' (Рис. 4.4).

Внаслідок конструкційних особливостей проведення експерименту, а також способу, яким сила прикладається до макромолекули ДНК, траєкторія 'stretch' повинна домінувати. Якщо зовнішня сила має достатньо велике значення (і може подолати гідродинамічне тертя клубка), розкриття пар основ ДНК в процесі анзіпінгу має відбуватися завжди вздовж траєкторії 'stretch'. Але якщо зовнішньої сили недостатньо, щоб зробити безпосереднє розкриття пари основ вздовж водневих зв'язків, то процес анзіпінгу може протікати таким чином, що це розкриття відбувається через певний метастабільний стан за траєкторією 'opening' (як це було запропоновано в [99]).

Отже, будемо вважати, що анзіпінг пар основ може протікати за двома можливими сценаріями: уотсон-криківська пара розкривається на пряму за траєкторією 'stretch' (сценарій 'stretch', Рис. 5.2 а), або уотсон-криківська пара спочатку переходить у 'привідкритий' метастабільний стан за траєкторією 'opening', а потім повністю розкривається за траєкторією 'stretch' (Рис. 5.2 б).

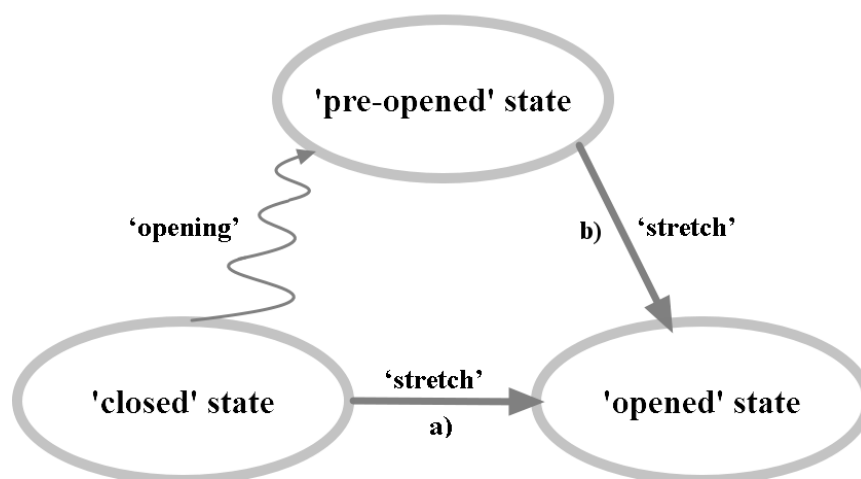


Рис. 5.2 Два можливі сценарії розкриття нуклеїнових основ у комплементарних парах в процесі анзіпінгу ДНК: а) безпосереднє розкриття за траєкторією 'stretch'; б) розкриття вздовж траєкторії 'stretch' зі стану, який перед цим привідкрився за траєкторією 'opening'.

Оскільки в експериментах, проведених методами мікрomanipулювання окремою молекулою [87, 96], досліджується довга макромолекула ДНК фага λ (≈ 50000 bp), значну роль у процесі анзіпінгу λ -ДНК можуть відігравати гідродинамічні параметри клубка. Перехід пари основ у привідкритий стан може мати місце у вилці анзіпінгу під дією натягу, створеним зовнішньою силою з однієї сторони і клубком макромолекули - з іншої. Завдяки конфігурації експериментальної установки, а також необхідності витягання двотяжевої ДНК з клубка, діюча сила повинна мати дві складові F_x і F_y (див. Рис. 5.1). Натяг в ланцюжку ДНК (компонента F_y на Рис. 5.1) повинна стимулювати розтягування подвійної спіралі і, відповідно, послаблення стекінг-взаємодії між стопками сусідніх пар основ у подвійній спіралі. Такий процес у природних умовах повинен призвести до привідкриття пар основ і їхній взаємодії з оточу-

ючими молекулами води [63, 64]. Таким чином, пари основ в області вилки анзіпінгу можуть перейти в ‘привідкритий’ метастабільний стан за траєкторією ‘opening’. Виникнення цього конформаційного переходу в області, розташованій між вилкою анзіпінгу та клубком, є природно обумовлено геометрією системи. Можливість виникнення такого метастабільного стану показана в дослідженнях взаємодії пар основ з молекулами води методами квантово-механічних розрахунків [63] та молекулярної динаміки [64]. Оскільки конкурентну взаємодію пар нуклеїнових основ з молекулами води та пероксиду водню розглянуто в попередньому розділі даної роботи, в даному розділі розглянуто загальну картину процесу анзіпінгу подвійної спіралі ДНК на масштабах рухів нуклеїнових основ у комплементарній парі.

З аналізу конформаційних коливань подвійної спіралі ДНК відомо, що коливання основ у парі вздовж траєкторії ‘opening’ відбуваються з набагато меншими частотами, ніж уздовж траєкторії ‘stretch’ [102]. Це означає, що розкриття пари основ за траєкторією ‘opening’ займає набагато більше часу, ніж уздовж траєкторії ‘stretch’. Отже, сценарій ‘stretch after opening’ повинен мати місце при низьких швидкостях розкриття.

5.2 Розрахунок енергій розкриття за двома сценаріями

Оцінимо енергію, необхідну для переходу пари основ з уотсон-криківського та ‘привідкритого’ до повністю розкритого станів для пар основ А·Т та G·C.

В розрахунках, виконаних в даному розділі для опису процесу анзіпінгу ДНК, враховується тільки енергія взаємодії нуклеїнових основ у парі. Відомо, що важливу роль у стабільності пари основ ДНК відіграє стекінг-взаємодія між стопками сусідніх пар основ [103]. Проте, для малих відхилень центру мас пари основ від уотсон-криківської конфігурації ($\Delta x \sim 0.2 \text{ \AA}$, $\Delta y \sim 0.8 \text{ \AA}$), відмінність у стекінг-взаємодії між сусідніми парами основ не є настільки суттєвою, щоб змінити наші висновки. Варто зазначити, що розкриття кожної наступної пари основ відбувається у

вилці анзіпінгу, що розташована на кінці закритої частини подвійної спіралі. У роботі [104] показано, що ймовірність флуктуаційного відкриття пари основ у подвійній спіралі на 2 порядки вище, ніж на кінцях [105]. Моделювання методом молекулярної динаміки показує, що нуклеїнові основи на кінцях здійснюють рухи з набагато більшими амплітудами, ніж пари, розташовані всередині подвійної спіралі. У роботі [106] показано, що пари, які знаходяться на кінці подвійної спіралі у вилці анзіпінгу, безумовно знаходяться в іншому стані, ніж інші пари, розташовані всередині подвійної спіралі. Їх стан також відрізняється від стану повністю відкритих пар. Це означає, що внесок стекінг-взаємодії у вилці анзіпінгу повинен бути набагато меншим, ніж для пари основ, розташованої всередині подвійної спіралі.

