

## ОТЗЫВ

официального оппонента ВАЦАДЗЕ Сергея Зурабовича  
на диссертацию БАЛЕЕВОЙ Надежды Сергеевны

"Синтез и свойства флуоресцентных красителей на основе аналогов хромофора GFP", представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Понимание структуры и функциональных свойств клеток, органов и живых организмов является одной из ключевых задач в современной медицине и биологии. Методы биовизуализации играют большую роль в диагностике и лечении многих заболеваний. Разработка методов диагностической визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), рентгеновская компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) или ультразвуковая визуализация и связанные с ними контрастные агенты внесли огромный вклад в развитие медицины в течение последних 30 лет, особенно, в случае выявления и лечения онкологических заболеваний. Однако актуальной остается проблема повышения чувствительности, пространственного разрешения, глубины проникновения и направленного таргетирования методов биовизуализации. В настоящее время одной из наиболее развивающихся областей является молекулярная визуализация, которая нацелена на получение *in vivo* детальной информации с высокой чувствительностью.

Оптическая биовизуализация, особенно люминесцентная, становится ключевым инструментом различных методов диагностики, отвечающих строгим требованиям современной медицины и биологии. В зависимости от длины волны, свет может глубоко проникать в биологические ткани, а его детектирование очень чувствительно, поскольку достижимо даже однофотонное обнаружение. Также можно отслеживать динамику изменения во времени получаемых данных, зависящих от времени жизни возбужденного состояния, генерирующего световое излучение.

Существует несколько типов люминесцентных меток: органические люминофоры, квантовые точки и ионы трехвалентных лантанидов ( $\text{Ln}^{\text{III}}$ ). Органические люминофоры особенно хорошо изучены и обладают высокой эмиссионной способностью. Кроме того, их структура может быть легко модифицирована для управления процессами испускания света и увеличения их специфичности. Однако к недостаткам можно отнести очень короткие времена жизни возбужденного состояния – порядка наносекунд и меньше, что требует использования дорогих и сложных установок для проведения время-разрешенной визуализации. Также следует заметить, что органические хромофоры часто подвергаются интенсивному фотообесцвечиванию, поэтому их можно использовать в течение нескольких секунд, что недостаточно для полноценной информативной визуализации.

Среди всего многообразия органических флуоресцентных меток можно выделить арилметеновые производные. Действительно, как показано в работах сотрудников лаборатории Химии метаболических путей Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, разнообразные производные хромофоров флуоресцентных белков, имеющие в своей основе структуру имидазолна (4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов), являются перспективными претендентами на роль новой группы флуоресцентных красителей. Эти соединения имеют малый размер, низкую степень гидрофобности, а также разнообразную и интенсивную окраску. Представленная к анализу работа Балеевой Н.С. посвящена развитию химии этих соединений, в первую очередь, созданию новых синтетических аналогов зафиксированных имидазолонов. На основании вышесказанного работу следует признать **актуальной**.

Рецензируемая диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 6 таблиц, 24 рисунка и 111 схем. Список литературы включает 224 наименования.

Во Введении автором обоснованы актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, показана научная новизна и

практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту, данные об апробации результатов, информация про публикации по теме диссертации, указаны структура и объем диссертации.

Первая глава работы (Обзор литературы) посвящена обсуждению известных данных по вопросам синтеза флуоресцентных соединений ряда имидазол-5-она, имеющих метилиденовую группу в положении 4. В последние десятилетия в литературе было опубликовано множество методов синтеза 4- метилиден-1Н-имидазол-5(4Н)-онов А (далее «имидазолонов») (Схема 1.1.1). Наиболее популярными среди них являются: циклизация амидов N-ацилдегидроаминокислот, взаимодействие имидатов с имидами, а также конденсация 1Н-имидазол-5(4Н)-онов D с карбонильными соединениями. Отдельно автор рассмотрел менее распространенные методы синтеза целевых классов соединений. Необходимым компонентом обзора литературы на тему люминесцентных соединений стали разделы, посвященные синтезу и фотофизике двух классов таких материалов – ксантенов и борных производных дипиррометенов.

На основании тщательно проведенного анализа литературы и с учетом богатого научного задела лаборатории, где работает автор, **цель** диссертационной работы была сформулирована следующим образом: создание флуоресцентных производных хромофоров флуоресцентных белков и установление взаимосвязи между их строением и свойствами. Для достижения поставленной цели автор решал следующие **задачи**:

1. синтез конформационно зафиксированных аналогов хромофоров белка Sirius и цианового флуоресцентного белка (CFP);
2. синтез ряда конформационно зафиксированных аналогов хромофора белка Kaede и изучение влияния подвижных фрагментов молекулы на оптические свойства;
3. расширение круга аминных аналогов хромофора GFP и изучение влияния заместителей на атоме азота на величину квантового выхода флуоресценции;
4. создание ряда производных синтетического хромофора GFP,

отличающихся более длинной цепью сопряженных связей, и изучение влияния этой модификации на оптические свойства;

5. разработка методов введения в флуоресцентные красители функциональных групп, пригодных для конъюгации с другими молекулами;
6. дизайн методов введения во флуоресцентные красители сенсорных групп. Демонстрация эффективности этих подходов на примере синтетических аналогов GFP.

