

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу **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 - биорганическая химия

### Актуальность темы диссертационной работы

Флуоресцентные красители – это некоторые вещества, способные переизлучать поглощенный свет с меньшей длиной волны и характеризующиеся относительно короткими временами жизни возбужденного состояния порядка от  $10^{-9}$  до  $10^{-8}$  с. Явление флуоресценции находит широкое применение в различных областях жизни человека: от бытового использования до научно-исследовательской практики.

Особенно важную роль флуоресцентные красители занимают при создании оптических сенсоров. Ввиду малых времен жизни возбужденного состояния они могут применяться в качестве сенсоров в быстрых динамических процессах, таких как биохимические реакции. Ввиду скачка в развитии создания лазерных микроскопов с фемтосекундными импульсными лазерами флуоресцентная микроскопия становится мощным инструментом исследования биологических систем. Поскольку большая часть соединений в клетке бесцветна, наблюдение за ними невозможно без предварительного введения каких-либо меток. Пожалуй, самой популярной флуоресцентной меткой являются флуоресцентные белки. Первый из них – зеленый флуоресцентный белок (GFP) – был выделен еще в 1962 из медузы *Aequorea victoria*, а спустя несколько десятилетий были разработаны уже сотни мутантных белков. И хотя научному сообществу удалось достигнуть больших успехов в этой области, поиск идеальной флуоресцентной метки по-прежнему остается актуальным. Согласно перечню приоритетных направлений развития науки, технологий и техники Российской Федерации, науки о жизни являются одним из приоритетных направлений исследований. Учитывая выше сказанное, исследовательская работа Балеевой Надежды на тему «Синтез и свойства флуоресцентных красителей на основе аналогов хромофора GFP», направленная на изучение связи структура-свойство аналогов хромофора GFP для разработки и получения новых биосовместимых флуорофоров для биоимиджинга, является актуальным исследованием.

### Научная новизна диссертационного исследования

Сочетание таких свойств производны хромофора GFP, как малый размер, высокая гидрофильность и высокий коэффициент молярного поглощения, очевидным образом сделало его интересным объектом для исследований. Особенно важным достижением стала разработка метода структурной модификации – введение фиксирующего фрагмента, что привело к многократному увеличению квантового выхода флуоресценции (КВФ) [Баранов, 2013]. Однако несмотря на высокую перспективность, вопрос создания флуоресцентных маркеров на основе хромофоров не был проработан. В связи с этим целью этой работы стала разработка красителей на основе хромофора GFP. Экспериментальные и теоретические данные проведенного исследования углубляют понимание связи структура-свойство во флуоресцентных красителях на основе хромофора GFP и закладывают фундамент для создания новых уникальных флуоресцентных меток

для биоимиджинга. Впервые синтезированы высокофлуоресцентные аналоги хромофоров белков Sirius, CFP и Kaede. Созданы аналоги хромофора GFP, характеризующиеся максимумами эмиссии в оранжевой и красной областях спектра. Разработаны удобные методы функционализации флуоресцентных красителей.

### **Анализ содержания выполненной работы**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, состоящую из четкого обоснованного введения, достаточно объемного литературного обзора, отражающего современное состояние исследований по данной тематике, занимающего основную часть диссертации обсуждения результатов, где автор анализирует экспериментально-теоретические данные своего исследования и дает выводы и заключения, экспериментальной части с достаточно подробным описанием материалов, методов и физико-химических характеристик всех полученных автором соединений, выводов, благодарностей, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 224 источника. Работа изложена на 156 страницах и содержит 24 рисунка, 111 схем и 6 таблиц.

Литературный обзор автор разбил на 2 основных главы. В первой главе «Современные методы создания 4-метилен-1H-имидазол-5(4H)-онов» автор выделяет во флуоресцирующих белках общее структурное ядро, 4-(4-гидроксипенцилиден)-1H-имидазол-5(4H)-он, и делает обзор литературы по синтетическим подходам создания данного гетероциклического соединения. Во второй главе «Арилметеновые флуоресцентные красители» автор делает обзор в рамках обсуждения влияния структурных изменений в данном классе красителей на их фотофизические свойства. При этом автор делает акцент на те структурные изменения, которые приводят к смещению спектров красителей в дальнюю красную или ближнюю инфракрасную области или к увеличению квантового выхода флуоресценции.

