

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Панова Михаила Сергеевича

«Косвенное детектирование короткоживущих интермедиатов реакций с участием биологически важных молекул методом импульсного ЯМР ^1H и ^{13}C », представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Представленная работа посвящена изучению методиками спиновой химии и ядерного магнитного резонанса строения и свойств короткоживущих парамагнитных интермедиатов биологически важных молекул в водных растворах. Поскольку другими методами охарактеризовать эти частицы трудно, а исследованные свободные и ион-радикалы участвуют во многих процессах в живых системах, то актуальность поставленной задачи не вызывает сомнения. Отметим, что согласно мировой литературе, роль свободно радикальных процессов в живых системах весьма велика, но большинство проведенных исследований касаются т.н. ROS (reactive oxygen species). В отличие от работ, посвященных активным кислородным радикалам, и выполненных методом ЭПР со спиновыми ловушками, в диссертации М.С. Панова проводятся исследования мало изученных свободных и ион-радикалов, для которых методики ЭПР не всегда информативны. Это же относится и к оптическим методам детектирования парамагнитных частиц в биологических системах, применение которых, как известно, возможно только при наличии хромофора в объекте исследования. Между тем радикальные процессы, описываемые в настоящей диссертации, являются моделями для важных в биологии процессов окисления остатков аминокислот в биомолекулах. Эти реакции, в частности, лежат в основе окислительного разрушения белков, считающегося в настоящее время причиной ряда болезней, как-то: окислительный стресс, приводящий к атеросклерозу и диабету, а также болезни Паркинсона и Альцгеймера, глазные катаракты, и многие другие недуги. Особенность цикла работ, выполненных Пановым, состоит в том, что автор в ходе исследований развивает уже имеющиеся в МГЦ количественные методы для определения величин констант сверх тонкого взаимодействия (СТВ) и g -факторов радикальных форм биологически значимых молекул, а также разрабатывает оригинальные методики. Например, позволяющие регистрировать химическую поляризацию углерода ^{13}C в образцах с естественным содержанием этого изотопа, или демонстрирует первый пример наблюдения химической поляризации протонов в твердой фазе.

Таким образом, можно признать, что проведенное М.С. Пановым исследование является не только актуальным, но и весьма своевременным, и, несомненно, будет востребовано специалистами в области физической химии и биохимии.

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка используемых сокращений, списка литературы и приложения. Полный объем диссертации составляет 139 страниц с 71 рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 215 наименований.

Во введении детально обоснована постановка задачи и способы ее решения, актуальность исследования, научная новизна, практическая и теоретическая значимость, перечислены выносимые на защиту положения, приведены сведения о достоверности, личном вкладе соискателя, а также об апробации работы и публикациях.

Первая глава представляет собой литературный обзор, по теме диссертации, состоящий из пяти разделов. Первый раздел посвящен полностью описанию явления химической поляризации ядер (ХПЯ), её объяснению в рамках теории радикальных пар и экспериментальному наблюдению. Во втором разделе описаны когерентные эффекты, а именно механизмы перераспределения спиновой поляризации в т. н. сильно связанных системах, в частности, в области антипересечения уровней спиновой системы в магнитном поле. Третий раздел обзора включает описание физико-химических свойств используемых в работе соединений. Четвертый и пятый разделы посвящены краткому описанию результатов исследования эксцизионной репарации ДНК, в частности, изучению динамики раскрытия двойной спирали ДНК.

Во второй главе детально описываются экспериментальные методики, используемые автором. Несомненным достижением работы является комплементарное сочетание методик времяразрешенной ХПЯ и зависимости эффективности ХПЯ от напряженности внешнего магнитного поля, позволяющее определять магниторезонансные параметры партнеров радикальных пар.

Третья глава содержит описание полученных в работе результатов и их обсуждение. Она разбита на шесть разделов. В первом разделе на примере гиперполяризации, зарегистрированной в процессе фотоиницированного взаимодействия тетракарбокисбензофенона и *n*-бутиламина, детально описываются эффекты перераспределения неравновесной заселенности между спиново связанными протонами амина. Эти когерентные эффекты перераспределения поляризации проявляются, как правило, в слабых магнитных полях, когда выполняются условия сильного связывания, а именно, когда различия в частотах Ларморовской прецессии соседних ядер оказываются меньше, чем энергии спин-спинового взаимодействия. В таких случаях гиперполяризация оказывается на ядрах, не имеющих заметных констант СТВ. В диссертации наглядно продемонстрирована необходимость учета когерентного переноса поляризации при анализе наблюдаемых эффектов ХПЯ. Это позволит избежать неправильной интерпретации данных, с одной стороны, а с другой может помочь визуализировать

короткоживущие диамагнитные продукты за счет усиления гиперполяризацией их сигналов в спектре ЯМР.

