

## УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе  
федерального государственного  
автономного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Московский физико-технический  
институт (национальный  
исследовательский университет)»



  
Баган Виталий  
Анатольевич

«10» сентября 2021 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Смирнова Александра Юрьевича «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Актуальность разработки и создания новых флуоресцентных меток для различных биологических объектов не вызывает сомнений, несмотря на обширные накопленные мировым научным сообществом данные. Работа Смирнова А.Ю. посвящена синтезу и изучению оптических свойств аналогов хромофоров флуоресцентных белков и их функционализированных производных. Важность разработки и исследования методов модификации флуоресцентных красителей сложно переоценить: маркирование соединений клетки и исследование клеточных процессов методом флуоресцентной микроскопии широко распространено в исследовательских лабораториях. Диссертационная работа направлена на создание флуоресцентных производных

хромофоров флуоресцентных белков и установление взаимосвязи «структура-свойство».

Стоит отметить разносторонность проведенного исследования, что характеризует Смирнова А.Ю. как многогранного специалиста с широким кругозором. В диссертации представлены как традиционные производные хромофора GFP, так и соединения с нетипичной структурой, для синтеза которых потребовалось отрабатывать новые методы синтеза. Заслуживает внимания и подробное изучение оптических свойств полученных соединений.

Диссертационная работа достаточна по объему, изложена на 128 страницах, содержит 77 рисунков, 21 таблиц и состоит из введения, трех глав (обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть) и выводов. Список цитируемой литературы обширен и включает 165 наименования, в том числе и работы научного руководителя диссертанта.

Диссертация начинается с введения, где сформулирована актуальность исследования и его цель, а в соответствующих разделах автореферата отражены научная новизна и практическая значимость работы, что логично раскрывает основной замысел диссертационного исследования.

Глава 1 (Обзор литературы) состоит из трех разделов, первый из которых посвящен краткому описанию явления флуоресценции, типам флуоресцентных красителей и предъявляемым им требованиям. Второй раздел посвящен описанию известных видов сольватохромных флуоресцентных красителей в зависимости от обуславливающей сольватохромизм причины. Третий раздел посвящен различным методам синтеза бензилиденимидазолонов – аналогам хромофора зеленого флуоресцентного белка. Представлены как часто применяемые методы, так и редко встречающиеся подходы. Обзор достаточно подробен и хорошо структурирован, что облегчает чтение и оценку основной главы диссертации, помогает понять логику формулирования цели

исследований автора, степень новизны предлагаемых практических решений.

В главе 2 обсуждаются результаты, полученные автором. Первый раздел данной главы (3.1) посвящен синтезу прямых аналогов хромофоров флуоресцентных белков GFP с различными арильными заместителями. Автор установил, какие соединения обладают высокими показателями квантового выхода флуоресценции, чтобы в дальнейшем на их основе синтезировать новые производные.

Раздел 3.2 посвящен поискам возможностей получения производных хромофора GFP с более длинноволновыми максимумами поглощения и испускания. В первой части данного раздела (3.2.1) представлены методы синтеза ранее не описанных 5-аминометилбензилиденимидазолонов. Оказалось, что данные соединения без дополнительных препятствий для вращения молекулы имеют крайне низкий квантовый выход флуоресценции, однако автор предложил стабилизировать плоскую форму при помощи введения дифторборильного мостика. Полученные соединения проявили значительный сольватохромизм, большие стоксовы сдвиги и достаточно высокие квантовые выходы флуоресценции, хотя при этом они обладали слишком коротковолновыми максимумами абсорбции чтобы в дальнейшем использовать их для биологических исследований. Во второй (3.2.2) и третьей (3.2.3) главах описан синтез производных ранее полученных бензилиденимидазолонов с дополнительными кратными связями, что обычно способствует смещению максимумов абсорбции и эмиссии в длинноволновую область. Третья глава данного раздела посвящена активно развиваемым сейчас реакциям сочетания с участием сульфанильных производных. В результате впервые были синтезированы винилметилсульфанильные аналоги хромофора Kaede, а также одно ацетиленовое производное. Наиболее интересные соединения были подвергнуты подробному сравнительному исследованию их оптических свойств в разделе 3.4. В заключительном разделе 3.5 оказавшие

самые интересные свойства соединения были исследованы на биологических объектах, что проводилось коллегами автора. Выяснилось, что несколько соединений могут селективно флуоресцентно окрашивать эндоплазматический ретикулум различных клеток, а одно из соединений равномерно окрашивает все митохондрии в клетках независимо от их мембранного потенциала.

