

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 17 марта 2021 г. № 2

О присуждении **Смирнову Александру Юрьевичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP» по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» принята к защите 17.12.2020 г. (протокол № 35) диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997, Приказ Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013).

Соискатель Смирнов Александр Юрьевич, 1987 года рождения, в 2009 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «Химия».

С 2009 по 2012 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. В настоящее время работает младшим научным сотрудником группы химии гетероциклических соединений отдела биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

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

Научный руководитель - кандидат химических наук Баранов Михаил Сергеевич, старший научный сотрудник, руководитель группы химии гетероциклических соединений отдела биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Вацадзе Сергей Зурабович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией №2 (Лаборатория супрамолекулярной химии) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им.

Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН);

Тараканов Павел Александрович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет) (МФТИ), г. Долгопрудный, в своем *положительном* заключении, подписанном кандидатом химических наук Черкасовым Владимиром Рюриковичем, старшим научным сотрудником, заместителем заведующего лабораторией нанобиотехнологий МФТИ и кандидатом химических наук, старшим научным сотрудником лаборатории нанобиотехнологий МФТИ Колычевым Евгением Леонидовичем, и утвержденном проректором по научной работе МФТИ кандидатом физико-математических наук Баганом Виталием Анатольевичем, отметила, что диссертационная работа Смирнова А.Ю. представляет собой завершённую научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям "Положения о присуждении учёных степеней", утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени кандидата наук, а автор работы Смирнов Александр Юрьевич заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия.

Соискатель имеет 22 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 6 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, объемом 4 печатных листа. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Смирнов А.Ю. внес основной или существенный вклад:

1. Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y.A., **Smirnov A.Y.**, Baleeva N.S., Krylov A.I., Baranov M.S. Pyridinium Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore: Fluorogenic Dyes with Large Solvent-Dependent Stokes Shift // J. Phys. Chem. Lett. 2018. Т. 9. № 8. С. 1958–1963.

2. Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., **Smirnov A.Y.**, Zagudaylova M.B., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Baranov M.S., Bochenkova A. V. Excited-state locked amino analogues of the green fluorescent protein chromophore with a giant Stokes shift // RSC Adv. 2019. Т. 9. № 66. С. 38730–38734.

3. Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., **Smirnov A.Y.**, Zagudaylova M.B., Baranov M.S. Pyridine analogue of fluorescent protein chromophore: Fluorogenic dye suitable for mitochondria staining // Dye. Pigment. 2019. Т. 170. С. 107550.

4. **Smirnov A.Y.**, Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., Baranov M.S. Design of red-shifted and environment-sensitive fluorogens based on GFP chromophore core // Dye. Pigment. 2020. Т. 177. С. 108258.

5. Zaitseva E.R., **Smirnov A.Y.**, Scherbinina S.I., Zasedateleva V. V, Mineev K.S., Baranov M.S. Synthesis of methylsulfanyl analogs of Kaede protein chromophore // Chem. Heterocycl. Compd. 2020. Т. 56. № 3. С. 399–402.

6. Зайцева С.О., **Смирнов А.Ю.**, Зайцева Э.Р., Балеева Н.С., Баранов М.С. Синтез и оптические свойства нового аналога хромофора белка Kaede // Биоорганическая химия, 2020. Т. 46, № 1. С. 106-109.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.х.н. Вацадзе С.З. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) обзор литературы: раздел 2.2.5 – указанные там красители принято называть фотохромами; 2) обсуждение результатов: выбор замещенных аренов на Рис. 48 – я бы еще добавил пара-CF₃-замещенный арен; возможно, интересные свойства проявили бы четвертичные аммониевые или фосфониевые соли; 2) обсуждение результатов: Таблица 3 – указанные выходы скорее не «умеренные», а низкие; 3) можно ли по цвету твердого соединения или его раствора качественно отнести его к удовлетворяющим требованиям поглощения в длинноволновой области? 4) обсуждение результатов: Рис. 57 – предложенный механизм не объясняет почти исключительного образования Z-изомеров, так как стадия тиопалладирования должна приводить к продукту син-присоединения (на рисунке изображен анти-аддукт); 5) очевидно, что стереохимия финального продукта определяется стадией восстановительного элиминирования; 6) экспериментальная часть: не очень привычно выглядит обозначение массы в миллиграммах как «Мг»; 7) редакторские: «4-пиридиновый альдегид» - надо 4-пиридинкарбальдегид; «гиброксиденбензилиден»; «пара-акцепторные производные»

