

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по диссертации на соискание учёной степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 8 июня 2016 г. № 6

О присуждении **Осиповой Зинаиде Михайловне**, гражданину РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация Осиповой Зинаиды Михайловны «Синтез люциферинов, оксилуциферинов и их аналогов для изучения механизмов биолуминесценции почвенного червя *Fridericia heliota* и высших грибов» по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия принята к защите 30 марта 2016 года, протокол № 4, диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель Осипова Зинаида Михайловна, 1990 года рождения, в 2012 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» по специальности «химия». В настоящее время является аспирантом 4 г.о. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и работает младшим научным сотрудником группы синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в группе синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель: **Ямпольский Илья Викторович**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, руководитель группы синтеза природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. **Устюжанина Надежда Евгеньевна**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии гликоконъюгатов №52 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук;

2. **Вацадзе Сергей Зурабович**, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), г. Москва, (заключение составил Чусов Денис Александрович, кандидат химических наук, руководитель группы №117, утвердил Малеев Виктор Иванович, доктор химических наук, заместитель директора ИНЭОС РАН по научной работе) указала, что диссертационная работа Осиповой З.М. является завершённой научно-исследовательской работой, которая по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842. Автор работы, Осипова Зинаида Михайловна, достойна присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 3 работы объемом 5 печатных листов в зарубежных научных изданиях, входящих в международную научную базу цитирования Web of Science.

Научные работы по теме диссертации, в которые автор внёс основной или существенный вклад:

1. Maxim A. Dubinnyi, Aleksandra S. Tsarkova, Valentin N. Petushkov, **Zinaida M. Kaskova**, Natalja S. Rodionova, Sergey I. Kovalchuk, Rustam H. Ziganshin, Mikhail S. Baranov, Konstantin S. Mineev, and Iliya V. Yampolsky. Novel peptide chemistry in terrestrial animals: natural luciferin analogues from the bioluminescent earthworm *Fridericia heliota*. // *Chem. Eur. J.* 2015. Т. 21. № 10. С. 3942–3947.
2. Maxim A. Dubinnyi, **Zinaida M. Kaskova**, Natalja S. Rodionova, Mikhail S. Baranov, Andrey Yu. Gorokhovatsky, Alexey Kotlobay, Kyril M. Solntsev, Aleksandra S. Tsarkova, Valentin N. Petushkov and Iliya V. Yampolsky. Novel Mechanism of Bioluminescence: Oxidative Decarboxylation of a Moiety Adjacent to the Light Emitter of *Fridericia* Luciferin. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Т.127. № 24. С. 7171-7173.
3. Konstantin V. Purtov, Valentin N. Petushkov, Mikhail S. Baranov, Konstantin S. Mineev, Natalja S. Rodionova, **Zinaida M. Kaskova**, Aleksandra S. Tsarkova, Alexei I. Petunin, Vladimir S. Bondar, Emma K. Rodicheva, Svetlana E. Medvedeva, Yuichi Oba, Yumiko Oba, Alexander S. Arseniev, Sergey Lukyanov, Josef I. Gitelson, Iliya V. Yampolsky. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Т.127. № 28. С. 8242-8246.

На диссертацию и автореферат поступили следующие отзывы:

1. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
  - 1.1. Не со всех твердых соединений была измерена температура плавления. В некоторых случаях это обусловлено маленькими нагрузками, но даже в тех случаях, когда вещества получались в большем количестве, информация о таких измерениях не приводится.
  - 1.2. При описании ЯМР спектров лучше указывать диапазон химических сдвигов для уширенных синглетов и мультиплетов.

