

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседание диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
17 марта 2021 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата химических наук

Смирнова Александра Юрьевича

По теме: «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе
хромофора GFP»

Специальность 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Москва - 2021

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 17 марта 2021 года

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1. Академик РАН, д.х.н.	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(03.01.03)
4. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(03.01.03)
7. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
8. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(03.01.03)
10. Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
14. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
15. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
16. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
17. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
19. Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
20. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов В.Т., председатель: Коллеги, доброе утро. У нас сегодня повестка дня достаточно понятная, защита кандидатской диссертации Александром Юрьевичем Смирновым. Всё готово. Я надеюсь, оппоненты готовы, не говоря уже о диссертанте. Есть какие-нибудь соображения по поводу выполнимости и целесообразности данной повестки дня? Не вижу каких-то предложений, их и не должно быть. Поэтому мы утверждаем ее и приступаем к делу. Владимир Александрович, начнем с материалов личного дела, давайте.

Олейников В.А., учёный секретарь: Традиционно, конечно, начинаем с материалов личного дела. Значит, у нас претендент Смирнов Александр Юрьевич, Российская Федерация. Окончил в 2009 году Химфак МГУ, с 2010 по 2017 младший научный сотрудник Института нефтехимического синтеза имени Топчиева. С 2017 по настоящее время: старший инженер, затем с 2018 младший научный сотрудник группы химии гетероциклических соединений отдела биофотоники нашего Института. С 2009 по 2012 год аспирант МГУ имени Ломоносова. Кандидатский экзамен по специальности «биоорганическая химия» сдан с оценкой «хорошо». Работа выполнена в группе химии гетероциклических соединений отдела биофотоники нашего Института. Научный руководитель диссертационной работы Михаил Сергеевич Мишин (*оговорка, надо - Баранов*), это руководитель группы химии гетероциклических соединений. По теме диссертации опубликовано девять печатных работ, в том числе шесть статей в рецензируемых журналах из списка Минобрнауки России, рекомендованных для опубликования результатов диссертационных работ. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАКа вовремя, а именно 28 декабря 2020 года, и все необходимые документы в деле имеются. Какие-то вопросы, уточнения? Есть какой-то вопрос, да, прошу Вас.

Уткин Ю.Н.: Прозвучала фамилия руководителя «Мишин», наверное, это неправильно.

Олейников В.А., учёный секретарь: А что я сказал?

Уткин Ю.Н.: Мишин.

Олейников В.А., учёный секретарь: А, Баранов Михаил Сергеевич, абсолютно правильная поправка, да, я прошу прощения.

Иванов В.Т., председатель: Еще есть какие-то замечания? Замечаний нет. Тогда даю слово диссертанту. 20 минут для доклада. Прошу.

Смирнов А.Ю., соискатель: (*излагает основные положения диссертационной работы*)

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Возникли вопросы у присутствующих какие-то? Прошу.

Белогуров А.А.: Скажите, пожалуйста, если Ваши красители, скажем так, оставить клетки, которые покрашены Вашими красителями, оставить на какое-то время, допустим, десятки минут, часы, краситель выводится? Если да, то насколько быстро?

Смирнов А.Ю., соискатель: В смысле, если он присутствует при этом в среде.

Белогуров А.А.: Ну, естественно, вы добавляете к клеткам, отмываете их потом и смотрите, насколько долго у вас сохраняется флуоресценция соответствующего компартмента.

Смирнов А.Ю., соискатель: Ну, вообще, насколько мне известно, подобные эксперименты не проводились, однако случаи есть, насколько я знаю, что если проводить облучение, то они, конечно, со временем будут разрушаться. Но пока они накоплены в клетках в каком-то количестве, они будут обновляться между средой и органеллой.

Иванов В.Т., председатель: У меня такой вопрос возник. В принципе, низкомолекулярные вещества, когда они в растворе, они могут агрегировать в зависимости от полярности, от концентрации, от температуры и прочее. Может ли как-то агрегация Ваших флуорогенов вмешиваться в наблюдаемую флуоресценцию?

Смирнов А.Ю., соискатель: При исследовании некоторые соединения при добавлении в клеточную среду все-таки частично выпадали в осадок, однако это не препятствовало дальнейшему исследованию.

Иванов В.Т., председатель: Осадок это одно, а вот образование там димеров, тримеров и так далее, данных на этот счет нет, я так понимаю?

Смирнов А.Ю., соискатель: Нет, честно говоря, с трудом представляю, как исследовать подобный процесс, в какой именно форме они присутствуют в растворе. Но спасибо за интересную идею, мы попробуем выяснить, что там происходит.

Иванов В.Т., председатель: Понятно. Есть еще вопросы?

Мартынов В.И.: Можно, я? У меня вопрос примерно на ту же тему. Для многих флуоресцентных соединений известно такое явление, особенно для гидрофобных, как aggregation induced quenching, то есть при агрегации эти соединения как бы теряют флуоресценцию. Вот что-то Вы исследовали на эту тему?

Смирнов А.Ю., соискатель: Конкретно каких-то тесных исследований с конкретными цифрами мы не производили, но наше соединение в твердом виде совершенно не флуоресцирует. То есть если, допустим, они агрегируют, то они не мешают никак нашим наблюдениям. Также они не флуоресцируют и в воде, не создают фонового сигнала в большинстве случаев.

Олейников В.А., учёный секретарь: Вопрос такой. А как фотостабильность? Вот этот эффект фотобликинга по сравнению с AlexaFluor, FITC, с фикоэритрином? Насколько они стабильны фото под действием излучения?

