

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.161.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
ИМ. А.Н.НЕСМЕЯНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,
ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 15 июня 2023 г. № 14

О присуждении Устимовой Марии Алексеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Разработка флуоресцентных реагентов на основе стироловых производных для внутриклеточной визуализации» по специальностям 1.4.3 - Органическая химия, 1.4.4 - Физическая химия принята к защите 05 апреля 2023 г. (протокол заседания № 8) диссертационным советом 24.1.161.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 28, стр. 1. Приказ о создании совета № 105 /НК от 11.04.2012.

Соискатель Устимова Мария Алексеевна, 03 ноября 1994 года рождения.

В 2018 году соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», г. Москва.

В период подготовки диссертации Устимова Мария Алексеевна обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н.

Несмеянова РАН с 2018 по 2022 год, в настоящее время работает в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация «Разработка флуоресцентных реагентов на основе стироловых производных для внутриклеточной визуализации» выполнена в лаборатории фотоактивных супрамолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук.

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор **Федорова Ольга Анатольевна**, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, лаборатория фотоактивных супрамолекулярных систем, заведующая лабораторией,

доктор химических наук **Федоров Юрий Викторович**, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, лаборатория по разработке хелаторов и их конъюгатов с молекулами-векторами для получения радиофарм-препаратов, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Кузьмин Владимир Александрович – доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, лаборатория процессов фотосенсибилизации, заведующий лабораторией,

Волкова Юлия Алексеевна – кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук, лаборатория химии стероидных соединений, старший научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» в своем положительном отзыве, подписанном проректором, доктором физико-математических наук, профессором РАН А.А. Федяниным (заключение составлено Белоглазкиной Еленой Кимовной, доктором химических наук, профессором кафедры органической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова), указала, что диссертационная работа Устимовой Марии Алексеевны полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, установленным в п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в действующей редакции, а ее автор, Устимова Мария Алексеевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.3 - Органическая химия, 1.4.4 - Физическая химия. Работа Устимовой М. А. представляет интерес для специалистов в области химии флуоресцентных красителей, органической химии и физической химии: Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова (Химический факультет), ФБГУН Институт элементоорганической химии им. А.Н.Несмеянова РАН, ФБГУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, ФБГУН Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, Казанский (Приволжский) Федеральный университет, ФБГУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр

Российской академии наук» (Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН) и др.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ по теме диссертации, из них 6 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в международных базах данных (Scopus, Web of Science), 3 – в журнале, включенном в РИНЦ. Диссертационное исследование представлено на 12 международных и Всероссийских конференциях.

Основные работы:

1. **Ustimova M.A.**, Lebedeva A.Yu., Fedorov Yu.V., Berdnikova D.V., Fedorova O.A. FRET-based metal ion sensing by a crown-containing bisstyryl dye // *New J. Chem.* – 2018. – Vol. 42. – № 10. – P. 7908–7913.
2. **Ustimova M.A.**, Fedorov Yu.V., Tsvetkov Vl.B., Tokarev S.D., Shepel N.A., Fedorova O.A. Helical aggregates of bis(styryl) dyes formed by DNA templating // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2021. – Vol. 418. – P. 113378.
3. Panchenko P.A., Efremenko A.V., Feofanov A.V., **Ustimova M.A.**, Fedorov Yu.V., Fedorova O.A. Ratiometric Detection of Mercury (II) Ions in Living Cells Using Fluorescent Probe Based on Bis(styryl) Dye and Azadithia-15-Crown-5 Ether Receptor // *Sensors.* – 2021. – Vol. 21. – P. 470.
4. **Ustimova M.A.**, Fedorov Yu.V., Chmelyuk N.S., Abakumov M.A., Fedorova O.A. Fluorescence turn-on probes for intracellular DNA/RNA distribution based on asymmetric bis(styryl) dyes // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2022. – Vol. 279. – P. 121446.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

1. **Ощепкова М. С.**, д.х.н., заведующего кафедрой химии и технологии биомедицинских препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»; 2. **Мироновой Д. А.**, к.х.н., доцента кафедры органической и медицинской химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный

университет»); 3. **Овчинниковой И. Г.**, к.х.н., научного сотрудника лаборатории гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского УрО РАН, **Русинова Г. Л.**, к.х.н., ведущего научного сотрудника лаборатории гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского УрО РАН. 4. **Мустафиной А. Р.**, д.х.н., главного научного сотрудника, заведующей лабораторией физико-химии супрамолекулярных систем Института органической и физической химии имени А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Все отзывы положительные.

