

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от «20» октября 2016 г. № 15
о присуждении Буглаку Андрею Андреевичу, гражданство Российской Федерации,
учёной степени кандидата химических наук.

Диссертация «Фотобиохимия птериновых коферментов» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 15 июля 2016 года (протокол № 12) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. №74/нк и от 10.02.2014г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Буглак Андрей Андреевич, 1986 года рождения, в 2010 г. окончил Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «Физиология». В ноябре 2010 г. Буглак Андрей Андреевич поступил в очную аспирантуру Учреждения Российской академии наук Института биохимии им. А.Н.Баха РАН, где проходил обучение по ноябрь 2013 г. С ноября 2013 г. работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук в должности младшего научного сотрудника, и с июля 2015 г. продолжил работу в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертационную работу Буглак А.А. выполнял в лаборатории экологической и эволюционной биохимии (до 2013 г. – лаборатория эволюционной биохимии)

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – Телегина Таисия Александровна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», старший научный сотрудник лаборатории экологической и эволюционной биохимии.

Официальные оппоненты: Кузьмин Владимир Александрович, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации; Векшин Николай Лазаревич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», в своем положительном заключении, подписанном членом-корреспондентом РАН, заведующим кафедрой биофизики биологического факультета, доктором биологических наук, профессором Рубиным Андреем Борисовичем, подписанном доктором биологических наук, профессором Фрайкиным Григорием Яковлевичем, утвержденном проректором – начальником Управления научной политики и организации научных исследований Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Федяниным Андреем Анатольевичем, указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью и соответствует критериям, изложенным в п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013), а ее автор, Буглак А.А., заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор химических наук, профессор Кузьмин Владимир Александрович является признанным специалистом в области химической кинетики, фотохимии и процессов фотосенсибилизации; доктор биологических наук Векшин Николай Лазаревич является известным специалистом в

области фотобиологии и флуоресцентной спектроскопии. Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися исследованиями в области биофотоники, молекулярной биофизики и фотобиологии, а также наличием высококвалифицированных специалистов, проводящих исследования в данных областях. Соискатель имеет 15 опубликованных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Kritsky M.S. A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of singlet oxygen generation by pteridines. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2016. v. 15, p. 801-811.

2. **Buglak A.A.**, Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Yu.L., Kritsky M.S. Photo-oxidation of tetrahydrobiopterin under UV-irradiation: possible pathways and mechanisms. – *Photochemistry and Photobiology*. 2014. v. 90, N 5, p. 1017-1026.

3. Kritsky M.S., Telegina T.A., Vechtomova Y.L., Kolesnikov M.P., Lyudnikova T.A., **Buglak A.A.** Photoexcited molecules of pteridine derivatives in prebiotic and biological evolution. *Paleontological Journal*. 2013. v. 47, N 9, p. 1074-1079.

4. Kritsky M.S., Telegina T.A., Vechtomova Yu.L., **Buglak A.A.** Why flavins are not competitors of chlorophyll in the evolution of biological converters of solar Energy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. v. 14, N 1, p. 575-593.

Результаты работы были также представлены на 6 международных и 3 Всероссийских конференциях:

III международная конференция по кофакторам (ISC-03), Турку, Финляндия, 2011 г.; VI Съезд Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, 2011 г.; III международный симпозиум «Молекулярная фотоника», Санкт-Петербург, 2012 г.; IV съезд биофизиков России, Нижний Новгород, 2012 г.; XV Конгресс Европейского фотобиологического общества (ESP), Льеж, Бельгия, 2013 г.; VI Всероссийская молодежная школа-конференция «Квантово-механические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул», Иваново, 2013 г.; XI Съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 2014 г.; XVI Международный конгресс по фотобиологии (ICP), Кордоба, Аргентина, 2014 г.; Международная конференция "Проблема происхождения жизни" и молодежная научная школа «Молекулярные и клеточные основы ранней эволюции жизни», Москва, 2014 г.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведённые в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, профессора Кузьмина В.А. (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

«При общей высокой оценке диссертационной работы имеется ряд замечаний:

1. В обзоре литературы не уделено внимание сравнительному рассмотрению птеридиновых генераторов синглетного кислорода и широко известных фотодинамических агентов порфиринового, фталоцианинового и хлоринового ряда.

2. В работе не представлены данные по идентификации пероксида водорода и изучению его влияния на фотоокисление тетрагидробиоптерина. Учитывать влияние перекиси важно как минимум по двум причинам: во-первых, перекись образуется при темновом окислении этого кофермента; во-вторых, повышенная концентрация перекиси идентифицируется в депигментированных клетках кожи у больных витилиго.

3. Для выявления влияния УФ-излучения и различных химических реагентов (СОД, йодид, дейтерированная вода) на протекание фотоокисления тетрагидробиоптерина предпочтительно сравнивать квантовые выходы фотопроцесса, а не скорости, зависящие от концентрации реагирующих веществ.

4. Диссертация написана чётко и аккуратно, но встречаются мелкие ошибки и опечатки, например, на странице 26 вместо «флаповропротеиновых» должно быть написано «флавопротеиновых».

