

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Буглака Андрея Андреевича «Фотобиохимия птериновых коферментов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 03.01.04 – Биохимия

Диссертация Буглака А.А. посвящена изучению фотобиохимии птеринов, в основном фотохимии тетрагидробиоптерина, функционирующего в качестве кофермента, и его окисленных производных, проявляющих фотосенсибилизирующую активность. Изучение молекулярных механизмов фотодинамического действия эндогенных сенсибилизаторов является одним из актуальных направлений современной фотобиохимии и фотомедицины. Наряду с широко известными сенсибилизаторами, такими как, например, порфирины и псоралены, существуют и другие, относительно малоизученные классы фотоактивных соединений, к которым относятся, в том числе, флавины и птерины. Учитывая какое широкое распространение в живой природе имеют флавины и птерины, изучение их фотохимии, безусловно, можно считать актуальным.

Еще одним фундаментальным направлением современной биохимии является изучение механизмов фоторецепции. Наряду с изучением механизмов передачи информации о световом сигнале белками, также важно исследовать и фотохимические функции низкомолекулярных фоторецепторных молекул, присутствующих в активном сайте белка-фоторецептора. К настоящему времени достаточно подробно известен механизм работы флавинов в составе фоторецепторов синего света фототропинов и криптохромов, ретиналя – в составе бактериородопсина, триптофана – в составе белка-фоторецептора УФ UVR-8 и т.д. Как следует из обзора литературы, в последние годы показана возможность участия птеринов в рецепции ультрафиолета растениями и цианобактериями. В этой связи изучение фоторецепторных свойств птеринов представляется весьма интересным и актуальным.

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы, включающего 203 ссылки, а также приложения.

Работа изложена на 137 страницах, иллюстрирована 47 рисунками, одной схемой, содержит 20 таблиц.

Во введении описана проблематика исследования и обоснована ее актуальность, поставлены цель и задачи работы.

Обзор литературы содержит сведения о фотохимических свойствах птеринов, дана классификация и указана биологическая роль различных групп птериновых соединений, основные физико-химические свойства коферментных форм птеринов рассмотрены на примере молекулы 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, подробно рассмотрены реакции фотосенсибилизированного окисления с участием окисленных форм птеринов, показано значение фотохимических реакций птериновых соединений для различных биологических процессов. Обзор литературы содержит ссылки в том числе на публикации самых последних лет, включает рисунки, схемы, структурные формулы, математические уравнения и свидетельствует о том, что диссертант хорошо разбирается в проблематике.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные автором современные методы исследования (ВЭЖХ-хроматография, масс-спектрометрия, спектрофотометрия и другие). Кроме того автором использованы современные методы квантовой химии и молекулярного моделирования. Успешное сочетание данных методов позволило диссертанту провести оригинальное исследование и получить интересные результаты, имеющие как теоретическую, так и практическую ценность.

В экспериментальной части диссертационной работы А.А. Буглака представлены данные по фотохимическому окислению тетрагидробиоптерина в водном растворе. Определение образующихся в ходе фотоокисления тетрагидробиоптерина продуктов проводилось методом ВЭЖХ, а также MS/MS-масс-спектрометрии. При проведении ВЭЖХ анализа регистрация продуктов проводилась с применением трех детекторов: фотометрического, флуоресцентного и амперометрического. На кофермент воздействовали широкополосным УФ-излучением (диапазон 300-380 нм) и монохроматическим ультрафиолетом (с длиной волны 300 нм и 350 нм), с добавлением и без добавления фотосенсибилизатора, в H_2O и вдейтерированной воде, в присутствии и в отсутствие супероксид-дисмутазы. При этом сравнивались квантовые выходы и скорость фотоокисления, и на этом основании делались выводы о механизме процесса фотоокисления.

