

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 к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 03.01.04 – биохимия

Кинуренин (KN) и его производные являются естественными молекулярными УФ-фильтрами в хрусталике глаза и играют существенную роль в его защите от повреждений. Деактивация поглощенной световой энергии в кинуренине происходит в основном в результате внутренней конверсии, не приводя к существенному изменению его концентрации. Однако совокупность фотохимических, термических и ферментативных реакций кинуренина и его производных в организме может приводить к образованию химически-активных частиц, которые, взаимодействуя с белковыми молекулами хрусталика, модифицируют их, что в результате накопления этих модификаций в течение всей жизни может быть одной из причин возникновения возрастной катаракты. Кинуреновая кислота (KNA) является одним из метаболитов кинуренина. Хотя кинуреновая кислота образуется в хрусталике глаза в незначительных количествах, выход триплетного состояния при облучении этого метаболита кинуренина светом УФ-А составляет около 80%. В результате реакций переноса электрона с участием триплетного состояния KNA и белковых молекул хрусталика и остаточного кислорода, всегда присутствующего в хрусталике, образуются реакционноспособные радикальные интермедиаты и синглетный кислород, которые участвуют в модификации белков хрусталика. Фотохимические реакции KNA и их влияние на модификацию белков хрусталика изучены мало, поэтому исследование механизма этих реакций и их продуктов, представляет актуальную задачу.

Научная новизна диссертационной работы определяется тем, что впервые определены механизмы фотоиндуцированных радикальных реакций между кинуреновой кислотой и аминокислотами и белками, впервые выделены и идентифицированы продукты этих реакций и предложены механизмы их образования.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав (литературный обзор, экспериментальная часть, четыре главы с изложением полученных результатов), выводов, списка литературы (256 источников) и 14 приложений. Работа изложена на 175 страницах (148 стр. основного текста и 22 стр. приложений) и включает 34 рисунка, 8 схем и 8 таблиц в основном тексте диссертации и 27 рисунков и 11 таблиц в приложениях.

Во введении обосновывается актуальность проведенного исследования, формулируются его цели, новизна полученных результатов, их практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из пяти разделов и составляет по объему 38 страниц. В Обзоре подробно рассматриваются вопросы строения системы глаза, роли хрусталика и его белков кристаллинов, реакции, приводящие к пост-трансляционным модификациям кристаллинов. В последнем разделе Обзора основное внимание уделено низкомолекулярным соединениям, входящим в состав хрусталика, антиоксидантам и УФ-фильтрам. Особенностью Обзора литературы является то, что более половины ссылок относятся к XX веку, и только 31 работа из цитированных 256 выполнены в последние 10 лет. Такое соотношение не является показателем отсутствия актуальности работы, а отражает тот факт, что только в последние годы произошло бурное развитие экспериментальной базы для глубокого исследования механизмов химических и биохимических процессов, происходящих в биологических системах, на молекулярном уровне. И в этом смысле, работы по исследованию фотофизических и фотохимических процессов, связанных с превращениями кинуренина и его метаболитов в хрусталике глаза, которые выполняются в МТЦ РАН в лаборатории протеомики и метабиоломики под руководством проф. Ю.П. Центаловича, являются пионерскими.

В Экспериментальной части диссертант приводит описание методик выделения белковых экстрактов из хрусталика, методов лазерного и стационарного фотолиза. Большое внимание уделено биохимическим методам разделения низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, электрофорезу, анализу ферментативной активности и масс-спектрометрии.

В гл. 3 рассматриваются фотохимические реакции КНА с низкомолекулярными компонентами хрусталика (аминокислотами, кислородом и антиоксидантами) и различными белками. Основным определяемым параметром фотохимической активности являются константы скорости тушения триплетного состояния этими молекулами. Наиболее активными тушителями триплетного состояния ^1KNA являются аминокислоты триптофан, тирозин и цистеин, антиоксидант аскорбат и молекулярный кислород. Тушение этими молекулами происходит с константами скорости близкими к диффузионным по механизму переноса электрона на КНА. Впервые было показано, что тушение ^1KNA α и β -кристаллинами происходит за счет реакций с триптофановыми и тирозиновыми остатками, а γ -кристаллином в основном за счет взаимодействия с тирозиновым остатком. Подчеркивается роль аскорбата в тушении активного состояния ^1KNA , при этом второй

антиоксидант GSH, неспособный тушить триплетное состояние, активно взаимодействует с радикалами, переводя их в неактивные формы.