Смирнов А.Ю., соискатель: Относительно сказанных Вами соединений исследование фотостабильности не проводилось, однако оно, в принципе, сопоставимо фотообесцвечивания по сравнению с коммерческими красителями. То есть в течение десяти

или десятков минут они стабильны при исследовании при интенсивном облучении. Что, естественно, зависит от конкретных соединений, какие-то более стабильны, какие-то менее стабильны, какие-то меньше, чем за минуту фотообесцвечивались.

Олейников В.А., учёный секретарь: А теперь из другой области тоже вопрос. А вот как Вы в клетку-то вводите? Они у Вас не водорастворимые, я так понимаю?

Смирнов А.Ю., соискатель: Частично эти соединения все-таки растворимы в воде, то есть мы готовили раствор в диметилсульфоксиде и капали в клеточную среду, ну, естественно, это делали мои коллеги, а не я сам. И при этом вещества большинство все-таки растворялось, так как концентрация оказалась очень невелика, и они способны проникать через клеточную мембрану и окрашивать эндоплазматический ретикулум.

Иванов В.Т., председатель: Еще есть вопросы? Вопросы иссякли, тогда можете чуть-чуть отдохнуть. Переходим к обсуждению. Дальше по протоколу я должен дать слово научному руководителю, если он имеет желание охарактеризовать диссертанта.

Баранов М.С., научный руководитель: Доброе утро, уважаемые коллеги, члены диссертационного совета. Охарактеризовать диссертанта я могу со всех сторон положительно. Я тут недавно посмотрел в календарь и обнаружил, что Саша работает у меня уже 3,5 года, время очень быстро летит. Пришел он действительно из другой области, занимался органическим синтезом, по поводу синтетических его навыков вообще никаких нареканий, это отличный специалист по синтезу. Немного сложно было ему переучиваться на нашу область, но, тем не менее, за эти годы он втянулся и вполне себе вышел на нормальный уровень. Сейчас он ведет очень много своих проектов, очень помогает нам по нашим грантам, так что Александр отличный специалист, я очень рад, что он с нами работает. И характеризую его со всех сторон положительно. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Далее у нас идут отзывы. Я так понимаю, отзыв организации, где выполнялась работа, а потом ведущей организации.

Олейников В.А., учёный секретарь: *(Излагает положительное заключение организации, где выполнялась диссертация).* Да. Работа выполнялась в нашем Институте биоорганической химии, и у меня в руках заключение. Заключение, скажу можно сказать, полностью положительное, естественно. Вначале библиографические данные, о которых уже говорилось, что аспирантура, химфак МГУ. Далее сдача кандидатских экзаменов, удостоверение в 2020 году получено. Научный руководитель Баранов Михаил Сергеевич, руководитель группы химии гетероциклических соединений. Тема диссертации утверждена в окончательной редакции 31 августа 2020 года, перед этим она немного видоизмененная была, тоже уже утвержденная. И заключение, что работа Смирнова по созданию новых флуоресцентных красителей методом их модификации является очень актуальной. Основные результаты

получены лично автором, и перечисляется, что синтезирована серия новых производных хромофоры GFP с различными заместителями. Впервые проведена реакция взаимодействия 2-метилсульфанилимидазолонов с терминальными ацетиленами в условиях реакции Соногаширы. Впервые всё было сделано. Исследованы оптические свойства полученных соединений. Диссертация обладает новизной, практической значимостью. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне. Выводы полностью отражают результаты работы. Соответственно, рекомендуется она к защите. Заключение принято на открытом заседании группы химии гетероциклических соединений отдела биофотоники, присутствовало 15 человек, «за» 15, единогласное голосование. И подписано секретарем Балеевой и зам. директора ИБХ РАН Ямпольским. Это заключение утверждено директором нашего Института, академиком Габибовым Александром Габибовичем. Это что касается заключения организации, где выполнялась работа.

Теперь что касается ведущей организации. *(Зачитывает положительный отзыв ведущей организации)*. Ведущая организация это федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», ну, «Физтех». Что пишется. Отзыв полностью положительный. Во-первых, подчеркивается актуальность разработки, важность разработки, то, что важность исследования методов модификации флуоресцентных красителей сложно переоценить: это маркирование соединений клетки, исследование клеточных процессов и так далее. То есть это очень важно, все мы пользуемся флуоресцентными метками. Стоит отметить разносторонность проведенного исследования, что характеризует Смирнова А.Ю. как многогранного специалиста с широким кругозором. Заслуживает внимания подробное изучение оптических свойств полученных соединений. Диссертация достаточно по объему, изложена на 128 страницах, 77 рисунков, 21 таблица. Список цитируемой литературы включает 165 наименований, в том числе и работы научного руководителя диссертанта. Начинается работа с введения, формулируется актуальность во введении, его цель. Первая глава – это обзор литературы, который состоит из трех разделов, обзор достаточно подробен, хорошо структурирован, что облегчает и чтение и оценку основной главы диссертации и помогает понять логику формулирования целей исследования и степени новизны предлагаемых практических решений. Глава вторая, обсуждаются результаты, полученные автором, и первый раздел данной главы посвящен синтезу. Следующий раздел – поиски возможностей получения производных хромофора GFP с более длинноволновыми максимумами поглощения и испускания. Опять же, целая серия достижений. Полученные соединения проявили значительный сольватохромизм, большие стоксовы сдвиги и достаточно высокие квантовые выходы флуоресценции. Описан синтез

производных ранее полученных соединений. Экспериментальная часть приведена достаточно подробно, что позволяет при необходимости воспроизвести результаты автора. Полученные продукты охарактеризованы необходимым набором физико-химических методов анализа: ЯМР на ядрах протона, протонный ЯМР и углеродный, и масс-спектрометрия высокого разрешения. Автореферат диссертации в достаточной степени отражает содержание работы. И таким образом, автором успешно решены поставленные в диссертационной работе задачи. Высокий уровень работы подтверждается списком публикаций по теме работы, результаты изложены в шести статьях в российских и зарубежных изданиях.