У наших розрахунках ми вважаємо, що перехід у ‘привідкритий’ стан відбувається через обертання нуклеїнових основ навколо осі, що проходить через атом C'_1 перпендикулярно до площини пари (Рис. 5.3). Що ж стосується траєкторії ‘stretch’, то тут ми розглядаємо рух основ у парі одне відносно одного вздовж лінії, що з'єднує атоми C'_1 (Рис. 5.3).

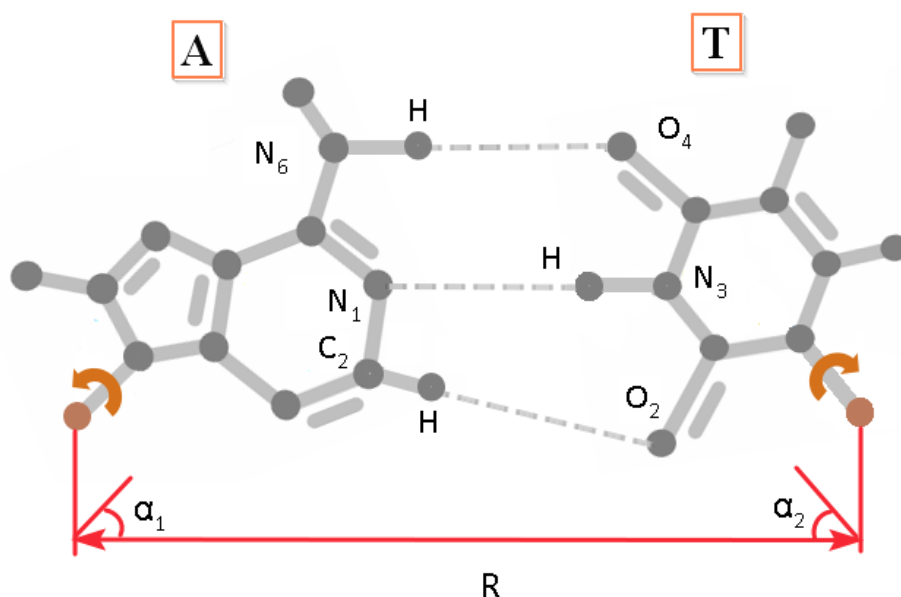


Рис. 5.3 Уотсон-кріківська конфігурація пари нуклеїнових основ Аденін-Тимін. Стрілками показано перехід у ‘привідкритий’ стан: поворот нуклеїнових основ навколо осі, що проходить через атоми C'_1 перпендикулярно до площини пари.

Геометрію уотсон-криківських пар А·Т і G·C взято з [31]. Для пари А·Т, відстань R між атомами C'_1 взято рівною 10.44 Å. Кути між глікозидним зв'язком і R (α_1 і α_2) обчислюються з умови, що в уотсон-криківській парі А·Т відстань $N_6H...O_4$ дорівнює 2.9 Å, а відстань $N_1...HN_3$ становить 2.8 Å. Для пари G·C розрахунки виконуються аналогічним чином.

Будемо вважати, що мінімум енергії взаємодії основ в уотсон-криківській парі відповідає енергії розкриття пари основ у сценарії 'stretch'. В той же час, енергія взаємодії основ у 'привідкритому' стані відповідає енергії розкриття за сценарієм 'stretch after opening'. Це припущення є справедливим, оскільки обидва сценарії мають місце за однакових зовнішніх умов, тобто під дією зовнішньої сили на пари основ, що знаходяться у вилці анзіпінгу.

Перехід у 'привідкритий' стан розраховується у два етапи. Спочатку ми здійснюємо обертання основ за траєкторією 'opening' (див. Рис. 5.3) до кута, який відповідає розриву зовнішнього водневого зв'язку в парі ($N_6H...O_4$ для пари А·Т і $O_6...HN_4$ для пари G·C). Відомо [31], що водневий зв'язок розривається, коли відстань між важкими атомами (N або O) і атомом водню досягає значення суми їх ван-дер-Ваальсових радіусів. Оскільки Ван-дер-Ваальсовий радіус атома водню становить ≈ 1.2 Å, а атомів кисню та азоту ≈ 1.5 Å [107], відповідна відстань розриву водневого зв'язку становитиме ≈ 2.7 Å. Оскільки довжина ковалентного зв'язку $N-H \approx 1$ Å [31], водневий зв'язок буде вважатися розірваним, коли відстань між важкими атомами досягне значення ≈ 3.7 Å. Ми також вважаємо, що повне розкриття пари основ відбувається за умови, коли розривається середній водневий зв'язок ($N_1...N_3$) [93], тобто відстань $N_1N_3 \approx 3.7$ Å.

На другому етапі, ми переміщуємо цю 'привідкриту' конфігурацію вздовж лінії $C'_1C'_1$ (траєкторія 'stretch'), шукаючи таким чином енергетичний мінімум 'привідкритого' стану. З табл. 5.1 можна побачити, що для того, щоб досягнути енергетичного мінімуму, основи пари А·Т мають наблизитися одна до одної на відстань ≈ 0.3 Å. В той же час, основи в парі G·C майже залишаються на своїх місцях після обертання. Вважа-

ємо, що отримані ‘привідкриті’ конфігурації пар А·Т та G·C є стійкими під дією зовнішньої сили.

Табл. 5.1 Уотсон-криківські та ‘привідкриті’ конфігурації пар основ А·Т та G·C. Вказано відстані (в Å) між важкими атомами у водневих зв'язках та вкороченому контакті пари А·Т ($C_2H...O_2$), відстані R (Рис. 5.3), кути α_1, α_2 (в градусах), а також енергії зв'язку пар нуклеїнових основ (в ккал/моль) .

A·T G·C	N ₆ H...O ₄ O ₆ ...HN ₄	N ₁ ...HN ₃ N ₁ H...N ₃	C ₂ H...O ₂ N ₂ H...O ₂	R	α_1	α_2	E
Уотсон-криківський (‘закритий’) стан							
A·T	3.0	2.8	3.4	10.47	53.7	59.0	-9.72
G·C	2.8	2.9	2.8	10.66	58.4	56.5	-15.82
‘привідкритий’ стан							
A·T	3.4	2.9	3.2	10.14	58.7	64.0	-7.72
G·C	3.7	3.3	2.9	10.67	63.6	61.7	-9.30

Результати розрахунків енергій розкриття пар основ для двох можливих сценаріїв анзіпінгу ДНК наведені в Табл. 5.2 разом з відповідними даними, отриманими в рамках мезоскопічної моделі, розробленої для опису експерименту з анзіпінгу [96]. Енергії, наведені в 4-му стовпчику Табл. 5.2 обчислюються шляхом усереднення енергій розкриття пар А·Т та G·C, наведених у [96], по всім 10 найближчим сусідам. Таким чином, для обчислення E_{AT} , ми здійснюємо усереднення: $E_{AT} = (E_{AA/TT} + E_{TA/AT} + E_{AT/TA} + E_{AC/TC} + E_{AG/TC})/5$. Для E_{GC} , маємо: $E_{GC} = (E_{CC/GG} + E_{CG/GC} + E_{GC/CG} + E_{CA/GT} + E_{GA/CT})/5$. Можна бачити, що результати наших розрахунків для сценарію ‘stretch after opening’ є набагато ближчими до даних з [96], ніж для сценарію ‘stretch’. Відповідно, можна зробити висновок, що в експериментах, проведених за допомогою методів мікрomanipування окремою молекулою при невеликих швидкостях розкриття (~ 10 мкм/сек), має місце сценарій ‘stretch after opening’.

