

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по науке  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института физической химии и  
электрохимии им. А.Н. Фрумкина  
Российской академии наук (ИФХЭ  
РАН)



Батищев О.В.

декабре 2016 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Маракулиной Ксении Михайловны

**«Взаимодействие природных фосфолипидов с антиоксидантами нового класса -  
изоборнилфенолами»,**

представленную на соискание ученой степени химических наук по специальности

02.00.04 «физическая химия»

Диссертационная работа Маракулиной К.М. выполнена в русле одного из актуальных направлений поиска антиоксидантов (АО) среди полусинтетических продуктов промышленного производства, перспективных для биомедицинских приложений, которые совмещают положительные характеристики природных и синтетических биопротекторов с широким спектром биологической активности. В этом отношении определенные перспективы имеет новый класс антиоксидантов, изоборнилфенолы (ИБФ), которые представляют собой замещенные фенолы, содержащие в качестве алкильного заместителя изоборнильные группы. В литературе отсутствуют данные о физико-химических характеристиках ИБФ и их способности взаимодействовать с основными компонентами биологических мембран – фосфолипидами (ФЛ) и диссертационная работа восполняет этот пробел. Более того, есть основание полагать, что способность комплексообразования между фенольными антиоксидантами и

фосфолипидами может существенно влиять на их ингибирующую эффективность и биологическую активность. Исследования Маракулиной К.М. посвящены выяснению основных механизмов взаимодействия ИБФ с типичными компонентами липидного матрикса клеточных мембран и выбору оптимальной процедуры оценки их протекторных свойств по отношению к биомембранам. С этой целью в работе проведен подробный анализ спектральных характеристик некоторых природных фосфолипидов и ряда ИБФ, определены условия их комплексообразования в органической среде, которые коррелируют с их влиянием на устойчивость мембран эритроцитов. Проведенное в работе исследование и полученные результаты являются актуальными и представляют несомненный интерес для пищевой промышленности и биомедицинских приложений.

Диссертационная работа представлена в традиционном стиле и изложена на 132 страницах, содержит 35 рисунков и 21 таблицу. Она состоит из введения, 5-ти глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Библиографический список включает 173 наименования, из которых 64 опубликованы в зарубежных изданиях. Здесь следует отметить нестандартное форматирование списка литературы, где в каждой ссылке присутствует непонятный комментарий «[текст]».

Вводная часть диссертации и обзор литературы достаточно аргументировано излагает выбор основного направления и объектов исследования, экспериментальных методов и способов анализа полученных результатов. Обзор литературы состоит из двух разделов, один из которых содержит сведения о влиянии антиоксидантов на различные стадии перекисного окисления и способах контроля этих стадий, акцентируя внимание на свойствах новых соединений фенольного типа. Здесь же приведены известные данные о поведении этих соединений в растворителях с разной полярностью. Вторая часть обзора столь же подробно излагает оптические характеристики фосфолипидов, типичных для большинства природных источников, и способы регистрации продуктов их окисления. Обзор демонстрирует достаточную компетентность автора в данной области. Опираясь на литературные данные, он подчеркивает, что для оценки протекторных свойств антиоксидантов необходимо использовать сведения о составе природных фосфолипидов в каждом конкретном случае. Судя по приведенным данным использование некоторых органических растворителей, в частности, н-гесана, наиболее удобно для УФ и ИК спектроскопии, хотя автор и не поясняет выбор именно этого растворителя для проведения собственных экспериментальных исследований.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание методики тонкослойной хроматографии, которая была необходима для контроля состава

исследуемых препаратов природных фосфолипидов по крайней мере из шести источников. Здесь же приведены структурные формулы фенольных соединений, которые являются основным объектом исследований в данной работе в качестве антиоксидантов и биопротекторов. Для оценки антипероксидной активности фенолов в суспензии фосфолипидов использован стандартный метод йодометрического титрования и анализ присутствия диеновых коньюгатов по УФ-спектрам. Комплексообразование в этих суспензиях контролировалось методом динамического светорассеяния, который в данном разделе представлен весьма схематично, примерно в объеме инструкции пользователя к приборам фирмы Малверн.