Тем не менее, по работе имеется ряд замечаний и вопросов. Первое. Все бензилиденимидазолы изображены в E-конфигурации. Подтверждался ли данный факт? Второе. 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, посвященных 5-аминобензилиденимидазолу 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 П.1а-8а? Возможно ли, что образование тройной связи происходит в момент удаления защитной силильной группы в случае соединения П.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 протонный данных соединений.

Высказанные замечания и вопросы не влияют на общее положительное впечатление работы, она полностью отвечает самым высоким предъявляемым стандартам и работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации. 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, это было 12 января 2021 года. Подписано: старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологий МФТИ, кандидат химических наук Колычев Евгений Леонидович. Этот отзыв утвержден проректором по научной работе Физтеха Баган Виталий Анатольевич. Замечания были.

Иванов В.Т., председатель: В отзыве ведущей организации были замечания. Хотелось бы услышать Ваши ответы.

Смирнов А.Ю., соискатель: Первая часть, я выражаю благодарность заочно сотрудникам Московского физико-технологического университета, что они согласились стать ведущей организацией для моей работы. Что касается конфигурации бензилиденимидазолонов, они там опечатались, на самом деле у нас там все *Z*-изомеры. Мы имеем просто большой опыт работы с бензилиденимидазолонами, и это расхожий, так сказать, для них вопрос. Вообще все они присутствуют в *Z*-конфигурации практически всегда. Очень часто в них присутствуют какие-либо примеси *E*-изомера, однако из-за того, что они находятся в равновесии друг с другом, они практически всегда переходят по большей части в *Z*-изомер. А допустим, если попробовать выделить *E*-изомер, то это практически невозможно, так как он при комнатной температуре в обычных условиях всегда будет частично переходить в *Z*-изомер. Поэтому мы дополнительно не устанавливали структуру соединений какими-то дополнительными методами.

Вопрос по поводу выбора основания для реакции кросс-сочетания. 5-диизопропилэтиламин является достаточно популярным основанием для реакции кросс-сочетания Соногаширы, мы также его использовали. При попытке использовать какие-нибудь неорганические основания они не привели ни к какому успеху.

Что касается побочных соединений от процесса, то, по всей видимости, происходила дальнейшая серия реакций между метилсульфанильной группой, и побочные соединения представляют из себя смесь трудно идентифицируемых соединений. И наши попытки каким-либо образом воспрепятствовать их образованию большого эффекта не возымели. Но мы получили соединение с относительно удовлетворительными выходами.

Что касается различных арильных заместителей, то, естественно, мы первоначально проводили эксперименты на каких-то простых арилах, то есть фенил, параметоксипроизводных. Что касается что сульфо-, что аминопроизводных. Однако мы установили, что их свойства не позволяют их использовать для дальнейших биологических исследований, и очень маловероятно, что исследование других арилов приведет к каким-то существенным изменениям, которые бы позволили их применять для биологических объектов.

Что же касается ацетиленового продукта, то мы не привели это в нашей диссертационной работе. Мы выяснили, что еще до обработки тетрабутиламмонийфторидом для снятия защитной группы происходит образование ацетиленового продукта, что было установлено по методам ЯМР. Это было нашей ошибкой не указать этот факт в работе, в следующий раз мы постараемся подобного не допускать.

Также в отзыве организации было сказано, что нам следовало показать спектры ^1H ЯМР в экспериментальной части, это, разумеется, является необязательным для диссертационной работы, но в следующий раз мы, естественно, это укажем. Вроде на все вопросы я ответил.

Иванов В.Т., председатель: Всё понятно. Двигаемся дальше. Дальше - это означает, что мы должны заслушать официальных оппонентов.

Олейников В.А., учёный секретарь: Нет, еще есть отзыв на автореферат у нас один.

Иванов В.Т., председатель: А, есть, да? Давайте.

Олейников В.А., учёный секретарь: *(Зачитывает положительный отзыв на автореферат)*. Самое интересное, что, значит, он полностью положительный, опять же, подчеркивается структура работы четкая, продуманная, актуальная работа и так далее. Что необычно немного для отзывов на автореферат, здесь есть список недостатков. По автореферату можно высказать следующие замечания. Первое. В связи со значительной составляющей органического синтеза в данной работе было бы желательно привести выходы целевых соединений в соответствующих реакциях в автореферате. Одновременно некоторую информацию в автореферате можно было бы не приводить, как избыточную (например, сведения о цвете и консистенции образующихся соединений). Второе. Страница 7 автореферата: «в качестве исходных компонентов применялись бензилиденимидазолы П.1а-П.8а как показавшие самые высокие КВФ». Однако в таблице 1, где представлены квантовые выходы флуоресценции данной серии соединений, указано, что для соединений П.2а, П.4а, П.6а выходы флуоресценции находятся в интервале 0,2-2,7%. Требуется пояснение, почему такие выходы считались самыми высокими. В целом стоило в самом начале автореферата обозначить, какие выходы флуоресценции автор считает «невысокими, хотя и достаточными для их использования как флуоресцентных меток», а какие столь невелики, что их можно не принимать во внимание. Однако данные замечания носят рекомендательный характер, не снижают общего впечатления. В соответствии с вышеизложенным, Смирнов А.Ю. достоин присуждения степени кандидата наук по специальности 02.00.10. Отзыв подготовила Дубинина Татьяна Валентиновна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории медицинской химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химфака МГУ. Вот два замечания.

