

## ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора химических наук Кузьмина Владимира Александровича 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**

Современные достижения в области флуоресцентных методов и молекул-меток предоставляют исследователям мощный инструментарий для изучения биологических процессов на молекулярном уровне. Флуоресцентные методы и молекулы-метки играют важную роль в современной биологии и медицине, предоставляя исследователям уникальные инструменты для исследования и понимания живых систем. Их высокая чувствительность, точность и способность визуализировать отдельные молекулы делают их незаменимыми для многих исследовательских задач и применений. Выбор подходящего флуорофора для визуализации биохимических и биологических процессов может быть сложной задачей. Молекула метка должна соответствовать требованиям, предъявляемым к флуоресцентным реагентам, используемым для биохимических и медицинских целей, а именно: высокий квантовый выход флуоресценции, большой Стоксов сдвиг, высокая фотостабильность и низкая цитотоксичность. Обычно выбор флуорофоров с нужными спектральными характеристиками для анализа биологических систем осуществляется из доступного набора коммерческих красителей. Однако все еще существуют более сложные задачи, требующие глубокого изучения и понимания различных биохимических и биомеханических процессов. Решение этих задач возможно с применением новых гибридных молекул красителей. Поэтому актуальной научной проблемой является разработка и использование новых гибридных бисхромофорных красителей в биологии и медицине. Таким образом, из вышесказанного вытекает несомненная **актуальность** данного диссертационного исследования.

### **Научная новизна**

В области синтеза красителей были разработаны методы для получения моностириловых производных, гомодимерных и гетеродимерных бисстириловых соединений, которые ранее не были описаны. В ходе проведенного исследования было показано влияние образования комплексов между краун-содержащим бисстириловым красителем и различными катионами металлов на оптические характеристики и фотоиндуцированный перенос энергии между хромофорными фрагментами молекулы. При исследовании взаимодействия симметричных бисстириловых красителей, где хромофорные фрагменты соединены через гетероциклический фрагмент, с двухцепочечной ДНК было обнаружено образование агрегатов различной хиральности. Кроме того, впервые проведены исследования взаимодействия бисстириловых красителей типа "голова-к-хвосту" с ДНК тимуса телят и РНК печени телят. Полученные несимметричные бисстириловые красители проявляют флуоресцентный отклик на наличие ДНК, находящейся в смеси с РНК. В несимметричных бисстириловых красителях был обнаружен и количественно охарактеризован фотоиндуцированный перенос энергии, сохраняющийся в комплексе с катионами металлов, биомолекулами и внутриклеточной средой.

### **Практическая значимость**

В ходе проведенных исследований были получены важные результаты, подтверждающие перспективность использования краун-содержащего бисстирилового красителя в приложениях распознавания и детектирования различных катионов металлов. Особый акцент был сделан на ратиометрическом детектировании ионов  $Hg^{2+}$  в живых клетках А549. Синтезированные бисстириловые красители проявили значительное разгорание флуоресценции при связывании с ДНК. Это свидетельствует о перспективности предложенных структур в качестве флуоресцентных маркеров для детектирования ДНК.

Благодаря высокой селективности при связывании с ДНК по сравнению с РНК и низкой токсичности, бисстириловые красители типа "голова к хвосту" представляют собой многообещающий инструмент для визуализации ДНК *in vitro*. Полученные результаты расширяют наши знания о свойствах и возможностях использования бисстириловых красителей и подтверждают их потенциал в области биомедицинских исследований. Для исследований межмолекулярных и внутримолекулярных расстояний в молекулярной биологии методом FRET большой интерес могут представлять синтезированные автором стириловые красители **m1** и **m2**, если присоединить к ним активные группы для осуществления реакции химического связывания этих красителей с биомакромолекулами.