Обсуждение результатов автор систематизировал по структурным классам синтезированных им хромофоров. Первая часть данного исследования «Прямые аналоги хромофоров флуоресцентных белков» посвящена синтезу и модификации, заключающейся во введении дифторборильной группы. Данная модификация была использована для создания конформационно зафиксированных синтетических аналогов хромофоров флуоресцентных белков – мутантов GFP: цианового флуоресцентного белка (CFP) и белка Sirius, а также белка Kaede. Это позволило показать, 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. Вторая часть работы «Отдаленные аналоги хромофора GFP» посвящена синтезу новых производных борированного хромофора GFP, используя различные модификации, влияющие на оптические свойства красителей. А именно, создан ряд аминокислотных заместителей с заместителями разной геометрии и синтезированы соединения, содержащие более длинную цепь сопряжения: полиароматические аналоги и производные с ацетиленовыми заместителями. Было установлено что:

- на формирование нефлуоресцентной формы возбужденного состояния (возбужденного состояния с высокой степенью перераспределения заряда), и, как следствие, на стабильность квантового выхода аминопроизводных зафиксированного хромофора GFP наибольшее влияние оказывает электронный эффект заместителей на атоме азота;
- нафталиновые производные имеют небольшой bathochromный сдвиг спектральных максимумов в сравнении с нейтральной формой оригинального борированного хромофора GFP. Производные же, содержащие гидроксильные группы, как и ожидалось, характеризуются более выраженным смещением в длинноволновую область спектра. Почти все полученные соединения характеризуются высокими показателями квантового выхода флуоресценции практически во всех растворителях. Так, для незамещенного нафталинового производного 2.2.6a и для гидроксипроизводных 2.2.6b,c КВФ составляет 60-95% и лишь в некоторых случаях снижается до 30%. Тем не менее, аминафталиновые производные 2.2.6d,e характеризуются заметным варьированием этой величины в зависимости от используемого растворителя. Например, в диоксане или этилацетате КВФ составляет 30-40%, а воде – около 5%. Вероятно, что для этих соединений, как и для аминопроизводных зафиксированного хромофора GFP, возможно образование дополнительной формы возбужденного состояния с высокой степенью перераспределения заряда в молекуле;
- введение в молекулу различных арилацетиленовых заместителей существенно изменяет оптические свойства красителей, что делает их весьма перспективными флуоресцентными красителями, а реакция Соногаширы – удобным методом создания подобных соединений.

Третья часть работы «Функционализированные синтетические аналоги хромофора GFP» посвящена по сути завершающей стадии разработки флуоресцентной метки, а именно введению в молекулу функциональной (линкерной) группы, обеспечивающей специфическое взаимодействие красителя с целевым объектом, а также введению сенсорных групп чувствительных к определяемому веществу. Как правило, введение подобных групп осуществляется на самых ранних этапах синтеза и накладывает определенные ограничения на все последующие стадии. В настоящей работе на примере некоторых аминопроизводных борированного хромофора GFP и представителей других классов флуоресцентных красителей автор продемонстрировал удобные методы функционализации, которые могут быть использованы на последних этапах синтеза. Таким образом, использование аминопроизводных борированного хромофора GFP в качестве основы для создания различных карбаматных флуоресцентных сенсоров оказалось перспективным. Весьма неожиданные результаты были получены для фенольного аналога 2.3.10c. При исследовании его спектров эмиссии в фосфатном буфере при значении pH 0.5-4.5 наблюдалась интенсивная флуоресценция, а при pH > 5 происходил резкий спад флуоресцентного сигнала. Такое необычное поведение дигидроксипроизводного выгодно выделяет его среди других аналогов борированного хромофора GFP. Резкое изменение флуоресцентных свойств, происходящее при pH 4-6 (физиологический диапазон), позволит успешно использовать его в качестве pH-сенсора для широкого спектра задач и экспериментов в живых системах.