Экспериментальная часть диссертации, основные результаты и их обсуждение разнесены по главам 3, 4 и 5. Ниже приведен анализ этих глав с указанием некоторых спорных моментов.

В главе 3, посвященной свойствам фосфолипидов, трудно ожидать сведений, принципиально отличных от хорошо известных в литературе. Автор подробно исследует влияние состава различных препаратов на характерные линии УФ и ИК спектров, которые в дальнейшем используются в качестве базовых для оценок влияния фенолов в последней главе. Здесь приведены четыре таблицы, которые содержат полученные автором конкретные данные о составе нескольких источников природных липидов. Эти данные затем использованы для качественной и количественной интерпретации спектральных характеристик этих препаратов. Зависимость поглощения основной полосы УФ спектра от концентрации суспензий снималась для трех образцов (рис. 3.2), по всей видимости, в н-гексане, о чем автор почти случайно упомянул в тексте, но не в подписи к рисунку. Тот факт, что в одном случае (сфингомиелин) замечено отклонение от линейности, интерпретируется автором как следствие образования агрегатов в суспензии. Хотя используется спектрометр ("Unico2800", США), имеющий большой динамический диапазон, не исключено, что нелинейные свойства регистратора могут несколько исказить результаты, представленные на рис. 3.3 и повлиять на численные оценки в таблице 3.5. Наиболее сложные для интерпретации факты в этой главе относятся к кинетике изменений оптических сигналов в отдельных частях спектра. Автор приводит достаточно разумные предположения о природе этих изменений, однако остается неясным, наблюдается ли эта кинетика только в растворах в н-гексане или также в других растворителях, и каким образом автор предлагает зафиксировать процедуру измерений при столь значительных изменениях оптических сигналов. Многие данные представлены для пронумерованных «партий» образцов и остается непонятным отношение автора к этим данным: отнесены ли обнаруженные различия между индивидуальными партиями к

источникам систематических ошибок или они были учтены при статистической обработке результатов.

Наконец, в последнем разделе главы 3 приведены данные о размерах агрегатов фосфолипидов в зависимости от их концентрации в н-гексане. Судя по результатам, представленным на рис. 3.9, при повышении концентрации липида суспензия становится более однородной с размером агрегатов (мицелл) порядка 10-30 нм. Для интерпретации данных с меньшей концентрацией липида полезно ориентироваться на соотношение сигнал/шум в данной серии измерений, который оценивается обычно по индексу полидисперсности при обработке корреляционных данных методом кумулянтов. К сожалению, в диссертации эти данные не приведены и есть опасность, что наличие шумов при разложении слабого сигнала не позволяет получить реальное соотношение размера доли отдельных компонент в суспензии. Тем не менее, достаточно разумным является сопоставление кинетики изменения интенсивности светорассеяния и динамики изменений оптических сигналов в отдельных областях спектра. Сама по себе зависимость результатов от времени означает, что система находится вдали от равновесия. Не очень ясно, как этот факт был учтен при выборе оптимальной процедуры измерений.

В главе 4 приведены УФ и ИК спектры и их анализ для растворов в н-гексане шести образцов фенольных антиоксидантов с несколько различной структурой. Характеристики трех основных полос поглощения в УФ диапазоне сведены в две таблицы. Для всех фенолов наблюдаются батохромные сдвиги полос поглощения ОН-группы. На полосе 275 нм выполняется закон Бугера-Ламберта-Бера во всем диапазоне концентраций, и именно эта полоса обоснованно была выбрана для дальнейших исследований. Столь же подробно измерены и представлены в таблицах данные ИК спектров фенольных соединений. Тщательно измеренные и статистически достоверные данные этой главы служат хорошим справочным материалом для этой и, возможно, последующих работ в данном направлении. Здесь обнаружено важное свойство ИК спектров – наличие полосы валентных колебаний ОН-группы, которые характерны для некоторых типов фенолов.