При прочтении гл. 3 у оппонента возникли следующие вопросы:

1. Для всех исследованных низкомолекулярных тушителей константа скорости тушения ниже в PBS с добавлением мочевины (табл. 3.1), чем в PBS в среднем в 1.5–2 раза. В диссертации это объясняется увеличением вязкости раствора. Однако значения вязкости не приведены. Соответствует ли это изменение зависимости коэффициента диффузии от вязкости по уравнению Стокса–Эйнштейна?
2. В случае лизоцима, предполагается, что кроме вязкости может быть эффект от изменения конформации в результате денатурации и вследствие этого уменьшение доступности аминокислотных остатков, что выглядит весьма сомнительно, тем более, что соотношение между константами тушения в отсутствие мочевины и в ее присутствии среднее между таким соотношением для триптофана и тирозина. В случае α -кристаллина денатурация наоборот приводит к резкому увеличению константы скорости тушения, которая становится даже выше, чем в случае лизоцима.
3. В табл. 3.1 и 3.2 константы скорости тушения приводятся в различных единицах, что затрудняет их сопоставление. Почему в табл. 3.1 не приведены данные для α -кристаллина в PBS в том виде, как это сделано для других слабых тушителей? Если сохраняется пропорциональность между константами, измеренными в различных единицах, то верхний предел константы скорости тушения для α -кристаллина в PBS должен быть $< (3.7 * 7.7/53.8) \times 10^8 = 0.53 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.
4. В 3.3 на основании спектральных данных утверждается, что образуются ион-радикал KNA и радикал триптофана, которые имеют близкие спектры поглощения. Почему в 3.4 для γ -кристаллина не наблюдали спектра ион-радикала KNA, а только радикала тирозина (рис. 3.6)?
5. Какие продукты образуются с O_2 ? Если идет обратный перенос электрона в реакции с аминокислотами, то восстанавливается ли нулевой дифференциальный спектр?

В гл. 4 рассматриваются превращения аминокислоты триптофана в результате УФ-А фотолиза в присутствии KNA. Рассматриваются два типа фотолиза – под действием ртутной лампы с невысокими концентрациями генерированных активных частиц (тип 1б) и под действие лазерного излучения с генерацией высоких концентраций реакционно-активных частиц за короткое время (тип 1а). Фотолиз типа 1б приближен к реальным условиям, когда небольшие концентрации активных частиц образуются в течение длительного времени, а типа 1а позволяет установить закономерности взаимодействия

высоких концентраций ^1KNA с аминокислотой. Был проведен анализ продуктов, образующихся при фотолизе двумя типами и установлена и интерпретирована зависимость состава продуктов от способа проведения фотолиза. На основании проведенных экспериментов была предложена схема взаимодействия активных радикалов, образующихся под действием УФ-А излучения, определены квантовые выходы продуктов окисления и димеризации триптофана. Показано, что эти выходы невелики, однако длительное накопление таких модификаций будет давать вклад в общую модификацию белков хрусталика.

В гл. 5 на примере модельного белка лизоцима рассматривается вопрос о взаимном влиянии строения белка и расположения аминокислотных остатков в белке на механизм фотохимических реакций с точки зрения деградации белка и накопления продуктов фотолиза. При интерпретации полученных данных применяются результаты по превращениям триптофана при фотолизе в присутствии КНА, полученные в гл. 4. Было изучено изменение ферментативной активности белка в результате действия света. Анализ продуктов фотолиза был проведен с использованием электрофореза, спектрофотометрии и флуориметрии, а также ВЭЖХ-МС анализа низкомолекулярных продуктов и МС анализа пептидов. Убедительно показано, что реакция между ^1KNA и лизоцимом протекает через реакции с аминокислотным остатком Trp62, а основными продуктами фотолиза являются димеры лизоцима, образованные между аминокислотными остатками Trp62 и Tyr23. Также может происходить присоединение КНА к белку, при этом выход ковалентно связанных продуктов для белка выше, чем для свободного Trp.