В отзывах указывается, что диссертационная работа Устимовой Марии Алексеевны, является актуальной, несомненно, обладает научной новизной и практической значимостью. В диссертационной работе осуществлена разработка флуоресцентных реагентов на основе стириловых производных для внутриклеточной визуализации и изучение их свойств. Исследование является важным вкладом в химию флуоресцентных красителей, органическую химию и физическую химию. Автор работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.3 - Органическая химия, 1.4.4 - Физическая химия.

В отзывах содержатся следующие замечания:

- 1) В работе представлены бисстириловые красители симметричного и несимметричного строения, хромофоры которых соединены между собой линкером, который для каждой группы соединений разный. Из текста автореферата не ясно, чем обоснован выбор длины и природы линкеры к каждой группе соединений на 6 стр.
- 2) На стр. 13 приведены квантово-химические расчеты, но не указан программный пакет и базис для расчета, с помощью которого были получены представленные результаты.

- 3) На стр. 22 представлена процедура докинга, но также не указана программа для расчета. Не ясно, почему расчет проводили только для соединений 2 и 3 и не проведен для соединений, содержащих атомы азота в структуре линкера?
- 4) При изучении комплексообразования краун-содержащего бисстирилового красителя 1 с катионом ртути в воде проводились ли эксперименты при одновременном присутствии катионов ртути (II), серебра (I) и протонов? Как при этом изменится чувствительность красителя 1 к определяемому катиону ртути (II)?
- 5) Повлияет ли изменение аниона у соли ртути (II) на селективность и чувствительность при ратиометрическом флуоресцентном обнаружении с использованием соединения 1?
- 6) Почему не изучалось комплексообразование красителей 2, 3, 4 типа «голова к голове» с РНК печени теленка?
- 7) В чем причина специфичного связывания красителя 5 с ДНК по сравнению с красителем 6?
- 8) В синтезе крауна 10 использовался катализатор в виде смеси кислоты и основания, тогда как во всех других случаях аналогичных реакций конденсации в работе использовался пиперидин. Предложите возможный механизм реакции образования соединения 10.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что д.х.н. Кузьмин В.А. является крупным специалистом в области физической химии, в том числе области исследования флуоресцентных красителей, а к.х.н. Волкова Ю.А. – крупный специалист в области химии органических соединений, в том числе в синтезе, исследовании строения и свойств органических соединений. Выбор ведущей организации обоснован тем, что Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» является одной из ведущих организаций в области

органической и физической химии, в том числе области синтеза и исследования гетероциклических соединений.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны методы синтеза неописанных ранее моностириловых производных, гомодимерных и гетеродимерных бисстириловых красителей; При взаимодействии с дц-ДНК симметричных бисстириловых красителей, хромофорные фрагменты которых были соединены через гетероциклический фрагмент, **обнаружено** образование агрегатов различной хиральности; **показано**, что полученные несимметричные бисстириловые красители способны демонстрировать флуоресцентный отклик на присутствие ДНК, находящейся в смеси с РНК. **Найден** и количественно **охарактеризован** фотоиндуцированный перенос энергии в несимметричных бисстириловых красителях, протекание которого сохраняется в комплексе с катионами металлов, с биомолекулой, а также во внутриклеточной среде; на серии соединений одного состава, но с различной организацией стирриловых фрагментов, **выявлено** влияние структурной организации бисстириловых красителей на связывание с ДНК.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

предложены схемы синтеза ранее не описанных гетеродимерных бисстириловых красителей; впервые **изучено** взаимодействие бисстириловых красителей типа «голова-к-хвосту» с дц-ДНК тимуса теленка и РНК печени теленка; **показано** влияние комплексообразования краун-содержащего бисстирилового красителя с различными катионами металлов на оптические характеристики и протекание фотоиндуцированного переноса энергии между хромофорными фрагментами молекулы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

определены перспективы практического использования краун-содержащего бисстирилового красителя для распознавания катионов металлов различной

