

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 ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Работа Савиной Е. Д. посвящена исследованию фотохимических реакций с участием кинуреновой кислоты и установлению её роли в фотоиндуцированной модификации белков хрусталика, а также в механизме образования и развития катаракты. Актуальность поставленной цели связана с широким распространением заболевания катарактой среди взрослого населения во всем мире. При этом ранняя диагностика и профилактика данного заболевания невозможны без понимания молекулярных процессов, происходящих в тканях хрусталика в процессе жизнедеятельности человека. Автором впервые установлены механизмы фотоиндуцированных радикальных реакций между хромофором хрусталика и аминокислотами в условиях, приближенных к естественным. Впервые были установлены детальные механизмы фотоиндуцированных реакций триплетного состояния кинуреновой кислоты с аминокислотами триптофаном, тирозином и белками, идентифицированы продукты реакций и определена динамика их накопления. Поэтому научная новизна и актуальность работы не вызывает сомнений. Накопление информации об этих процессах позволит построить модели развития патологий хрусталика глаза и найти пути их диагностики и лечения.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 175 страницах и включает 8 таблиц, 8 схем, 34 рисунка и 256 ссылок на цитируемую литературу. Все использованные в работе результаты были получены автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии.

Первая глава - это литературный обзор по тематике диссертационной работы. В ней описаны особенности строения человеческого глаза и хрусталика, а также представлен обзор основных УФ-фильтров, антиоксидантов и белков хрусталика. Особое внимание уделено фотоиндуцированным модификациям белков. Материалы этой главы свидетельствуют о хорошем знании автором литературы по рассматриваемым проблемам.

Вторая глава посвящена экспериментальным методам. Описана процедура приготовления образцов и дано описание методик анализа экспериментальных результатов. Также подробно описано экспериментальное оборудование использованное в работе.

В третьей главе представлены результаты исследования фотохимических реакций кинуреновой кислоты (КНА) с биологическими молекулами: аминокислотами (триптофан, тирозин, цистеин, гистидин, фенилаланин и метионин), антиоксидантами (аскорбатом и глутатионом), а также с различными белками. Показано, что наибольшие значения констант скорости тушения демонстрируют кислород и аминокислоты Trp и Tug.

Радикалы тирозина и триптофана были зарегистрированы также и при фотолизе в присутствии белков хрусталика. Показано, что в случае кристаллинов упаковка белков и их трехмерная структура играют более важную роль, нежели количество аминокислотных остатков Trp и Tyr в их составе.

В четвертой главе представлены результаты исследования процесса димеризации и окисления аминокислоты триптофана в результате фотолиза в присутствии кинуреновой кислоты. На основании полученных результатов была установлена схема реакций, протекающих между радикалами кинуреновой кислоты и триптофана, образующимися под действием УФ-А излучения. Реакция анион-радикала кинуреновой кислоты с остаточным молекулярным кислородом приводит к образованию радикала супероксида, который может вступать в реакции окисления с радикалами Trp[•], тогда как реакция рекомбинации двух радикалов Trp[•] приводит к образованию ковалентных связей в структуре белка. Хотя квантовые выходы продуктов окисления и димеризации Trp в анаэробных условиях относительно невелики, но длительное накопление таких модификаций может давать значительный вклад в общую модификацию белков хрусталика.

В качестве примера в главе 5 было изучено повреждение белка лизоцима в результате фотолиза в присутствии кинуреновой кислоты. Показано, что УФ-А фотолиз по типу I в присутствии кинуреновой кислоты приводит к появлению многочисленных модификаций на белке: ковалентной сшивки белков через радикалы триптофана, присоединение KNA к белку, что в итоге приводит к потере ферментативной активности.

Шестая глава посвящена изучению фотолиза белков кристаллинов в присутствии кинуреновой кислоты. Как и при фотолизе белка лизоцима, основным продуктом фотолиза типа I с участием KNA и кристаллинов является ковалентная сшивка белков. Участие реакционных форм кислорода, супероксид радикала и синглетного кислорода существенно ускоряет модификацию белков за счёт образования промежуточных пероксидных форм и окисленных форм белков. Наблюдаемое в ходе экспериментов формирование высокомолекулярных агрегатов белков приводит к образованию центров рассеяния света в процессе развития катаракты хрусталика.