Иванов В.Т., председатель: Редкий случай, когда в отзыве на автореферат есть вопросы и замечания. Хотел бы услышать Ваши ответы.

Смирнов А.Ю., соискатель: Во-первых, спасибо, Татьяна Валентиновна, что подготовили отзыв на мой автореферат. Да, я, естественно, совершенно согласен с Вами, что нам следовало бы указать в автореферате выходы наших соединений в таблице, они были, кстати, в процессе написания удалены, к сожалению. И также, возможно, у нас была и лишняя

информация. Что же касается того, какие квантовые выходы флуоресценции мы считали удовлетворительными, мы, так сказать, отбросили вещества, которые продемонстрировали совсем незначительный квантовый выход флуоресценции, и одно соединение, у которого квантовая флуоресценция оказалась 0,2%, в принципе, в дальнейшем мы их модифицировали. Мы посчитали, что, возможно, последующее соединение продемонстрирует уже более ощутимые значения, и поэтому тоже его приняли во внимание. Все остальные уже демонстрировали квантовый выход флуоресценции более 1%, что, в принципе, достаточно для их использования в качестве флуорогентов. Ответил я на Ваши вопросы?

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Теперь мы можем действительно перейти к заслушиванию официальных оппонентов. Профессор Вацадзе Сергей Зурабович, ИОХ имени Зелинского.

Вацадзе С.З., оппонент: *(Издаёт отзыв. Отзыв положительный).* Добрый день, глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены совета, дорогие коллеги. Во-первых, приятно, в наше время последние несколько месяцев выступать, поскольку выступающий имеет право снимать маску, это крайне важно, иногда это, может быть побудительным мотивом записаться в выступатели. Но в данном случае это не совсем так, поскольку это уже не первое выступление на диссертациях, сделанных и защищаемых в вашем Институте, в частности, я недавно оппонировал диссертации Надежды Балеевой, которая идеологически связана и она из этого же подразделения. Но я бы хотел начать с очень краткого, понимая, что, с одной стороны, одна защита, с другой стороны, тоже все люди занятые, надо бы по сути рассказать.

Естественно, зачитывать отзыв не буду, но кратко сказать, что вопросы, которые были, по сути дела, касались только одного, это вопрос агрегации и в какой-то степени стабильности получаемых соединений. Вообще, если этим заниматься, это отдельное серьезное фотохимическое, фотофизическое исследование, поскольку, с одной стороны, надо в определенном диапазоне концентрации показать выполнимость закона Бугера-Ламберта-Бера, чтобы показать, что нет агрегации. Если там какие-то есть отклонения, то по-хорошему надо изучать размер частиц методом, скажем, динамического светорассеяния, еще какими-то методами. Разумеется, всё это надо совмещать с изучением флуоресценции, поскольку был вопрос насчет того, что происходит гашение за счет ассоциации молекул, оно также может происходить разгорание за счет ассоциации молекул. Если мы добавим изменение среды вокруг одной или ассоциата молекул, переход от водной среды или какого-то буфера в среду, которая находится внутри клетки или в мембране, то тут еще вопросов очень много, это, конечно, отдельное исследование.

Если говорить конкретно о данной работе, то, если сконцентрироваться над выбором объектов исследования, у меня здесь прямо звучит такая фраза, краеугольным камнем методов флуоресцентной микроскопии являются флуоресцентная метка. И, как верно замечает автор, «идеальная флуоресцентная метка до сих пор не существует, разработка походов к мечению остается актуальной задачей». Мечение биологических объектов, очевидно. Если бы можно было посчитать любую интересующую молекулу на предмет того, будет ли она флуоресцировать, какое у нее будет время жизни в возбужденном состоянии, синглетные/триплетные переходы и всё прочее, то это бы решило только часть задачи дизайна подобных молекул, поскольку есть вопросы синтеза, у меня тоже будет комментарий как раз по этому слайду, есть вопросы изучения стабильности агрегации/деагрегации в разных растворах. Но и есть вопросы, у вас будет всё прекрасно на уровне модельных каких-то вещей, а эта молекула по каким-то неизвестным причинам не будет проникать через мембрану и заходить в клетку, и привет. Все наши теоретические вычисления оказываются, вообще говоря, не очень правильными. Поэтому синтез и дальнейшие исследования всё равно остаются основой для того, чтобы изучать какие-то реальные объекты.

Что касается синтеза, я не буду рассказывать, в отзыве ведущей организации уже прозвучал вопрос структуры и так далее, могу лишь сказать, что автор по результату изучения литературы по данному вопросу принял решение систематически изучить разнообразные модификации этих бензилиденимидазолонов, а там методов модификации, вообще говоря, несколько: это та самая арильная группа, которая, в основном, модифицируется; это положение между атомами азота, которые тоже можно модифицировать; ну, и разные комбинации, скажем, замыкание в цикл, то, что названо в этой работе ауриноподобные; это возможность введения борных закрепляющих кусочков, на прошлой неделе оппонировал докторской, которая в ИХР защитилась, как раз по бордипирильным и фосфордипирильным структурам. Это очень интересно.

