

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Буглака Андрея Андреевича «Фотобиохимия птериновых коферментов», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Диссертационная работа Буглака А.А. посвящена изучению фотобиохимии птериновых коферментов, при этом основное внимание уделено тетрагидробиоптерину (по номенклатуре ИЮПАК 2-амино-6-(1,2-дигидроксипропил)-5,6,7,8-тетрагидро-3Н-птеридин-4-он). Полностью восстановленное состояние пиразинового цикла в птериновых коферментах позволяет им быть донорами электрона и водорода в многочисленных red/ox ферментах. Одним из таких ферментов является фенилаланингидроксилаза, отвечающая за первую стадию в биосинтезе меланина. Нарушение биосинтеза меланина является симптомом ряда патологий, к которым относится заболевание витилиго. Одной из установленных причин и триггеров витилиго является нарушение метаболизма тетрагидробиоптерина, оказывающее влияние на работу ферментов начальных стадий меланогенеза. Также широко известно, что значительное влияние на меланогенез оказывает стимуляция УФ-излучением. Вопросы, касающиеся фототрансформаций птериновых коферментов под действием УФ, практически не изучены. В работе сделана попытка выяснить, какое влияние ультрафиолет оказывает на тетрагидробиоптерин и к каким последствиям это может вести с точки зрения патологии витилиго.

Второй аспект, определяющий **актуальность** темы диссертационной работы, касается фоторецепторных свойств этих соединений. Не так давно открыта фоторецепция УФ излучения растениями и цианобактериями, при которой в качестве хромофоров выступают тетрагидроптерины. Изучить характеристики тетрагидроптеринов, которые могут быть ответственны за рецепцию света – одна из задач, решаемых в данной работе.

Третий аспект диссертационной работы связан с тем, что окисленные птеридины являются эффективными генераторами синглетного кислорода и могут быть перспективны в качестве фотодинамических агентов. Учитывая все три перечисленные аспекта, **актуальность** исследования не вызывает сомнений.

Содержание работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (описание материалов и методов исследования), изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений. Работа изложена на 137 страницах печатного текста, содержит 47 рисунков, 1 схему и 20 таблиц. Список литературы включает 203 наименования.

Во **введении** даётся общая характеристика проблемы, обосновывается её актуальность, формулируются цели и задачи исследования.

В обзоре литературы изложена классификация и биологическая роль птериновых соединений и их фотохимические свойства. Основные свойства коферментных форм неконъюгированных птеринов описаны на примере 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина. Проанализированы характеристики птеринов (включая флавины, или бензоптеридины), которые могут быть связаны с их функционированием в составе фоторецепторов УФ света, а также в качестве фотогенераторов активных форм кислорода. Обзор литературы хорошо иллюстрирован рисунками, схемами реакций, математическими уравнениями и удачно вводит в изучаемую проблему.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе источники УФ излучения и условия проведения экспериментов, а также применяемые методы анализа. Можно отметить, что для ВЭЖХ анализа автором были последовательно соединены три типа детекторов (фотометрический, флуориметрический и амперометрический), что позволило многосторонне охарактеризовать исследуемые продукты реакций.

Наряду с препаративными методами исследования диссертантом применялись расчётные методы квантовой химии и молекулярного моделирования с использованием современного программного обеспечения.

В главе «Результаты и обсуждение» изложены полученные экспериментальные данные и результаты, установленные с применением расчётных методов. В начале главы изложены данные по изучению фотоокисления кофермента тетрагидробиоптерина молекулярным кислородом в водном растворе. Методами ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией определены продукты фотоокисления, включающие как птерины, окисленные до дигидро- состояния (7,8-дигидробиоптерин, 7,8-дигидроптерин, 7,8-дигидроксантоптерин), так и полностью окисленный биоптерин, а также димеры дигидроптеринов. Данные по воздействию ультрафиолета с разной длиной волны позволили установить, что наиболее эффективно воздействие света с длиной волны 350 нм, и это объяснено возможностью фотосенсибилизированного окисления тетрагидробиоптерина, когда сенсибилизатором выступает продукт его деградации - биоптерин. Далее исследованы два возможных механизма участия триплетного биоптерина в фотоокислении тетрагидробиоптерина. На основании полученных экспериментальных данных и соответствующих расчетных характеристик биоптерина сделан вывод о доминировании механизма сенсибилизации I типа. Полученные в этом разделе результаты обсуждены в биомедицинском аспекте. Возможность протекания процесса фотосенсибилизированного окисления тетрагидробиоптерина рассмотрена в качестве одного из факторов, ведущих к развитию патологии при витилиго.