природы и ратиометрического детектирования ионов Hg^{2+} в живых клетках А549; **представлена** серия бисстириловых красителей, которые при связывании с ДНК демонстрируют значительное разгорание флуоресценции, что свидетельствует о перспективности предложенных структур в качестве флуоресцентных маркеров для детектирования ДНК; **получены** бисстириловые красители типа «голова к хвосту», демонстрирующие низкую токсичность и большую селективность при связывании с ДНК, чем с РНК, и которые могут использоваться для визуализации ДНК *in vitro*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: для экспериментальных работ и спектральных исследований были использованы современные методы физико-химического анализа (ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопия, масс-спектрометрия, оптическая спектроскопия, рентгеноструктурный анализ), экспериментальные данные были получены на сертифицированном оборудовании, согласуются с литературными исследованиями и являются полностью достоверными; теория построена на основе анализа литературных данных и полученных экспериментальных зависимостях; **установлено** качественное соответствие результатов автора с данными, приведенными в независимых источниках по данной теме.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационного исследования: от анализа литературных данных до обсуждения решаемых задач, подготовке и проведении экспериментов, интерпретации и обобщении полученных результатов, а также написании научных публикаций и представлении докладов по теме работы на конференциях.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Почему для синтеза соединений 10 и 11 необходимо использовать различные условия конденсации? Варьировались ли условия получения соединения 11 из альдегида и метилпиридина, и тестировались ли в этой

- реакции те же условия, что были использованы при синтезе соединения 10 (пиперидин, уксусная кислота, уксусный ангидрид)?
2. Соединение 4 на Схеме 5 представлено (и описано в тексте обсуждения) как диiodид, тогда как то же соединение на Рис. 1 изображено как иодидобромид, какая из структур верная? Аналогичный вопрос по Схеме 8 и Рис. 2, где соединение 6 в одном случае изображено как иодидобромид, а в другом – как диiodид.
 3. Стр. 90-91: как рассчитывались уровни энергий ВЗМО и НСМО по электрохимическим данным? Хорошо бы указать это в основном тексте.
 4. Учитывая многоплановость исследования, требуется уточнить, какие экспериментальные исследования автор выполнял лично.
 5. Проводились ли для красителя 1 конкурентные эксперименты в 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. 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.
 8. 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 стирилового красителя на ДНК. Если замещение происходит, то стироловый краситель входит на тоже место и замещает стандартный краситель. При этом вывод делается по тушению флуоресценции

стандартного красителя и разгоранию флуоресценции стирилового красителя. Предположение является неправильным по многим причинам.

Соискатель Устимова М.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

- 1) Для соединения двух хромофорных фрагментов в структуре бисстирилового красителя были выбраны алифатическая, триазол-содержащая цепочка и линкер, включающий положительно заряженные атомы азота. В случае несимметричных красителей длина линкера должна соответствовать необходимому расстоянию между хромофорами для реализации FRET (резонансного переноса энергии) 10-100 Å. В синтезируемых нами несимметричных красителях расстояние между хромофорами варьируется от 10 до 20 Å. В случае красителей 7, 8 были выбраны большие по длине линкеры для предотвращения агрегации красителей.
- 2) Для расчёта расстояния между хромофорами в структуре несимметричных бисстириловых красителей была построена трехмерная структура с помощью пакета программ MORAC 2016 с использованием полуэмпирического метода PM7.
- 3) Расчет методом молекулярного докинга проводили при использовании программных пакетов Sybyl-X и Molsoft ICM-Pro 3.8.6. Для соединений, содержащих атомы азота в структуре линкера, расчет не проводили, поскольку в работе не исследовалось взаимодействие данных структур с ДНК.
- 4) Экспериментов по конкурентному титрованию с катионами серебра и протонами мы не проводили, но были проведены эксперименты по конкурентному взаимодействию ртути с катионами меди, кальция, магния, цинка, железа, никеля, свинца и кадмия, где краситель 1 показал селективность к катионам ртути.
- 5) В биологических средах и в клетках содержится много различных анионов, и в таком случае окружение ртути зависит от состава среды.

Поэтому в биологических экспериментах не столь важно, в каком виде мы добавим соль ртути, в нашем случае мы использовали соль перхлората, потому что она хорошо растворяется в воде.

6) Комплексообразование красителей типа «голова к голове» 2, 3, 4 с РНК печени телят не изучалось, поскольку при исследовании данных красителей на связывание с ДНК тимуса телят они проявили свою склонность к агрегации и при этом показали меньшее разгорание флуоресценции.

7) Причиной более специфичного связывания красителя 5 с ДНК по сравнению с красителем 6 может служить наличие в структуре линкера красителя 6 триазольного фрагмента, который участвует в комплексообразовании с биомолекулой.