5.3 Оцінка критичної сили

Тепер розглянемо реалізацію двох запропонованих сценаріїв анзіпінгу ДНК: ‘stretch after opening’ та ‘stretch’. Як слідує з експерименту, їх реалізація залежить від швидкості розкриття і, відповідно, від значення

Табл. 5.2 Порівняння енергій розкриття (в ккал/моль) за сценаріями ‘stretch’ та ‘stretch after opening’, розрахованих в даній роботі, з ентальпіями, які використовуються для опису експерименту з анзіпінгу в рамках мезоскопічної моделі [96]. Ентальпії, взяті з [96], усереднені за найближчими сусідами. $\Delta E = |E_{AT} - E_{GC}|$ - різниця в енергіях розкриття пар А·Т та G·C.

	‘stretch’	‘stretch after opening’	мезоскопічна модель [96]
E_{AT}	-9.72	-7.72	-7.70
E_{GC}	-15.82	-9.30	-9.02
ΔE	6.10	1.58	2.03

критичної сили. Будемо вважати критичною таку силу, при якій пари основ починають розкриватися при заданій швидкості. Значення критичної сили (так само як і швидкості) може бути ознакою, яка визначає сценарій розкриття пар основ в процесі анзіпінгу ДНК. У рівноважному процесі повільного розкриття це значення можна обчислити за формулою, запропонованою в [81]:

$$F = \frac{G_{pair} + 2G_{el}}{l}, \quad (5.1)$$

де G_{pair} - сума вільних енергій всіх розкритих пар основ у полінуклеотиді, G_{el} - вільна енергія розтягу одиночного тяжу, l - загальна довжина розтягу одиночних тяжів.

При проведенні оцінок будемо використовувати параметри, взяті з роботи [81]: $l = 9.5 \text{ \AA}$ та $G_{el} \approx 0.3 \text{ ккал/моль}$. Здійснюючи ті ж самі кроки, що й у роботі [81], проте використовуючи обчислені в даній роботі енергії взаємодії, оцінимо середнє значення сили розкриття для полінуклеотиду з 50% вмістом пар А·Т. Відзначимо, що ДНК фагу λ , яка зазвичай використовується в експериментах з анзіпінгу, має приблизно такий самий відсоток вмісту пар основ. Вільна енергія анзіпінгу пари основ може бути обчислена за формулою:

$$G = E - TS, \quad (5.2)$$

де E - ентальпія, S - ентропія, а T - температура. Згідно з [96], ентропія розкриття пари основ, усереднена за найближчими сусідами, становить $S_{AT} = -21,3$ кал/(моль*К) для А·Т-вмісного полінуклеотиду, та $S_{GC} = -23,83$ кал/(моль*К) ($T = 293$ К) для Г·С-вмісного полінуклеотиду. Використовуючи значення ентальпій розкриття для сценарію ‘stretch after opening’ (Табл. 5.2), а також формулу (5.2), розраховано вільні енергії: $G_{AT} = -1.48$ ккал/моль, $G_{GC} = -2.32$ ккал/моль. Підставляючи вільну енергію, усереднену за парами А·Т та Г·С: $G_{av} = (G_{AT} + G_{GC})/2$ у вираз (5.2), отримуємо середню силу розкриття для 50% А·Т-вмісного полінуклеотиду: $F_{av} \approx 13$ пкН, що збігається зі значенням, розрахованим в роботі [81] і зі спостережуваним в експериментах з анзіпінгу [81, 89—91, 96]. В роботі [89] спостерігалось, що за швидкостей ≤ 1 мкм/сек (які відповідають значенням сили ≤ 15 пкН), анзіпінг ДНК протікає як рівноважний кооперативний процес. Отже, можна вважати, що спостережуваний процес анзіпінгу ДНК зі значеннями сил ≤ 15 пкН протікає за сценарієм ‘stretch after opening’.

Зауважимо, що для сценарію ‘stretch after opening’, розраховані значення різниці $\Delta G = G_{GC} - G_{AT} \approx 0.84$ ккал/моль знаходяться в діапазоні теплових флуктуацій у системі. Таким чином, процес анзіпінгу гетерогенної ДНК за сценарієм ‘stretch after opening’ протікає так само, як і в однорідному полімері. Можна вважати, що невелика різниця у вільних енергіях анзіпінгу для А·Т та Г·С-вмісних полімерів у цьому сценарії, є причиною стабільності процесу анзіпінгу ДНК за невеликих швидкостей розкриття, і, відповідно, невеликих сил розкриття.

В рамках даного дослідження, аналогічні розрахунки вільної енергії не можуть бути зроблені для сценарію ‘stretch’ через труднощі врахування внеску тертя обертання клубка дволанцюжкової ДНК. Результати розрахунків показують, що різниця між ентальпіями розкриття А·Т та Г·С-вмісних полімерів у сценарії ‘stretch’ є набагато більшою, ніж у сценарії ‘stretch after opening’ (Табл. 5.2). Очевидно, що ця різниця разом із суттєвим вкладом від тертя обертання повинна призвести до більшої нестабільності процесу анзіпінгу ДНК у сценарії ‘stretch’, що спостерігається на експерименті [89].

З іншої сторони, якщо експеримент з анзіпінгу ДНК виконувати над зразками ДНК невеликої довжини, і якщо ефект тертя обертання клубка мінімізувати, то процес анзіпінгу буде достатньо стабільним для будь-якої сили і швидкості розкриття. У цьому випадку розкриття ДНК повинно відбуватися за сценарієм ‘stretch’ без будь-яких значних гідродинамічних флуктуацій.

5.4 Можливість реалізації двох сценаріїв анзіпінгу

Згідно даного дослідження, механізм анзіпінгу подвійної спіралі ДНК може мати місце за двома різними сценаріями.