Следующие два раздела посвящены собственно исследованиям фотоиницируемых реакций окисления тетракарбокисбензофеноном и его неполностью замещенными аналогами ряда аминокислот: L-тирозина, L-гистидина, S-метил цистеина, и S-метил глутатиона (Приводится номенклатура, используемая в диссертации). Цель этого исследования получить портреты радикальных частиц, участвующих в процессах окисления в живых системах с помощью анализа эффектов ХПЯ в модельных реакциях фотоокисления. Для достижения этой цели диссертант выбрал следующую стратегию. На первом этапе, на примере системы с ранее установленными магниторезонансными параметрами для одного интермедиата были определены такие же характеристики для партнеров - ряда карбоксизамещенных бензофенонов. Для этого количественно анализировались эффекты времязрешенной ХПЯ (TR ХПЯ) при варьировании условий: рН растворов и временных задержек TR ХПЯ. Константы СТВ карбоксизамещенных бензофенонов, полученные из анализа данных ХПЯ, сравнивались с результатами расчетов методом функционала плотности. Для определения g-фактора использовался анализ зависимости эффектов ХПЯ от напряженности внешнего магнитного поля. Далее с помощью полученной информации исследуется фотоокисление гистидина в результате которого было показано, что процесс проходит через стадии последовательного переноса электрона и протона, и в зависимости от кислотности среды партнером может выступать один из трех радикальных интермедиатов карбоксизамещенного бензофенона, или они все вместе с равными вероятностями. При исследовании фотоиндуцированного окисления практически важных серосодержащих аминокислот - S-метил цистеина и S-метил глутатиона автору приходится делать выбор между обсуждаемыми в литературе вариантами строения парамагнитных интермедиатов: радикалами с трехцентровой связью «азот-сера», или «кислород-сера», а также парамагнитными димерами. М.С. Панов решает эту задачу имея в своем распоряжении только гиперполяризацию исходной аминокислоты, образованную в акте обратного переноса электрона в радикальной паре с анион-радикалом тетракарбокисбензофенона. На основании анализа различий в кинетике TR ХПЯ протонов S-метил цистеина и S-метил глутатиона, связанных с присутствием или отсутствием вклада электронного обмена в наблюдаемую поляризацию при двух значениях рН среды, автор может судить об образовании при определенных рН промежуточных циклических радикалов. Эффекты ХПЯ указывают на образование именно «кислород-сера» содержащих циклических радикалов, а сравнение экстремумов экспериментальных полевых зависимостей с расчетными, подтверждают этот вывод.

Таким образом, выводы этой части работы ставят точку в длительной дискуссии о природе биологически важных серосодержащих радикалов.

Следующий пятый раздел посвящен решению ещё одной важной для биологии задачи: применению динамического ЯМР для изучения процессов обратимого раскрытия двойной спирали тридекамерных ДНК дуплексов, содержащих химически модифицированные основания. Эти азотистые основания моделируют повреждения, которые в живых системах репарируются ферментом алкиладенин ДНК гликозилазой по неустановленному на сегодняшний день механизму. Диссертант пытается установить насколько важную роль в процессе репарации играет динамика раскрытия цепи - выведения из двойной спирали модифицированных оснований. Устойчивость двойной спирали была изучена с помощью анализа скоростей обмена иминных протонов азотистых оснований в модифицированных и канонических дуплексах с протонами воды. Отметим, что обмен возможен только для выведенных из двойной спирали оснований. В диссертации, с использованием разработанных ранее в литературе методик, измерены отношения констант равновесия спонтанного выворачивания двух типов азотистых оснований. Сравнение с кинетическими данными для ферментативного гидролиза гликозидной связи тех же оснований показало, что конформационная устойчивость ДНК не является лимитирующей стадией процесса репарации.

И, наконец, в последнем, шестом разделе, приводится первый пример протонной твердотельной ХПЯ. Эффект зарегистрирован при УФ облучении с одновременным вращением под магическим углом замороженного образца - раствора кетона - циклогексанона в диоксане. ХПЯ демонстрирует альдегидный протон продукта фотолиза - гексанала. Наблюдение гиперполяризации протонов в твердом теле может быть важным для медицины фактом, поскольку открывает новые возможности для ЯМР исследований биологических материалов, представляющих собой организованную среду, например, коллагена.

Наиболее важными оригинальными результатами, полученными в работе М.С. Панова следует признать:

1. Использование совместного анализа данных двух типов химической поляризации: времяразрешенной и зависящей от напряженности внешнего магнитного поля, включая ХПЯ ^{13}C , которое позволило определить константы СТВ, g-факторы и времена ядерной релаксации радикальных форм тетразамещенного бензофенона и его аналогов. Таким образом, были впервые, охарактеризованы все активные парамагнитные формы 3,3',4,4'-тетракарбоксивензофенона - соединения, которое широко используется в качестве акцептора при моделировании окислительно - восстановительных взаимодействий в биологических процессах.

