

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Зинатуллиной Карины Марсовны «Кинетика и механизм радикальных реакций гидрофильных тиолов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия

Актуальность темы диссертации.

Природные тиолы, полифункциональные эндогенные соединения, оказывают многофакторное влияние на клеточный окислительно-восстановительный метаболизм, антиоксидантную защиту и передачу сигналов, а также нейтрализуют активные формы кислорода (АФК) и регулируют конформацию белков посредством тиол-дисульфидного обмена. Однако для этих реакций в литературе не представлена системная информация о механизмах этих процессов и влиянии среды, хотя количественная информация о реакционной способности тиолов могла бы быть использована в синтетической биологии для промышленных и фундаментальных применений, начиная от биокомпьютеров и заканчивая производством лекарств. Более того, включение тиолов в биологические системы позволит разнообразить функциональные свойства создаваемых объектов. Поэтому задача диссертационной работы выявить кинетические закономерности и механизм радикальных реакций гидрофильных тиолов с активными формами кислорода в водных растворах и выяснить влияние среды на эти реакции является актуальной и обоснованной.

Научная новизна и теоретическая значимость диссертационной работы Зинатуллиной К.М. заключается в детально изученном механизме реакций тиолов с АФК в деионизированной воде, что позволило далее выявить и количественно оценить влияние рН и отдельных биологически значимых катионов на эти реакции. Принципиально новым является установление образования тиольных радикалов в реакции тиолов с H_2O_2 при $pH < 7$ и инициирование тиол-ен реакций с ненасыщенными соединениями. Для реакции глутатиона с ресвератролом, имеющим ненасыщенную связь в боковой цепи, в присутствии H_2O_2 определены кинетические закономерности в деионизированной воде и предложена кинетическая модель этой реакции. Результаты диссертационного исследования

К.М. Зинатуллиной существенно расширяют фундаментальные представления о механизме реакций природных тиолов с АФК и другими биоантиоксидантами.

Полученные количественные данные, разработанные и экспериментально обоснованные кинетические модели взаимодействия тиолов с АФК представляют **практическую значимость** как для прогнозирования и оценки воздействия на живые организмы совместного действия тиолов с биоантиоксидантами и фармпрепаратами в условиях окислительного стресса, так и для конструирования биоподобных объектов в синтетической биологии. Водорастворимый анионный полиметиновый краситель, использованный в работе, можно использовать в качестве акцептора радикалов для оценки антирадикальной активности методом конкурирующих реакций и определения скоростей инициирования радикалов методом ингибиторов в водных средах.

Структура и основное содержание работы.

Диссертационная работа К.М. Зинатуллиной построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, три главы, в которых представлены результаты исследования и их обсуждение, а также заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список цитируемой литературы, содержащий 309 источников. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 45 рисунками, содержит 19 таблиц и 3 схемы.

Во введении представлены обоснование актуальности исследования, степень разработанности темы, четко сформулированы цель и основные задачи работы, описана теоретическая и практическая значимость работы, а также степень достоверности результатов работы и перечислено большое число конференций разного уровня, на которых автор представляла результаты своей работы.

В литературном обзоре (глава 1) приведены основные сведения о теории жидкофазного окисления липидов, механизмах действия антиоксидантов разных типов. Изложены данные о содержании тиолов в живых организмах и их физиологическом действии, взаимосвязи с различными заболеваниями; кратко рассмотрено применение тиолов в качестве БАДов и лекарственных средств. Обобщены имеющиеся экспериментальные и теоретические данные о физико-

химических свойствах природных тиолов, кинетике и механизме реакций природных тиолов с радикалами и пероксидами.

В экспериментальной части (глава 2) представлены материалы и методы, использованные при проведении исследований, описаны методики проведения экспериментов и методы анализа, подробно описан выбор анионного полиметинового красителя в качестве акцептора радикалов для водных растворов.

В главах 3–5 приводятся основные результаты исследований и их обсуждение.

В главе 3 представлена оценка антирадикальной активности эндогенных тиолов цистеина, гомоцистеина и основного биоантиоксиданта глутатиона, а также синтетического тиола *N*-ацетилцистеина и растительного фенола ресвератрола (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен), который автор далее использовала в модельной тиол-ен реакции глутатион-ресвератрол в присутствии H_2O_2 . Антирадикальную активность характеризовали величиной константы скорости взаимодействия с пероксильными радикалами, которую определяли методом конкурирующих реакций с полиметиновым красителем в качестве акцептора радикалов. Определение спектрально-кинетических характеристик выбранного красителя, позволило рассчитать константы скорости реакций тиолов с пероксильными радикалами, которые характеризуют тиолы и ресвератрол, как ингибиторы умеренной силы.

В главе 4 детально исследованы кинетические особенности реакции тиолов с H_2O_2 в деионизированной воде. Впервые установлено образование свободных радикалов при взаимодействии тиолов с H_2O_2 . Сначала методом ингибиторов зарегистрировано их образование и определены скорости генерирования радикалов при взаимодействии с H_2O_2 . Затем методом ЭПР с использованием спиновой ловушки DMPO установлено, что в реакции глутатиона и *N*-ацетилцистеина с H_2O_2 образуются тиольные радикалы. Несмотря на небольшой выход радикалов в этой реакции, показано, что его достаточно для инициирования тиол-ен реакций глутатиона с ненасыщенными соединениями. Проведено детальное исследование кинетических закономерностей реакции глутатиона с ресвератролом в присутствии H_2O_2 и изучен состав образующихся продуктов методом масс-спектрометрии. На основе полученных экспериментальных и литературных данных разработана кинетическая модель взаимодействия глутатиона с ресвератролом в присутствии

H_2O_2 , которая хорошо описывает особенности кинетики процесса в широком диапазоне концентраций реагентов в водной среде при физиологической температуре.

