

ОТЗЫВ

Официального оппонента кандидата химических наук Волковой Юлии Алексеевны на диссертационную работу Устимовой Марии Алексеевны на тему: «Разработка флуоресцентных реагентов на основе стироловых производных для внутриклеточной визуализации», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.3 – Органическая химия, 1.4.4 – Физическая химия.

Актуальность работы. Развитие методологий создания флуоресцентных сенсоров на катионы металлов, неорганические и органические анионы, а также на органические молекулы является одним из ведущих направлений текущего этапа развития междисциплинарных исследований, объединяющих усилия специалистов в области органической, физической, аналитической, координационной химии и в смежных сферах других наук, таких как биология, медицина, защита окружающей среды. Привлекательность флуоресцентных методов заключается в том, что они дают возможность значительно снизить порог чувствительности, по сравнению с колориметрическими или электрохимическими методами, при этом характеризуются большей селективностью и надежностью обнаружения.

Стироловые красители занимают особое место среди классов органических соединений благодаря сочетанию ценных характеристик. Синтетически легкодоступные, они демонстрируют высокую чувствительность к параметрам среды, таким как полярность растворителя, вязкость или pH, а также, как правило, характеризуются фотостабильностью, высокими значениями квантовых выходов флуоресценции и коэффициентов экстинкции. Эти красители нашли широкое применение при создании сенсibilизаторов, органических полупроводников, фотоактивных супрамолекулярных систем, и оптических молекулярных сенсоров. Более того они являются привлекательными кандидатами для разработки молекулярных маркеров для биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, аминокислоты, пептиды и полипептиды. Несмотря на обширный массив накопленных данных по свойствам стироловых красителей, на данный момент лишь немногие представители этого класса удовлетворяют современным требованиям оптического сенсора, а именно обладают высоким уровнем сигнала оптического отклика, устойчивостью в биологических средах, хорошей биосовместимостью, большими Стоксовыми сдвигами и т.д. В связи с чем, разработка новых флуоресцентных сенсоров/маркеров или усовершенствование свойств уже известных красителей стиролового ряда является актуальной фундаментальной задачей.

Диссертационная работа Устимовой М. А. является методологическим развитием в области бисстироловых красителей. Работа посвящена синтезу ранее неизвестных гомо- и гетеро-димерных бисстирилпиридиниевых красителей, содержащих в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино- группы, изучению их потенциала в качестве флуоресцентных

сенсоров на катионы металлов, а также молекулярных маркеров для распознавания биомолекул - ДНК/РНК. Исследование многоплановое, представляет собой прекрасный пример расширения всех аспектов создания флуоресцентных сенсоров в ряду стирильных красителей, включая отработку синтеза, изучение оптических свойств, установление закономерностей структура-свойства и оценку потенциала их применения.

Структура работы и основные результаты. Диссертация Устимовой М. А. построена традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, и списка литературы. Работа изложена на 160 страницах машинописного текста, список цитируемой литературы включает 211 наименований. Работа построена логично, а изложение результатов четко структурировано.

Литературный обзор посвящен анализу литературы преимущественно за последние 15 лет в области применения флуоресцентных красителей для нековалентного мечения биомолекул и внутриклеточных органелл. Помимо стирильных красителей, рассмотрены красители антрахинонового, Bodipy, карбазольного, кумаринового, родаминового, цианинового, скваренового и тиофенового рядов, а также гибридные структуры. Подобный формат представляется обоснованным и целесообразным в силу выбранного объекта исследования. Проведенный анализ литературы позволяет легко оценить значительный вклад автора в развитие области исследования и сравнить полученные результаты с мировым уровнем.

Обсуждение результатов состоит из семи логически вытекающих друг из друга разделов, включающих синтез бисстириловых красителей, изучение их оптических свойств, оценку возможности фотоиндуцированного безызлучательного переноса энергии (FRET) в несимметричных бисстириловых красителях, изучение комплексообразования краун-содержащего бисстирилового красителя с катионами металлов в ацетонитриле и водных средах, изучение комплексообразования бисстириловых красителей с ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка.

Диссертационная работа Устимовой М. А. представляет собой исследование, удачно сочетающее решение как фундаментальных, так и прикладных проблем в области химии стирильных красителей. Автором синтезирована представительная серия новых бисстириловых красителей, отличающихся функциональными группами, типом соединения хромофорных фрагментов и природой линкера. Систематически изучены фотофизические свойства красителей в различных средах. Показано, что FRET-процесс между хромофорами может быть использован для создания красителей с большим Стоксовым сдвигом. Проведена кропотливая работа по изучению влияния катионов металлов и кислотного протона на спектры поглощения/испускания краун-содержащего бисстирилового красителя, в результате чего продемонстрирована его перспективность в качестве сенсора на катионы тяжелых металлов. Систематически исследовано влияние строения бисстириловых красителей на способность связываться с ДНК и РНК. Показано,

что бисстириловые производных типа «голова к голове» с гетероциклическим линкером способны давать ДНК-индуцированные агрегаты, в случае симметричных бисстириловых красителей за счет залегания в малой бороздке ДНК. В тоже время, установлено что, бисстириловые красители типа «голова к хвосту» селективно взаимодействуют с ДНК в присутствии РНК без агрегации, демонстрируя интенсивное разгорание флуоресценции.

