



МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)

Ленинские горы, Москва,
ГСП-1, 119991
Телефон: 939-10-00
Факс: 939-01-26

22.09.2016 № 1939-16/03-03

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований



А.А. Федянин

2016 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Андрея Андреевича Буглака на тему «Фотобиохимия птериновых коферментов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия по химическим наукам

Актуальность исследования

Диссертационная работа А.А. Буглака заполняет пробел в наших представлениях о свойствах важного семейства биологических рецепторов света - птеринов (2-амино-4-оксоптеридинов). Ряд представителей этого семейства идентифицирован в качестве хромофоров распространенных фоторецепторных белков, например, ДНК-фотолиаз и криптохромов. Список птеринов – участников процессов физиологической рецепции света неуклонно пополняется. Поскольку биологические производные птерина различаются по своей структуре и свойствам, возникает необходимость оценить, какие свойства того или иного соединения могут реализоваться при его функционировании в составе фоторецепторного белка. Препятствием служит то обстоятельство, что птерины в фотохимическом плане изучены слабо, значительно слабее, нежели такие классические объекты фотобиохимии, как хлорофиллы, билины, каротиноиды, или даже структурно родственные птеринам flavины (бензо-[g]-птеридины). Необходимость исследования фотохимических свойств птеринов диктуется также задачами биомедицины, связанными с анализом патологий, затрагивающих ферментативные процессы с участием птериновых коферментов.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа А.А. Буглака состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы (203 ссылки). Работа изложена на 137 страницах текста, иллюстрирована 47 рисунками, одной схемой и 20 таблицами, а также содержит два приложения, в которые вынесен вспомогательный расчетный материал, связанный с квантово-химическим моделированием молекул.

Обзор литературы соответствует задачам работы. В нем суммируются сведения о химических, фотофизических и фотохимических свойствах птеринов, анализируются биохимические функции птериновых коферментов, в основном, 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина. При этом рассматривается связь нарушений метаболизма Н₄Бип с развитием в организме патологических нарушений. Анализируется значение структуры заместителей и степени восстановленности птеридиновой структуры для реализации свойств и функций птеринов. Рассматривается сенсибилизированная светом генерация

АФК птеринами. При анализе фоторецепторных функций птеринов в организмах автор вполне обоснованно касается также родственных соединений – флавинов (бензо-[g]-птеридинов), а также затрагивает эволюционную проблематику. Обзор целесообразно рекомендовать для самостоятельной публикации.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о том, что автор владеет необходимыми для решения поставленных задач современными методами биохимии, фотохимии, биоинформатики и компьютерной химии.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены результаты, полученные автором настоящей диссертационной работы, и их интерпретация. Автором подробно изучен процесс фотоокисления кофермента 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина под действием ультрафиолета. Показано, что при фотоокислении 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина наиболее эффективно воздействие монохроматического ультрафиолета с длиной волны 350 нм, что экспериментально обосновано возможностью реакций фотосенсибилизированного окисления кофермента продуктами его деградации. Автором отмечено сходство между фотохимией тетрагидровосстановленных форм птеринов и фотохимией гуанина - пуринового основания, характеризующегося коротким временем жизни возбужденных состояний и фотостабильностью.

Построены QSPR-модели, предсказывающие порядок величины квантового выхода генерации синглетного кислорода птеринами и флавинами. Методами квантовой химии рассчитаны и сравнены фотофизические характеристики ряда птериновых сенсибилизаторов.