Из анализа кинетических кривых расходования реагентов автор установила, что в реакции с пероксильными радикалами и с ресвератролом в присутствии H_2O_2 глутатион и *N*-ацетилцистеин проявляют близкую активность. Измерение тепловыделения в реакциях глутатиона и *N*-ацетилцистеина с H_2O_2 , взятых в стехиометрическом соотношении 2:1, методом изотермической калориметрии показало практическое совпадение кинетики тепловыделения и изменения удельных скоростей тепловыделения для этих тиолов. Это указывает на относительную автономность связей S-H и S-S в тиолах и дисульфидах, на которые не оказывают влияния другие группы в молекуле, и позволяет заключить, что *N*-ацетилцистеин можно рассматривать как кинетический аналог глутатиона в реакциях с активными формами кислорода.

В главе 5 выявлена сильная зависимость скорости реакций глутатиона и других тиолов с пероксильными радикалами и H_2O_2 от pH: в фосфатных буферных растворах при $pH > 7$ увеличивается конкурентная активность тиолов) в реакциях с пероксильными радикалам, а скорость реакции глутатиона с H_2O_2 , которая относительно мало меняется в диапазоне pH 3-5, резко увеличивается при $pH \geq 7$. В диапазоне физиологических pH 6,8-7,4 скорость реакции глутатиона с H_2O_2 описывается экспоненциальной зависимостью от pH: $\lg W_{TSH} = \text{const} + pH$. При этом изменяется механизм реакции: при $pH \geq 7$ не образуются радикалы, а лимитирующей стадией процесса является реакция тиолат-аниона с H_2O_2 . В работе на примере окисления метиллинолеата в мицеллярном растворе продемонстрировано, что сильное влияние pH на реакционную способность тиолов в реакциях с АФК ярко проявляется в окислении липидов, ингибированном глутатионом, что, несомненно, следует учитывать при использовании тиолов как антиоксидантов. Проведена оценка влияния однозарядных биологически значимых катионов на реакционную способность глутатиона в реакции с H_2O_2 . При одинаковых pH растворов 7,35 скорость расходования глутатиона в реакции с H_2O_2 по сравнению с деионизированной водой увеличивается в фосфатных буферах, но по-разному в натрий-солевом фосфатном буфере PBS, натриевом и калиевом

фосфатных буферах. Показано, что ионы K^+ специфически взаимодействуют с глутатионом: увеличивают скорость окисления глутатиона пероксидом водорода, но при этом уменьшают выход радикалов в этой реакции по сравнению с катионами Na^+ и ацетилхолина (R_4N^+).

В Заключении автор подводит итоги исследования, обобщая полученные результаты. Выводы диссертационной работы логично вытекают из полученных данных, адекватны и обоснованы, соответствуют поставленным задачам.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Научные положения и выводы диссертационной работы К.М. Зинатуллиной базируются на обширном экспериментальном материале, полученном с использованием комплекса современных методов физико-химического исследования (метод кинетической УФ-спектрофотометрии, методы ЭПР и масс-спектропии, метод изотермической калориметрии, компьютерное моделирование). Применение перечисленных методов обеспечивает надежность и достоверность полученных результатов.

Результаты работы опубликованы в 10 статьях в рецензируемых журналах, включенных в Перечень ВАК, 12 статьях в сборниках научных статей и были представлены на 26 всероссийских и международных конференциях.

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, дает полное представление об основных положениях диссертации и соответствует ее содержанию.

Вопросы и замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе К.М. Зинатуллиной нет. Замечания не принципиального характера:

1. Хотелось бы видеть подтверждение образования продуктов в тиол-ен реакции глутатиона с ресвератролом, полученные и другими методами, помимо масс-спектрометрии, например, ЯМР-спектроскопией.
2. Встречаются ошибки и опечатки; например, на рисунке 2.4б стр. 46 время, по-видимому, измерялось в секундах; на рисунке 4.3 стр. 64 перепутаны обозначения кривых 1 и 3.

Следует подчеркнуть, что замечания носят лишь частный характер и ни в коем случае не умаляют достоинств диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Зинатуллиной Марины Марсовны «Кинетика и механизм радикальных реакций гидрофильных тиолов», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия, является самостоятельной цельной законченной научно-квалификационной работой. По своей актуальности, научной новизне, содержанию, объему и уровню проведенных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, научной и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор, Зинатуллина Карина Марсовна, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.4.4. Физическая химия.

Официальный оппонент:

Член-корреспондент РАН, доктор химических наук (специальность 02.00.03 – Органическая химия), заведующий лабораторией исследования гомолитических реакций № 13 ФГБУН Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 47. Тел.: +7 (499) 137-29-44, факс: +7 (499) 135-53-28, e-mail: terentev@ioc.ac.ru

Терентьев Александр Олегович

24.02.2022

Подпись чл.-кorr. РАН Терентьева А.О., заверяю.
Ученый секретарь ИОХ РАН, к.х.н.



И.К. Коршевец И.К. Коршевец