Научная новизна заключается в следующем: (1) отработаны условия синтеза ранее неизвестных гомо- и гетеро-димерных бисстирилпиридиниевых красителей, содержащих в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино- группы; (2) для красителей несимметричного строения типа «голова к голове» и «голова к хвосту» показана возможность FRET-процесса между хромофорами красителя, содержащими диалкиламино-моностириловый акцепторный и донорный алкокси фрагменты; (3) впервые продемонстрировано, что краун-содержащий бисстириловый краситель может быть использован для распознавания Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} и Ag^+ , а также для количественного определения Hg^{2+} в биологических образцах; (4) впервые установлено влияние строения гомо- и гетеро-димерных бисстирилпиридиниевых красителей на их связывание с нуклеиновыми кислотами на примере использования дц-ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка; (5) обнаружены несимметричные бисстириловые красители, способные демонстрировать флуоресцентный отклик в присутствии ДНК, находящейся в смеси с РНК.

Практическая значимость работы связана с физико-химическими исследованиями процессов комплексообразования бисстириловых красителей в присутствии различных аналитов, таких как катионы металлов, ДНК и РНК. В частности, показано, что краун-содержащий бисстириловый краситель позволяет ратиометрически детектировать Hg^{2+} в клетках аденокарциномы легкого. По совокупности оценки спектральных характеристик симметричных и несимметричных бисстириловых красителей в присутствии нуклеиновых кислот, выявлены соединения, которые демонстрируют значительное разгорание флуоресценции при связывании с ДНК и представляют интерес для дальнейшей разработки на их основе флуоресцентных маркеров для селективного детектирования ДНК.

Достоверность полученных результатов. Диссертационная работа Устимовой М. А. представляет собой исследование, выполненное на самом современном экспериментальном и теоретическом уровне. В экспериментальной части приведены исчерпывающие данные, подтверждающие полученные автором результаты. Достоверность полученных результатов сомнений не вызывает. Автором для доказательства структуры и состава полученных соединений использован комплекс физико-химических методов анализа, включая спектроскопию ЯМР ^1H , ^{13}C , масс-спектрометрию и элементный анализ. Для изучения процессов комплексообразования бисстириловых красителей с катионами металлов, ДНК и РНК был использован комплекс методов, включающий ^1H ЯМР спектроскопию, циклическую вольтамперометрию,

спектрофотометрическое и флуоресцентное титрование, конфокальную флуоресцентную микроскопию, индуцированный круговой дихроизм, молекулярный докинг и молекулярную динамику.

Замечания. При чтении диссертации возник ряд вопросов и замечаний, направленных на усиление сделанных выводов, получение более полной информации о полученных веществах и расширение представления об их свойствах:

1. В работе не сформулировано, по какому принципу отбирались функциональные группы и линкеры при создании красителей.
2. Для красителей **7** и **8** типа «хвост к хвосту» отсутствуют основные характеристики спектров поглощения и испускания, что исключает их из рассмотрения в контексте взаимосвязи структура – свойства.
3. В литературном обзоре для более глубокого понимания основных тенденций и проблематики использования флуоресцентных красителей для нековалентного мечения биомолекул не хватает таблицы объединяющей и систематизирующей фотофизические характеристики обсуждаемых веществ.
4. Учитывая многоплановость исследования, требуется уточнить какие экспериментальные исследования автор выполнял лично.
5. Проводились ли для красителя **1** конкурентные эксперименты на живых клетках в присутствии таких часто встречающихся в биологических образцах металлов как Li^+ , Na^+ и Ca^{2+} ? В каком диапазоне концентраций наблюдалась линейная зависимость для изменения интенсивности флуоресценции красителя **1** при титровании Hg^{2+} ?
6. С чем связано более высокое разгорание флуоресценции в присутствии ДНК для красителя **3**, по сравнению с аналогами **2** и **4**?
7. В экспериментальной части и обсуждении результатов имеется ряд неточностей и опечаток: 1) не уточняется в каких растворителях соединение **19** обладало низкой растворимостью; 2) не приведены результаты циклической вольтамперометрии для соединений **m1** и **m2**; 3) не упомянуты λ_{ex} , использовавшиеся для соединений в таблице 1; 4) значения λ_{abs} в таблице 1 незначительно отличаются от указанных на рисунке 3; 5) в таблице 4 и ее обсуждении не указаны соотношения лиганд/металл при которых достигался максимальный отклик.

Сделанные замечания не снижают общей высокой оценки работы. Работа хорошо написана и позволяет охарактеризовать автора как высококвалифицированного специалиста, способного планировать и решать сложные научные задачи на современном уровне. Уровень научных журналов (*J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc*, *Sensors*, *New J. Chem.*) в которых опубликованы результаты исследования однозначно демонстрируют ее значимость. Выполненное исследование

вносит существенный вклад, как в химию стироловых красителей, так и в методологию разработки современных инструментов биовизуализации.

Заключение. На основании проведенного анализа можно заключить, что диссертационная работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и критериям, изложенным в п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. в действующей редакции, а ее автор – Устимова Мария Алексеевна – заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.3 – Органическая химия, 1.4.4 – Физическая химия.

Официальный оппонент:

Волкова Юлия Алексеевна, кандидат химических наук по специальности 1.4.3 органическая химия, старший научный сотрудник лаборатории Химии стероидных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской Академии Наук (ИОХ РАН).

Адрес: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 47.

Телефон: +7 [499] 137-29-44

Электронный адрес: yavolkova@gmail.com

Дата «23» мая 2023 г.

Кандидат химических наук,
Старший научный сотрудник

Волкова Ю. А.

Подпись старшего научного сотрудника, к.х.н. Волковой Ю. А. заверяю:

Ученый секретарь ИОХ РАН



Коршевец И. К.