Научная новизна работы и практическая значимость

Основой для заключений и выводов диссертации послужили прямые фотохимические эксперименты, а также квантово-химическое моделирование молекул с целью оценки их параметров на разных этапах фотоцикла. Главной задачей стало исследование свойств тетрагидроформы птериновой молекулы, иными словами, полностью восстановленных птеринов (*далее сокр. Н₄-птерины*). Именно в такой форме реализуется активность птеринов в биокатализе и в рецепции света. В качестве объекта исследования взят представитель так называемых неконъюгированных птеринов - 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, т.е. 6-(1,2-дигидроксипропил)-5,6,7,8-тетрагидроптерин (*далее сокр. Н₄Бип*) – соединение, выполняющее коферментные функции в ряде биокаталитических систем. Квантово-химические расчеты проведены для корректной структурной модели Н₄Бип, а именно, 6-гидроксиметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина. Фотохимические свойства неконъюгированных Н₄-птеринов ранее не исследовались отчасти вследствие высокой химической лабильности этих соединений. Автору удалось преодолеть это затруднение, что служит свидетельством высокого экспериментального мастерства.

Результаты диссертации полностью оригинальны и существенно пополняют наши представления о фотохимии птеринов, в том числе, о диапазоне возможностей Н₄-птеринов как участников фоторецепторного акта. Так, согласно результатам квантово-химического анализа, структура Н₄-птериновой молекулы претерпевает в ходе фотоцикла конформационную перестройку. Обнаружение этого факта имеет принципиальное значение, поскольку прослеживается интересная сравнительно-эволюционная параллель с некоторыми другими семействами биологических фоторецепторов. Так, именно фотоиндуцированное изменение пространственной организации молекулы хромофора

лежит в основе функционирования 11-цис-ретиналя в составе родопсина и билинового пигмента в фитохроме.

Для развития представлений о фотохимических свойствах Н₄-птеринов важны результаты проведенного в работе экспериментального исследования УФ-зависимого окисления Н₄Бип атмосферным кислородом. Было известно, что молекула Н₄Бип легко окисляется кислородом воздуха, однако, как оказалось, возбуждение светом мало влияет на скорость такого окисления. Иными словами, сама молекула Н₄Бип оказалась фотохимически относительно инертной, что согласуется и с квантово-химическими расчетами автора. В то же время, при воздействии широкополосного ультрафиолета, имитирующем условия природной среды, в растворе происходит автокаталитическое окисление Н₄Бип, в котором птериновые продукты реакции (окисленные формы птеринов) играют роль фотосенсибилизаторов. На основании результатов эксперимента автором выдвинута гипотеза, согласно которой неферментативное фотокатализическое окисление молекул Н₄Бип вносит вклад в развитие дерматологического заболевания витилиго, связанного с нарушением Н₄Бип-зависимого ферментативного пути биосинтеза меланина.

Логичным развитием рассмотренного выше смыслового блока стал углубленный анализ функций окисленных птеринов как фотосенсибилизаторов процессов окисления. Содержание этой части исследования базируется, в основном, на квантово-химическом моделировании, а также регрессионном QSAR-анализе зависимости фотосенсибилизирующей активности птеридинов от их структуры и от параметров возбужденных состояний. Сюда же можно отнести эксперименты, в которых анализировался механизм сенсибилизирующего действия окисленных птеринов в отношении молекул восстановленных форм.

Важнейшим результатом данной части исследования стало построение серии QSAR линейных регрессионных моделей, способных предсказывать величину квантового выхода генерации синглетного кислорода (ФΔ) в зависимости от структуры птеридинов. В наибольшей степени способность птеридинов генерировать синглетный кислород коррелировала с энергией НМО Орбитали и электроотрицательностью молекул.

Таким образом, главным фундаментальным результатом диссертации стало формирование комплекса представлений о фотохимии Н₄-птериновой молекулы (на примере кофермента Н₄Бип), а также выявление роли окисленных птеринов как фотосенсибилизаторов окисления восстановленных форм. Результатом, ориентированным на практическое использование, служит разработка автором оригинального полуэмпирического подхода, позволяющего проводить предварительный (досинтетический) скрининг птеридиновых структур, а возможно и более широкого круга соединений, планируемых для тестирования и скрининга в качестве фотосенсибилизаторов и генераторов ¹O₂. Как в фундаментальном, так и практическом плане плодотворно развитие предложенной автором фотохимической модели воздействия ультрафиолета на пул птеринов в клетке. В этой связи заслуживает внимания обсуждение процесса неферментативного окисления Н₄Бип в связи с регуляцией меланогенеза и патогенезом витилиго.

