

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук, профессора Камнева Александра Анатольевича на диссертационную работу Сушко Екатерины Сергеевны «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

### Актуальность темы

Диссертационное исследование Екатерины Сергеевны Сушко посвящено изучению биологической активности фуллеренолов.

Разработка, производство и применение фуллеренов и их водорастворимых производных намного опережают изучение их свойств, важных для современной медицины и фармакологии. Водорастворимые полигидроксिलированные фуллерены (фуллеренолы), характеризующиеся высокой биосовместимостью и биологической активностью, могут использоваться в производстве фармакологических и медицинских препаратов – антиоксидантов, радиопротекторов, противоопухолевых, противовирусных, противогрибковых и бактерицидных агентов, препаратов для адресной доставки лекарств в организме. Специфические пути и механизмы, определяющие токсические или активационные (в частности, антиоксидантные) эффекты фуллеренолов в организмах изучаются на различных живых объектах в несопоставимых условиях, исключающих их сравнительный анализ. Поэтому возникает острая необходимость оценки свойств фуллеренолов в сопоставимых условиях. Необходимым является выявление связи между структурными характеристиками водорастворимых производных фуллеренов (размером молекул, характером модификации поверхности, природой металла-заместителя, типом его включения) и их биологической активностью (токсичностью и антиоксидантной активностью). Это направление является перспективной областью использования биолюминесцентных (БЛ) биотестов, основанных на морских бактериях.

Токсичность определяется как угнетение физиологических функций организма под воздействием токсиканта. При БЛ-тестировании токсичность фуллеренолов в работе оценивается по подавлению интенсивности свечения, а их антиоксидантная активность – по смягчению ими токсических эффектов модельных окислителей. Простота БЛ-биотестов и высокая скорость процедуры тестирования позволяют анализировать одновременно большое число образцов в сопоставимых условиях, что обеспечивает достоверную статистическую обработку результатов и их надежное сравнение. Возможность применения БЛ-систем разной сложности (люминесцентных бактерий и выделенных из них ферментов) позволяет оценивать вклад биохимических процессов в откликах клеток на внешнее воздействие. Выявлять роль активных форм кислорода в токсических и антиоксидантных эффектах фуллеренолов позволяет хемилюминесцентный люминольный метод.

## Структура диссертации и автореферата

Диссертация Сушко Е.С. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с изложением результатов работы, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, двух приложений. Список цитируемой литературы насчитывает 219 источников. Работа представлена на 131 странице и содержит 28 рисунков, 8 таблиц и 2 приложения. Автореферат соответствует основным положениям и выводам диссертации, написан доступно, хорошо иллюстрирован.

Во Введении обоснована актуальность исследования фуллеренолов люминесцентными методами; показаны научная новизна, степень разработанности темы исследования, теоретическая и практическая значимость, использованные методы исследования.

В Обзоре литературы рассмотрены наиболее распространенные биотесты, строение и принципы функционирования бактериальных БЛ-систем. Описаны возможные механизмы воздействия модельных окислителей на биолюминесценцию. Описаны преимущества и характерные особенности использования: 1) БЛ-биотестов, основанных на люминесцентных бактериях и их ферментах, для мониторинга состояния водной среды и оценки биологической активности веществ; 2) хемилюминесцентного люминольного метода для выявления содержания и роли активных форм кислорода (АФК) в процессах изменения токсичности водных растворов под действием фуллеренолов.

Показаны преимущества использования фуллеренолов в качестве антиоксиданта; описаны их химические и биологические свойства, которые могут меняться в зависимости от строения фуллеренолов. Показано, что механизм биологической активности (токсичности и антиоксидантной активности) фуллеренолов требует дальнейшего внимания и новых подходов. Рассмотрены свойства и основные источники модельных окислителей (гексацианоферрата(III) калия, 1,4-бензохинона). Описаны наиболее известные антиоксиданты и активные формы кислорода, а также их функции в организмах.

Раздел заканчивается постановкой основной задачи: выявления эффективности и механизмов воздействия ряда фуллеренолов на клеточную систему (морские люминесцентные бактерии) на основе связей между структурными характеристиками фуллеренолов и параметрами их биологической активности – токсичностью и антиоксидантной активностью.

Раздел Материалы и методы полностью отражает все методологические подходы, используемые в работе. Даны характеристики использованного в работе оборудования и химических реактивов. Приведены методы оценки биологической активности (токсичности и антиоксидантной активности) фуллеренолов с помощью БЛ-бактерий и выделенных из них ферментов, а также выявления механизмов этих эффектов (оценивали влияние фуллеренолов на: 1) активность НАДН-зависимых ферментативных и неферментативных процессов; 2) содержание АФК в условиях БЛ-экспериментов).

В главе *Результаты и обсуждение* впервые проанализированы биоэффекты ряда фуллеренолов в сопоставимых условиях с использованием биолюминесцентных тестовых систем, клеточной и ферментативной. Показано, что токсичность фуллеренолов (подавление интенсивности биолюминесценции бактерий) наблюдается при высоких концентрациях, а антиоксидантная активность (способность смягчать окислительный стресс, вызванный воздействием окислителей на бактерии) – при низких. При этом указанные свойства связаны со следующими особенностями структуры фуллеренолов: (А) «гипотезой  $\frac{1}{2}$ », основанной на соотношении полярных и неполярных фрагментов в структуре фуллеренола: наименьшей токсичностью и наибольшей антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы, в структуре которых количество кислородосодержащих групп примерно в 2 раза меньше количества атомов углерода в каркасе фуллеренола; (Б) наименьшую токсичность имеют металлосодержащие фуллеренолы; (В) фуллеренолы, не модифицированные атомами металлов, эффективнее ингибируют биолюминесценцию бактерий, чем биолюминесценцию ферментативных реакций, что может быть связано с их воздействием на гидрофобные участки клеточной мембраны бактерий.