Экспериментальная часть работы изложена на 34 страницах и содержит данные  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения практически для всех органических молекул. Стоит подчеркнуть, что этот набор физико-химических данных для органических соединений соответствует требованиям международных высокорейтинговых журналов. Последний факт сам за себя говорит о высоком уровне синтетической экспериментальной работы Балеевой Надежды.

Научную часть диссертации завершают Выводы, которые четко сформулированы и полностью соответствуют поставленным задачам.

### **Научная и практическая значимость результатов**

Экспериментальные и теоретические данные проведенного исследования углубляют понимание связи структура-свойство во флуоресцентных красителях на основе хромофора GFP и закладывают фундамент для создания новых уникальных флуоресцентных меток для биоимиджинга. Более того, ряд уже полученных автором красителей могут найти конкретные прикладные применения в биоимиджинге и сенсорике в биосистемах.

### **Опубликование результатов диссертации в научной печати**

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 8 статьях в рецензируемых научных журналах, 3 из которых - в международных журналах, имеющих импакт-фактор выше 3, а также представлены на трех конференциях различного уровня.

### **Содержание автореферата**

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

В диссертации присутствуют ряд неудачных выражений:

- стр. 9: «других кислот Льюиса» сразу после упоминания уксусной кислоты.
- стр. 44: «характеризуется уширением сигналов». При сравнительном анализе оптических свойств следовало бы говорить об увеличении значения полуширины полос поглощения в ЭСП.
- стр. 51: «аналогов зафиксированных имидазолонов». Зафиксированный имидазолон при обсуждении синтеза в контексте фиксации вращательных колебаний структурного фрагмента уже не воспринимается, поэтому лучше было бы использовать выражение «аналогов дифторборильных имидазолонов».

Как и в любой объемной работе с большим массивом данных присутствуют ошибки, косвенно или напрямую связанные с опечатками:

- на схеме 1.1.20 взаимодействия фосфазена с ангидридами органических кислот при получении соединений **1.1.29**, в общей формуле ангидридов органических кислот  $(\text{R}^2\text{CO})_2\text{O}$  допущена опечатка  $(\text{R}^2\text{CO})\text{O}_2$ ;

- на схеме 1.1.23 указано выделение гидроксида цезия по реакции органической кислоты с карбонатом цезия, что, с большой вероятностью, является ошибкой;
- стр. 40: перепутаны положения – указано четвертом и пятом, а имеются в виду 3-е и 5-е положения;
- на схеме 1.2.31 связи C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> молекулы BODIPY обозначены как α, а C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> как β, далее в тексте и на схемах 1.2.38 и 1.2.39 связи C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> обозначены как β, а C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> как α;
- на схеме 1.2.43 расшифровка структурного фрагмента дана не корректно, X = C в алифатической цепочке не может быть, скорее всего, автор имел в виду X = CH<sub>2</sub>;
- на схеме 2.1.3 для соединений **2.1.2** буквенные индексы **a**, **b** не введены, что затрудняет восприятие текста при сравнительном обсуждении соединений на схеме;
- под таблицей 2.3.2 присутствует сноска о низкой растворимости некоего соединения, однако, эта сноска не указана в самой таблице. Таким образом, непонятно к чему она относится;
- стр. 103, 104: 5% раствор карбоната калия не может быть насыщенным;
- стр. 106: для соединения **2.1.5a** пик молекулярного иона имеет массу на 14 единиц (Да) ниже теоретического;
- стр. 109: в брутто формуле для соединения **2.1.9c** вместо серы указан углерод;
- стр. 122: для соединения **2.2.9a** в 1H ЯМР сигнал альдегидного протона при δ = 9.96 м.д. обозначен как ОН.

К диссертационной работе есть замечания по оформлению:

- на схеме 2.1.11 для соединений **2.1.11** обозначение различных заместителей индексом R является неудачным.