2. Отзыв официального оппонента к.х.н. Тараканова П.А. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1) Автор обсуждает одну из важных для его красителей фотофизическую характеристику, как Стоксов сдвиг. Ряд соединений, в которых измеряется данная характеристика поглощает довольно в широком диапазоне длин волн от 350 нм, до 550 нм. Так как разброс по значениям длин волн в сравниваемых соединениях более 100 нм в коротковолновом диапазоне, то характеристику Стоксова сдвига следовало бы приводить в энергетических единицах см⁻¹. Последнее давало бы более правильное представления вклада изменения структуры на величину Стоксова сдвига; 2) стр. 45: рисунок 58. для соединений **II.24-27** упущен индекс а-расшифровывающий радикал; 3) стр. 109: формула для расчета квантового выхода флуоресценции методом сравнения приведена неверно - перепутаны местами в дроби фактор абсорбции исследуемого

соединения и стандарта. Приведено «
$$\Phi_x = \Phi_x \times \frac{F_x}{F_{st.}} \times \frac{f_x}{f_{st.}} \times \frac{n_x^2}{n_{st.}^2}$$
 », а должно быть

$$\Phi_x = \Phi_{st.} \times \frac{F_x}{F_{st.}} \times \frac{f_{st.}}{f_x} \times \frac{n_x^2}{n_{st.}^2};$$

4) К диссертационной работе есть замечание к автореферату: - на странице 6 автор дает ссылку на таблицу с выходами соединений, которой не существует «Соединения были получены с хорошими выходами (Таблица 1)». В таблице 1 приводятся оптические свойства полученных имидазолонов в ацетонитриле, но в тексте автор ссылается на нее как на таблицу 2 «Оптические свойства растворов всех синтезированных соединений в ацетонитриле представлены ниже (Таблица 2)»; 5) К диссертационной работе есть ряд вопросов: Чем объясняется отсутствие различных химических сдвигов сигналов атомов углерода Z и E изомеров в соединениях **II.1c**, **II.2c**, **II.4c**, в отличие от изомеров соединения **II.23a**? 6) Одной из задач в своей работе автор поставил модификацию соединений, направленную на смещение максимумов абсорбции и эмиссии новых веществ в длинноволновую область. Классическим приемом достижения такой цели является расширение планарной п-электронной системы хромофора. Однако автор прибегнул к этому приему только для фенилиденового фрагмента, что предсказуемо в виду его конформационной подвижности не привело к искомому результату «Будучи расширенными на один сопряженный цикл соединениями **II.7a-e**, были бы должны демонстрировать смещение максимумов абсорбции и эмиссии в более длинноволновую область. Однако подобного в явном виде не наблюдалось, а в некоторых случаях происходило даже гипсохромное смещение (Таблица 18). Из этого напрашивается вывод, что введение дополнительного ароматического сопряжения в бензилиденовый фрагмент бензилиденимидазолонов не всегда оправдано.» Почему в своей работе автор не попытался наращивать п-электронное сопряжение конформационно жесткой планарной части имидазолонна, которая на примере ауриноподобных флуорофоров выглядит более перспективным направлением для ИК смещения.

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) Все бензилиденимидазолонны изображены в E-конфигурации. Подтверждался ли данный факт? 2) 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; 3) В разделах, посвященным 5-аминобензилиденимидазолонам 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**? 4) Возможно ли, что образование тройной связи происходит в момент удаления защитной силильной группы в случае соединения **II.28** из-за одновременного элиминирования метилмеркаптана? 5) В экспериментальной части указано несколько соединений, которые были синтезированы по литературным методикам, однако они никак не

описаны. Следовало бы указать спектр ЯМР ^1H данных соединений.