Отмеченные замечания не касаются принципиальных сторон исследования, носят в большей степени рекомендательный характер и не снижают общую положительную оценку работы.»

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Векшина Н.Л. (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

«На странице 61 текста диссертации автор утверждает что, йодид калия является специфическим тушителем для триплетного состояния сенсibilизатора, однако это не так.

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 сенсibilизатора йодидом? Автором данный вопрос не рассматривается.

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 положительное впечатление от диссертационной работы.»

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (положительный) содержит следующие замечания:

«Название «Фотобиохимия птериновых коферментов» слишком широко и не вполне соответствует реальному содержанию диссертационного труда. Среди объектов фотохимического эксперимента и квантово-химических расчетов фигурирует лишь один птериновый кофермент – 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин. Для остальных исследованных в диссертации производных птерина и птеридина коферментные функции не известны. В то же время, вне круга исследования остались такие важнейшие птериновые коферменты, как молибдоптерин, тетрагидрометаноптерин, и, наконец, обширное семейство коферментных производных фолиевой кислоты. Каждая из этих групп имеет свою структурную и функциональную специфику, и было бы некорректно автоматически распространять на них представления, сложившиеся при исследовании H_4 Бип.

Рекомендация птеринов в качестве фотосенсibilизаторов (для использования в клинической фотомедицине, как можно понять из контекста диссертации, см. пункт 6 выводов), требует либо менее категоричной формулировки, либо более всестороннего предварительного обсуждения в тексте работы.

В подписях к ряду рисунков (рис. 19, 22) не указана ссылка на литературный источник. Отсутствует полноценная расшифровка сокращения 8-ГДФ (калька с английского 8-HDF, т.е. 8-hydroxy-5-deazaflavin). Сокращение FADH⁻ (или ФАДН⁻) фигурирует то в английской, то в русской транскрипции.

Указанные замечания не умаляют важности и оригинальности материала. Они касаются деталей оформления и редактуры работы, а для ее оценки принципиального значения не имеют.»

На автореферат поступило шесть положительных отзывов:

1) от научного сотрудника лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук» (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) кандидата химических наук Фрейдзон Александры Яковлевны и главного научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук», профессора, доктора химических наук Багатурьянца Александра Александровича, замечаний нет;

2) от ведущего научного сотрудника лаборатории физико-химических основ рецепции отдела фотохимии и фотобиологии Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, доктора биологических наук, профессора Зака Павла Паловича, замечаний нет;

3) от доцента кафедры биохимии им. академика Т.Т. Березова медицинского института ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» министерства образования и науки Российской Федерации кандидата биологических наук Рыскиной Елены Анатольевны и заведующего кафедрой биохимии им. академика Т.Т. Березова медицинского института ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов», профессора, доктора биологических наук Чернова Николая Николаевича. В отзыве приведено следующее замечание: «В качестве замечания к автореферату можно высказать сожаление о том, что проблема продукции активных форм кислорода птеринами рассмотрена только с точки зрения их использования в фотодинамической терапии, в то время как обсуждение фототоксичности данных соединений должным образом проведено не было. Как известно, разработка моделей структура-свойство, позволяющих проводить виртуальный скрининг токсичных соединений является одной из наиболее востребованных задач QSAR»;

4) от ведущего научного сотрудника лаборатории гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, профессора, доктора химических наук Беленького Леонида Исааковича. В отзыве приведены следующие замечания: «Существенных нареканий автореферат диссертационной работы не вызывает. Однако хотелось бы сделать следующие замечания: 1. Отсутствуют данные по величинам выходов отдельных продуктов фотоокисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина в зависимости от длины волны УФ излучения. Между тем наличие этих данных позволило бы сделать вывод о генеральном пути фототрансформации в каждом случае. 2. По данным ВЭЖХ среди

продуктов фотоокисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина практически отсутствует 7,8-дигидроптерин в то время как в продуктах темнового окисления он присутствует. Это может говорить о вхождении 7,8-дигидроптерина в состав димеров наряду с 7,8-дигидробиоптеринном. Для установления структуры димеров можно было бы рекомендовать ЯМР метод в сочетании с ВЭЖХ хроматографией. 3. Автореферат в целом написан строгим научным языком, хорошо иллюстрирован рисунками и содержит 8 таблиц, обладает внутренним единством. Вместе с тем в тексте иногда видны следы лабораторного жаргона. Из последних нельзя не отметить часто встречающееся названия типа «тетрагидровосстановленных форм птеринов». Несмотря на сделанные замечания значимость полученных результатов несомненна, поскольку результаты были опубликованы в международных рецензируемых журналах и неоднократно докладывались на всероссийских и международных конференциях»;

5) от ведущего научного сотрудника кафедры физической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кандидата физико-математических наук Хреновой Марии Григорьевны. В отзыве приведено следующее замечание: «при построении QSPR моделей в качестве одного из дескрипторов используется энергия НОМО орбитали, что обосновывается теоремой Купманса. Однако по теореме Купманса предполагается использование энергий молекулярных орбиталей, полученных в методе Хартри-Фока, в то время как из текста автореферата следует, что орбитальная энергия взята из метода функционала электронной плотности, не предполагающего наличие физического смысла орбитальных энергий. Тем не менее, указанное замечание не умаляет достоинств и не снижает качества диссертационной работы»;

б) от декана медико-биологического факультета, заведующего кафедрой биофизики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», профессора, доктора биологических наук, заслуженного деятеля науки РФ Артюхова Валерия Григорьевича и ассистента кафедры биофизики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», кандидата биологических наук Лысенко Юлии Александровны, замечаний нет.

