

Молотковский Юлиан Георгиевич, доктор химических наук (02.00.10 Биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных соединений), профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии липидов

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Болдырев, И. А. Новые 4,4-дифтор-3a,4a-диаза-s-индацен (BODIPY)-меченные сфинголипиды для мембранных исследований / И.А. Болдырев, Ю.Г. Молотковский // *Биорг. химия*. – 2010. – Том 36. – № 4. – С. 508–511.
2. Tuuf, J. The intermembrane ceramide transport catalyzed by CERT is sensitive to the lipid environment. / J. Tuuf, M.A. Kjellberg, J.G. Molotkovsky, K. Hanada, P. Mattjus // *Biochim. Biophys. Acta* – 2011. – V. 1808. – Issue 1. – P. 229–235.
3. Gorbenko, G. The effect of lysozyme amyloid fibrils on cytochrome c-lipid interactions. / G. Gorbenko, V. Trusova, R. Sood, J. Molotkovsky, P. Kinnunen // *Chem. Phys. Lipids*. – 2012. – V. 165. – Issue 7. – P. 769–776.
4. Кузнецова, Н. Р. Изучение взаимодействия липосом, содержащих в липидном бислое липофильное производное доксорубина, с опухолевыми клетками. / Н.Р. Кузнецова, Е.В. Смирцевская, И.В. Скрипник, Е.Н. Зарудная, А.Н. Бенке, Г.П. Гаенко, Ю.Г. Молотковский, Е.Л. Водовозова // *Биологические мембраны*. – 2012. – Том 29. – № 5. – С. 329–339.
5. Zhai, X. GLTP-fold interaction with planar phosphatidylcholine surfaces is synergistically stimulated by phosphatidic acid and phosphatidylethanolamine. / X. Zhai, W.E. Momsen, D.A. Malakhov, I.A. Boldyrev, M.M. Momsen, J.G. Molotkovsky, H.L. Brockman, R.E. Brown // *J. Lipid Res.* – 2013. – V. 54. – Issue 4. – P. 1103–1113.
6. Zhai, X. Nanoscale Packing Differences in Sphingomyelin and Phosphatidylcholine Revealed by BODIPY Fluorescence in Monolayers: Physiological Implications. / X. Zhai, I.A. Boldyrev, N.K. Mizuno, M.M. Momsen, J.G. Molotkovsky, H.L. Brockman, R.E. Brown // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – Issue 11. – P. 3154–3164.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

### **Отзыв**

официального оппонента на диссертацию А.Н. Винниковой «Синтез аналогов бактериального ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия.

### **Актуальность темы**

Комплексным полисахаридам принадлежит, среди прочего, важнейшая роль во взаимодействии патогенных и симбиотических микроорганизмов с организмом хозяина – животного или человека; всестороннее выяснение строения, биосинтеза и функций этих соединений – одна из актуальных задач современной биологии. Ключевую роль в биосинтезе многих бактериальных полисахаридов играют «строительные блоки» – ундекапренилфосфат и ундекапренилдифосфатсахара.

Меченые аналоги этих веществ – необходимые инструменты в указанных исследованиях, имеющих как фундаментальную направленность, ибо они дают ключ, прежде всего, к пониманию механизмов инфицирования макроорганизма, так и значительный практический интерес, – так как такое понимание позволяет разрабатывать методы и средства борьбы с инфекциями. Такого рода инструменты востребованы современной биологией и экспериментальной медициной. К настоящему времени разработан ряд молекулярных зондов – производных ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров, в том числе и флуоресцентных, – однако сложность их получения и неполное соответствие их свойств многообразию задач, стоящих перед исследователями, значительно сужают возможности последних, что настоятельно требует поиска новых инструментов.

Синтез новых доступных флуоресцентных аналогов ундекапренилфосфат и ундекапренилдифосфатсахаров и изучение их субстратной специфичности составляют предмет настоящей диссертации, что определяет ее несомненную актуальность.

**Структура и объем диссертации.** Работа построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка литературных

источников. Объем диссертации составляет 98 страниц, список литературы содержит 124 источника, работа проиллюстрирована 31 схемой в обзоре и 15 схемами в результатах, а также 5 рисунками.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, его объект и цели, определяет научную новизну и практическую значимость работы.