Перший сценарій є повільним внаслідок того, що відбуваються деякі конформаційні зміни у парах нуклеїнових основ перед розкриттям. У цьому сценарії (‘stretch after opening’) пари основ спочатку переходять у (‘привідкритий’ метастабільний стан за траєкторією (‘opening’ (Рис. 5.2 b), після чого повністю розкриваються за траєкторією ‘stretch’. У першому сценарії перехід у ‘привідкритий’ стан може відбуватися через структурні зміни пар основ у вилці анзапінгу, викликані силою натягу від клубка двотяжевої ДНК. Розкриття пар основ у цьому сценарії може відбуватися кооперативно, оскільки різниця між енергіями розкриття А·Т and G·C пар (ΔE) є досить незначною (Табл. 5.2, ‘stretch after opening’). Таким чином, цей сценарій є більш ймовірним для експериментів з анзіпінгу з низькими швидкостями розкриття і повинен відбуватися під час реальних процесів анзіпінгу *in vivo*, наприклад, транскрипції і трансляції.

Другим сценарієм є розтяг водневих зв'язків за траєкторією ‘stretch’ (Рис. 5.2 a). Цей сценарій протікає швидше, і розкриття відбувається безпосередньо з будь-якого конформаційного стану ДНК. У цьому випадку, пари основ не встигають перейти в ‘привідкритий’ метастабільний стан. Згідно наших розрахунків, різниця в ентальпіях між парами А·Т та G·C є значно більшою, ніж у сценарії ‘stretch after opening’.

Підсумовуючи все вищезазначене, можна стверджувати, що на траєкторії анзіпінгу можуть виникати ‘привідкриті’ та ‘розтягнуті’ стани пар нуклеїнових основ. В попередньому розділі було показано, що ці стани можуть бути стабілізовані молекулами розчину. Якщо до стандартного буферу, в якому проводиться експеримент, додати певну концентрацію молекул пероксиду водню, то у вилці анзіпінгу можлива поява стабілізованих молекулами пероксиду пар. Згідно результатів попереднього розділу, енергії розкриття ‘привідкритих’ та ‘розтягнутих’ конфігурацій пар, стабілізованих молекулами пероксиду водню є більшою, ніж відповідних конфігурацій, стабілізованих молекулами води (Рис. 4.11). Відповідно, згідно нашого дослідження, присутність в розчині молекул пероксиду водню повинно призвести до зростання значення сили розкриття, що вимірюють на експерименті.

Висновки

У дисертаційній роботі досліджено конкурентну взаємодію молекул пероксиду водню та води із центрами неспецифічного та специфічного впізнавання макромолекули ДНК. Основні результати роботи можна підсумувати наступним чином:

1. Запропоновано новий механізм блокування активності ДНК молекулами пероксиду водню.
2. Показано, що методи атом-атомних потенціальних функцій та квантової механіки молекул, дають близькі результати, які також узгоджуються з відповідними результатами попередніх робіт для розрахунків енергії взаємодії та геометрії комплексів, що складаються з молекул води та пероксиду водню.
3. В результаті проведених розрахунків показано, що комплекси атомів фосфатної групи ДНК з молекулою пероксиду водню є більш стабільними, ніж аналогічні комплекси з молекулою води.
4. Визначено атомні групи нуклеїнових основ ДНК, які є більш енергетично вигідними для утворення комплексів з молекулою пероксиду водню, ніж із молекулою води. Знайдено просторові конфігурації пар нуклеїнових основ, стабілізованих молекулою пероксиду водню суттєво краще, ніж молекулою води.
5. Показано можливість появи ‘привідкритих’ та ‘розтягнутих’ станів на траєкторії анзіпінгу. Стабілізація таких станів молекулами пероксиду водню повинна призвести до зростання сили розкриття подвійної спіралі.
6. Запропонований метод експериментальної перевірки взаємодії молекул пероксиду водню з макромолекулою ДНК. Він полягає в проведенні експериментів з анзіпінгу методами мікроманіпулювання за присутності певної концентрації молекул пероксиду водню.

Список використаних джерел

- [1] D. V. Piatnytskyi, O. O. Zdorevskyi, S. M. Perepelytsya, and S. N. Volkov, «Understanding the mechanism of DNA deactivation in ion therapy of cancer cells: hydrogen peroxide action», *The European Physical Journal D* **69**, 255 (2015).
- [2] D. Piatnytskyi, O. Zdorevskyi, S. Perepelytsya, and S. Volkov, «Formation of complexes of hydrogen peroxide molecules with DNA», *Ukrainian journal of physics* **61**, 219–225 (2016).
- [3] O. Zdorevskyi, D. Piatnytskyi, and S. Volkov, «Blocking of DNA specific recognition sites by hydrogen peroxide molecules in the process of ion beam therapy of cancer cells», *Dopov. nac. akad. nauk. Ukr.*, 82–89 (2019).
- [4] O. Zdorevskyi and S. Volkov, «The Possibility of Blocking the Process of DNA Base Pairs Opening by Hydrogen Peroxide», *Ukrainian journal of physics* **64**, 500 (2019).
- [5] O. Zdorevskyi and S. N. Volkov, «Possible scenarios of DNA double-helix unzipping process in single-molecule manipulation experiments», *European Biophysics Journal* **47**, 917–924 (2018).
- [6] L. Gravit, «Physical scientists take on cancer», *Nature* **491**, S49 (2012).
- [7] W. H. Bragg and R. Kleeman, «LXXIV. On the ionization curves of radium», *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **8**, 726–738 (1904).
- [8] G. Kraft, «Tumor therapy with heavy charged particles», *Progress in Particle and Nuclear Physics* **45**, S473–S544 (2000).
- [9] H. A. Bethe and J. Ashkin, «Experimental nuclear physics», Wiley, New York (1953).

- [10] M. Krämer and M. Durante, «Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy», *The European Physical Journal D* **60**, 195–202 (2010).
- [11] D. Boscolo, M. Krämer, M. Durante, M. Fuss, and E. Scifoni, «TRAX-CHEM: A pre-chemical and chemical stage extension of the particle track structure code TRAX in water targets», *Chemical Physics Letters* **698**, 11–18 (2018).
- [12] A. V. Solov'yov, E. Surdutovich, E. Scifoni, I. Mishustin, and W. Greiner, «Physics of ion beam cancer therapy: a multiscale approach», *Physical Review E* **79**, 011909 (2009).
- [13] C. M. Gustafsson, «Mechanistic Studies Of DNA Repair», Royal Swedish Academy of Sciences (2015).
- [14] S. Le Caër, «Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H₂ production under ionizing radiation», *Water* **3**, 235–253 (2011).
- [15] M. S. Kreipl, W. Friedland, and H. G. Paretzke, «Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation», *Radiation and Environmental Biophysics* **48**, 11 (2008).
- [16] S. Uehara and H. Nikjoo, «Monte Carlo Simulation of Water Radiolysis for Low-energy Charged Particles», *Journal of Radiation Research* **47**, 69–81 (2006).
- [17] J. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, Always learning (Pearson/CSH Press, 2014).
- [18] N. L. Parrow, J. A. Leshin, and M. Levine, «Parenteral Ascorbate As a Cancer Therapeutic: A Reassessment Based on Pharmacokinetics», *Antioxidants & Redox Signaling* **19**, 2141–2156 (2013).
- [19] Q. Chen, M. G. Espey, M. C. Krishna, J. B. Mitchell, C. P. Corpe, G. R. Buettner, E. Shacter, and M. Levine, «Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 13604–13609 (2005).

