

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Зеленцовой Екатерины Анатольевны  
«Фотохимические свойства и реакции хромофоров хрусталика человека»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук  
по специальности 03.01.02 – биофизика

### Общая характеристика работы

**Актуальность** темы диссертационной работы Зеленцовой Е.А. не вызывает сомнений, она обусловлена необходимостью понимания молекулярных механизмов катарактогенеза, что может способствовать созданию в будущем эффективных методов ранней диагностики катаракты. В работе продемонстрировано изменение оптических свойств (а значит и молекулярной структуры) белковых и метаболомных фракций хрусталика человека и проанализированы механизмы этого явления, такие как деструкция кристаллинов, сенсibiliзирoванная фотоактивными соединениями – продуктами разложения естественных УФ-фильтров хрусталика. **Новизна** работы состоит во всестороннем анализе фотохимических свойств УФ-фильтров хрусталика человека и продуктов их разложения в условиях, приближенных к *in vivo*. Разнообразие экспериментальных методов, объектов исследования, полноценный анализ современной научной литературы по теме и непротиворечивость результатов опубликованным ранее аналогам определяют **достоверность** результатов и обоснованность научных положений и выводов, представленных в диссертации.

Представленная к защите диссертационная работа изложена на 126 страницах и имеет традиционную структуру. Содержательная часть состоит из разделов «Введение», «Литературный обзор», «Объекты и метод исследования», трёх глав с изложением результатов исследования, а также разделов «Заключение» и «Выводы». Автор иллюстрирует материал 34-я рисунками и 7-ю схемами, цитирует 185 литературных источников.

Опираясь на материалы, представленные в диссертационной работе, можно заключить, что все полученные результаты прошли апробацию в научном сообществе как в виде докладов на конференциях, так и посредством публикации в открытой научной печати в рецензируемых изданиях.

### Содержание работы

Глава 1 содержит краткий обзор литературы по фундаментальной проблеме, в рамках которой выполнено исследование. Обзор производит хорошее впечатление, поскольку при небольшом объеме содержит необходимую и достаточную информацию

об объекте исследования и современных представлениях о механизмах возникновения катаракты.

В Главе 2 описаны объекты и методы исследования диссертационной работы. Разнообразие и высокий технологический уровень последних свидетельствует в пользу обоснованности научных положений и выводов, защищаемых в данной диссертации. Но, на мой взгляд, в данном разделе пристальное внимание уделено техническим подробностям проведения экспериментов (что оправдано), в то время как методы расчета фотофизических и фотохимических параметров (таких как квантовые выходы, скорости релаксации возбужденных состояний и т.п.) представлены весьма скудно. Глава 2 не содержит ни одной формулы. Все детали расчетов распределены в последующих главах по ходу изложения результатов исследования, что вызывает определенные затруднения для поиска, когда возникает вопрос, каким же образом были получены те или иные величины, например, в таб. 6 (с.75).

В Главе 3 изложены результаты исследования оптических характеристик (поглощения и флуоресценции) различных фракций хрусталика человека (средневозрастного, возрастного и катарактального). Основываясь на спектральных свойствах, показано, что с возрастом изменяется как количественный, так и качественный состав хрусталика. В частности, доля поглощения в УФА-диапазоне низкомолекулярной (метаболической) фракции падает, в то время как белковые фракции теряют прозрачность в данном диапазоне. Наблюдаемая тенденция усугубляется в случае катаракты. Полученные результаты подтверждают известные факты об изменении состава низкомолекулярных УФ-фильтров и модификации белков хрусталика с возрастом. Используя выявленные закономерности, автор предлагает новый подход для ранней диагностики катаракты, основанный на сдвиге полосы флуоресценции хрусталика в красную область, а не на увеличении интенсивности флуоресценции, как предлагалось ранее. По материалу, изложенному в третьей главе, хочется заметить, что спектры поглощения белковых фракций катарактальных хрусталиков в УФА-диапазоне (рис. 8, с. 45) отягощены рассеянием излучения, и это искажает значения удельного поглощения, хотя не меняет общую закономерность. Кроме того, после прочтения материала главы возникает вопрос, насколько равномерно распределены три исследуемые фракции (низкомолекулярные метаболиты, водорастворимые и мочевинорастворимые белки) в катарактальном хрусталике, и не повлияло ли частичное извлечение хрусталиков такого типа на полученное соотношение вкладов компонент в поглощение и флуоресценцию.

Глава 4 диссертационной работы посвящена исследованию фотохимических свойств продуктов термического распада естественного УФ-фильтра хрусталика человека кинуренина (KN). Показано, что продукт распада кинурениновая кислота (KNA) обладает высоким выходом триплетных состояний, то есть отличается фотоактивностью и уже не выполняет функцию эффективного фильтра излучения в УФА-диапазоне. Охарактеризованы фотофизические и фотохимические свойства KN, KNA, KNY такие как константы скорости различных путей дезактивации возбужденного состояния и квантовые выходы процессов. Автор предполагает, что реакционная активность продуктов термического и фото-распада естественного фильтра KN может приводить к повреждениям белков хрусталика, которые накапливаются с возрастом. Доказательству этого предположения посвящена глава 6.