Хотелось бы отметить основные результаты:

1. Впервые установлены продукты фотоокисления тетрагидробиоптерина в водном растворе в присутствии кислорода воздуха; показано, что тетрагидробиоптерин подвержен фотосенсибилизированному окислению продуктами собственной деградации, в частности биоптерином. Обоснован механизм сенсибилизации I типа. Высказано предположение, что, поскольку при заболевании витилиго в депигментированных клетках эпидермиса происходит накопление как тетрагидробиоптерина, так и биоптерина, описанный процесс фотосенсибилизированного окисления тетрагидробиоптерина может вести к развитию патологии.
2. С помощью квантово-химических расчетов для тетрагидровосстановленных птеринов в целом показано, что природа возбужденных состояний тетрагидроптеринов схожа с природой возбужденных состояний азотистого основания гуанина. Продемонстрировано, что при образовании катион-радикальной формы тетрагидровосстановленного птерина возможно изменение конформации его бокового заместителя. Предположено, что тетрагидроптерины, играющие роль фоторецепторных молекул в живых организмах, таким образом могут передавать сигнал о воздействии УФ излучения на белок.
3. Методами компьютерной химии автором произведен поиск корреляций между строением птериновых молекул и их способностью генерировать активные формы кислорода. Продемонстрирована успешность применения метода QSPR к анализу процессов фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода, а полученные модели, отражающие корреляцию квантового выхода генерации синглетного кислорода и ряда физико-химических параметров, можно считать адекватными и обладающими предсказательной способностью.
4. Также изучено влияние природы бокового заместителя птериновых сенсибилизаторов на реакции образования активных форм кислород. С применением методов квантовой химии автором показано, что образование супероксид-анион в целом не характерно для птеринов, что подтверждается экспериментальными данными из литературы. Полученные результаты позволили рекомендовать птерины в качестве потенциальных безопасных фотодинамических агентов.

Вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация Буглака А.А. посвящена изучению актуальной и интересной проблемы, выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, содержит новые оригинальные результаты. Результаты наглядно оформлены в виде рисунков, графиков и таблиц. Поскольку экспериментальные результаты получены с использованием нескольких методов, а теоретические данные соответствуют данным эксперимента, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Интерпретация и выводы, сделанные на основании полученных данных, корректны и не вызывают возражений.

Следует сделать несколько замечаний:

1. На странице 61 текста диссертации автор утверждает что, иодид калия является специфическим тушителем для триплетного состояния сенсибилизатора, однако это не так.
2. Весьма вероятно, что в ходе фотосенсибилизированного окисления, проводимого автором, происходило образование йода в результате реакции между йодидом и перекисью. Образовывался ли йод в ходе фотосенсибилизированного окисления, и могло ли это оказывать нивелирующий эффект на реакции тушения возбужденных состояний сенсибилизатора йодидом? Автором данный вопрос не рассматривается.
3. В списке цитируемой литературы в начале расположены англоязычные публикации в конце - русскоязычные, в то время как должно быть наоборот. То же относится и к списку сокращений, который также должен содержать сначала термины в русскоязычной транскрипции, и только затем – в английской.

Данные замечания не влияют на общее положительные впечатление от диссертационной работы. Результаты исследования опубликованы, в том числе, в четырех статьях в рецензируемых англоязычных журналах, а также представлены автором на нескольких конференциях, имеющих всероссийский и международный статус.

Диссертация написана строгим научным языком, подробно иллюстрирована рисунками и схемами. Автореферат полностью отражает основное содержание работы.

Таким образом, диссертационная работа Буглака А.А. является законченным научным исследованием. По актуальности темы, достоверности полученных данных, обоснованности научных положений и выводов, новизне,

теоретической и научно-практической значимости, диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п.9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013г.), а ее автор, Буглак Андрей Андреевич, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН,
ведущий научный сотрудник,
лаборатория внутриклеточной сигнализации,
доктор биологических наук
(03.00.02 – биофизика)

Векшин Николай Лазаревич

142290, Пущино, ул. Институтская, д. 3
тел. 8(968) 792-21-41
e-mail: nvekshin@rambler.ru

N. Vekshin

« 9 » сентября 2016 г.