### **Структура работы и основные результаты**

Диссертация представляет собой комплексное исследование, состоящее из нескольких разделов. Введение, первый раздел диссертации, содержит обоснование актуальности выбранной темы исследования, а также формулировку целей и задач, которые были поставлены перед автором. Второй раздел, литературный обзор, представляет собой обширное исследование литературных данных, связанных с основными классами органических флуоресцентных красителей. В этом разделе освещаются важные аспекты, связанные с применением красителей для нековалентного мечения биомолекул и внутриклеточных органелл, а также их фотофизические свойства и комплексы. Обзор литературы подчеркивает ограниченное количество сложных гибридных молекул бисхромофорных красителей, присутствующих в настоящее время, и выделяет разработку и применение новых гибридных красителей как актуальную научную проблему в области биологии и медицины. Третий раздел диссертации посвящен обсуждению полученных автором данных. В этом разделе подробно рассматриваются результаты синтеза и исследования свойств гомо- и гетеро-димерных бисстирилпиридиниевых красителей, содержащих в фенильном ядре алкокси- и диалкиламино- группы. Автор представляет анализ и интерпретацию полученных данных и выводы, сделанные на основе этих результатов. Четвертый раздел диссертации содержит подробное описание методик синтеза целевых стириловых красителей, а также методики их физико-химической характеристики, что является важной основой для понимания и интерпретации результатов исследования. В заключительной части диссертации, в разделе выводов, представлены основные результаты диссертационного исследования. Автор представляет основные выводы, которые являются результатом проведенного исследования. Он подчеркивает значимость и важность полученных результатов, а также выделяет перспективы для дальнейшей разработки темы исследования.

Список литературы, приложенный к диссертации, включает 211 наименований, включая собственные публикации автора по теме диссертации.

### **Достоверность основных положений и выводов**

Все результаты, представленные в диссертации, основаны на надежном установлении структур полученных соединений с помощью различных физико-химических методов анализа. Результаты работы были опубликованы в высокорейтинговых журналах, что свидетельствует о признании и важности исследований со стороны научного сообщества. В целом, диссертация представляет собой цельное исследование, основанное на надежных методах и анализе данных. Результаты, представленные в работе, имеют высокую достоверность и могут служить основой для дальнейших исследований в области органических флуоресцентных красителей.

По диссертационной работе следует сделать замечания

1. Диссертация посвящена флуоресцентным реагентам на основе стириловых производных, однако литературный обзор дается по красителям, которые не имеют никакого отношения к стириловым красителям (антрахиноновые, BODIPY, акарбазоловые, кумариновые, родаминовые, цианиновые, сквареновые, тиофеновые, гибридные красители). Несмотря на различие в структуре все эти красители образуют неспецифические нековалентные комплексы с нуклеиновыми кислотами за счет

кулоновского взаимодействия, но только производные бисбензимидазола могут образовывать специфические комплексы залегания с АТ-компартаментами ДНК за счет водородных связей. К сожалению, непосредственно по химии стироловых красителей цитируется только четыре работы [112,114, 124 и 125].

2. Физико-химические исследования и обсуждение результатов проведены на качественном уровне. Автор диссертации получил многочисленные данные о константах комплексообразования красителей с катионами металлов: натрий, литий, магний, кальций, магний, ртуть, серебро, барий (Табл. 4 и Табл. 5). Однако, в диссертации автор никак не использует эти результаты и не обсуждает зависимость констант комплексообразования от строения и природы комплексов.

3. Стр 111 Рис 26 – на спектре КД комплекса ДНК с исследуемыми веществами наблюдаются индуцированные сигналы в области, где отсутствует поглощение данных веществ. Рекомендуются объяснить наблюдаемое явление. Наличие отрицательного сигнала КД может свидетельствовать об интеркаливании красителей в ДНК, а не о залегании по малой бороздке.

4. FRET описан на стр. 89 и продемонстрирован для случая внутримолекулярного переноса энергии, из чего следует, что автор диссертации знаком с этим механизмом. На стр 111 -112 Рис. 27 эксперименты по титрованию одного красителя на ДНК другим интерпретированы как механизм замещения лигандов на ДНК в комплексе с биомакромолекулой. Делается вывод о местонахождении молекулы стиролового красителя на ДНК. Если замещение происходит, то стироловый краситель входит на то же место и замещает стандартный краситель. При этом вывод делается по тушению флуоресценции стандартного красителя и разгорания флуоресценции стиролового красителя. Это предположение является неправильным по многим причинам.