Токсический эффект фуллеренолов связывается автором со снижением содержания АФК, что объясняется избыточной антирадикальной активностью концентрированных растворов фуллеренолов с последующим замедлением метаболических окислительных процессов в биологических системах и увеличением скорости автоокисления НАДН. Активация биолюминесценции бактерий в присутствии  $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ , где  $x + y = 40 \dots 42$ , сопровождается умеренным снижением АФК, что, вероятно, связано с усилением потребления АФК бактериями; такой эффект фуллеренола объясняется его высоким сродством к электрону и, как следствие, высокой реакционной способностью. Антиоксидантный эффект фуллеренолов (смягчение окислительного стресса) связан с гидрофильно-гидрофобными характеристиками среды, потреблением АФК бактериями, ускорением окисления НАДН эндогенным окислителем (ФМН) в ферментативной реакции.

В *Заключении* автор обосновывает связь биоэффектов групп фуллеренолов с особенностями их структуры, описывает механизмы токсичности, активации и антиоксидантной активности фуллеренолов, а также перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы. Представленные *выводы* представляются полностью обоснованными и не вызывающими сомнений.

При ознакомлении с авторефератом (АР) и диссертацией (Д) Е.С. Сушко возникли некоторые **замечания и вопросы**:

1. Четко не указано, применяются ли фуллеренолы в медицине, косметологии; какие концентрации фуллеренолов применяют в этих областях. Отличаются ли они от исследованных диапазонов, которые представлены в работе?

2. С чем может быть связана бóльшая ингибирующая способность фуллеренолов, не модифицированных металлами, по отношению к бактериям по сравнению с ферментативной системой?

3. На спектре (б) рис. Б.6 (Д, с. 124; данные РФЭС) у полосы с максимумом 533.9 эВ имеется пометка “C=O, H<sub>2</sub>O”, при этом в тексте не разъясняется, какое отношение к данной полосе имеет вода (образцы фуллеренола высушивали при 100 °С: раздел Б3, с. 121).

4. Для ИК-спектра гидроксированного Gd@C<sub>82</sub> (рис. Б.9; Д, с. 126) в тексте отмечены четыре полосы (при 3427, 1627, 1390 и 1078 см<sup>-1</sup>), свидетельствующие “о наличии окисленных единиц на поверхности углеродного каркаса”, три из которых (3427, 1390 и 1078 см<sup>-1</sup>) отнесены к определенным колебаниям O-содержащих функциональных групп; однако вместо полосы при 1627 см<sup>-1</sup> для колебаний νC=O указана частота 1703 см<sup>-1</sup>. Неясно, обе ли эти полосы присутствуют в спектре.

5. Несмотря на четкую структурированность и очевидную хорошую проработку текста, имеется ряд неточностей и опечаток (в том числе в пунктуации), включая неудачные и неправильные выражения. Примеры: 1) “связь их ... характеристик (...) и параметрами” (Д, с. 5); 2) нелогично смотрится множественное число (“морские бактерии *P. phosphoreum*”; Д, с. 6) при использовании лишь одного конкретного вида (штамма) бактерии; 3) “*P. Phosphoreum*” (Д, с. 48; название вида пишется со строчной буквы); 4) “гексацианоферрат калия” (Д, с. 42; номенклатурное название K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] – гексацианоферрат(III) калия, в отличие от гексацианоферрата(II) калия K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; см. с. 43 – описание перед уравнением (7)) и др.

Указанные замечания имеют характер дискуссии, не умаляют достоинств данной работы и не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов.

Диссертационная работа Е.С. Сушко является результатом комплексного цельного исследования, обладает научной новизной, а именно: для изучения биологической активности фуллеренолов впервые были применены биолюминесцентные тестовые системы различной сложности (морские бактерии *P. phosphoreum* и ферментативная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза). Использование этих двух типов систем позволяет выявить и сравнить клеточные и биохимические процессы, ответственные за антиоксидантные и токсические эффекты фуллеренолов разного строения.

Практическая значимость результатов определяется формированием современных подходов для выявления связей между структурными характеристиками изученных соединений и параметрами их биологической активности – токсичностью и антиоксидантной активностью.

Научные положения и выводы диссертационной работы Е.С. Сушко базируются на обширном экспериментальном материале. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов, прошла солидную апробацию, поддержана рядом грантов. Основные результаты диссертации опубликованы, помимо тезисов 24 докладов, в 8 статьях в

рецензируемых международных журналах (6 из которых – в журналах первого квартала (Q1)), что заметно превышает формальные требования ВАК.

### Заключение

Диссертационная работа Е.С. Сушко «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для молекулярной биофизики. Рецензируемая диссертация отвечает требованиям пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление 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 наук, а ее автор Сушко Екатерина Сергеевна заслуживает присвоения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник Лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН)

профессор, доктор химических наук  Александр Анатольевич Камнев

«09» сентября 2024 г.

Контактная информация:

Саратов, 410049, просп. Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН.

Моб. тел.: +7(917)2184118, раб. тел.: +7(8452)970444.

E-mail: a.a.kamnev@mail.ru

*Подпись в.н.с., проф., д.х.н. А.А. Камнева заверяю:*

Ученый секретарь ИБФРМ РАН





О.Г. Селиванова