

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Савиной Екатерины Дмитриевны «Исследование механизмов, динамики и продуктов фотоиндуцированных реакций кинуреновой кислоты с белками хрусталика и модельными системами», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Современные химические исследования в области физиологии и медицины уже давно прошли этап простого изучения любопытных феноменов; акцент делается на расшифровке механизмов возникновения заболеваний как пути улучшения здоровья человека. Настоящая диссертационная работа посвящена изучению механизмов возникновения помутнения хрусталика глаза – катаракты. Целью представленной диссертационной работы являлось изучение химических и фотохимических реакций производных кинуреновой кислоты (КНА); получение кинетических характеристик таких реакций; выделение и характеристика продуктов.

В настоящее время фотохимические реакции КНА мало изучены, и особый интерес представляет информация о её фотоиндуцированных реакциях с белками хрусталика. Информация о механизмах, динамике и продуктах этих реакций может существенно улучшить понимание молекулярных механизмов развития катаракты, поэтому актуальность работы Савиной Е. Д. не вызывает сомнений.

Цель диссертационной работы состояла в изучении фотохимических реакций с участием кинуреновой кислоты и установление её роли в фотоиндуцированной модификации белков хрусталика. Для реализации настоящей цели были решены основные задачи:

установление механизмов реакций триплетного возбужденного состояния КНА с рядом аминокислот, антиоксидантов, модельным белком лизоцимом и белками хрусталика глаза;

определение механизмов, динамики и продуктов фотоиндуцированной реакции КНА с аминокислотой триптофаном, наиболее эффективным тушителем триплетного состояния КНА;

установление влияния кислорода, присутствующего в растворе, на протекание исследуемых фотохимических реакций;

идентификация основных типов модификаций белка лизоцима, образующихся в результате КНА-сенсibilизированного фотолиза. Установление аминокислот, подвергающихся модификации, и их положения в структуре белка;

установление основных типов модификаций белков хрусталика, вызванных взаимодействиями с фотовозбужденной КНА в анаэробных условиях.

Диссертационная работа Савиной Е. Д. имеет классическую структуру, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 175 страницах, содержит 34 рисунка и 8 таблиц. Библиография включает 256 источников.

Материал обзора литературы «Пост-трансляционные модификации белков хрусталика» изложен на 38 стр.; свидетельствует о тщательном подходе к материалу и полном понимании автором научного ландшафта в конкретной научной области. К сожалению, стиль обзора излишне повествовательный – автор охватывает очень широкий спектр работ от оптической системы глаза до реакций кинуреновой кислоты. В обзоре остро не хватает критического взгляда на проблему; обобщения материала. Большая часть ссылок в обзоре литературы относится к публикациям, появившимся в 20-м веке; лишь малая их часть появилась в последние 20 лет. Говорит ли это о падении интереса к проблеме или о полном решении всех задач в указанной области не ясно.

Обзор завершается важным заключением, в котором обосновывается необходимость развития темы диссертации как систематического исследования механизмов и продуктов фотоиндуцированных радикальных реакций с участием компонентов хрусталика.

В экспериментальной части Савина Е. Д. приводит сведения об используемых реактивах, классе чистоты реагентов и методах исследования. Раздел написан хорошо, строго, вся необходимая для понимания информация приведена.

Часть диссертации «Результаты и их обсуждение» можно условно поделить на четыре задачи.

В первой части изучали фотохимические реакции кинуреновой кислоты. Показано, что активными тушителями триплетного состояния ^1KNA являются аминокислоты Trp, Tyr, Cys, антиоксидант Asc и молекулярный кислород. Предположили, что механизм тушения заключается в переносе электрона с молекулы тушителя на молекулу КНА. Основываясь на полученных результатах Савина Е. Д. предположила, что остатки триптофана и тирозина в кристаллинах являются наиболее уязвимыми положениями для модификации белков хрусталика с помощью ^1KNA .

Вторая часть работы посвящена изучению реакций аминокислоты триптофан в результате фотолиза в присутствии кинуреновой кислоты. В диссертации была установлена схема реакций, протекающих между радикалами $\text{KNA}^{\bullet-}$ и NTrpH^{\bullet} , образующимися под действием УФ-А излучения. Впервые были установлены

механизмы реакций, показана роль остаточного кислорода в фотохимических реакциях типа I и проведена полная характеристика основных продуктов реакций. Показано, что большинство триплетных состояний ^1KNA реагирует с аминокислотными остатками кристаллинов, что приводит к образованию радикалов Trp^\bullet на белке и радикалов $\text{KNA}^{\bullet-}$ в клетках ткани. Реакция $\text{KNA}^{\bullet-}$ с остаточным молекулярным кислородом приводит к образованию супероксида $\text{O}_2^{\bullet-}$, который может вступать в реакции окисления с радикалами Trp^\bullet , тогда как реакция рекомбинации двух радикалов Trp^\bullet приводит к образованию ковалентных связей в структуре белка.