Обзор литературы, охватывающий результаты современных работ в области синтеза фотоактивных (т.е. хромофорных, флуоресцентных и фотоактивируемых) аналогов линейных изопреноидов, отражает состояние дел в этой области и показывает, что основное внимание исследователей привлекает получение новых флуоресцентных зондов. Это понятно: исследования с помощью флуоресцентных аналогов обеспечивают чувствительность измерений, сравнимую с таковой при использовании радиоактивных субстратов, но, в отличие от последних, флуоресцентные зонды позволяют работать с большей производительностью и, что важно, безопасны. Диссертант приводит подробные данные о методологии указанных синтезов и областях использования синтезированных зондов.

Обращает на себя внимание многообразие примененных для их синтеза флуорофоров, что еще раз указывает на востребованность данного направления. При этом, тем не менее, ясно, что описанные в обзоре зонды для большинства биохимиков-исследователей труднодоступны ввиду сложностей синтеза и малой доступности исходных соединений. Все это говорит о важности и актуальности предпринятого автором исследования.

**Научная новизна исследования.** Задавшись целью создать ряд новых высокочувствительных и доступных зондов-аналогов ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров, диссертант начал с хромофорного производного ундекапренилфосфата **5**, несущего феноксигруппу на конце изопреноидной цепи. Синтез, проведенный исходя из растительного ундекапренола морапренола (групповое вещество), более доступного по сравнению с бактериальным, был осуществлен на современном уровне и показал хорошую квалификацию автора; аналог **5** оказался приемлемым субстратом для бактериальных ферментов, участвующих в сборке антигенных полисахаридов. Однако этот синтез (8 стадий) дал продукт, вставший в общий ряд малодоступных зондов, описанных в обзоре

диссертации, и мало соответствовал основной задаче автора – получению не только эффективных, но и доступных флуоресцентных аналогов ундекапренилфосфата.

Поэтому дальнейшие исследования А.Н. Винниковой были сосредоточены на аналогах ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров, получаемых из доступных исходных соединений и обладающих хорошей устойчивостью. В ходе значительной по объему работы был синтезирован представительный набор аналогов ундекапренилфосфата, содержащих вместо изопреноидной липидной цепи (55 С-атомов)  $\omega$ -флуоресцентномеченую неразветвленную насыщенную цепь длиной от 2 до 16 С-атомов. Примененные в качестве метки 4 близкородственные флуоресцентные группы, имеющие в основе 9-антрильный хромофор, представляют собой 9-антрил-CONH-, 9-антрил-CH<sub>2</sub>O-, 9-антрил-O-, а также просто 9-антрил-. Все они обладают близкими (но не идентичными) УФ-спектрами (максимумы при 250–260 и при 340–380 нм) и флуоресценции (триплет в области 390–435 нм). Критерии выбора именно 9-антрильного флуорофора остались за рамками диссертации (и сопутствующих публикаций), надо полагать, имелись в виду его небольшие размеры (плоская не имеющая заряда пластинка), фото- и химическая устойчивость, малая зависимость параметров флуоресценции от полярности окружения, доступность.

Синтез набора флуоресцентных зондов выполнен на отличном современном уровне; следует отметить большой объем проделанной работы, тщательность выполнения эксперимента. Особо можно отметить сложный синтез  $\omega$ -фенокси-ундекапренилфосфата 5 и удачный выбор методов введения фосфатной и дифосфатной группировок. Несмотря на трудности, связанные с выделением и очисткой ряда сложных соединений амфифильной природы, автор надежно доказывает их индивидуальность и структуру, широко используя различные виды хроматографии, масс-спектрометрию, <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопию.

Важной частью работы является изучение субстратной эффективности флуоресцентных (с 9-антрил- и 9-антрилокси-флуорофорами) неизопреноидных аналогов ундекапренилдифосфатсахаров в ферментативной реакции, катализируемой бактериальной маннозилтрансферазой, в зависимости от длины липофильного фрагмента. Это, кроме прочего, говорит о том, что диссертант, наряду с

химической методологией, хорошо владеет и техникой биохимического эксперимента.