Цель работы не буду зачитывать, она уже сегодня прозвучала и в виде графическом и в виде слов, но добавлю, что не прозвучало, по-моему, то, что в задачи работы дополнительно к тому, что уже было высказано автором, входила разработка новых подходов к синтезу и модификации производных хромофора GFP и их более отдаленных аналогов. Мы можем говорить, что такое более или менее отдаленный аналог, но, тем не менее, синтетическая компонента, безусловно, присутствует и она очень важна для данной работы. Во введении диссертации в обсуждении результатов, это страница 32-34, на соответствующем слайде это продублировано, показан общий подход к синтетической части, и это очень удобно, дальше понимаешь, что и зачем автор делал. Вообще такое логическое объяснение, а зачем делается следующий шаг, это характерно для данной работы и, по-моему, для всех работ из данной

научной группы. Четыре раздела собственных результатов, уже понятно, они точно соответствуют заявленным четырем задачам работы.

Что могу сказать? Интересная реакция, которая здесь изображена, ее можно назвать по-разному, бензилиденимидазолирование, карбонирование, даже не знаю, как сказать. Она необычна тем, что авторы хотели получить одно, оно внизу под номером 2.28, не стал делать замечание этой сложной нумерации, которая присутствует в диссертациях из данной группы, им так нравится, будем считать, что, если мы знаем и видим структуру, то с этой сложной нумерацией мы как-то разберемся. Хотелось получить 2.28, а получили соединения верхнего ряда, которые были неожиданны. И здесь, судя по всему, вообще отдельное интересное направление работы, потому что, допустим, автор говорит, что эти соединения оказались неинтересными или неперспективными для тех целей, которые на них возлагались изначально, то есть они нестабильны. Но буквально сегодня утром я читал одну работу, когда люди из такой фотохимической нестабильности некой пары фотохромов сделали совершенно новую реакцию и получили новые результаты. На самом деле тоже можно отдельно задаться этой задачей, на будущее, посмотреть, что значит, нестабильные, во что они превращаются. Возможно, продукты превращения сами по себе интересны не только для этой химии, а для какой-то еще. То есть всегда если что-то нестабильное, это не значит, что это плохо. Это может быть хорошо. Но это сейчас во время прослушивания доклада у меня возникла мысль. Если вообще вдаваться в подробности этого процесса, там, как вы видите, играет роль в классической реакции Соногаширы, и палладиевый катализатор и лигандное окружение и наличие или отсутствие меди, а во многих реакциях ацетилена терминальных медь может совершенно по-разному взаимодействовать с этим ацетиленом, она может замещать и атом водорода, давать спирт, ацетиленит меди, может при этом еще дополнительно координировать спектральную связь. То есть там целый спектр разных направлений, и то, что происходит здесь, это произошло, это интересно, для органической химии по крайней мере точно. Здесь, я запомнил эти структуры, посмотреть, как они имеют номера в докладе, там одинаковый заместитель в арилиденовой части, заместители во 2-м положении между азотом метил/фенил. Они в диссертации названы II.5a и II.5a*, это очень близкие структуры, но у них кардинально различаются квантовые выходы. Вообще очень интересно понять, почему, и, может быть, здесь есть какая-то разработка на будущее в области этой структуры.

Кстати, если говорить про квантовые выходы, то в принципе, на мой взгляд, такая оценка перспективности или бесперспективности соединений как реальные метки обязательно должна включать, вообще говоря, эффективность флуоресценции, то есть должен учитываться фактор поглощения, насколько хорошо вещество поглощает. У нас были примеры, когда флуоресценция была не очень хорошая, но поглощение было хорошее, и в

целом получались вполне удобные, хорошие метки на уровне *in vitro* экспериментов с клеткой. То есть надо всегда учитывать этот фактор тоже.

Что могу сказать? Что новизна уже была перечислена, и практическая значимость совершенно понятна, новые интересные структуры. Обоснованность полученных данных подтверждается физико-химическими методами исследований, и те биологические тесты, которые были сделаны. Поэтому положения, выводы, рекомендации достоверны, новизна и их истинность не вызывают сомнений. Также это подтверждается наличием 6 публикаций в серьезных журналах, некоторые из которых входят в верхний квартиль, или попросту Q1.

При прочтении работы возникли некоторые вопросы и пожелания. Допустим, обзор литературы, указанные красители, которые переходят обратимы один в другой, принято называть фотохромами. Слово там не прозвучало у автора. Когда автор выбирает, при всей, как я уже сказал, обоснованности выбора соединений, на рисунке 48 как-то не хватает, на мой взгляд, может быть, он раньше был, параCF₃-замещенный арен, который за счет своих акцептовых свойств, возможно, определенным образом влияет на фотофизику. Ну, и в одной из статей было упомянуто со словом «пиридин» у автора прозвучало, вообще говоря, если говорить конкретно про митохондрии, да и не только про них, то при наличии аминопроизводных, пиридинов или третичных аминов, аммониевые соли очень бы четвертичные могли бы дать интересный результат, если они не гасят реакцию, конечно. Или фосфониевые соли, что является классикой для проникания в митохондрии. Это такое пожелание. Здесь, видимо, еще у меня одно замечание перекликается с отзывом на автореферат, там где-то автор скромно пишет, вообще автор очень скромный, видели даже по его выступлению, он старается держаться спокойно, хотя делает очень классную работу, это, видимо, от научного руководителя идет. Выходы в таблице 3 не умеренные, а, прямо скажем, низкие. Ну, низкие и низкие, ну, так получилось, это химия, не обязательно давать всегда 99% выхода.