8) Пиперидин в качестве основания использовался в реакции конденсации бензальдегида с кватернизованным гетероциклом, поскольку в таком случае депротонирование протекает легче. При получении соединения 10 для активации гетероцикла мы проводили реакцию в среде уксусного ангидрида, который ацилирует 4-пиколин, в присутствии каталитических количеств пиперидина и уксусной кислоты.

9) Различия в условиях конденсации при получении соединений 10 и 11 связаны с различной реакционной способностью исходных бензальдегидов. У азадитиакраун-содержащего бензальдегида активность в реакции конденсации ниже, ввиду большей донорности атома азота. При получении соединения 11 использовались алкоголяты натрия и калия, поскольку катионы металлов встраивались в полость краун-эфира, снижая донорность атомов кислорода, что облегчало протекание реакции.

10) Соединение 4 представляет собой диодид, соединение 6 – иодидбромид.

11) Уровни энергии ВЗМО и НСМО были рассчитаны по формуле:

ВЗМО, эВ = $-E_{\text{окисл.}}$, В – 4.8; НСМО, эВ = $-E_{\text{восст.}}$, В – 4.8; поскольку уровень энергии ферроцена/ферроцена на 4.8 эВ ниже уровня вакуума.

- 12) В ходе диссертационного исследования мною лично были выполнены синтетические работы по получению моно- и бисстириловых красителей, физико-химические эксперименты для изучения оптических свойств полученных красителей. Также лично мною проводились спектрофотометрические исследования комплексообразования красителя 1 с катионами металлов, связывания красителей 2-6 с биомолекулами ДНК/РНК, исследования методом кругового дихроизма.
- 13) Мы проводили эксперименты по связыванию катионов калия, кальция и натрия в водном растворе, где наблюдали отсутствие изменений оптических характеристик красителя 1. Конкурентных экспериментов в живых клетках в присутствии таких металлов мы не проводили. Однако при выращивании клеток биологами использовалась DMEM-среда, которая содержит хлориды, сульфаты, гидрокарбонаты кальция, калия, натрия, присутствие которых не мешало детектированию ртути в клетках. При титровании красителя 1 линейная зависимость для изменения интенсивности флуоресценции наблюдалась до точки эквивалентности, и в данном случае до концентрации 20 мкМ. В клеточных исследованиях линейная зависимость наблюдалась в диапазоне внутриклеточной концентрации 37 нМ – 1 мкМ.
- 14) Более высокое разгорание флуоресценции в присутствии ДНК для красителя 3, по сравнению с аналогами 2 и 4, связано с тем, что в свободном виде релаксация возбужденного состояния красителя 3 протекает безызлучательно за счет образования скрученных Т1СТ-состояний, чем объясняется более низкий квантовый выход флуоресценции. Поэтому при связывании с биомолекулой вращение вокруг одинарных и двойных связей становится затруднительным и релаксация протекает излучательно, что объясняет интенсивное разгорание флуоресценции.
- 15) Зависимость констант комплексообразования от строения и природы комплексов согласуется с литературными данными. Жёсткие лиганды, содержащие атомы кислорода, хорошо координируются с жёсткими катионами щелочных и щелочно-земельных металлов, а более мягкие

лиганды, содержащие атомы серы и азота, лучше связывают мягкие катионы, например серебро, ртуть.

16) Эксперименты по конкурентному титрованию красителем комплекса ДНК с известным стандартом являются стандартной методикой для определения места залегания красителя в структуре ДНК и представлены во многих статьях. Поэтому мы тоже проводили такие эксперименты, но также мы не исключаем возможность протекания процесса переноса энергии между исследуемым красителем и стандартом в структуре ДНК.

На заседании 15 июня 2023 года диссертационный совет принял решение за разработку флуоресцентных реагентов на основе бисстириловых производных, вносящих значительный вклад в развитие органической и физической химии фотоактивных соединений, присудить Устимовой М. А. ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 5 докторов наук по специальности 1.4.3. – Органическая химия и 6 докторов наук по специальности 1.4.4. – Физическая химия, участвовавших в заседании, из 28 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней – 0.

Заместитель председателя

Диссертационного совета 24.1.161.01.

д.х.н.



Любимов Сергей Евгеньевич

Ученый секретарь

Диссертационного совета 24.1.161.01.

к.х.н.

Ольшевская Валентина Антоновна

15 июня 2023 г.