- [20] Brief Chemical Encyclopedia (Soviet Encyclopedia, Moscow, 1961).
- [21] R. H. Hunt, R. A. Leacock, C. W. Peters, and K. T. Hecht, «Internal-Rotation in Hydrogen Peroxide: The Far-Infrared Spectrum and the Determination of the Hindering Potential», *The Journal of Chemical Physics* **42**, 1931–1946 (1965).
- [22] W. R. Busing and H. A. Levy, «Crystal and Molecular Structure of Hydrogen Peroxide: A Neutron-Diffraction Study», *The Journal of Chemical Physics* **42**, 3054–3059 (1965).
- [23] J. Postlewaite and L. Taraban, «A Study Monitoring the Hydrogen Peroxide Stability for Shelf-Life Determination Using a Permanganate Titrate Test Method», *Technotes* **14** (2015).
- [24] G. Glockler and G. Matlack, «The O--O Bond Energy in Hydrogen Peroxide», *The Journal of Chemical Physics* **14**, 504–505 (1946).
- [25] P. A. Giguère, «Molecular association and structure of hydrogen peroxide», *Journal of Chemical Education* **60**, 399 (1983).
- [26] A. Hoy and P. R. Bunker, «A precise solution of the rotation bending Schrödinger equation for a triatomic molecule with application to the water molecule», *Journal of Molecular Spectroscopy* **74**, 1–8 (1979).
- [27] T. Hirayama, «Development of Chemical Tools for Imaging of Fe (II) Ions in Living Cells: A Review», *Acta histochemica et cytochemica* **51**, 137–143 (2018).
- [28] Z. I. Cabantchik, «Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology», *Frontiers in pharmacology* **5**, 45 (2014).
- [29] M. Kruszewski and T. Iwaneňko, «Labile iron pool correlates with iron content in the nucleus and the formation of oxidative DNA damage in mouse lymphoma L5178Y cell lines», *Acta Biochimica Polonica* **50**, 211–216 (2003).
- [30] G. Sebastiani, N. Wilkinson, and K. Pantopoulos, «Pharmacological targeting of the hepcidin/ferroportin axis», *Frontiers in pharmacology* **7**, 160 (2016).

- [31] W. Saenger, Principles of nucleic acid structure, edited by C. R. Cantor (Springer-Verlag, 1984).
- [32] A. J. Pertsin and A. I. Kitaigorodsky, The atom-atom potential method (Springer, 1987), pp. 69–148.
- [33] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. D. Mackerell, «CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields», *Journal of Computational Chemistry* **31**, 671–690.
- [34] T. E. Cheatham and D. A. Case, «Twenty-five years of nucleic acid simulations», *Biopolymers* **99**, 969–977.
- [35] V. Zhurkin, V. Poltev, and V. Florent'ev, «Atom--atomic potential functions for conformational calculations of nucleic acids», *Molekuliarnaia biologiya* **14**, 1116–1130 (1980).
- [36] V. Poltev and N. Shulyupina, «Simulation of interactions between nucleic acid bases by refined atom-atom potential functions», *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **3**, 739–765 (1986).
- [37] B. E. Hingerty, R. H. Ritchie, T. L. Ferrell, and J. E. Turner, «Dielectric effects in biopolymers: The theory of ionic saturation revisited», *Biopolymers* **24**, 427–439.
- [38] J. W. Eaton, D. Bateman, and S. Hauberg, GNU Octave version 3.0. 1 manual: a high-level interactive language for numerical computations (SoHo Books, 2007).
- [39] M. Born and R. Oppenheimer, «Zur quantentheorie der molekeln», *Annalen der physik* **389**, 457–484 (1927).
- [40] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Men-
nucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E.

Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, A. M. A. Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, «Gaussian 03, Revision C.02»,

- [41] P. Hohenberg and W. Kohn, «Inhomogeneous Electron Gas», *Phys. Rev.* **136**, B864–B871 (1964).
- [42] B. Mennucci, J. Tomasi, R. Cammi, J. Cheeseman, M. Frisch, F. Devlin, S. Gabriel, and P. Stephens, «Polarizable continuum model (PCM) calculations of solvent effects on optical rotations of chiral molecules», *The Journal of Physical Chemistry A* **106**, 6102–6113 (2002).
- [43] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, and R. E. Dickerson, «Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 2179–2183 (1981).
- [44] S. A. Clough, Y. Beers, G. P. Klein, and L. S. Rothman, «Dipole moment of water from Stark measurements of H₂O, HDO, and D₂O», *The Journal of Chemical Physics* **59**, 2254–2259 (1973).
- [45] J. Massey and D. Bianco, «The Microwave Spectrum of Hydrogen Peroxide», *The Journal of Chemical Physics* **22**, 442–448 (1954).
- [46] S. T. Moin, T. S. Hofer, B. R. Randolph, and B. M. Rode, «An ab initio quantum mechanical charge field molecular dynamics simulation of hydrogen peroxide in water», *Computational and Theoretical Chemistry* **980**, 15–22 (2012).

- [47] E. A. Orabi and A. M. English, «A Simple Additive Potential Model for Simulating Hydrogen Peroxide in Chemical and Biological Systems», *Journal of chemical theory and computation* **14**, 2808–2821 (2018).
- [48] P. A. Giguère, «The Infra-Red Spectrum of Hydrogen Peroxide», *The Journal of Chemical Physics* **18**, 88–92 (1950).
- [49] A. Savitzky and M. J. Golay, «Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures.», *Analytical chemistry* **36**, 1627–1639 (1964).
- [50] A. K. Srivastava and N. Misra, «Calculating interaction energies of hydrogen bonded dimers and complexes of HF, H₂O and NH₃: supermolecular versus AIM approach», *Journal of Computational Methods in Molecular Design* **4**, 19–23 (2014).
- [51] A. Mukhopadhyay, S. S. Xantheas, and R. J. Saykally, «The water dimer II: Theoretical investigations», *Chemical Physics Letters* **700**, 163–175 (2018).
- [52] D.-m. Du, A.-p. Fu, and Z.-y. Zhou, «Theoretical study of the rotation barrier of hydrogen peroxide in hydrogen bonded structure of HOOH–H₂O complexes in gas and solution phase», *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **717**, 127–132 (2005).
- [53] L. González, O. Mó, and M. Yáñez, «High-level ab initio versus DFT calculations on (H₂O₂)₂ and H₂O₂–H₂O complexes as prototypes of multiple hydrogen bond systems», *Journal of Computational Chemistry* **18**, 1124–1135.
- [54] B. Schneider, M. Kabelac̃, and P. Hobza, «Geometry of the phosphate group and its interactions with metal cations in crystals and ab initio calculations», *Journal of the American Chemical Society* **118**, 12207–12217 (1996).
- [55] S. Perepelytsya and S. Volkov, «Ion mode in the DNA low-frequency vibration spectra», *Ukrainian journal of physics* **49**, 1072–1077 (2004).

