

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Журавлевой Юлии Сергеевны «Механизмы повреждения аминокислоты триптофан в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Современное общество и, в частности, научное сообщество давно волнуют механизмы процесса старения и, в особенности, поиск путей его предотвращения. Одним из факторов, ускоряющим старение, согласно свободнорадикальной теории старения, предложенной в середине двадцатого века, является накопление окислительных повреждений в тканях. Данный механизм играет важную роль в развитии ряда заболеваний, например, катаракты хрусталика глаза. Структурные белки являются наиболее частыми мишенями для активных форм кислорода из-за их высокой концентрации в клетках и отсутствия обновления. Примером долгоживущих белков служат белки хрусталика глаза. Остатки триптофана и тирозина в белках особенно подвержены окислительным повреждениям, так как легко окисляются. Поэтому, диссертационная работа Журавлевой Юлии Сергеевны, в которой рассмотрены молекулярные механизмы повреждения триптофана в результате радикальных реакций, которые возникают под воздействием кинуреновой кислоты ( $\text{KNAH}^-$ ), является актуальной и имеет большое научное и практическое значение.

Диссертационная работа состоит из списка используемых сокращений, введения, семи глав, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Диссертация изложена на 189 страницах и включает 21 таблицу, 68 рисунков, 14 схем. Библиография включает 280 литературных источников.

Во **Введении** обоснована актуальность научной работы, сформулированы цель и задачи работы, описана степень разработанности темы исследования, описана новизна исследований, приведена научная и практическая значимость результатов, представлены выносимые на защиту положения, достоверность и апробация результатов работы, личный вклад автора.

В **главе 1 «Обзор литературы»** представлен подробный литературный обзор фотохимических превращений аминокислотных остатков триптофана и тирозина в свободной и связанной форме, кинуренинов и продуктов их термического разложения. Во Введении обсуждено строение хрусталика глаза, состав ткани хрусталика, описано изменение белков хрусталика глаза при развитии катаракты.

**Глава 2 «Экспериментальная часть»** содержит описание используемых реагентов, подробное описание установок для измерения стационарных электронных спектров и схемы установки лазерного импульсного фотолиза для измерения наносекундных спектров нестационарного поглощения, установок для стационарного и импульсного фотолиза и методика расчета квантовых выходов фотохимических реакций. В данной главе приведены характеристики приборов, используемых для изучения продуктов фотолиза изучаемых соединений (ВЭЖХ-УФ, масс-спектрометрия, гель-электрофорез), а также детали проведения биохимических экспериментов, включая анализ ферментативной активности лизоцима (HEWL) и его ферментативного гидролиза.

В **главе 3 «Механизм реакции между триплетным состоянием кинуреновой кислоты и аминокислотой триптофан»** обсуждаются кинетика эволюции триплетного состояния кинуреновой кислоты при взаимодействии с триптофаном по данным наносекундной спектроскопии нестационарного поглощения. По результатам анализа данных сделан вывод об образовании радикалов  $\text{Trp}\cdot$  непосредственно в реакции  ${}^3\text{KNAH}^-$  и  $\text{TrpH}$  по механизму, включающему быстрый перенос электрона в качестве первой



стадии и перенос протона в радикальной клетке в качестве конечного шага. При низких значениях pH образующийся анион-радикал  $\text{KNAH}_2^{\cdot-}$  подвергается протонированию с образованием нейтрального радикала  $\text{KNAH}_3^{\cdot}$ .

В главе 4 «Влияние pH на механизмы и продукты фотоиндуцированных реакций между кинуреновой кислотой и аминокислотами триптофан и тирозин в свободном состоянии» описаны результаты исследования влияния pH на фотоиндуцированное повреждение триптофана и его производных в свободном состоянии кинуреновой кислотой. Показано, что протонирование  $\text{KNAH}_2^{\cdot-}$  с образованием  $\text{KNAH}_3^{\cdot}$  не влияет на его реакционную способность по отношению к  $\text{Trp}^{\cdot}$  и  $\text{TyrO}^{\cdot}$ . Низкие квантовые выходы деградации  $\text{KNAH}^{\cdot-}$  и  $\text{TrpH}$  и незначительное изменение состава образующихся продуктов указывают на то, что обратный перенос электронов является основным каналом гибели радикалов, образующихся под действием УФ-А света, в диапазоне pH 3–7. Выявлено, что эффективность обратного переноса электронов не меняется существенно при протонировании радикала кинуреновой кислоты.