В дискуссии приняли участие три человека:

доктор биологических наук, профессор А.А. Красновский;

доктор биологических наук, профессор Р.А. Звягильская;

доктор биологических наук К.Б. Шумаев.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- Методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-MS/MS-масс-спектрометрии установлены продукты, образующиеся при воздействии УФ на 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин в водном растворе в присутствии кислорода воздуха. Основными продуктами являются 7,8-дигидробиоптерин (H_2 Бип), димер $(H_2$ Бип) $_2$, 7,8-дигидроптерин, 7,8-дигидроксантоптерин и 6-биоптерин (Бип).

- Впервые показана возможность фотосенсибилизированного окисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина. В роли сенсибилизатора может выступать Бип - продукт окисления H_4 Бип. Доминирующим является механизм сенсибилизации I типа, связанный с прямым переносом электрона с молекулы-тушителя (H_4 Бип) на сенсибилизатор.

- С помощью квантово-химических расчетов показана возможность быстрой внутренней конверсии возбужденных состояний тетрагидроптеринов. Впервые продемонстрировано, что природа возбужденных состояний тетрагидроптеринов аналогична природе возбужденных состояний гуанина.

- Конформация бокового заместителя в С6 положении нейтральной молекулы 5,6,7,8-тетрагидрогидрогидроксиметил-птерина (H_4 Гмп) отличается от конформации катион-радикала H_4 Гмп $^{+\bullet}$, что имеет существенное значение в связи с фоторецепторными функциями тетрагидроптеринов в живых организмах.

- Впервые построена серия QSPR моделей, предсказывающих порядок величины квантового выхода генерации синглетного кислорода (Φ_Δ) в зависимости от структуры птеридинов.

- Методами квантовой химии для 6 птериновых сенсибилизаторов показано, что они не генерируют супероксид-анион радикал, что позволяет рекомендовать птерины в качестве потенциальных фотодинамических агентов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Показана возможность реакций фотосенсибилизированного окисления ключевого кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина продуктами его темновой дегградации. Методами квантовой химии оценена возможность протекания реакций, составляющих основу фотосенсибилизированного окисления 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина, также оценена фотостабильность тетрагидроптеринов. Впервые методами квантовой химии показано сходство фотохимии тетрагидровосстановленных форм птеринов с фотохимией гуанина - пуринового основания, характеризующегося коротким временем жизни возбужденных состояний и фотостабильностью. В то же время, показано, что в случае

переноса электрона на молекулу-акцептор и образования катион-радикала возможно изменение конформации молекулы тетрагидроптерина; высказано предположение, что Н₄птерины, играющие роль фоторецепторных молекул в живых организмах, таким образом могут передавать сигнал о воздействии УФ излучения.

В контексте эволюционной гипотезы «РНК мира» фотокаталитические реакции птеринов могут играть существенную роль. В условиях абиогенеза птеридины, по-видимому, могли синтезироваться при термоконденсации абиогенных аминокислот. Птерины могли поглощать УФ и функционировать в качестве фотокатализаторов свободно-радикальных процессов. В неокислительных условиях предбиологической и ранней биологической эволюции показанное сходство электронной конфигурации восстановленных птеринов и гуанина и их однотипная фотоустойчивость, обусловленная внутренней конверсией энергии фотовозбуждения, возможно, позволяли птеринам включаться в состав прото-РНК. Конъюгированные в прото-РНК восстановленные птерины могли функционировать в качестве доноров электрона и водорода в различных процессах, связанных с запасанием свободной энергии.

Впервые с помощью QSPR анализа для птеридинов показано, что квантовый выход генерации синглетного кислорода коррелирует со значениями потенциала ионизации и электроотрицательности.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что:

- предложена схема, отражающая возможную роль фотохимических реакций кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина в развитии дерматологического заболевания витилиго;
- установлено, что 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (действующее вещество фармацевтического препарата «Куван») подвержен фотосенсибилизированному окислению продуктами собственной деградации, что необходимо учитывать при использовании и хранении данного лекарственного препарата;
- создан ряд QSPR моделей для предварительной оценки величины квантового выхода генерации синглетного кислорода флавиновыми и птериновыми сенсибилизаторами;
- с помощью квантово-химических расчетов для молекул окисленных птеринов показано, что они не генерируют супероксид-анион радикал, что позволяет рекомендовать птерины в качестве потенциальных фотодинамических агентов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- используемые методики исследования и проведенные расчёты корректны;

