

Отзыв на автореферат диссертации

Осиповой Зинаиды Михайловны

«Синтез люциферинов, оксилюциферинов и их аналогов для изучения механизмов биоломинесценции почвенного червя *Fridericia heliota* и высших грибов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Диссертационная работа Осиповой Зинаиды Михайловны посвящена синтезу природных соединений и их аналогов, которые участвуют в процессе биоломинесценции почвенных кольчатых малощетинковых червей *Fridericia heliota* и высших грибов. Химический принцип процесса биоломинесценции заключается в катализируемом белком-люциферазой окислении молекулы люциферина кислородом воздуха. Образующаяся при этом молекула оксилюциферина испускает квант видимого света при переходе из возбужденного в нормальное состояние. На данный момент структуры определены лишь для восьми природных люциферинов и нескольких десятков люцифераз. В контексте этого работа Осиповой З. М. является актуальной, поскольку проливает свет на новые механизмы биоломинесценции в живых организмах.

Первой целью диссертационного исследования явилась оптимизация синтеза люциферина сибирского почвенного червя *Fridericia heliota*, структура которого, определённая в 2014 году, представляет собою необычный пептид, состоящий из остатков γ -аминомасляной кислоты, модифицированного тирозина, лизина и щавелевой кислоты. При этом за счет более конвергентной схемы синтеза, позволившей уменьшить количество стадий постановки и удаления защитных групп, суммарный выход возрос с 0.04% до 2% по сравнению с прежним синтезом, проведенным в той же исследовательской группе.

Далее для установления конфигурации двойной связи во фрагменте модифицированного тирозина, который имеется в самом люциферине и его аналогах, был осуществлён его четырёхстадийный синтез. Последующее сравнение ЯМР-спектров полученного соединения и природных образцов показало, что двойная связь имеет Z-конфигурацию.

Таким образом, зная точную структуру люциферина и имея удобную схему его синтеза, следующей задачей стал синтез двух аналогов люциферина, модифицированных по фрагменту γ -аминомасляной кислоты. Биоломинесценция этих соединений показала, что активность в реакции проявляет одна из карбоксильных групп в остатке ω -оксалиллизина. Это предположение подтвердила также и структура оксилюциферина, полученно коллегами

автора при смешивании синтетического люциферина *F.heliota* с экстрактом люциферазы в присутствии избытка АТФ.

Следующей частью диссертационного исследования Осиповой З. М. стало изучение биолюминесцентной системы высших грибов. Предварительные исследования показали, что люциферин грибов представляет собой соединение класса стирилпиранов, а именно 3-гидроксигиспидин.

Попытка автора синтезировать это соединение прямым гидроксированием коммерчески доступного гиспидина не увенчалась успехом. Поэтому для синтеза люциферина была предложена стратегия, в которой ключевой стадией явилось создание двойной связи путем конденсации Кневенагеля фрагментов дигидроксибензальдегида и метилпиранона. В результате синтез был осуществлён в пять стадий из доступной дегидроацетовой кислоты. При этом особую сложность представляли собой как выбор подходящих защитных групп, так и подбор оптимальных условий конденсации Кневенагеля.

С целью установления механизма биолюминесценции далее была выполнена задача по получению ряда аналогов грибного люциферина, содержащих различные донорные заместители в бензольном ядре. Однако при использовании донорных альдегидов выходы в реакции конденсации Кневенагеля оказались слишком низки, поэтому двойная связь создавалась по реакции Виттига, ради которой была синтезирована фосфониевая соль, содержащая пираноновый фрагмент. Таким образом было получено шесть аналогов люциферина.

Затем была изучена их активность при добавлении экстракта люциферазы грибов. При этом выяснилось, что активность аналогов люциферина, имеющих диалкиламиногруппу в *para*-положении бензольного кольца в 2-4 раза превышает активность природного люциферина, в то время как производные с нафталиновым и индольным ядром малоактивны. Подобная модификация ароматического ядра люциферина без потери люминесцентной активности указала на то, что реакция биолюминесценции грибного люциферина затрагивает только пираноновый фрагмент молекулы субстрата.

Более детальные сведения о механизме биолюминесценции могло бы дать авторам установление структуры молекулы оксилуциферина, однако это соединение было зафиксировано лишь при помощи ВЭЖХ, и в процессе биолюминесценции это соединение оказалось неустойчивым и подвергалось дальнейшему окислительному распаду. Конечные продукты этого распада были выделены, а на основании их спектральных данных была предложена их структура. Оказалось, что в этих соединениях окислены как пираноновый, так и катехольный фрагменты молекулы исходного люциферина. На основании

биоломинисцентных свойств аналогов люциферина было предположено, что за возникновение биоломинесценции отвечает распад именно пиранонового цикла. С этой целью соединение, имеющее структуру предполагаемого оксильюциферина, было получено синтетическим путём. Причем оказалось, что оно имеет ту же подвижность в ВЭЖХ, что и оксильюциферин, образующийся в условиях биоломинесценции. На этом основании было доказано, что в реакции биоломинесценции люциферина грибов ключевую роль играет пираноновый фрагмент субстрата.

В ходе ознакомления с авторефератом возникли следующие вопросы и замечания:

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 илidy 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?

2) Что именно помешало выделить сам оксильюциферин **2.62**, образующийся в процессе биоломинесценции при том условии, что он отчётливо фиксируется при помощи ВЭЖХ?

3) Не совсем понятно, завершается ли излучательный процесс одновременно с исчезновением люциферина **2.33**? Иными словами: не может ли дальнейший окислительный распад самого оксильюциферина, в котором происходит расщепление катехольного фрагмента, также приводить к биоломинесценции?

4) Тот факт, что не были изучены продукты реакции биоломинесценции аналогов люциферина **2.45-2.50**, создаёт впечатление некоторой незаконченности работы и недостаточной обоснованности предполагаемого механизма биоломинесценции. 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 биоломинесценции изучено, а необходимые для установления механизма выводы сделаны на основании других, имеющихся в работе данных.

Судя по изложенному в автореферате материалу, диссертация Осиповой З. М. представляет собой законченную работу, изложенную ясно и последовательно, выполненную на высоком экспериментальном уровне, результаты которой опубликованы в престижных международных журналах, входящих в перечень ВАК. Диссертационная

работа Осиповой Зинаиды Михайловны соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), а сам соискатель, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности: 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Старший научный сотрудник, к.х.н.

Лаборатории функциональных органических соединений
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института органической химии им. Н.Д. Зелинского
Российской академии наук (ИОХ РАН)

Виталий Владимирович Левин

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

Телефон: +7 916 342 15 81

e-mail: levitavl@yandex.ru

19.05.2016 г.

Подпись с.н.с., к.х.н. Левина В.В.

«удостоверяю»

Ученый секретарь ИОХ РАН,
кандидат химических наук



И. К. Коршевец