Показано, что активны все испытанные аналоги, с длиной цепи от 2 до 16 С-атомов; наиболее активен самый длинный аналог 43. К сожалению, не был подобным образом испытан в качестве контроля и природный субстрат фермента, ундекаprenилдифосфатгалактоза, что могло быть важным для применения флуоресцентных аналогов в дальнейших исследованиях (такое сравнение было предпринято лишь для феноксимеченого фосфата морапренола 5).

**Теоретическая и практическая значимость.** Важнейшими оригинальными результатами рецензируемой работы следует считать получение значительного набора флуоресцентных аналогов ундекаprenилфосфата и аналогичных ундекаprenилдифосфатсахаров – доступных инструментов для широкого спектра биохимических исследований. Важное теоретическое значение имеет и уточнение границ субстратной специфичности ряда ферментов, участвующих в биосинтезе бактериальных антигенов.

Надо полагать, что полученные А.Н. Винниковой флуоресцентные зонды найдут должное применение в исследованиях биологов.

**Степень обоснованности и достоверность полученных результатов и выводов.** Примененные автором химические и биохимические методы адекватны поставленным задачам. Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Представленные в автореферате и публикациях А.Н. Винниковой результаты полностью отражают проведенные исследования.

Результаты работы изложены в 6 научных публикациях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Отдельные аспекты работы изложены и обсуждены на 4 российских и международных конференциях.

Некоторые замечания и вопросы, требующие разъяснений диссертанта:  
Обзор составлен несколько сумбурно, например, схемы 11–14 обзора не сразу удастся соотнести с описанием (стр. 14–17). В обзоре приведено в основном

перечисление синтезов меченных хромофорами изопреноидов и, довольно кратко, их использование, но нет критического обсуждения этих данных (преимущества того или иного метода получения производного или зонда, сравнение их применимости в различного рода исследованиях, плюсов и минусов различных хромо- или флуорофоров и др.).

Отсутствует обоснование выбора 9-антрила для мечения аналогов ундекапренилфосфата. У этого флуорофора, наряду с достоинствами (см. выше) имеются и недостатки – невысокая чувствительность при возбуждении в зоне 340–380 нм, флуоресценция в коротковолновой (синей) области видимого спектра.

Новые флуоресцентные аналоги, будучи должным образом описаны как химические соединения, недостаточно полно охарактеризованы как зонды. Считается общепринятым в публикациях при описании новых флуоресцентных соединений приводить длины волн их поглощения и флуоресценции, а также квантовые выходы. В диссертации подобное описание (неполное) дано лишь для дифосфата **40** (стр. 49).

Непонятно назначение ретросинтетической схемы **12** (**11** в автореферате).

Описание синтезов уже известных соединений 2-(9-антрил)ацетонитрила (**52**, ссылка 123) и 2-(9-антрил)этанола (**48**, ссылка 124) без упоминания о какой-либо новизне подходов представляется излишним.

Все эти замечания имеют частный характер и не изменяют общей положительной оценки диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа Анны Николаевны Винниковой «Синтез аналогов бактериального ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия, является научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи – разработке синтеза новых фотоактивных аналогов важных природных соединений – бактериального ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров. Результаты исследования важны для органической химии, биохимии и экспериментальной медицины.

По актуальности, научной новизне и практической значимости работа соответствует требованиям пп. 9,10,11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук, а автор А.Н. Винникова заслуживает присуждения искомой степени по специальности 02.00.03 – органическая химия.

Официальный оппонент  
гнс лаборатории химии липидов Института  
биоорганической химии  
им. академиков М.М.Шемякина и  
Ю.А.Овчинникова РАН  
доктор химических наук, проф.  
Молотковский Юлиан Георгиевич



17 ноября 2014 г.

Подпись Ю.Г.Молотковского  
удостоверяю.  
Ученый секретарь Института  
биоорганической химии  
им. академиков М.М.Шемякина и  
Ю.А.Овчинникова РАН  
доктор физико-математических наук  
В.А.Олейников



Молотковский Ю.Г. – контактная информация.  
почтовый адрес: ГСП-7, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10, корп. 34, к. 531;  
тел. 8-495-330-6601  
Эл. почта [jgmol@ibch.ru](mailto:jgmol@ibch.ru)