По содержанию замечание касается не полного раскрытия автором связи оптических свойств со структурой исследуемых красителей в части механизмов диссипации возбужденных состояний органических молекул в конденсированной фазе. Без базового введения читателя в понимание механизмов безызлучательной релаксации невозможно систематически анализировать зависимость тушения квантового выхода флуоресценции от структурных изменений рассматриваемых флуорофоров. Из-за этого автором были допущены в литературном обзоре такие фразы, как «...величина батохромного сдвига максимумов абсорбции и эмиссии относительно оригинального родамина увеличивается в ряду сера-селен-теллур. **Однако оказалось**, что квантовый выход в этой же последовательности резко снижается,...». Словосочетание «Однако оказалось» здесь неуместно, поскольку подразумевает неизвестность в литературе эффекта тяжелого атома, вызывающего усиление спинорбитального взаимодействия и, как следствие, увеличение кинетики безызлучательной диссипации синглетного возбужденного состояния в триплетное возбужденное состояние. Далее в обсуждении результатов автор довольно

легко оперирует понятиями состояния с высокой степенью перераспределения заряда в молекуле (ICT – англ. сокр.), разделяя их на планарные (PICT – Planar Intramolecular Charge Transfer) и скрученные (TICT – Twisted Intramolecular Charge Transfer). В литературном обзоре при этом ни о возбужденных состояниях с переносом электронной плотности, ни об их типах и их возможных механизмах диссипации ничего не сказано. Это обстоятельство затрудняет понимание логики автора при его анализе влияния структурных изменений исследуемых флуорофоров на их фотофизические свойства.

По содержанию диссертационной работы к автору имеются следующие вопросы:

- 1- Стр. 89 Чем объясняется выбор именно алкильного спейсера при исключении влияния триазольного цикла на основной хромофор? Учитывал ли автор конформационную подвижность данного типа спейсера?
- 2- Стр. 98. Насколько оправдано применение данных флуорофоров для биологических систем, учитывая большую загруженность этой области спектра другими хромо- и флуорофорами?
- 3- Стр. 105. С чем связано несоответствие количества сигналов в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре количеству неравнозначных согласно симметрии молекулы атомов углерода в структуре соединений **2.1.3a** и **2.1.3b**?
- 4- Стр. 117. Чем объясняется отсутствие для соединения **2.2.7a** масс и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР и HRMS), хотя для его гидроксо-производного они приведены? Тот же вопрос касается соединений **2.2.9a,b** стр. 122.
- 5- Автор в работе для подтверждения структуры полученных соединений среди физико-химических методов анализа использует масс-спектрометрию высокого разрешения, что позволяет установить точную брутто-формулу без элементного анализа, однако, среди мало отличающихся в серии соединений встречаются масс-спектры с существенным отклонением уже во втором знаке после запятой. Можно ли в тех случаях масс-спектры называть спектрами высокого разрешения и с чем связано такое отличие спектров этих соединений от остальной серии структур?

## **Заключение**

В итоге, высказанные замечания никоим образом не снижают общего положительного впечатления о диссертации Балеевой Надежды, а носят, скорее, рекомендательный характер. Не могу не отметить высокий уровень проделанной синтетической работы, который соответствует международным стандартам, что и подтверждается ее публикациями в высокорейтинговых международных журналах. Профессионально поставленные синтетические задачи и профессиональный уровень их выполнения предопределили такую результативность в диссертационной работе Балеевой Надежды. Все это позволило Балеевой Надежде заложить фундамент нескольких перспективных направлений создания уникальных флуорофоров и сенсоров для биоимиджинга, а некоторые производные уже рассматривать как перспективные биометки. Таким образом, по актуальности, новизне, достоверности результатов и их научно-практической значимости, а также оформлению диссертационная работа Балеевой Надежды Сергеевны «Синтез и свойства флуоресцентных красителей на основе аналогов хромофора GFP» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (Утверждено 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 работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор **Балеева Надежда Сергеевна** заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Кандидат химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия  
Старший научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт физиологически активных веществ  
Российской академии наук



Тараканов Павел Александрович

Адрес: 142432, Московская область,  
г. Черноголовка, Северный проезд, 1  
Тел.: +7(496)52-42593  
E-mail: [tarakanov\\_pa@ipac.ac.ru](mailto:tarakanov_pa@ipac.ac.ru)

Подлинность подписи Тараканова П.А. подтверждаю

Ученый секретарь ФГБУН Института  
физиологически активных веществ  
Российской академии наук  
Кандидат химических наук



Великохатко Татьяна Николаевна