



"УТВЕРЖДАЮ"  
Директор ИБХФ РАН  
д.х.н. профессор

И. Н. Курочкин  
"02" октября 2024 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) на диссертационную работу Журавлевой Юлии Сергеевны "Механизмы повреждения аминокислоты триптофан в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой", представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

**Актуальность работы.** Известно, что необратимые окислительные повреждения компонентов живых тканей приводят к возрастной потере функций органов, поэтому исследование процессов повреждения биомакромолекул и их низкомолекулярных составляющих под действием активных форм кислорода (АФК) и способов замедления этих процессов является актуальной задачей. В диссертационной работе Журавлевой Ю.С. рассматриваются проблемы, относящиеся к важной части общей проблемы окислительных повреждений биомакромолекул, а именно, повреждению белковых молекул и составляющих их аминокислот под действием АФК. Наиболее уязвимыми аминокислотными остатками в составе белков являются остатки триптофана (TrpH) и тирозина (TyrOH). Сложный состав клеток и малая концентрация радикалов в тканях затрудняют исследование этих реакций *in vivo*. Поэтому часто используют модельные системы для генерации радикалов с применением фотосенсибилизаторов (ФС). В «Международном томографическом центре» СО РАН под руководством профессора Ю.П. Центаловича было показано, что метаболит хрусталика глаза кинуреновая кислота (КНАН<sup>-</sup>) является высокоэффективным ФС. Поэтому использование КНАН<sup>-</sup> в качестве ФС для исследования радикальных реакций индивидуальных аминокислот и их остатков с АФК является вкладом в решение общей проблемы окислительных повреждений биологических объектов, а также может рассматриваться как конкретная задача, имеющая отношение к старению хрусталика глаза и развитию катаракты.

**Цель работы.** Исследование механизмов и продуктов повреждения аминокислоты TrpH в свободном состоянии и аминокислотного остатка TrpH в составе модельного белка в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой *in vitro*.

**Содержание работы.** 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 (из них 11 в приложении), 68 рисунков (из них 38 в приложении), 14 схем (из них 1 в приложении). Библиография включает 280 литературных источников (из них более четверти опубликовано за последние 10 лет).

Во **введении** обосновывается актуальность проведенного исследования, формулируются его цели, новизна полученных результатов, их практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** состоит из пяти частей и посвящен современным представлениям о радикальных реакциях аминокислот и аминокислотных остатках триптофана и тирозина, строению хрусталика глаза как удобной модели для исследования последствий радикальных реакций, кинуренинах, которые синтезируются из аминокислоты триптофан, о термических и фотохимических реакциях кинуренина и кинуреновой кислоты. Литературный обзор полно отражает как исторический аспект рассматриваемых вопросов, так и современное состояние научного знания по этим проблемам. К сожалению, в конце литературного обзора слишком расплывчато формулируются задачи диссертационной работы, которые должны следовать из проведенного обзора литературы.

**Экспериментальная часть** диссертационной работы Журавлевой Ю.С. изложена на 7 страницах. В 11 подразделах описываются используемые методы исследования. Наряду с традиционными стационарными методами спектроскопии и фотохимии, в работе используется время-разрешенный метод импульсного лазерного фотолиза с микросекундным разрешением. Широко используются современные биохимические методы анализа белков и пептидов, в том числе электрофорез и различные модификации масс-спектрометрического анализа белков и пептидов. Подробное описание всех этих методов приводится в диссертации.

В **главе 3** представлено детальное исследование механизма реакции между триплетным состоянием кинуреновой кислоты и аминокислотой триптофан. Сопоставление реакции тушения триплета в водных растворах при различных pH, а также в среде H<sub>2</sub>O и D<sub>2</sub>O позволило сделать вывод о том, что реакция протекает по механизму последовательного переноса электрона и протона (proton-coupled electron transfer, PCET) с образованием нейтрально заряженного радикала TrpH, что имеет важные биологические последствия, а именно, этот механизм не приводит к образованию заряженных промежуточных продуктов в белковой среде, и нейтральные радикалы TrpH в меньшей

степени проявляют окислительные свойства, т.е. являются менее опасными интермедиатами.

Исследование механизма фотоиндуцированной реакции кинуреновой кислоты с аминокислотами триптофаном и тирозином в свободном состоянии в зависимости от pH представлено в **главе 4**. На основании этого исследования сделан вывод о том, что обратный перенос электрона является основным каналом гибели радикалов, образующихся под действием облучения в широком диапазоне pH и было показано, что реакция обратного переноса электрона в случае протонированной формы радикала триптофана протекает с более высокой константой скорости, что, как следствие, приводит к дополнительному снижению степени повреждения триптофана при низких значениях pH.