2. Первое наблюдение спектра ХПЯ ^{13}C на природном содержании магнитного изотопа, из анализа которого определены относительные величины констант СТВ на ядрах ^{13}C .
3. Использование полученных характеристик парамагнитных форм тетракарбокситетрагидроксибензофенона для детального описания окислительно - восстановительных процессов с участием биологически важных молекул L -гистидина, S-метил-L-цистеина, S-метил глутатиона, включающих последовательный перенос электрона и протона. При этом описано строение и определены магниторезонансные параметры свободных радикалов гистидина, S-метил цистеина и S-метил глутатиона.
4. Представляют немалый интерес также полученные автором данные о когерентном переносе поляризации в фотоиндуцированной реакции тетракарбокситетрагидроксибензофенона с н-бутиламином, Описание этого явления в модельной системе будет весьма полезным для корректной интерпретации эффектов ХПЯ в произвольных магнитных полях в других системах, включая реакции биологически важных соединений.
5. Впервые зарегистрированный эффект ХПЯ на протонах в твердой фазе, полученный при вращении образца замороженного циклогексана под магическим углом.

Таким образом, представленная диссертационная работа содержит результаты, которые демонстрируют возможность существенного расширения области использования методик ЯМР по косвенному детектированию короткоживущих радикалов при исследовании биологически важных процессов.

К сожалению, диссертационная работа не лишена недостатков. К недостаткам работы следует отнести немногочисленные, но досадные небрежности в оформлении. Так, на очень важных для понимания рисунках 47 и 51 присутствуют только оси. А на рисунке 3 в автореферате данные обозначены разными цветами, что невозможно увидеть в черно-белой печати.

Другой проблемой является язык, которым написана работа. Текст так изобилует жаргоном, что зачастую не позволяет читателю понять, что, собственно, имеет в виду автор. В качестве примера можно использовать первый вывод работы:

«Был обобщен подход к анализу геминальной ХПЯ, основанный на учете вклада в ^1H ХПЯ от трех радикальных пар на геминальной стадии, с его помощью в реакции ТСВР с гистидином и тирозином был уточнен механизм реакции на геминальной стадии – это перенос электрона, и перенос электрона, связанный с переносом протона на одну из карбоксильных групп. Формирование кетильного радикала в результате таутомерных переходов происходит на более длинной (микросекундной) временной шкале, что подтверждается данными ^{13}C ХПЯ».

Даже если не обсуждать стилистику, остается непонятным, о каком обобщении идет речь, можно только предполагать, что это совместный анализ времязрешенной ХПЯ и ее

полевой зависимости. Последняя фраза этого вывода представляется совсем загадочной, а ведь это очень важный результат, который мог бы объяснить описанные в литературе неопределенности, возникающие при интерпретации ХПЯ в реакциях с участием кетильного радикала не только бензофенона, но и практически важного его аналога - кетопрофена.

Такие примеры можно было бы продолжить, но оппонент ограничится только несколькими упоминаниями жаргона, которым просто переполнен текст диссертации: «Резонанс протонов воды селективно переворачивается...» (стр. 46); «Гистидин часто встречается вблизи активного центра ферментов в качестве лиганда из-за его свойств протонирования» (стр. 75); «катион-радикал Cys(Me), сформированный в результате тушения триплета» (стр. 85); «Концентрационная зависимость вероятности формирования $(S \cdot S)^+$ радикала может объяснить, почему эти радикалы не проявляют себя в настоящем исследовании» (стр. 94).

Тем не менее, общее впечатление от работы только положительное, упомянутые недостатки ни в коей мере не умаляют ценности полученных результатов. Диссертация содержит тщательно измеренные экспериментальные данные, не позволяющие усомниться в их достоверности. Сделанные выводы вполне обоснованы. Защищаемые положения содержат оригинальные результаты и не противоречат существующим фундаментальным достижениям в исследуемой области. Диссертационная работа Панова М.С. представляет собой законченное исследование, название работы соответствует ее содержанию, автореферат и опубликованные статьи правильно и полно отражают содержание диссертации. На основе полученных результатов опубликовано шесть научных статей в рецензируемых международных журналах, рекомендованных ВАК, и сделано восемь докладов на международных конференциях. Все это доказывает, что автор диссертации является зрелым исследователем, способным ставить научные задачи в области физической химии и химической физики и решать их.

Считаю, что диссертационная работа «*Косвенное детектирование короткоживущих интермедиатов реакций с участием биологически важных молекул методом импульсного ЯМР 1H и ^{13}C* » отвечает критериям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Панов Михаил Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 01.04.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