Синтетическая часть работы Балеевой Н.С состоит из трех частей: синтез хромофоров других флуоресцентных белков; создание аналогов хромофоров; разработка методов введения функциональных групп в структуру хромофоров. Ключевые **научно-практические достижения** рецензируемой диссертации кратко могут быть выражены следующим образом. Автором показано, что непосредственное увеличение КВФ и изменение других оптических свойств при фиксации подвижного бензилиденового фрагмента характерно не только для хромофора GFP, но и для хромофоров других флуоресцентных белков (решение задач 1-4). Показано, что полученные конформационно зафиксированные аналоги белка Sirius и CFP являются хорошими претендентами на роль флуоресцентных красителей. Они характеризуются высокими показателями квантового выхода, а все рН-зависимые процессы лежат за пределами физиологической области и не препятствуют их применению в живых системах. Что касается аналогов белка Kaede, то показано, что фиксация бензилиденового фрагмента в 4-м положении хромофора приводит к существенному увеличению квантового выхода флуоресценции; дополнительная фиксация двойной связи в положении 2 приводит к еще большему увеличению этого показателя. В плане решения задачи 5 крайне интересным и перспективным выглядит проведение реакции [3+2]-циклоприсоединения азидов с енаминами без участия медных катализаторов. Решение задачи 6 привело к созданию группы новых флуоресцентных сенсоров.

**Личный вклад автора** заключался в проведении анализа литературных данных по теме диссертационной работы, проведении экспериментальной работы по

синтезу, выделению и очистке органических соединений, регистрации электронных спектров поглощения и испускания, а также интерпретации данных всех физико-химических исследований. Постановка задач исследования, обсуждение полученных результатов и подготовка публикаций были проведены совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Следует отдельно отметить, что работа написана красивым научным языком, её приятно читать; также крайне важным является наличие качественного иллюстративного материала на схемах и рисунках.

**Достоверность** полученных результатов подтверждается применением широкого набора современных методов, таких как: масс-спектральный анализ, ЯМР-спектроскопия, электронная спектроскопия поглощения и испускания.

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 8 статьях, опубликованных в журналах из перечня научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертационных работ, в том числе, в журналах первой четверти, и доложены на 3 национальных и международных научных конференциях. Автореферат и публикации **полностью отражают** содержание диссертации.

В результате проведенного оппонентом анализа текста диссертации, автореферата и публикаций Балеевой Н.С. можно ответственно заявить, что **цель** работы, сформулированная в постановочной части, автором **достигнута**, а сопутствующие ей **задачи выполнены**. Представленные в работе **научные положения, выводы и рекомендации** являются обоснованными.

При тщательном анализе работы появилось некоторое количество вопросов и замечаний, которые, надеюсь, станут основой плодотворной дискуссии:

- *введение и постановка задачи*: можно было бы добавить информацию про методологию и методы исследования;
- *обсуждение результатов*: стр. 54 – «подобное поведение...объясняется образованием координационной связи между атомами азота и бора» - тут, по мнению оппонента, следовало бы пошире и поподробнее обсудить этот вопрос;
- *обсуждение результатов*: с фотолabileными соединениями типа **2.1.9**.

можно попытаться работать в затемненном помещении, чтобы свести к минимуму процессы фотоизомеризации;

- *обсуждение результатов:* стр. 73 – сомневаюсь, что атом водорода может обладать “более слабым электронно-донорным эффектом” – он, вообще, как заместитель, не обладает никакими эффектами, так как с ним сравнивают все остальные заместители;
- *обсуждение результатов/экспериментальная часть:* региохимия продуктов [3+2]-циклоприсоединения не обсуждается и не доказана;
- *редакторские и стилистические:* автореферат – стр. 4, нижняя строчка – вместо  $pK_a$  должно быть  $pH$ , указанный диапазон не показан на Рис. 1; диссертация - в Схеме 1.1.20. опечатка в структуре реагента над нижней стрелкой; стр. 27 – «на атомы других групп периодической таблицы»;
- *рекомендации:* было бы удобнее для читателя, если бы квантовые выходы во всей работе были приведены в одном стиле – либо в %, либо в долях от 1; “получены при воздействии трибромида бора” – имеет смысл добавить “с последующей обработкой фтористым водородом”.

Вышеперечисленные замечания не касаются основной сути работы, не влияют на содержание выводов, сделанных на основании полученных соискателем данных, не ставят под сомнение новизну и практическую значимость полученных результатов.

Диссертация Балеевой Н.С. соответствует паспорту специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия (химические науки) в области исследований: 4. Выделение и синтез молекулярных ансамблей, моделирующих функции природных живых систем.

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертация "Синтез и свойства флуоресцентных красителей на основе аналогов хромофора GFP" представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая по актуальности выбранной темы, уровню проведенных исследований, научной и практической значимости, степени обоснованности научных положений и выводов полностью соответствует всем требованиям, установленным пунктами 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного

Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650, а ее автор, Балеева Надежда Сергеевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

**Официальный оппонент:**

доктор химических наук,  
профессор по специальности 02.00.03 – органическая химия,  
профессор кафедры органической химии  
Химического факультета МГУ, профессор РАН  
Вацадзе Сергей Зурабович

Подпись Вацадзе С.З. удостоверяю:  
и.о. декана Химического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова,  
член-корреспондент РАН, профессор  
Калмыков Степан Николаевич

Почтовый адрес: 119991, Российская Федерация,  
г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Наименование организации:

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,  
Химический факультет

Телефон: +7-495-939-3571

Адрес электронной почты: [szv@org.chem.msu.ru](mailto:szv@org.chem.msu.ru)

« 16 » сентября 2019 г.