Вопрос полуфилософский-полу... такой, на будущее, можно ли... Тут тоже был вопрос, надо ли приводить цвет и консистенцию? Я считаю, что надо, потому что вопрос – можно ли по цвету твердого соединения или его раствора качественно отнести его к тому, удовлетворяет или не удовлетворяет требованиям поглощения длинноволновой области. Мы же говорим про поглощение, испускание в красной или даже в инфракрасной области. Может ли цвет соединения сразу вам сказать, получилось то, что надо, надо изучать, или получилась какая-то интересная молекула, отложим ее на полочку. На странице 57 обсуждений есть механизм, но он не объясняет полученной Z-конфигурации этих структур, вот II.23, II.24 справа вверху. Тут можно тоже подискутировать. На самом деле понятно, что, как и в любой реакции, связанной с элементопалладированием, когда связь элемент-палладий, в данном случае

элемент — это сера, сера-палладий присоединяется к двойной или к тройной связи, это происходит синтез при соединении, поэтому конфигурация аддукта, скорее всего, проявляется стадией элиминирования уже из некоего интермедиата.

Из таких замечаний уж совсем маленьких, как-то непривычно было, когда автор величает миллиграммы с большой буквы, «М» заглавное. В этом что-то есть, не знаю, он как-то уважает эту вещь, она мне показалась немножко странной. Даже если в английском, там «Г» большая буква, «граммы». Ну, и там есть небольшие замечания редакторские типа «пара-акцепторные производные», «4-пиридинальдегид», но это уже совсем по мелочам.

В принципе, как вы понимаете, к основной сути, к выводам, положениям замечаний нет. Поэтому это рекомендательные вещи или, может быть, в дискуссионном плане. Что важно сказать в заключительной части выступления, это есть в отзыве напечатанном, что автореферат публикации полностью отражает содержание диссертации, и проделана работа в соответствии с заявленной специальностью 02.00.10 – биоорганическая химия. Выделение и синтез молекулярных ансамблей моделирующих функций природных живых систем. Полученные в диссертации теоретические научные результаты могут быть использованы в большом количестве организаций, я не буду все перечислять, но, разумеется, это ваш уважаемый Институт, это Институт органической химии, Институт элементов органических соединений, много других организаций, которые в той или иной степени работают либо с фотофизикой, либо с флуоресцентными красителями.

Конечное ритуальное предложение я, видимо, должен зачитать для протокола. Диссертационная работа Смирнова Александра Юрьевича на тему «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи наработки библиотек соединений с целью поиска перспективных биоломинесцентных меток. Диссертационная работа Смирнова Александра Юрьевича соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», утверждённым и изменённым Постановлениями Правительства Российской Федерации, тут номера перечислены. Сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. Спасибо за внимание.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо за отзыв. Александр Юрьевич, у Вас есть возможность поговорить с оппонентом.

Смирнов А.Ю., соискатель: Спасибо большое, Сергей Зурабович, за работу по оппонированию моей диссертации. Давайте ответу на Ваши вопросы. По поводу параCF₃-производного, данное вещество уже получено, и более того, мы работаем над более

сложными производными фторного ряда, и в ближайшее время мы также опубликуем одну или даже несколько работ. Большое спасибо Вам за идею по поводу аммонийных и фосфониевых солей, мы попробуем также использовать в нашей работе.

По поводу умеренных выходов мне поспорить с Вами трудно, могу даже добавить, что они были печально низкими выходами. И Ваш дискуссионный вопрос по поводу того, можно ли предсказать оптические свойства вещества на основании его внешнего вида. В 80-90% случаев это можно предсказать, соответственно, если у нас вещество, допустим, выглядит желтым или даже бледно-желтым, то, скорее всего, оно будет поглощать исключительно синие волны или даже ультрафиолетовые. Если оно красное, то, скорее всего, будет поглощать красные волны, и оно уже более, так сказать, удовлетворяет нашим запросам. Вещество, которое будет излучать в инфракрасной области, уже будет черно-фиолетового вида или черно-зеленого. Однако из-за того, что для многих соединений характерен сольватохромизм и различные эффекты, существует вероятность и ошибиться в этом процессе.

По поводу механизма превращения, вынес его в дополнительный слайд. Нам на самом деле кажется, что конечные продукты находятся в равновесии между своими E- и Z-конфигурациями, и, скорее всего, у нас устанавливается в процессе реакции термодинамическое равновесие между двумя продуктами, как аналогичный процесс происходил для стирольных производных. Поэтому, скорее всего, преимущественно образование следующего вещества происходит уже после завершения данного реакционного цикла.

Также Сергей Зурабович указал на несколько наших опечаток и не очень хороших выражений, спасибо, мы приняли к сведению, в дальнейшем постараемся их не употреблять. Кажется, я ответил на все Ваши вопросы. Или, возможно, что-то забыл.

Иванов В.Т., председатель: Переходим к заслушиванию следующего официального оппонента. Тараканов Павел Александрович, Институт физиологически активных веществ, Черноголовка.

Тараканов П.А., оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).* Добрый день, уважаемые коллеги. Приветствую членов диссертационного совета и гостей и диссертанта. Второй раз я здесь выступаю последним, можно сказать, и мне остается лишь некоторые детали только добавить. По своему роду деятельности мы тоже занимаемся скринингом и попыткой выстроить корреляции связи структуры и свойства фотофизические с дизайном молекул. И мне бы стоило как рекомендацию к данной научной группе предложить, чтобы усилить внимание на теоретические аспекты по поводу квантово-химических расчетов, влияния различных дизайна структуры изменений на их фотофизические свойства. Потому

что если даже в целом сторонним взглядом посмотреть, что авторы поставили задачу изменения абсорбции эмиссии предволновой области и выбрали ту часть молекулы, то есть бензилиденовую, ну, и даже во 2-м положении, там всё равно получается аналог стирильных производных, которые сильно подвержены конформации, и по сути понятно, что слишком далеко сдвинуть увеличение сопряженной цепочки там не получится ввиду и колебательных конформационных изменений. Как раз одно из направлений модификации, называемых аурановыми производными, где сочленилось, аннелировалось бензольное кольцо по связи при 1, 2 атоме азота и углерода, там очевидно более плоскостная молекула, более P-расширенная, и, соответственно, там более четкое было наблюдение за сдвигом в предволновую область. Поэтому при отсечении, например, нескольких производных, нафталин-производных по бензилиденовому положению, которые не проявили значительных сдвигов даже в абсорбцию, и тушение флуоресценции, то если бы в данном направлении по аннелированию по 1, 2 атому углеродного скелета наращивать эту сопряженную цепочку, там, возможно, можно было бы более лучших эффектов наблюдать.