Полнота опубликованности основных положений и результатов диссертации

Материал экспериментальной части полностью отражен в публикациях, отвечающих требованиям ВАК. Автором опубликованы четыре статьи в рецензируемых журналах, реферируемых WOS, а также две статьи в сборниках. Материал работы докладывался автором на девяти международных и внутрироссийских конференциях, профильных по отношению к тематике диссертации. Список публикаций и докладов свидетельствует о личном вкладе соискателя в науку.

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите

Диссертация А.А. Буглака является законченным самостоятельным исследованием. Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.04 «биохимия». Диссертация содержит решение ряда задач в одной из слабо изученных областей биохимии – фотобиохимии птеринов, важного класса биологически активных соединений. Решение задачи достигнуто с использованием современного арсенала химической и биохимической аналитики, а также методов компьютерного квантово-химического моделирования.

Рекомендация результатов к использованию

Результаты целесообразно рекомендовать к применению в практике научных исследований в области фотобиохимии и фотобиологии, а также в биомедицинских исследованиях дерматологической направленности. Результаты могут быть использованы в образовательном процессе в университетах при подготовке лекционных и семинарских курсов по фотобиохимии и фотобиологии. Предложенный в работе предварительный скрининг молекул-фотосенсибилизаторов может оказаться полезен для использования в научно-исследовательских учреждениях химико-фармакологического профиля.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Содержание диссертации, решение поставленных в диссертации задач с использованием современных методом химической и биохимической науки и интерпретация полученных результатов позволяют сделать заключение о высокой научной квалификации Андрея Андреевича Буглака, соответствующей ученой степени кандидата химических наук.

Замечания

Название «Фотобиохимия птериновых коферментов», очевидно, слишком широко, так как среди объектов фотохимического эксперимента и квантово-химических расчетов фигурирует 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 остался ряд важных птериновых коферментов, каждый из которых имеет свою структурную и функциональную специфику, и было бы не вполне корректно автоматически распространять на них представления, сложившиеся при исследовании Н₄Бип.

Рекомендация птеринов для использования в фотомедицине в качестве фотосенсибилизаторов требует более всестороннего обсуждения этого вопроса 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.

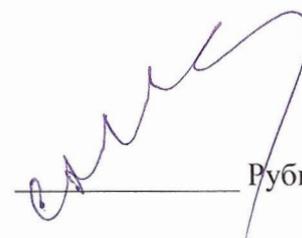
Заключение

Все представленные в диссертации результаты полностью оригинальны. Научные положения и выводы вполне обоснованы, их достоверность и новизна не вызывают сомнения. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы. Экспериментально-методическая сторона работы замечаний не вызывает. По оформлению диссертации серьезных замечаний нет.

Таким образом, диссертационная работа «Фотобиохимия птериновых коферментов», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п.9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.) Автор диссертации А.А. Буглак несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

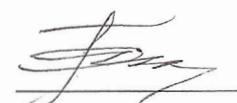
Отзыв о диссертационной работе А.А. Буглака подготовлен доктором биологических наук, профессором, ведущим научным сотрудником кафедры биофизики биологического факультета МГУ Фрайкиным Григорием Яковлевичем. Отзыв на диссертацию и автореферат заслушан и утвержден на заседании кафедры биофизики 1 сентября 2016 г. (Протокол № 9 от 1 сентября 2016 г.)

Заведующий кафедрой биофизики
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН



Рубин А.Б.

Ведущий научный сотрудник
кафедры биофизики
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук, профессор



Фрайкин Г.Я.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биофизики
119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12
E-mail: GFraikin@yandex.ru
Тел. +7(495)939-3968

22.08.2016