- 1.3. Если продукт очищают методом колоночной хроматографии, то хорошо бы указывать Rf.
- 1.4. Не во всех случаях в описании спектров  $^1\text{H}$  ЯМР для дублетов приведены константы спин-спинового взаимодействия.
- 1.5. В разделе «результаты и обсуждение» на одних схемах превращений указывается выход, а на других нет.
- 1.6. В работе встречаются опечатки и стилистическая несогласованность. Например, на странице 4, абзац 4. «Каждая из исследованных биоломинесцентных систем обладает своим набором недостатков и ограничений, что *провоцирует искать* и исследовать новые системы и механизмы их функционирования в качестве альтернативы к существующим». Лучше было бы сказать: провоцирует к поиску и исследованию. На страницах 95, 104 допущена опечатка в названии (E)-6-(3,4-дигидроксистирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он.
2. Отзыв официального оппонента к.х.н. Устюжаниной Н.Е. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
- 2.1. При обсуждении результатов уделено мало внимания подтверждению структуры полученных соединений. Например, на Схеме 2.17 представлен синтез соединений из общего предшественника **2.52**. Не ясно, образовывалась ли смесь E- и Z-изомеров? Как подтверждалась *транс*-конфигурация двойной связи в полученных соединениях **2.52-2.58**?
- 2.2. В разделе 2.1.1 при оптимизации синтеза метилового эфира CompX не обсуждается подробно, с чем связано увеличение выхода соединения **2.4**.
- 2.3. В разделе 2.2.1 при описании синтеза грибного люциферина **2.33** автор отмечает легкость удаления двух метильных защитных групп по сравнению с аналогичной стадией в синтезе гиспидина **2.32** (Схема 2.16). С чем связано такое различие в реакционной способности указанных соединений?
- 2.4. К сожалению, автор не объясняет, с чем связан выбор аналогов грибного люциферина, описанных в разделе 2.2.3. Можно ли предсказать, куда будет направлять смещение максимумов в спектрах поглощения и люминесценции та или иная группа?
- 2.5. Не ясно, почему при установлении структуры продукта реакции биоломинесценции грибного люциферина – оксилуциферина (Раздел 2.2.4) нельзя было выделить из реакционной массы собственно оксилуциферин (пик №6). Судя по Рисунку 2.10, это соединение накапливалось в значимых количествах через 150 минут после инкубации.
- 2.6. Встречаются в тексте не совсем удачные выражения. Например, на с.53. «В ходе предварительных исследований *было установлено*, что активность в реакции биоломинесценции, *вероятнее всего*, проявляет одна из карбоксильных групп в остатке ω-оксалиллизина». Выводы (с.104) можно было бы сформулировать короче.
3. Отзыв официального оппонента д.х.н., проф. РАН Вацадзе С.З. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
- 3.1. в *постановочной части* работы цель работы, сформулированная как «изучение», звучит не очень корректно – как проверить ее достижимость? Соответственно, и формулировка первого, главного, вывода о достижении поставленной цели, отсутствует;

- 3.2. *обзор литературы*: обширность и разнообразие тематик обзора в ущерб конкретике – много отсылок к обзорам в литературе;
- 3.3. стр. 28 – стоило указать, какие именно нанотрубки упоминаются – скорее всего, речь идёт об углеродных материалах;
- 3.4. стоило завершить обзор литературы критическим обобщением, которое стало бы основой для постановки целей и задач исследования;
- 3.5. *обсуждение результатов*: я бы с большой натяжкой отнёс «Люциферин *Fridericia heliota* **2.1**» к классу *пептидов*;
- 3.6. *редакторские*: «в работе...кратко обзревается исследования»; «биоимаджинг»; в подписи к рис. 1.3 стоило конкретизировать, что это за «восемь люциферинов»; на рис. 5 автореферата не видна нумерация атомов; стр. 15 автореферата – вместо «Спектры...приведены в Таблице» нужно было указать «Данные спектров...приведены...».
4. Отзыв на автореферат к.х.н. Перекалина Дмитрия Сергеевича, старшего научного сотрудника лаборатории пи-комплексов переходных металлов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
- 4.1. Из автореферата диссертации остается неясным, почему хемилюминесценция соединения **2.31** (стр. 9, схема 10) под действием оснований подтверждает гипотезу автора о механизме биолюминесценции *F. heliota*? В предложенном механизме биолюминесценции участвует свободная карбоксильная группа, которая в соединении **2.31** защищена трет-бутиловым эфиром. Автор полагает, что основание может атаковать подобную карбоксильную группу? Неясно также, что являлось окислителем в эксперименте по хемилюминесценции – кислород или  $H_2O_2$ ? Были ли при этом выделены продукты типа оксилуциферина?
- 4.2. Поспешным кажется замечание автора (стр. 12) о том, что «постановка защиты на две соседние гидроксильные группы в пираноновом кольце [соединения **2.40**] затруднена стерически». Анализ литературы показывает, что сходные производные бензола и даже пиридона были ранее получены. Скорее можно предположить, что постановка защитных групп в соединении **2.40** осложнена электронными эффектами, которые снижают нуклеофильность ОН-групп.
- 4.3. В автореферате также присутствует ряд опечаток, самая существенная из которых – переставленные местами спектры продуктов распада оксилуциферина грибов (стр. 17, рисунок 11).
5. Отзыв на автореферат к.х.н. Левина Виталия Владимировича, старшего научного сотрудника лаборатории функциональных органических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:
- 5.1. В реакции Виттига, приводящей и предшественникам аналогов люциферина **2.53-2.58** указаны весьма скромные выходы (12-32%). Связано ли это с низкой конверсией в реакции или образованием побочных продуктов? Нельзя ли поднять выход путём повышения

температуры реакции? Ведь известно, что стабилизированные фосфорные илиды реагируют с альдегидами, особенно с донорными, при повышенных температурах. Почему нельзя было использовать для осуществления этого процесса более быструю реакцию Хорнера-Вадсворта-Эммонса, как это делалось автором в других случаях?