В главе 5 сделана попытка приблизить условия наблюдения фотохимических свойств УФ-фильтров хрусталика *in vitro* к *in vivo*. Моделируя внутриклеточные условия бинарными водно-глицериновыми смесями с низким содержанием растворённого кислорода, автором было получено, что фотофизические характеристики KNA слабо зависят от вязкости, в то время как для KNY наблюдается увеличение квантового выхода флуоресценции. Хочется отметить, что для детального понимания влияния вязкости среды на фотонику молекул необходимо использовать несколько химически разнообразных вязких косольвентов и рассматривать зависимость именно от вязкости среды, а не содержания добавки. Это позволит разделить различные механизмы влияния (эффект вязкость, водородных связей, поляризуемости среды и др.). Поэтому создаётся впечатление, что данная глава является скорее постановкой новой проблемы, чем её решением и ответом на вопрос, как же происходит дезактивация УФ-фильтров и продуктов их распада *in vivo*.

Глава 6 посвящена изучению роли KNA как сенситизатора фотодеструктивных процессов белков хрусталика, что может быть одним из механизмов формирования катаракты. Установлено образование тирозиновых и триптофановых радикалов в составе  $\alpha$ -кристаллина под действием продуктов фотолиза кинурениновой кислоты. Изучена сенситилизованная KNA деградация кристаллинов под воздействием УФ-излучения. Методами масс-спектрометрии идентифицированы фрагменты белков, подверженные модификации – метионин- и триптофан-содержащие пептиды. Продемонстрировано защитное действие естественных антиоксидантов хрусталика (аскорбиновой кислоты и глутатиона).

Довольно лаконичный раздел «Заключение», по объёму уступающий следующему разделу «Выводы», завершает содержательную часть диссертационной работы. Автор

коротко резюмирует все полученные результаты и определяет их вклад в решение фундаментальной проблемы, в рамках которой выполнено исследование.

### **Критические замечания**

Рецензируемая работа Зеленцовой Е.А. не лишена некоторых недостатков, которые, однако, касаются в первую очередь формы подачи материала и не ставят под сомнение значимость результатов и обоснованность сделанных выводов.

В работе присутствуют опечатки, несогласованность членов предложения, наблюдаются недочёты в оформлении рисунков и таблиц. Например, десятичным разделителем в числах является то точка (на стр. 31, 33-40, 42, 44, 47, 50, 56 и др.), то запятая (на стр. 49, 89, 99 и др.). Отсутствует численная шкала поглощения на рис. 14 (стр. 59) и рис. 34 (стр. 102). Подробно обсуждаемые в Главе 6 «альфа-кристаллины» и «альфаА-кристаллины», на мой взгляд, в тексте работы следовало обозначать с использованием греческой буквы (« $\alpha$ -кристаллины» и « $\alpha$ А-кристаллины»). И многое другое.

Также можно заметить ряд стилистических погрешностей:

– употребляется выражение «промежуточные интермедиаты» (на стр. с.9, 20, 67, 71), которое является тавтологией, поскольку интермедиаты и есть промежуточные короткоживущие продукты реакции;

– часто используется слово «гибель» как эквивалент английского «decay», хотя по отношению к электронно-возбужденным состояниям молекул (с. 15, 52, 71) более подходящим термином является «деактивация» или «распад», и выражение «гибель флуоресценции» (стр. 36, 62-63) несомненно требует более корректного перевода на русский язык.

Указанные недостатки не умаляют несомненных достоинств представляемой диссертационной работы, её высокую научную новизну, достоверность и значимость научных положений и выводов.

### **Заключение**

Диссертация Зеленцовой Е.А. «Фотохимические свойства и реакции хромофоров хрусталика человека» является законченной, целостной научно-квалификационной работой, направленной на решение актуальной задачи – раскрытию молекулярных механизмов катарактогенеза. Она выполнена на высоком методическом уровне с привлечением широкого арсенала экспериментальных методов определения структурных изменений функционально важных биологических молекул.

Считаю, что диссертационная работа Зеленцовой Е.А. отвечает критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утвержденным

Постановлением N 842 Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г.) для кандидатских диссертаций, и её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Немцева Елена Владимировна,  
доцент по кафедре биофизика,  
кандидат физико-математических наук  
по специальности 03.01.02 – биофизика,  
старший научный сотрудник  
научно-исследовательской части  
Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Адрес: пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041

Телефон: +7(391)206-207-2

E-mail: [enemtseva@sfu-kras.ru](mailto:enemtseva@sfu-kras.ru)

11 сентября 2018 г.



ФГАОУ ВО СФУ  
Подпись Е.В. Немцевой  
Заместитель начальника общего отдела С. Чиря  
13.09 20 18 г.