- [56] S. Perepelytsya and S. Volkov, «Counterion vibrations in the DNA low-frequency spectra», *The European Physical Journal E* **24**, 261–269 (2007).
- [57] S. Perepelytsya and S. Volkov, «Intensities of DNA ion-phosphate modes in the low-frequency Raman spectra», *The European Physical Journal E* **31**, 201–205 (2010).
- [58] L. Bulavin, S. Volkov, S. Kutovy, and S. Perepelytsya, «Observation of the DNA ion-phosphate vibrations», *Dopov. nac. akad. nauk. Ukr.*, 69–73 (2007).
- [59] S. Volkov and A. Kosevich, «Conformation oscillations of DNA», *Molekuliarnaia biologii* **21**, 797–806 (1987).
- [60] S. Volkov, A. Kosevich, and G. Wainreb, «Theoretical studies in low-frequency vibrations of DNA macromolecules», *Biopolymers and Cell* **5**, 32–39 (1989).
- [61] S. Volkov and A. Kosevich, «Theory of low-frequency vibrations in DNA macromolecules», *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **8**, 1069–1083 (1991).
- [62] S. Arrhenius, «Über die Dissociationswärme und den Einfluss der Temperatur auf den Dissociationsgrad der Elektrolyte», *Zeitschrift für physikalische Chemie* **4**, 96–116 (1889).
- [63] E. S. Kryachko and S. N. Volkov, «Preopening of the DNA base pairs», *International Journal of Quantum Chemistry* **82**, 193–204.
- [64] E. Giudice, P. Várnai, and R. Lavery, «Base pair opening within B-DNA: free energy pathways for GC and AT pairs from umbrella sampling simulations», *Nucleic Acids Research* **31**, 1434–1443 (2003).
- [65] E. Clementi and G. Corongiu, «A theoretical study on the water structure for nucleic acids bases and base pairs in solution at T=300 K», *The Journal of Chemical Physics* **72**, 3979–3992 (1980).
- [66] V. Poltev, E. Gonzalez, and A. Teplukhin, «Possible Role of Rare Tautomers of Nucleic Bases in Mutagenesis: Effect of Hydration on Tautomer Equilibrium», *Molecular Biology* **29**, 213–219 (1995).

- [67] J. Dobado and J. Molina, «Adenine- Hydrogen Peroxide System: DFT and MP2 Investigation», *The Journal of Physical Chemistry A* **103**, 4755–4761 (1999).
- [68] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, and A. Rich, «Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**, 804–808 (1976).
- [69] I. Haq, G. Blackburn, M. Gait, D. Loakes, and D. Williams, «Nucleic acids in chemistry and biology», Blackburn, GM, Gait, MJ, Loakes, D., Williams, DM, Eds (2006).
- [70] S. Diekmann, «Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters», *Journal of molecular biology* **205**, 787–791 (1989).
- [71] S. R. Holbrook, R. E. Dickerson, and S.-H. Kim, «Anisotropic thermal-parameter refinement of the DNA dodecamer CGC-GAATTCGCG by the segmented rigid-body method», *Acta Crystallographica Section B: Structural Science* **41**, 255–262 (1985).
- [72] E. Westhof, «Re-refinement of the B-dodecamer d (CGC-GAATTCGCG) with a comparative analysis of the solvent in it and in the Z-hexamer d (5BrCG5BrCG5BrCG)», *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **5**, 581–600 (1987).
- [73] V. Tereshko, G. Minasov, and M. Egli, «The Dickerson-Drew B-DNA dodecamer revisited at atomic resolution», *Journal of the American Chemical Society* **121**, 470–471 (1999).
- [74] N. Tjandra, S.-i. Tate, A. Ono, M. Kainosho, and A. Bax, «The NMR structure of a DNA dodecamer in an aqueous dilute liquid crystalline phase», *Journal of the American Chemical Society* **122**, 6190–6200 (2000).
- [75] J. Kuszewski, C. Schwieters, and G. M. Clore, «Improving the accuracy of NMR structures of DNA by means of a database potential of mean force describing base- base positional interactions», *Journal of the American Chemical Society* **123**, 3903–3918 (2001).

- [76] Z. Wu, F. Delaglio, N. Tjandra, V. B. Zhurkin, and A. Bax, «Overall structure and sugar dynamics of a DNA dodecamer from homo- and heteronuclear dipolar couplings and ^{31}P chemical shift anisotropy», *Journal of biomolecular NMR* **26**, 297–315 (2003).
- [77] A. Y. Denisov, E. Zamaratski, T. V. Maltseva, A. Sandström, S. Bekiroglu, K.-H. Altmann, M. Egli, and J. Chattopadhyaya, «The Solution Conformation of a Carbocyclic Analog of the Dickerson-Drew Dodecamer: Comparison with its own X-ray Structure and that of the NMR Structure of the Native Counterpart», *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **16**, 547–568 (1998).
- [78] R. Galletto, M. J. Jezewska, and W. Bujalowski, «Unzipping mechanism of the double-stranded DNA unwinding by a hexameric helicase: quantitative analysis of the rate of the dsDNA unwinding, processivity and kinetic step-size of the Escherichia coli DnaB helicase using rapid quench-flow method», *Journal of molecular biology* **343**, 83–99 (2004).
- [79] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, «Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads», *Science* **258**, 1122–1126 (1992).
- [80] R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich, «Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap», *Biophysical journal* **70**, 1813–1822 (1996).
- [81] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, «DNA strand separation studied by single molecule force measurements», *Physical Review E* **58**, 2386 (1998).
- [82] C. Bustamante and D. Keller, «Scanning force microscopy», *Biology Physics Today* **48**, 32 (1995).
- [83] R. Lavery, A. Lebrun, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, «Structure and mechanics of single biomolecules: experiment and simulation», *Journal of Physics: Condensed Matter* **14**, R383 (2002).