В **главе 5** на основе результатов, полученных в главах 3 и 4, рассмотрены эти процессы в более сложной системе фотоиндуцированных реакций между кинуреновой кислотой и аминокислотными остатками триптофана и тирозина в составе белка лизоцима (HEWL). Полученные результаты демонстрируют влияние белковой глобулы на радикальные реакции между  $\text{KNAH}^\cdot$  с аминокислотными остатками триптофана и тирозина в составе белка. Это влияние проявляется в незначительном изменении константы скорости обратного переноса электрона между радикалом  $\text{KNAH}^\cdot$  и радикалом  $\text{TgrH}$  в составе HEWL при уменьшении pH, что обусловлено pH-индуцированными изменениями доступности остатков аминокислот и изменениями кулоновских взаимодействий заряженных частиц. По сравнению со случаем аминокислот в свободном состоянии, для радикальных реакций  $\text{TgrH}$  и  $\text{TyrOH}$  в составе белковой молекулы повышается конкуренция между реакциями димеризации и ковалентного присоединения атома кислорода к аминокислотным остаткам с образованием т.н. оксигенированных форм. Интересным фактом, отмеченным в диссертации, является одинаковая потеря ферментативной активности HEWL, облученного в водных растворах при pH 7 и 5, несмотря на разный характер образующихся модификаций белка.

В **главе 6** подтверждено существование реакции диспропорционирования между основным и триплетным состоянием  $\text{KNAH}^\cdot$ . Эта реакция эффективно протекает в анаэробных условиях. Однако, вследствие низкого содержания  $\text{KNAH}^\cdot$  в хрусталике, фотоиндуцированное диспропорционирование и последующее образование димеров  $\text{KNAH}^\cdot$  являются маловероятными процессами.

В **главе 7** применен элегантный метод исследования механизма и продуктов реакции между радикалом триптофана и супероксид-анионом ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) с использованием  $\text{KNAH}^\cdot$  в качестве фотосенсибилизатора. Использование комплекса экспериментальных

методов показало, что реакция радикала триптофана с  $O_2^{\bullet-}$  протекает с выходом оксигенированных форм TrpH около 100%, что делает эту реакцию источником повреждений TrpH. При этом было обнаружено, что KNAH<sup>-</sup> является менее эффективным генератором  $O_2^{\bullet-}$ , чем предполагалось ранее.

Диссертационная работа содержит **Приложение** на 44 страницах, в котором представлен большой массив экспериментальных данных и математического обоснования расчетов кинетических параметров, представленных в основной части. Это, с одной стороны, облегчает чтение основного материала диссертации, а с другой, демонстрирует большой объем работы, проведенной диссертантом.

Раздел **Основные результаты и выводы** обобщает в краткой форме достигнутые результаты и основные заключения, которые следуют из работы.

Что касается замечаний, то надо отдать должное диссертанту. В диссертации отмечены проблемы, которые не удалось разрешить на этом этапе работы и поставлены задачи для их разрешения. Это относится, например, к расхождению расчетов на основе анализа схемы реакций и экспериментальных значений выходов продуктов фотолиза триптофана (Глава 7, §7.6). Недостатком автореферата является несоответствие нумерации частей автореферата главам диссертации. В работе есть стилистические погрешности, особенно в автореферате. Очень частое употребление слова «данный» вместо «этот», например, в двух последних предложениях обзора оно употребляется 4 раза, когда можно было обойтись вообще без него.

Проведенное Журавлевой Ю.С. исследование отличается полнотой, в работе были использованы объекты с разным уровнем организации: от гомогенных растворов низкомолекулярных соединений до растворов белковых молекул. Диссертационная работа представляет интересное экспериментальное исследование, выполненное с использованием комплекса современных физических, физико-химических и биохимических методов. Особо следует отметить блестящее владение диссертантом современными методами обработки кинетических данных для сложных многостадийных реакций. **Достоверность полученных результатов и их обработка** не вызывают сомнения. Отмеченные в отзыве замечания не затрагивают существа работы. Выводы, сделанные автором на основании результатов диссертационной работы, соответствуют представленным данным. Полученные в ходе работы результаты могут быть рекомендованы к использованию в академических научно-исследовательских коллективах физического, физико-химического и биологического профиля, а также в медико-биологических исследованиях.

Опубликованные по результатам диссертации статьи в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, а также автореферат полно отражают содержание диссертации. Работа прошла апробацию на престижных всероссийских и международных конференциях.

Диссертационная работа Журавлевой Ю.С. "Механизмы повреждения аминокислоты триптофан в результате радикальных реакций, фотоиндуцированных кинуреновой кислотой" представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, соответствующую критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 04.09.2013 г. № 842 ред. от 26.01.2023), а ЖУРАВЛЕВА Юлия Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Отзыв на диссертационную работу Журавлевой Ю.С. был заслушан и утвержден на объединенном научном семинаре по фотохимии и биофизике ФГБУН Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН. Протокол № 5 от 25 сентября 2024 г.

Отзыв подготовила Некипелова Татьяна Дмитриевна  
Главный научный сотрудник  
Лаборатории процессов фотосенсибилизации  
ИБХФ РАН, д.х.н.



Татьяна Дмитриевна Некипелова

Москва, 119334, ул. Косыгина 4

Тел.: 8(495)939-7336, e-mail: nekip@sky.chph.ras.ru

Ученый секретарь ИБХФ РАН к.б.н.



 /С.И. Скалацкая/