Методически глава 4 не сильно отличается от предыдущих и содержит данные, полученные в смесях фосфолипидов и фенолов. Выбранный в качестве растворителя н-гексан позволил автору наблюдать достаточно тонкие эффекты, сопутствующие мицеллообразованию в этих системах. Подробно сопоставляя оптические характеристики комплексов этих соединений с их индивидуальными свойствами, автор приходит к важному заключению о не ковалентной природе их взаимодействия.

И, пожалуй, наиболее интересная в практическом отношении часть работы, вынесена в раздел, названный Заключение. Именно в этом разделе приведены данные об



антипероксидной активности фенолов, которая, как и следовало ожидать, оказалась различной в присутствии фосфолипидов разного типа. Более того, здесь присутствуют результаты, свидетельствующие о влиянии фенолов на состояние поверхности такого сложного объекта, как эритроциты. Здесь обнаруживается хорошая корреляция между способностью фенолов к комплексообразованию с фосфолипидами и их влиянием на устойчивость мембран эритроцитов к разрушению (спонтанный и индуцированный гемолиз). Этот результат завершает диссертацию и постулирует выполнение основной цели работы – выбор оптимальной химической системы для первичного отбора антиоксидантов по биопротекторным свойствам.

Резюмируя вышесказанное, можно выделить основные положительные качества диссертации. Работа выполнена на хорошем экспериментальном уровне с привлечением тонкослойной хроматографии, методов УФ- и ИК-спектроскопии и динамического светорассеяния. Достоверность полученных результатов достигалась статистической обработкой многократных измерений. Основные положения и результаты работы опубликованы в профильных российских журналах рекомендуемых ВАК, и многократно докладывались на российских и международных конференциях.

К недостаткам работы следует отнести наличие опечаток, которые имеются и в оглавлении, и при форматировании списка литературы. Указанные выше замечания к процедуре некоторых измерений не влияют на достоверность основных результатов и выводов. Наиболее существенные редакторские правки можно предложить к формулировке цели, задач и выводов диссертации. Так, никакое исследование механизмов не может быть самоцелью, и акцент следовало делать на поиске оптимальной химической системы (но не модели!) для первичного отбора антиоксидантов в качестве биопротекторов. Тем не менее, именно эта цель по существу и была достигнута в результате проведенных исследований. Причем одна из очевидных задач в этом случае, не поставленная в работе, но выполненная в конечном итоге, – это оценка их способности ингибировать некоторые стадии перекисного окисления. Формулировка выводов работы также вызывает нарекания. Так, первый вывод сформулирован неудачно как априорно очевидный факт «... на параметры (спектров) существенное влияние оказывает основная фракция...»). Почему-то в выводах не упомянут доказанный в работе не ковалентный механизм взаимодействия фенолов с фосфолипидами. Вывод 4 постулирует предложенный в работе способ оценки поверхностно активных свойств разных соединений (не только антиоксидантов?), названный почему-то «моделью». Он заключается в оценке способности их к мицеллообразованию, которая лишь косвенно свидетельствует о возможном влиянии на поверхностное натяжение. Более оправданной

оценкой этой способности является критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), которая в диссертации даже не упоминается. Последний вывод также сформулирован в самом общем виде без ссылки на конкретные факты, полученные диссертантом. Один из них – наличие корреляции между склонностью фенолов к образованию комплексов с липидами и их влиянием на устойчивость мембран эритроцитов к разрушению.

Перечисленные недостатки относятся, скорее, к редактированию текста, и не влияют на научную ценность полученных в диссертации результатов. Их достоверность, новизна и практическая значимость для биомедицинских приложений не вызывает сомнений. Содержание диссертации с достаточной полнотой отражено в автореферате, а степень ее завершенности заслуживают положительной оценки. Диссертационная работа К.М. Маракулиной удовлетворяет требованиям, установленным пунктами 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в положение о присуждении ученых степеней», а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04.

Настоящий отзыв обсужден и принят на расширенном научном семинаре сотрудников лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН протокол № 6 от 21.12.2016 г. Отзыв составил ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН, доктор физико-математических наук Ермаков Юрий Александрович

 (Ермаков Ю.А.)

Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4; 119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4. Тел.: +7(495) 955 46 01 (канцелярия),  
*e-mail*: dir@phychе.ac.ru