И в целом, если бы еще были проведены некоторые теоретические исследования, то есть корреляции, то это бы лучше раскрыло работу и подтолкнуло бы даже ряд других исследователей для использования вашей системы в своих целях и задачах.

Сама в целом работа несет очень классический характер, поставлены конкретные цели, задачи, проведен скрининг молекулярного дизайна, проверены физико-химические свойства. Соответственно, лидеры были выделены, исследовались дальше, не-лидеры отсекались, хотя, возможно, зная механизм, если бы теория была немного подраскрыта, может, они бы и не назывались неперспективными либо могли бы им быть предложены некоторые иные направления использования.

По своему уровню доказательства структуры, чистоты химических соединений работа соответствует международному стандарту, здесь стоит только порадоваться и отметить, что, так как я уже второй раз оппонирую диссертации, что это такая визитная карточка данной группы, и химиков-органиков это не может не радовать.

Ну, и в целом, чтобы сильно не затягивать, я прочитаю то положение, которое необходимо. Таким образом, по актуальности, новизне, достоверности результатов и их научно-практической значимости, а также оформлению диссертационная работа Смирнова Александра Юрьевича на тему «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёной степени», утверждённым Постановлением Правительства РФ, предъявляемым к работам, представленным на соискание учёной степени кандидата

химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, ее автор заслуживает искомой степени. Спасибо за внимание.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо за отзыв. Я, честно говоря, не зафиксировал, были ли замечания, на которые требуются ответы, или нет? Были? Прошу ответить на замечания.

Смирнов А.Ю., соискатель: Спасибо большое, Павел Александрович, за Вашу работу. Вы упомянули стоксовы сдвиги. Мы, разумеется, в дальнейшем будем стараться указывать энергетические характеристики в обратных сантиметрах, так как они представляют интерес для физическо-химических исследований.

Что же касается расширения имидазолонного цикла для наращивания Р-системы, то я хотел бы сообщить, что данная работа на самом деле ведется, просто она не вошла в данную работу, и публикации у нас в дальнейшем планируются по данной тематике.

Также уже в самом отзыве Павел Александрович упоминал вопрос по поводу того, что в спектре ^{13}C , а для тиостирильных (01:04:39) заместителей, для изомеров практически не изменяются, тогда как для просто стирольных заместителей они разные. Спасибо, что обратили на это внимание, мы как-то первоначально этого факта даже и не заметили. Но мы считаем, что, возможно, это связано с тем, что по своим электронным свойствам S-метил-группы и арил оказываются более похожими друг с другом, чем арил и протон. И поэтому и влияние оказывается в данном случае минимальным.

Также Павел Александрович привел несколько наших опечаток и ошибок, спасибо, мы постараемся в дальнейшем подобного не допускать.

Иванов В.Т., председатель: Всё понятно, спасибо. Мы завершили заготовленную часть нашего обсуждения, можем перейти к общей дискуссии. Кто бы хотел добавить? Потому что мы слышали какие-то аргументы, в том числе и по поводу голосования, рекомендации какие-то. Прошу.

Уткин Ю.Н.: Уважаемые коллеги, поскольку флуоресцентные метки нам не чужды, я хотел бы несколько слов сказать по этому поводу. Во-первых, сильное впечатление производит набор синтезированных флуоресцентных соединений. Автор как-то скромно нигде не указал общее количество, но судя по обозначениям, это, наверное, где-то близко к сотне. И, собственно, он прекрасно продемонстрировал свои возможности как химикосинтетик. И в соответствии с этим я буду голосовать, несомненно, за и призываю всех коллег сделать то же самое.

Еще в одной из предыдущих работ из этой же лаборатории были синтезированы соединения, которые позволяли вводить флуоресцентную метку в природные соединения, и Михаил Сергеевич нам любезно предоставил такое соединение, мы уже поработали с ним, готовим публикацию. Но поскольку здесь, в этой работе, были получены производные, обладающие

уникальными свойствами, например, этот сольватохромизм, в качестве предложений хотелось бы получить такие производные, которые позволяли бы проводить химическую модификацию, скажем, в частности, белков. И при взаимодействии белков открывается новое измерение, когда происходит перенос метки из окружающей среды в, скажем, гелиофобную часть белка, происходило бы возгорание. То есть это еще один способ детектировать взаимодействие. Но это пожелание. И мы готовы, если будут такие соединения, использовать их в своей работе. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Есть еще желающие выступить?

Лукьянов К.А.: Я добавлю немного как завотделом, где эта группа развивается Михаила Баранова, мне очень нравится, как они взаимодействуют с биологами. И в целом, как много подчеркивали, эта группа принадлежит к разряду базовых, что называется, лабораторий Института в плане тематики, то есть биоорганической химии как таковой, не биологии, не биохимии, а именно синтетике и характеристике природных и близких к этому соединений. И в составе отдела мы тесно взаимодействуем, эти вещества идут в работу в биологических исследованиях. И группа молодая, очень активно растущая. Я просто хочу подчеркнуть и попросить дирекцию поддерживать Михаила Баранова и его сотрудников, мы видим - защита, сейчас будут готовиться еще следующие; в частности, комнаты тоже в дефиците, я уж прошу прощения за приземленные вопросы, но этот вопрос тоже остро стоит. Спасибо. А так да, я очень за защиту, я не вхожу в диссовет и не могу голосовать, но, безусловно, присоединился бы к позитивным оценкам диссертации.