В целом, результаты работы, полученные с помощью широкого набора биохимических и физико-химических методов, позволяют сделать заключения важные для понимания роли фотоиндуцированных радикальных реакций в ткани хрусталика при нормальном старении и развитии катаракты. Представленная диссертация является законченным научным исследованием, выполненным с использованием современных экспериментальных методов. Полученные автором экспериментальные данные и выводы не вызывают сомнения в их достоверности. Диссертационная работа соответствует специальности - биохимия. В ходе работы Савиной Е.Д. получено много новых и интересных результатов, наиболее важными из которых являются: (1) Установлено, что первичные реакции между ^TKNA и белками протекают в основном через аминокислотные остатки триптофана (Trp) и тирозина (Tyr) с образованием соответствующих нейтральных радикалов; (2) Показано, что фотолиз лизоцима и кристаллина с ^TKNA приводит к деградации Trp и Tyr остатков белков и образованию димерных и других мультимерных форм, ковалентно связанных через остатки Trp и Tyr, а также к ковалентному присоединению KNA к белкам хрусталика; (3) Кислород в низких концентрациях может выступать в роли протекторного агента, снижая фотоповреждение белков, за счет высокой

эффективности реакции обратного переноса электрона между супероксидом и радикалами аминокислоты или белка с восстановлением исходных реагентов. Результаты исследования позволили существенно продвинуться в понимании процессов старения и катарактогенеза в тканях хрусталика. Именно через понимание причин возникновения заболевания возможна разработка метода профилактики или неинвазивного лечения.

Диссертационная работа апробирована на всероссийских и международных конференциях и опубликована в 3-х статьях в высокорейтинговых журналах, рекомендованных ВАК. Достоверность результатов, новизна и высокий научный уровень проделанной работы не вызывает сомнений. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и соответствует содержанию опубликованных статей. Считаю, что представленная работа полностью соответствует требованиям ВАК предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Замечания:

- 1) В главе 3 автор утверждает, что аминокислоты триптофан, тирозин, цистеин, гистидин, фенилаланин и метионин являются эффективными донорами электронов и активно участвуют в процессах тушения возбужденных состояний. В дальнейшем она сама опровергает это утверждение: «Основываясь на полученных значениях, можно сделать вывод, что аминокислоты (His, Phe и Met) не являются эффективными тушителями ^1KNA ». На мой взгляд, изначально было понятно, что из перечисленных соединений эффективными донорами электронов являются только триптофан и тирозин.
- 2) Кроме того, в литературном обзоре (стр 48) и в главе 3 диссертации (стр 62) приводятся разные предполагаемые механизмы тушения: в главе 3 в качестве продукта реакции приводится анион радикал кинурениновой кислоты, а в литобзоре диссертации – нейтральный радикал. При этом наличие KNA^- подтверждается лишь отрицательными значениями промежуточного поглощения в районе 310-350 нм, что указывает на уменьшение концентрации KNA в основном состоянии за счет её перехода в продукты реакции.
- 3) Приведенные в таблицах 1.2 и 3.1 константы скорости тушения ^1KNA различными тушителями отличаются в несколько раз. Автор объясняет эти различия, что Pileni и коллеги проводили свои эксперименты в водных растворах без контроля pH, а настоящие исследования были проведены в буферном растворе с постоянным значением pH = 7.4, близким к физиологическим условиям в хрусталике глаза (pH 6.89). На самом деле Pileni и коллеги проводили исследования при pH = 7.0.
- 4) Автор утверждает, что полученные в ходе работы результаты позволяют предположить наиболее вероятный механизм взаимодействия белков хрусталика с фотовозбужденной молекулой кинурениновой кислоты. При анаэробном УФ-А облучении происходит формирование радикалов на триптофановых и тирозиновых аминокислотных остатках белка. Вызывает удивление, почему автор не проверил это предположение, используя имеющийся в ее распоряжении метод химической поляризации ядер. Этот же метод мог быть использован для доказательства образования анион радикала кинурениновой кислоты либо нейтрального радикала в первичном акте тушения.

Указанные замечания, однако, никоим образом не искажают существа представленной диссертационной работы, которая по своей цели, научной новизне, практической значимости, а также представленным публикациям полностью 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, безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:
Доктор химических наук,
Заведующий Лабораторией магнитных явлений
ФГБУН Институт химической кинетики и горения
им. В.В. Воеводского Сибирского отделения РАН
Поляков Николай Эдуардович



Подпись

12.08.2020

Новосибирск, 630090,
Ул. Институтская, 3;
Тел. +7 (383) 3332947
e-mail: polyakov@kinetics.nsc.ru

Докторская диссертация защищена по специальности 01.04.17 - Химическая физика, в том числе физика горения и взрыва.

Подпись Полякова Н.Э. заверяю:

Заместитель директора ФГБУН Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения РАН
кандидат химических наук
Валиулин Сергей Владимирович



Подпись