- [84] C. Bustamante, S. B. Smith, J. Liphardt, and D. Smith, «Single-molecule studies of DNA mechanics», *Current opinion in structural biology* **10**, 279–285 (2000).
- [85] C. Bustamante, Z. Bryant, and S. B. Smith, «Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics», *Nature* **421**, 423 (2003).
- [86] M. Manghi and N. Destainville, «Physics of base-pairing dynamics in DNA», *Physics Reports* **631**, 1–41 (2016).
- [87] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot, «Mechanical separation of the complementary strands of DNA», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 11935–11940 (1997).
- [88] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, «Molecular stick-slip motion revealed by opening DNA with piconewton forces», *Physical review letters* **79**, 4489 (1997).
- [89] P. Thomen, U. Bockelmann, and F. Heslot, «Rotational drag on DNA: a single molecule experiment», *Physical review letters* **88**, 248102 (2002).
- [90] U. Bockelmann, P. Thomen, B. Essevaz-Roulet, V. Viasnoff, and F. Heslot, «Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips», *Biophysical journal* **82**, 1537–1553 (2002).
- [91] U. Bockelmann, P. Thomen, and F. Heslot, «Dynamics of the DNA duplex formation studied by single molecule force measurements», *Biophysical journal* **87**, 3388–3396 (2004).
- [92] R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke, and J. A. Walder, «Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures», *Biochemistry* **43**, 3537–3554 (2004).
- [93] M. D. Frank-Kamenetskii and S. Prakash, «Fluctuations in the DNA double helix: a critical review», *Physics of life reviews* **11**, 153–170 (2014).

- [94] R. M. Wartell and A. S. Benight, «Thermal denaturation of DNA molecules: a comparison of theory with experiment», *Physics Reports* **126**, 67–107 (1985).
- [95] U. Bockelmann and V. Viasnoff, «Theoretical study of sequence-dependent nanopore unzipping of DNA», *Biophysical journal* **94**, 2716–2724 (2008).
- [96] J. M. Huguet, C. V. Bizarro, N. Forns, S. B. Smith, C. Bustamante, and F. Ritort, «Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 15431–15436 (2010).
- [97] C. Danilowicz, V. W. Coljee, C. Bouzigues, D. K. Lubensky, D. R. Nelson, and M. Prentiss, «DNA unzipped under a constant force exhibits multiple metastable intermediates», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1694–1699 (2003).
- [98] N. K. Voulgarakis, A. Redondo, A. R. Bishop, and K. Rasmussen, «Probing the mechanical unzipping of DNA», *Physical review letters* **96**, 248101 (2006).
- [99] S. Volkov and A. Solov'yov, «The mechanism of DNA mechanical unzipping», *The European Physical Journal D* **54**, 657–666 (2009).
- [100] C. Barbieri, S. Cocco, R. Monasson, and F. Zamponi, «Dynamical modeling of molecular constructions and setups for DNA unzipping», *Physical biology* **6**, 025003 (2009).
- [101] S. N. Volkov, E. V. Paramonova, A. V. Yakubovich, and A. V. Solov'yov, «Micromechanics of base pair unzipping in the DNA duplex», *Journal of Physics: Condensed Matter* **24**, 035104 (2011).
- [102] S. Volkov and A. Kosevich, «Theory of low-frequency vibrations in DNA macromolecules», *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **8**, 1069–1083 (1991).
- [103] P. Yakovchuk, E. Protozanova, and M. D. Frank-Kamenetskii, «Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix», *Nucleic acids research* **34**, 564–574 (2006).

- [104] A. V. Lukashin, A. V. Vologodskii, M. D. Frank-Kamenetskii, and Y. L. Lyubchenko, «Fluctuational opening of the double helix as revealed by theoretical and experimental study of DNA interaction with formaldehyde», *Journal of molecular biology* **108**, 665–682 (1976).
- [105] P. D. Dans, L. Danilāne, I. Ivani, T. Dršata, F. Lankaš, A. Hospital, J. Walther, R. I. Pujagut, F. Battistini, J. L. Gelpí, R. Lavery, and M. Orozco, «Long-timescale dynamics of the Drew–Dickerson dodecamer», *Nucleic Acids Research* **44**, 4052–4066 (2016).
- [106] D. Jose, K. Datta, N. P. Johnson, and P. H. von Hippel, «Spectroscopic studies of position-specific DNA “breathing” fluctuations at replication forks and primer-template junctions», *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4231–4236 (2009).
- [107] Y. V. Zefirov and P. Zorkii, «Van der Waals radii and their application in chemistry», *Russian Chemical Reviews* **58**, 421 (1989).

Додаток А Список публікацій за темою та відомості про апробацію

Результати даної дисертаційної роботи представлено у 5-и роботах, що опубліковані у провідних фізичних журналах [1—5]:

- [1] D. V. Piatnytskyi, O. O. Zdorevskyi, S. M. Perepelytsya, and S. N. Volkov, «Understanding the mechanism of DNA deactivation in ion therapy of cancer cells: hydrogen peroxide action», *The European Physical Journal D* **69**, 255 (2015).
- [2] D. Piatnytskyi, O. Zdorevskyi, S. Perepelytsya, and S. Volkov, «Formation of complexes of hydrogen peroxide molecules with DNA», *Ukrainian journal of physics* **61**, 219–225 (2016).
- [3] O. Zdorevskyi, D. Piatnytskyi, and S. Volkov, «Blocking of DNA specific recognition sites by hydrogen peroxide molecules in the process of ion beam therapy of cancer cells», *Dopov. nac. akad. nauk. Ukr.*, 82–89 (2019).
- [4] O. Zdorevskyi and S. Volkov, «The Possibility of Blocking the Process of DNA Base Pairs Opening by Hydrogen Peroxide», *Ukrainian journal of physics* **64**, 500 (2019).
- [5] O. Zdorevskyi and S. N. Volkov, «Possible scenarios of DNA double-helix unzipping process in single-molecule manipulation experiments», *European Biophysics Journal* **47**, 917–924 (2018).

Матеріали роботи було представлено на семінарах в Інституті теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України, а також на вітчизняних та міжнародних конференціях:

- D.V. Piatnytskyi , O.O. Zdorevskyi, S.M. Perepelytsya, S.N. Volkov «Creation of stable complexes of DNA double helix with hydrogen peroxide», VI Young scientists conference ‘ Problems of Theoretical Physics’, Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 13-15 December (2014);