В главе 5 «Влияние pH на механизмы и продукты фотоиндуцированных реакций между кинуреновой кислотой и аминокислотными остатками триптофана и тирозина в составе белка лизоцима» обсуждаются кинетика эволюции триплетного состояния кинуреновой кислоты при взаимодействии с аминокислотными остатками триптофана и тирозина в составе белка лизоцима HEWL и приводится анализ стабильных продуктов фотолиза данной системы. Полученные результаты демонстрируют существенное влияние белковой глобулы на исход реакций между триплетным состоянием кинуреновой кислоты и триптофанового остатка в составе белка HEWL по сравнению со свободным триптофаном в зависимости от pH среды. Показано, что фотосенсибилизированное повреждение HEWL УФ-светом приводит к одинаковой потере ферментативной активности HEWL при различном pH. Проанализированы и установлены продукты фотоповреждения HEWL.

Глава 6 «Диспропорционирование и димеризация кинуреновой кислоты под действием УФ-излучения» посвящена установлению механизма диспропорционирования и димеризации  $\text{KNAH}^{\cdot-}$  под действием УФ-А излучения. Подтверждено наличие диспропорционирования между триплетным и основным состояниями  $\text{KNAH}^{\cdot-}$  с образованием радикалов-анионов  $\text{KNAH}_2^{\cdot-} + \text{KNA}^{\cdot-}$ . Выявлено, что один из продуктов диспропорционирования,  $\text{KNA}^{\cdot-}$ , склонен к димеризации. Сделан вывод, что данные процессы эффективно протекают только в анаэробных условиях.

В главе 7 «Механизм и продукты реакции между радикалом Триптофана и супероксид-анионом» обсуждаются вторичные реакции интермедиата  $\text{Trp}^{\cdot}$  с использованием N-ацетил-триптофана,  $\text{NTrpH}$ , как производного триптофана. Выявлены основные каналы генерации и последующие реакции интермедиатов  $\text{NTrp}^{\cdot}$  и  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . На основе анализа экспериментальных данных сделано предположение, что  $\text{KNAH}_2^{\cdot-}$  и  $\text{O}_2^{\cdot-}$  могут реагировать друг с другом с образованием либо  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , либо пероксильных радикалов.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций диссертационной работы Журавлевой Ю.С. основывается на большом числе экспериментальных данных, полученных современными и разнообразными физическо-химическими методами исследований. Материалы выполненных исследований опубликованы в международных научных журналах, неоднократно докладывались на международных конференциях.

В заключении кратко сформулированы основные результаты диссертационной работы.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов и основных положений диссертации определяется высоким общим уровнем результатов исследования механизма фотохимических реакций, идентификации фотопродуктов кинуреновой кислоты и триптофана как в свободном, так и связанном с белком состоянии. Информация дополняет понимание роли условий среды в развитии различных



заболеваний, связанных с окислительным стрессом биологических тканей под действием ультрафиолетового света. В частности, полученные данные позволяют глубже понять фотопроцессы в хрусталике глаза с участием кинуреновой кислоты и триптофана, приводящим к развитию катаракты.