4. Отзыв на автореферат кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории медицинской химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Дубининой Татьяны Валентиновны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) 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); 2) Стр.7. «в качестве исходных компонентов применялись бензилиденимидазолы **II.1a-II.8a** как показавшие самые высокие КВФ» Однако в таблице 1, где представлены квантовые выходы флуоресценции данной серии соединений, указано, что для соединений **II.2a, II.4a, II.6a** 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?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области органического синтеза и химии флуоресцентных красителей. В ведущей организации - Московском физико-техническом институте - ведутся работы в области создания новых материалов, в том числе оптических биосенсоров, для исследования их биологической активности клеточными культурами и животными. Официальный оппонент Вацадзе Сергей Зурабович является высококлассным специалистом в областях органической и металлоорганической химии, создании средств биовизуализации и фотофизических материалов на их основе, а также медицинской химии. Среди важнейших достижений официального оппонента Тараканова Павла Александровича стоит особо отметить синтез гетероциклических и макроциклических флуоресцентных соединений и исследование их физиологической активности. Высокая квалификация официальных оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что в результате выполненной соискателем работы были синтезированы аналоги хромофора GFP с различным типом структур, проявляющие заметное варьирование квантового выхода флуоресценции в различных средах и ярко выраженный сольватохромизм. Предложены новые методы их модификации, в частности, впервые показана реакция

кросс-сочетания терминальных ацетиленов и 2-метилсульфанилбензилиден-имидазолонов, синтезированы ранее неизвестные борированные 5-аминометиленбензилиденимидазоланы. Впервые показана возможность использовать аналоги хромофора GFP в качестве флуорогенов для меченья органелл живых клеток.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что было показано, что в результате введения акцепторных и сопряженных заместителей в бензилиденный фрагмент производных хромофора GFP могут быть получены соединения, проявляющие ощутимый квантовый выход флуоресценции без введения в молекулу фрагментов, препятствующих вращательной безызлучательной релаксации. Также впервые продемонстрирована реакция кросс-сочетания производных тиогидантоинов с ацетиленами, приводящая к образованию тиостирильных аналогов хромофора белка *Kaede*. Полученные данные вносят важный вклад в понимание взаимосвязи между структурой соединения и его сольватохромными и флуоресцентными свойствами, а также позволяют предсказывать способность соединений флуоресцентно и селективно окрашивать различные внутриклеточные структуры.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что в результате проведенной работы впервые показана возможность использования производных хромофора GFP в качестве флуорогенных красителей, пригодных для селективного флуоресцентного меченья эндоплазматического ретикулума и митохондрий в живых клетках, что может найти применение при исследовании происходящих внутри клеток процессов, а также использоваться в медицине для диагностики различных патологий.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Идеи и концепции, изложенные в диссертации, базируются на современных представлениях химической и биологической науки, не противоречат мировым литературным данным.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в процессе всех выполненных исследований, разработке и выборе экспериментальных подходов, а также анализе результатов экспериментов. Основные экспериментальные данные получены лично автором, за исключением регистрации данных ЯМР-спектроскопии (получены в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН) и исследовании флуорогенных свойств полученных соединений на биологических объектах (изучение проводилось в лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов, группе молекулярных меток для оптической наноскопии и группе редокс-биологии). Смирнов А.Ю. принимал непосредственное участие в написании и подготовке научных статей по теме диссертации к публикации, а также

лично представлял результаты работы на конференциях.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Смирнова А.Ю. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой важны для развития исследований в области органического синтеза, биохимии и биомедицины. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Смирнова Александра Юрьевича «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

На заседании 17 марта 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Смирнову Александру Юрьевичу ученую степень кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 02.00.10 – биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

18 марта 2021 г.