- 5.2. Что именно помешало выделить сам оксилуциферин **2.62**, образующийся в процессе биолюминесценции при том условии, что он отчётливо фиксируется при помощи ВЭЖХ?
- 5.3. Не совсем понятно, завершается ли излучательный процесс одновременно с исчезновением люциферина **2.33**? Иными словами: не может ли дальнейший окислительный распад самого оксилуциферина, в котором происходит расщепление катехольного фрагмента, также приводить к биолюминесценции?
- 5.4. Тот факт, что не были изучены продукты реакции биолюминесценции аналогов люциферина **2.45-2.50**, создаёт впечатление некоторой незаконченности работы и недостаточной обоснованности предполагаемого механизма биолюминесценции. Однако это нельзя вменить автору как серьёзный недостаток, поскольку данное диссертационное исследование более носит синтетический характер, а с этой точки зрения все необходимые соединения были получены, их поведение в условиях процесса биолюминесценции изучено, а необходимые для установления механизма выводы сделаны на основании других, имеющихся в работе данных.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в области химии биологически активных природных соединений, исследованиях реакционной способности органических веществ и моделировании свойств и реакционной способности химических соединений, а также наличием большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по теме диссертации соискателя. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научное и практическое значение настоящей диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что соискателем осуществлена модификация синтеза люциферина *Fridericia heliota*, впервые получен его функциональный аналог с новыми спектральными характеристиками. В ходе работы также осуществлен встречный синтез фрагмента природных аналогов люциферина *F. heliota* и доказана их структура. Получен функциональный аналог аденилата люциферина *F. heliota*, доказан механизм биолюминесценции *F. heliota*. Впервые осуществлен синтез люциферина высших грибов, получены шесть его структурных аналогов, изучены их спектральные характеристики. Установлена структура продуктов биолюминесцентной реакции высших грибов и предложена структура оксилуциферина грибов. Осуществлен синтез оксилуциферина грибов и его аналога для подтверждения механизма реакции грибной биолюминесценции.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- диссертация З.М. Осиповой имеет фундаментальную направленность и расширяет представление о химической природе и механизмах биолюминесценции.
- применительно к проблематике диссертации результативно, с получением обладающих новизной результатов, использованы различные методы современного органического синтеза, а

также современные методы анализа органических соединений и изучения их оптических свойств, такие как одно- и двумерная спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , спектрофотометрия и флуоресцентная спектроскопия.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что изучен механизм реакции биоломинесценции и разработана платформа для получения новых устойчивых синтетических аналогов природных люциферинов *F. heliota* и высших грибов. Результаты диссертации в дальнейшем могут найти практическое применение в разработке новых аналитических методов *in vitro* и *in vivo*, включающих в себя тесты на различные аналиты, иммунологические исследования, изучение экспрессии генов, скрининг лекарств, а также биоимиджинг живых систем в режиме реального времени.

Оценка достоверности результатов основывается на том, что они получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов; доказана воспроизводимость результатов исследования; идеи и концепции, изложенные в диссертации, базируются на современных представлениях химической и биологической науки.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе направления исследований, разработке и выборе экспериментальных подходов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Основные экспериментальные данные получены соискателем лично за исключением данных ЯМР-спектроскопии для аналогов люциферина грибов и природных аналогов люциферина *F. heliota*, полученных К. Минеевым и М. Дубинным, сотрудниками лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН (Москва), и данных ВЭЖХ, полученных В.Н. Петушковым и Н.С. Родионовой, сотрудниками лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН (Красноярск). Подготовка публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

На заседании 8 июня 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Осиповой Зинаиде Михайловне учёную степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 6 докторов наук по профилю диссертации (специальность 02.00.10 - биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета  
Академик РАН

Ученый секретарь диссертационного совета  
Д.ф.-м.н.

  
Иванов В. Т.

  
Олейников В. А.