В гл. 6 приведены результаты исследования УФ-А фотолиза кристаллинов в присутствии КНА. Эти исследования выполнены с использованием методов анализа продуктов, отработанных в гл. 3–5. Рассматриваются особенности фотолиза разных типов кристаллинов. Основными продуктами фотолиза с участием КНА и кристаллинов всех типов являются димерные, тримерные и мультимерные формы, образовавшиеся в результате ковалентной сшивки белков. Оценено участие реакционных форм кислорода, которые могут как ускорять, так и замедлять модификацию белков.

Выводы полностью соответствуют результатам диссертационной работы. На основании большого массива экспериментальных данных, полученных с помощью широкого набора современных биохимических и физико-химических методов, Савина Е.Д. делает заключение о важной роли фотоиндуцированных радикальных реакций в ткани хрусталика при нормальном старении и развитии катаракты. Определена двоякая роль кислорода в этих реакциях.

Основные замечания оппонента связаны с неудобством чтения диссертации, особенно в электронной форме: (1) в гл. 3 приводятся данные, которые обосновываются в гл. 4, например, промежуточные спектры ион-радикалов KNA и аминокислот; (2) не приведены спектры триплетного KNA и во что KNA превращается в результате T-T аннигиляции без добавок. Поскольку эти результаты были получены ранее, следовало привести их в виде рисунков и схемы в Обзоре литературы; (3) одни и те же реакции нумеруются по-разному в разных главах, более удобной была бы сквозная нумерация реакций без указания номера главы; (4) слишком много значимых экспериментальных рисунков помещено в приложения, по мнению оппонента, по крайней мере половину из них надо было дать в основном тексте, при этом приложения только нумеруются, но не имеют заголовков.

В литературном обзоре и тексте диссертации активные интермедиаты (возбужденные состояния и радикальные продукты) часто называются *переходными состояниями*, хотя не являются таковыми. В химической кинетике и в теории абсолютных скоростей реакций понятие *переходное состояние* имеет совсем другой смысл. В диссертации в небольшом количестве встречаются неизбежные опечатки. Устойчивой ошибкой является *в отсутствии* вместо *в отсутствие*. Выражение «*Как уже говорилось выше*» (стр. 70) означает, что от колоратурного сопрано перешли к мецо-сопрано. В раздел Сокращения, почему-то вошли понятия, являющиеся общепринятыми, а не сокращениями. Например: D₂O, различные активные формы кислорода, рН, рD, **рK_a** (надо так, а не так, как в диссертации), ε, λ_{max}, Da и др.

Диссертационная работа Савиной Е.Д. является законченным научным исследованием, выполненным на уровне мировых стандартов. Все основные результаты получены впервые. Результаты этой работы вносят вклад в понимание важной проблемы, связанной с возрастными патологиями органов зрения, и должны стимулировать развитие способов их предотвращения. Сделанные оппонентом замечания никоим образом не снижают уровень оценки диссертации и не влияют на основные выводы работы.

Опубликованные по результатам диссертации статьи в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных для опубликования результатов диссертаций, а также автореферат полно отражают содержание диссертации. Работа прошла апробацию на 7 Российских и Международных конференциях в 2015–2019 гг.

Таким образом, диссертационная работа Савиной Е. Д. «Исследование механизмов, динамики и продуктов фотоиндуцированных реакций кинуреновой кислоты с белками хрусталика и модельными системами» по актуальности, научной новизне, теоретической и

практической значимости 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 в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложением № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Автор диссертации, Савина Екатерина Дмитриевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Главный научный сотрудник
Лаборатории процессов фотосенсибилизации
ИБХФ РАН, д.х.н.

Москва, 119334, ул. Косыгина 4

Тел.: 8(495)939-7336 (раб), +7(906) 031-7235 (моб)

e-mail: nekip@sky.chph.ras.ru

Татьяна Дмитриевна Некипелова

Ученый секретарь ИБХФ РАН

к.б.н.



Скалдина С.И.