Третья часть работы посвящена анализу продуктов модификации белка лизоцима (HEWL) в результате УФ-А фотолиза типа I в присутствии кинуреновой кислоты. Показано, что фотолиз раствора KNA и HEWL приводит к формированию радикала $\text{KNA}^{\bullet-}$ и радикала на аминокислотных остатках Trp белка. С использованием масс-спектрометрического анализа показано, что реакции между ^1KNA и HEWL протекают через реакции с аминокислотным остатком Trp62. Основными продуктами обоих типов фотолизом являются димеры HEWL, образованные через остатки Trp62 и Tyr23.

Четвертая часть диссертационной работы посвящена анализу фотолиза кристаллинов в присутствии кинуреновой кислоты. В главе представлены результаты исследования KNA-сенсibilизированного УФ-А фотолиза кристаллинов, экстрагированных из хрусталика *Bos taurus*, в анаэробных и аэробных условиях. В работе показано, что участие реакционных форм кислорода, супероксид радикала и в особенности синглетного кислорода существенно ускоряет модификацию белков, по-видимому, за счёт образования промежуточных пероксидных форм и финальных окисленных форм белков. Быстрое и эффективное образование белковых агрегатов с высокой молекулярной массой в случае фотолиза типа II указывает на то, что окисление белков существенно способствует ковалентному связыванию белков.

Научная новизна работы состоит, в первую очередь, в определении механизмов фотоиндуцированных радикальных реакций между хромофором хрусталика и аминокислотами/белками в условиях, приближенных к естественным: в анаэробных условиях фотолиза, то есть крайне низкой концентрации остаточного кислорода, и при облучении УФ-А светом (315 – 400 нм), который способен глубоко проникать в ткань хрусталика, и который поглощается хромофорами ткани. В работе впервые были установлены детальные механизмы фотоиндуцированных реакций триплетного состояния KNA с аминокислотой триптофан и белками, идентифицированы продукты реакций и определена динамика их накопления.

В диссертации показано, что первичные реакции между ^1KNA и белками протекают в основном через аминокислотные остатки триптофана и тирозина с образованием соответствующих нейтральных радикалов.

Показано, что кислород эффективно окисляет радикал KNA^\cdot с образованием исходной молекулы KNA и супероксид радикала. Соотношение концентраций между кислородом и радикалами фотосенсибилизатора в растворе играет ключевую роль в процессе фотолиза KNA и аминокислот/белков.

Доказано, что квантовый выход распада исходных реагентов (аминокислота или белок) в случае фотореакций типа Ib на порядок ниже, чем при фотореакциях типа Ia. Это указывает на высокую эффективность реакции обратного переноса электрона между супероксидом и радикалами аминокислоты или белка с восстановлением исходных реагентов.

Показано, что фотолиз лизоцима и кристаллинов в нативных и денатурирующих условиях приводит к деградации остатков аминокислот Trp и Tyr, образованию продуктов, поглощающих в диапазоне 320 – 400 нм, образованию димерных, тримерных и других мультимерных форм, ковалентно связанных через остатки Trp и Tyr, ковалентному присоединению KNA к белкам хрусталика.

Из замечаний следует отметить лишь незначительное количество технических опечаток, наличие которых не мешает восприятию материала диссертации.

Замечание по существу работы: в гл. 3 диссертации (стр. 63 – 66) показано, что константа скорости тушения зависит от состава буфера (наличия мочевины). Для белка лизоцима, предполагается, что кроме вязкости раствора на скорость тушения может влиять изменение конформации лизоцима в результате денатурации и вследствие этого уменьшение доступности аминокислотных остатков. Для α -кристаллина, наоборот, показано, что денатурация приводит к увеличению константы скорости тушения, которая становится даже выше, чем для лизоцима. Настоящий тезис (о влиянии изменения вторичной структуры) не выглядит строго доказанным. Я бы его охарактеризовал как одну из возможных гипотез.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. Её результаты опубликованы в ведущих международных журналах и представлены на международных конференциях. Выводы полностью основаны на полученных результатах, которые чрезвычайно важны как с точки зрения фундаментальных исследований (механизмы фотоиндуцированных модификаций белков хрусталика), так и для понимания роли радикалов в развитии различных заболеваний, в первую очередь катаракты, с целью разработки новых методов замедления или предотвращения развития этого заболевания. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Савиной Е. Д. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 – биохимия (химические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах, а её автор, Савина Екатерина Дмитриевна, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

к.х.н., доцент

21 августа 2020 г.



Коваль В. В.

Коваль Владимир Васильевич, к.х.н., доцент, зам. директора по научной работе, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; 630090, г. Новосибирск, пр-кт академика Лаврентьева, 8; тел.: +7 383 363 51 77, e-mail: koval@niboch.nsc.ru