**Замечания:**

- 1) На Рисунке 3.1 (А) диссертации приведены кинетические кривые, отражающие ускорение протонирования образующегося нейтрального радикала триптофана в кислой среде по мере увеличения концентрации протонов в растворе. При этом при рН 2.9 характерный рост сигнала, отражающий этот процесс, исчезает. Является ли этот факт следствием того, что скорость протонирования радикала в среде с низким значением рН достигла настолько высоких значений, что не может быть разрешима в эксперименте? Не может ли это быть следствием изменения механизма тушения в сильнокислой среде?
- 2) Раздел 3.2. Стр. 50-51. При установлении механизма реакции между  ${}^3\text{KNAH}^-$  и TrpH в разделе 3.2. вначале следовало бы обсудить спектр нестационарного поглощения (ТА), а затем приводить зависимости кинетических кривых от рН.
- 3) Раздел 3.2. Стр. 53. Стоило бы измерить спектры нестационарного поглощения (ТА) при различных рН аналогично кинетическим кривым для подтверждения предложенного механизма.
- 4) В разделе 5.2 титрование катион-радикала триптофана в составе белка лизоцима было проведено в приближении существования лишь одного кислотно-основного равновесия. Говорит ли это о том, что в реакции между триплетным состоянием кинуреновой кислоты и белком радикальный центр в составе белка образуется лишь на одном виде аминокислотных остатков триптофана? Если это так, то каким образом можно объяснить тот факт, что среди поврежденных продуктов присутствует несколько разных аминокислотных остатков триптофана?
- 5) Для установления механизма УФ-индуцированного диспропорционирования  $\text{KNAH}^-$  в разделе 6.2 при измерении спектров нестационарного поглощения ТА использована лазерное излучение с энергией импульса 5 мДж, а кинетические кривые на 590 нм были получены для двух энергий - 1 и 3 мДж. Чем обусловлено использование меньших энергий импульса при измерении кинетических кривых? Стоило бы измерять спектры ТА и кинетические кривые при одной энергии импульса накачки, а также получить зависимость амплитуды ТА спектров и их формы от мощности с использованием ещё нескольких значений энергии импульса. Как бы выглядело при этом значение амплитуды ТА от мощности в рамках предложенного механизма?
- 6) В Главе 7 диссертации выход супероксида в реакции окисления радикала кинуреновой кислоты кислородом был оценен с помощью кинетической схемы реакций, согласующейся наилучшим образом с экспериментальными кинетиками гибели радикала триптофана. В то же время вывод о неполном восстановлении  $\text{KNAH}^-$  в этой реакции был изначально сделан на основе наблюдения выгорания основного состояния вещества в спектре промежуточного поглощения. Возникает вопрос, почему выход супероксида не был рассчитан на основе спектральной информации о выгорании/восстановлении  $\text{KNAH}^-$ , что выглядит намного более простым подходом, нежели использование сложной аппроксимации кинетических данных.

Вышеуказанные замечания, однако, не искажают сущности изложенных в диссертации результатов, положений и выводов, не снижают общую положительную оценку научного уровня работы и носят скорее рекомендательный характер. Диссертационная работа Журавлевой Ю.С. представляет собой целостный научный труд,




ее результаты имеют научную и практическую значимость. Автором диссертации, несомненно, достигнута поставленная в работе цель.

Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации.


В целом, можно заключить, что диссертационная работа *«Механизмы повреждения аминокислоты триптофан в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой»* соответствует требованиям «Положениям о присуждении ученых степеней» п. II «Критерии, которым должны отвечать диссертации на соискании ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 (в текущей редакции), а её автор *Журавлева Юлия Сергеевна* заслуживает присуждение ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

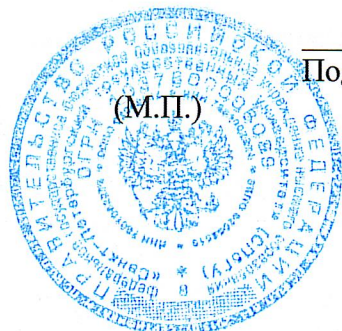
Официальный оппонент,  
Мерещенко Андрей Сергеевич  
доктор химических наук, специальность 02.00.09 - Химия высоких энергий  
доцент кафедры лазерной химии  
и лазерного материаловедения,  
Институт Химии,  
Санкт-Петербургский государственный университет  
198504, Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский проспект, д. 26.  
Телефон: +79516775465  
Электронная почта: a.mereshchenko@spbu.ru

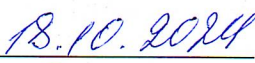
Я, Мерещенко А.С., согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

  
\_\_\_\_\_/Мерещенко А.С./  
Подпись

«Подпись Мерещенко А.С. заверяю»  
И.О. начальника отдела кадров №3  
Санкт-Петербургского государственного университета

  
\_\_\_\_\_/Константинова И.И./  
Подпись



  
\_\_\_\_\_  
Дата

Текст документа размещен  
в открытом доступе  
на сайте СПбГУ по адресу  
<http://spbu.ru/science/expert.htm>

Документ подготовлен  
в порядке исполнения  
трудовых обязанностей