Экспериментальная часть приведена достаточно подробно, что позволяет при необходимости воспроизвести результаты автора. Полученные продукты охарактеризованы необходимым набором физико-химических методов анализа: ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и масс-спектрометрией высокого разрешения.

Автореферат диссертации в достаточной степени отражает содержание работы.

Таким образом, автором успешно решены поставленные в диссертационной работе задачи. Синтезированы новые аналоги хромофора GFP, проявляющие высокую флуоресценцию в несвязанном виде, на основе которых были затем получены производные с расширенной системой двойных связей, которые в свою очередь оказались зачастую подходящими по своим параметрам для применения в биологических объектах как флуоресцентные красители. Также впервые синтезированы соединения с аминогруппой у метиленового фрагмента бензилиденимидазолна и метилсульфанильные и ацетиленовые производные хромофора GFP. Коллегами автора было показано, что синтезированные им соединения могут эффективно использоваться для флуоресцентного окрашивания различных внутриклеточных органелл. Мультидисциплинарность диссертационной работы делает ее интересной как для специалистов в области органического синтеза, так и для исследователей, развивающих биохимические направления.

Высокий уровень работы диссертанта подтверждается списком публикаций по теме работы: результаты изложены в 6 статьях в российских и зарубежных

журналах и представлены на трех российских конференциях.

Тем не менее, по работе имеется ряд замечаний и вопросов.

- Все бензилиденимидазолы изображены в E-конфигурации. Подтверждался ли данный факт?

- В разделе, посвященном изучению реакции кросс-сочетания алкинов и сульфопроизводных имидазолонов совсем не объяснен выбор аминного основания. Также автор не объяснил, что именно не позволяет реакции пройти дальше и что представляют собой побочные продукты.

- В разделах, посвященным 5-аминобензилиденимидазолам и метилсульфанильным производным используются простые арильные заместители, которые, очевидно, не сильно способствуют увеличению квантового выхода флуоресценции. Проводились ли попытки синтеза соединений с теми же арилами, что были в соединениях **II.1a-8a**?

- Возможно ли, что образование тройной связи происходит в момент удаления защитной силильной группы в случае соединения **II.28** из-за одновременного элиминирования метилмеркаптана?

- В экспериментальной части указано несколько соединений, которые были синтезированы по литературным методикам, однако они никак не описаны. Следовало бы указать спектр ЯМР  $^1\text{H}$  данных соединений.

Высказанные вопросы и замечания не влияют на общее положительное впечатление от диссертационной работы. Она полностью отвечает самым высоким предъявляемым стандартам, выполнена на отличном теоретическом и экспериментальном уровне. Таким образом, диссертационная работа «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу и соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от

24.09.2013 г., предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата химических наук. Автор работы, Смирнов Александр Юрьевич, несомненно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия.

Отзыв на диссертацию обсуждён и одобрен на расширенном научном семинаре Лаборатории нанобиотехнологий МФТИ «12» января 2021 г.

с.н.с. лаборатории

нанобиотехнологий МФТИ,

к.х.н.

Колычев

Евгений Леонидович

Почтовый адрес: 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер.,9. Телефон: +7(498)744-6618, Адрес электронной почты: [kolychev.el@mipt.ru](mailto:kolychev.el@mipt.ru). Организация – место работы: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико–технический институт (национальный исследовательский университет)», Лаборатория нанобиотехнологий. Должность: старший научный сотрудник. Web-сайт организации: <https://mipt.ru/>

Заместитель заведующего Лабораторией  
нанобиотехнологий МФТИ,

к.х.н.

Черкасов

Владимир Рюрикович

Почтовый адрес: 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер.,9. Телефон: +7(498)744-6618, Адрес электронной почты: [cherkasov.vr@mipt.ru](mailto:cherkasov.vr@mipt.ru). Организация – место работы: федеральное

государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Лаборатория нанобиотехнологий.  
Должность: Заместитель заведующего лабораторией. Web-сайт организации:  
<https://mipt.ru/>