Иванов В.Т., председатель: Ну что, мы услышали ряд аргументов касательно голосования. Может, какие-то еще у нас появятся соображения? Я могу добавить два своих личных впечатления. В течение многих лет я могу следить за динамикой развития тематик в институте, и, в общем, мы все понимаем, что последний десяток лет у нас довольно существенный крен в сторону биологизации происходит и уменьшение доли собственно чисто химических исследований. А то, что мы сегодня слышим, это показывает то, что у нас сохраняется серьезная культура современных чисто химических исследований. И это можно только приветствовать. Спасибо. Какие-нибудь еще есть соображения? Больше соображений нет. Тогда я даю слово диссертанту, который имеет право уже на заключительное слово.

Смирнов А.Ю., соискатель: В качестве своего заключительного слова я бы хотел выразить благодарность многим собравшимся. Во-первых, я благодарен своему научному руководителю, Михаилу Сергеевичу, за неопределимую помощь и полезные советы на протяжении всей моей работы. Также я благодарю своих бывших коллег и теперешних коллег и просто друзей, знакомых, которые пришли сегодня. Также я выражаю благодарность руководителю отдела биофотоники Лукьянову Константину и всем сотрудникам этого отдела

за неоценимый вклад в биологические исследования и спектроскопические изучения. Также хотел бы поблагодарить сотрудницу МГУ Боченкову Анастасию Владимировну за проведение квантовых механических расчетов для наших работ. Также бы я хотел поблагодарить Ермакову Юлию Геннадьевну за изучение окрашивания митохондрий. Также я благодарю сотрудников лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии и лично Минеева Константина Сергеевича за регистрацию спектров ядерно-магнитного резонанса, а также за помощь в расшифровке особенно сложных случаев. Также я благодарен всем собравшимся, также тем, кто не смог прийти. Спасибо вам большое. Наверное, всё.

Иванов В.Т., председатель: Всё? Спасибо. Ну, что же, мы фактически уже созрели для голосования. Мы должны избрать счетную комиссию и договориться о паре последующих шагов. У меня уже есть предложение, подготовленное и согласованное, по поводу состава счетной комиссии. Без регалий, имен, отчеств: Смирнов, Белогуров, Олейников. Стандартный размер счетной комиссии, который, как опыт показал, прекрасно справляется с задачей, стоящей перед ней. Есть какие-нибудь иные соображения? Отводы, самоотводы? Давайте проголосуем за данный состав счетной комиссии перед тем, как двигаться дальше. Кто за? Кто против? Счетная комиссия принята, утверждена, выбрана. Еще нам предстоит, после того, как мы утвердим итоги голосования, проголосовать за проект заключения, который на руках у всех членов ученого совета имеется. Есть какие-нибудь соображения подготовительного характера по поводу того проекта, который вам был предоставлен? Если есть предложения по поводу коррекции, лучше их обсудить сейчас, чтобы голосовать уже за подготовленный, откорректированный проект заключения. Есть какие-то замечания? Да, прошу.

Лебедев Ю.Б.: На пятой странице абзац про официальных оппонентов нуждается в более тщательном редактировании. Конкретно ведущая организация «МФТИ» должна быть убрана, это не официальный оппонент. И последнее предложение, ну, не надо таких анекдотов вставлять в заключение, что гетероциклические флуоресцентные соединения или достижение обладают высокой квалификацией, которая позволяет объективно оценить. Последнее предложение не сочетается с предыдущим.

Иванов В.Т., председатель: Я, честно говоря, не сообразил. У Вас предложение по поводу редакции этого текста, правильно я понимаю?

Лебедев Ю.Б.: «МФТИ» убрать вообще, а всё остальное – посмотреть на согласованность предложений общего контекста. Там нет конкретных замечаний, но неаккуратно...

Иванов В.Т., председатель: Да, я предлагаю, когда дело дойдет до голосования, проголосовать за предлагаемый текст с учетом того, что мы сейчас слышали. Для этого должно быть согласие автора, надеюсь, оно есть. Еще есть соображения по тому, что мы

слышали? Не вижу. Тогда объявляю перерыв на голосование, прошу голосовать, не расходиться. Я думаю, подсчет будет очень быстрый и короткий, и мы довольно быстро примем решение по поводу уже нашей защиты. Прошу голосовать.

(Идёт тайное голосование)

Иванов В.Т., председатель: У меня ощущение, что счетная комиссия с успехом завершила свою работу и готова нам доложить. Прошу внимания.

Олейников В.А., учёный секретарь: Заключительный акт у нас сегодняшнего заседания, и это работа счетной комиссии. Мы рассматривали диссертацию Смирнова Александра Юрьевича. Присутствовал 21 член диссертационного совета, роздано бюллетеней – 21, оказалось в урне – 21, за – 21, против и недействительных нет.

Иванов В.Т., председатель: Прошу утвердить итоги данного голосования. Кто за? Кто против? Действительно, все за, как один.

И последнее голосование, прошу утвердить проект заключения нашего совета с учётом той поправки, которая была озвучена несколько минут тому назад. Кто за то, чтобы утвердить проект заключения? Кто за? Кто против? Спасибо, коллеги. Мы успешно завершили сегодняшнюю повестку дня. До следующих встреч.

Председатель
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В.А.