1) ДНК не имеет строгой известной химической структуры – тимусная ДНК содержит хаотический неопределенный набор случайных сочетаний компарментов АТ и СG, для которых последовательность неизвестна.

2) Концентрации Hoechst 33258, Метиленового зеленого и стироловых красителей были порядка 5 мкМ, концентрация ДНК составляла по парам баз 300 мкМ. Никакого вытеснения лигандов не может быть, так как не все места для комплексообразования в ДНК заняты и красители могут свободно садиться на любое свободное место в структуре ДНК, не мешая друг другу, что на самом деле и происходило, судя по экспериментальным данным, которые и приводит автор в диссертации.

3) Красители свободно размещаются в своих местах в ДНК и при этом образуется микрофаза (локальная концентрация красителей увеличивается на несколько порядков). Расстояния относительно друг друга между красителями, которые образуют комплексы на ДНК, становятся небольшими 1 – 10 нм. Это эквивалентно тому, если бы концентрации красителей в растворе стали порядка 10 мМ в тысячу раз больше. Тогда расстояния между красителями сокращаются до нескольких нанометров и становятся возможным перенос энергии по механизму FRET. Это и происходит согласно экспериментальным данным автора диссертации. Энергия переносится от Hoechst 33258 на стироловые красители, флуоресценция Hoechst 33258 перекрывается со спектрами поглощения стироловых красителей. Спектр флуоресценции Метиленового зеленого лежит в области 650-800 нм и не перекрывается со спектром поглощения стироловых красителей, поэтому нет тушения флуоресценции и нет переноса энергии между этими красителями. Поэтому интерпретация замещения лигандов на ДНК в комплексах не соответствует экспериментальным данным автора. Аналогичный эффект переноса энергии по механизму FRET виден на рис 34 стр. 118 при титровании комплекса Hoechst 33258-ДНК красителем 5 и при этом наблюдается увеличение флуоресценции красителя 5 при 620 нм, что подтверждает механизм переноса энергии. При механизме замещения лиганда Hoechst 33258 в ДНК на краситель 5, не должна наблюдаться флуоресценция красителя 5, так как возбуждается только система Hoechst 33258-ДНК и флуоресцировать краситель 5 не

должен. Увеличение флуоресценции в этой системе при 620 нм доказывает перенос энергии по механизму FRET и в этой системе. По этой причине связывание стирловых красителей путем залегания в малой бороздке ДНК не является доказанным. Однако, этот эксперимент не исключает связывание стирловых красителей путем залегания в малой бороздке ДНК, но это требует дополнительных экспериментов и доказательств.

Вышеперечисленные замечания не касаются основной сути работы, не влияют на содержание выводов, сделанных на основании полученных соискателем данных, не ставят под сомнение новизну и практическую значимость полученных результатов.

С результатами, полученными при выполнении данной работы, следует ознакомить химиков, работающих в области химии флуоресцентных красителей, органической химии и физической химии на химическом факультете Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, в Российском химико-технологическом университете им. Д. И. Менделеева, в Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, в Институте проблем химической физики РАН, в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, в Центре Фотохимии РАН.

Работа прошла достаточную апробацию, материалы были представлены на многочисленных российских и международных конференциях. Результаты работы изложены в 9 публикациях, 6 из них - в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат отражает в полной мере результаты, представленные в диссертации.

#### **Заключение**

На основании проведенного анализа можно заключить, что диссертационная работа М.А. Устимовой 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., 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:**

Кузьмин Владимир Александрович, доктор химических наук по специальности 1.4.4 физическая химия, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

Адрес: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

Телефон: +7 [495] 939-73-41

Электронный адрес: vak@sky.chph.ras.ru

Дата «24» мая 2023 г.

Доктор химических наук,  
Заведующий лабораторией

Кузьмин В. А.

Подпись зав. лаб. д.х.н. Кузьмина В. А.  
Ученый секретарь ИБХФ РАН к.б.н.

Зав. лаб. Кузьмина В. А.

Скалацкая С. И.