Поскольку непосредственного участия возбуждённого тетрагидробиоптерина в фотохимических реакциях обнаружено не было, второй раздел главы «Результаты и обсуждение» посвящен изучению физико-химических свойств

тетравосстановленных птеринов методами квантовой химии. Показана возможность быстрой внутренней конверсии их возбуждённых синглетных состояний и схожесть данного процесса с внутренней конверсией возбуждённого гуанина. На основании этого фотостабильность тетравосстановленных птеринов оценена как высокая.

Автор отмечает, что высокая степень восстановленности данных соединений делает вероятным фотоиндуцированный перенос электрона с птерина на акцептор. Также установлено, что при потере электрона и образовании катион-радикала возможно изменение конформации тетрагидровосстановленных птеринов, что, безусловно, может иметь значение с точки зрения их фоторецепторных функций.

Третий раздел главы «Результаты и обсуждение» посвящён изучению фотохимических свойств окисленных птеринов. Квантово-химическими методами проанализирована эффективность фотогенерации активных форм кислорода (синглетного кислорода и супероксид-анион радикала) различными сенсибилизаторами птеридинового ряда. Впервые для этого класса соединений, включающего в себя птерины, флавины и фолаты, построены QSPR модели, позволяющие предсказывать порядок величины квантового выхода генерации синглетного кислорода в зависимости от структуры птеридина. Проанализированы значения 128 молекулярных параметров для 29 соединений и выявлено, что способность генерировать синглетный кислород в значительной степени коррелирует с энергией верхней занятой молекулярной орбитали (НОМО) и абсолютной электроотрицательностью молекулы. Ценность предложенного теоретического метода расчёта и его предсказательная способность определяется тем, что рассчитанные значения квантовых выходов генерации синглетного кислорода совпадают с имеющимися в литературе экспериментальными данными. В связи с возможностью применения птеринов в качестве сенсибилизаторов для фотодинамической терапии была проанализирована вероятность переноса электрона на молекулу кислорода. Было показано, что в ходе реакции птерина в триплетном состоянии с молекулой кислорода фототоксичный супероксид-анион радикал не образуется (и это подтверждается экспериментальными данными из литературы). Все это позволяет рассматривать птерины в качестве потенциальных фотодинамических агентов.

В главе «**Заключение**» суммированы полученные экспериментальные и теоретические результаты и сделаны рекомендации, касающиеся использования птеринов в биомедицинских исследованиях.

Полученные расчётные характеристики тетравосстановленных птеринов позволили сделать интересные предположения, касающиеся эволюционного аспекта химии птеринов. Рассматривая изложенные результаты в контексте гипотезы «РНК мира», автор высказывает догадку о возможном участии абиогенных тетравосстановленных птеринов в предбиологической эволюции. Так, в неокислительных условиях сходство электронной конфигурации восстановленных птеринов и гуанина и их однотипная фотоустойчивость, возможно, позволяли птеринам включаться в составproto-РНК. Конъюгированные в proto-РНК

восстановленные птерины могли функционировать в качестве доноров электрона и водорода в процессах усложнения углеродистых соединений на пути к жизни.

Достоверность и надёжность полученных результатов обусловлена использованием высокочувствительных методов анализа, современных квантово-химических методов расчёта, а также согласованностью данных, полученных с помощью разных подходов, и не вызывает сомнений.

Выводы отражают основные достижения проведенного исследования, обоснованы и подтверждаются полученными в работе экспериментальными и расчётными данными.

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 причин: 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 «флаповпротеиновых» должно быть написано «флавопротеиновых».

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

Диссертация, несомненно, может быть квалифицирована как законченное научное исследование, в котором соискателем успешно решены все поставленные задачи. Результаты работы опубликованы в четырёх статьях в профильных рецензируемых журналах. Полученные экспериментальные и теоретические результаты доложены лично соискателем на многочисленных всероссийских и международных конференциях, что свидетельствует об определяющем **личном вкладе соискателя** в выполнение всего объёма диссертационного исследования, в получение всего массива экспериментальных и теоретических данных, в формулировку положений, выносимых на защиту, анализ полученных результатов, а также в написание статей. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа А.А. Буглака на тему «Фотобиохимия птериновых коферментов», представленная на соискание учёной степени кандидата химических наук, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов работа полностью отвечает требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года). Автор диссертации, Андрей Андреевич Буглак, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент

Кузьмин
Владимир Александрович

Доктор химических наук

(специальность 02.00.04 – Физическая химия)

Профессор, заведующий

лабораторией процессов фотосенсибилизации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской академии наук (ИБХФ РАН)

Почтовый адрес: 119334, Россия, г. Москва,

ул. Косыгина, 4. E-mail: vak@sky.chph.ras.ru

Тел. (495) 939-7341

Подпись Кузьмина

Владимира Александровича заверяю,

Ученый секретарь ИБХФ РАН, к.б.н.

С.И. Скалацкая



« 23 » сентября 2016 г.