- O.Zdorevskyi, S. N. Volkov «About the possible scenario of the DNA unzipping process», VII Young scientists conference ‘Problems of Theoretical Physics’, Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 13-15 December (2016);
- O. Zdorevskyi, S.N. Volkov «The mechanism of DNA deactivation by hydrogen peroxide action», 13th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, Split, Croatia, 1-10 September (2016);
- O. Zdorevskyi, S.N. Volkov «Role of water and hydrogen peroxide molecules in nucleic base pairs stabilization», VIII Young scientists conference ‘Problems of Theoretical Physics’ Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 12-14 December (2017);
- О. Здоревський, С.Н. Волков «Два сценарії процесу анзипінгу подвійної спіралі ДНК», 17-а Всеукраїнська школа-семінар та Конкурс молодих вчених зі статистичної фізики та теорії конденсованої речовини, Львів, Україна, 8-9 червня (2017);
- O. Zdorevskyi, S.N. Volkov «Possible scenarios of DNA unzipping process», 19th IUPAB and 11th EBSA congress, Edinburgh, Scotland, 16-20 July (2017);
- O.Zdorevskyi, D.V.Piatnytskyi, S.N.Volkov «Blocking of DNA sites of specific recognition by hydrogen peroxide molecules in the process of ion beam therapy», IX Young scientists conference ‘Problems of Theoretical Physics’, Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine, 4-5 December (2018);
- O.Zdorevskyi, S.N.Volkov «Competitive interaction of water and hydrogen peroxide molecules with specific DNA recognition sites», 14th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics, Split, Croatia, 23 August - 1 September (2018);
- O.Zdorevskyi, D.V.Piatnytskyi, S.N.Volkov «Competitive interaction of hydrogen peroxide and water molecules with specific DNA recognition sites», Final AMMODIT Conference ‘Mathematics for Life Sciences’, Kyiv, Ukraine, 18-22 March (2019);
- O.Zdorevskyi, S.N.Volkov «The Possibility of blocking the process of DNA base pairs opening by hydrogen peroxide», X International Conference for

Professionals and Young Scientists ‘Low Temperature Physics 2019’ in memory of B.Verkin for his 100th birthday anniversary, 3-7 June (2019);

- O.Zdorevskyi, D. Piatnytskyi, S.N. Volkov «Competitive interaction of hydrogen peroxide and water molecules with specific DNA recognition sites in the process of ion beam therapy», Joint 12th EBSA 10th ICBP-IUPAP biophysics congress, Madrid, 20-24 July (2019).

Додаток Б Таблиці та рисунки

Табл. Б.1 Позначення атомів нуклеїнових основ та фосфатної групи ДНК, які входять до параметрів опису ван-дер-Ваальсових взаємодій у даній роботі. Позначення взято з роботи [35]. В правій колонці наведені позначення атомів нуклеїнових основ за стандартною номенклатурою.

Позначення	Тип атомів нуклеїнової основи або фосфатної групи
H	всі атоми водню
C2	всі атоми карбону нуклеїнових основ
N1	N ₄ (C), N ₆ (A), N ₂ (G)
N2	N ₁ (C), N ₁ (T), N ₉ (G), N ₉ (A), N ₁ (G), N ₃ (T)
N3	N ₃ (C), N ₇ (A), N ₃ (G), N ₁ (A), N ₃ (A)
O2	атоми кисню нуклеїнових основ, молекул H ₂ O ₂ та H ₂ O
O3	заряджений атом кисню фосфатної групи

Табл. Б.2 Кулонівські заряди на атомах нуклеїнових основ, що використовуються для обчислень комплексів у даному дослідженні. Параметри взято з роботи [35]. Значення наведено в одиницях заряду електрона.

Аденін		Тимін		Гуанін		Цитозин	
N ₁	-0.518	N ₁	-0.253	N ₁	-0.094	N ₁	-0.314
C ₂	0.313	C ₂	0.547	C ₂	0.439	C ₂	0.446
N ₃	-0.51	N ₃	-0.628	N ₃	-0.665	N ₃	-0.326
C ₄	0.317	C ₄	0.292	C ₄	0.4	C ₄	0.338
C ₅	0.113	C ₅	0.028	C ₅	-0.157	C ₅	-0.1
C ₆	0.34	C ₆	0.342	C ₆	0.242	C ₆	0.127
N ₇	-0.56	N ₇	-0.541	O ₂	-0.39	O ₂	-0.352
C ₈	0.3	C ₈	0.223	N ₄	-0.431	O ₄	-0.353
N ₉	-0.041	N ₉	0.032	H ₅	0.055	C(Met)	-0.149
N ₆	-0.439	O ₆	-0.371	H ₆	0.059	H ₆	0.059
H ₂	0.07	N ₂	-0.417	H ₄	0.229	H ₃	0.195
H ₈	0.068	H ₈	0.068			H(Met)	0.054
H ₆	0.23	H ₂	0.231				
		H ₁	0.196				

Табл. Б.3 Параметри ван-дер-Ваальсової взаємодії (2.2) для нуклеїнових основ, взяті з роботи [35]. Позначення атомів розшифровано в Табл. Б.1.

Тип атомів	A_{ij} , ккал*Å ⁶ /моль	B_{ij} , ккал*Å ¹² /моль
H-H	40	7.74
C2-H	126	61.7
N1-H	105	62.0
N2-H	126	53.7
N3-H	146	58.7
O2-H	121	17.8
O3-H	105	15.4
C2-C2	400	704
C2-N1	334	544
C2-N2	400	630
C2-N3	464	699
N1-N1	280	421
N1-N2	334	488
N1-N3	391	544
N2-N2	400	565
N2-N3	467	629
O2-C2	385	406
O2-N1	327	317
O2-N2	391	366
O2-N3	465	413
O3-O2	347	208

Табл. Б.4 Параметри потенціалу водневих зв'язків (2.3), що використовуються для обчислень енергій взаємодії молекулярних комплексів у даній роботі. Значення параметрів взято з роботи [36].

Тип атомів	$A_{ij}^{(10)}$, ккал*Å ¹⁰ /моль	$B_{ij}^{(10)}$, ккал*Å ¹² /моль
H...O	7350	21400
H...N	9100	27400

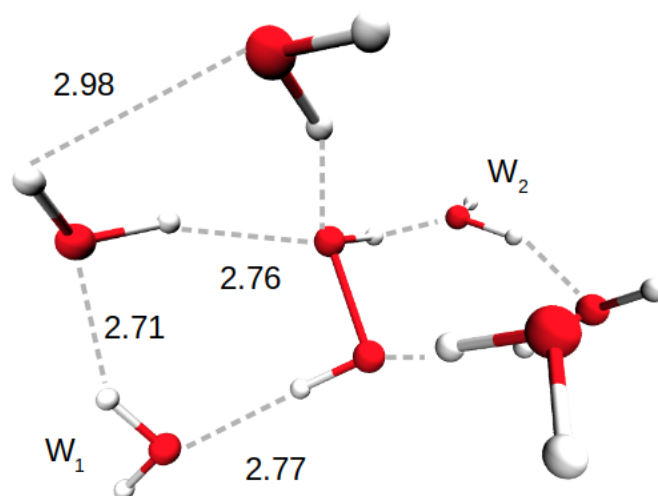


Рис. Б.1 Розрахована в даній роботі стабільна конфігурація комплексу молекули пероксиду водню, оточеної шістьма молекулами води. Розрахунок здійснено методом AARFh. Цифрами позначено відстані (в Å) між важкими атомами у відповідних водневих зв'язках. Літерами W_1 , W_2 позначено молекули води, атоми яких використовувалися для визначення 'розміру кластеру' пероксиду.