

ОТЗЫВ

официального оппонента Вацадзе Сергея Зурабовича на диссертацию
Смирнова Александра Юрьевича на тему
«Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – биорганическая химия

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.

Краеугольным камнем метода флуоресцентной микроскопии является флуоресцентная метка, которая вводится в исследуемый объект для целей биовизуализации. Как верно заметил автор: "идеальной флуоресцентной метки до сих пор не существует и разработка новых подходов к мечению остается актуальной задачей." Среди всего многообразия органических флуоресцентных меток можно выделить арилметеновые производные имидазолонов. Действительно, как показано в работах сотрудников отдела биофотоники Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, разнообразные производные хромофоров флуоресцентных белков, имеющие в своей основе структуру имидазолона (4-бензилиден-1H-имидазол-5(4H)-онов), являются перспективными претендентами на роль оригинальной группы флуоресцентных красителей. Эти соединения имеют малый размер, низкую степень гидрофобности, а также разнообразную и интенсивную окраску. Представленная к анализу

работа Смирнова А.Ю. посвящена развитию химии этих соединений, в первую очередь, созданию новых синтетических аналогов имидазолонов, а также изучению возможности их применения в качестве люминесцентных меток. На основании вышесказанного работу Смирнова А.Ю. следует признать **актуальной**.

Диссертационная работа изложена на 128 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, а также списка цитируемой литературы, включающего 165 ссылки. Диссертация содержит 77 рисунков и 21 таблицу.

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.

Первый раздел обзора литературы посвящен краткому описанию явления флуоресценции, а также требованиям, предъявляемым флуоресцентным красителям (флуорофорам) в биологии. Во втором разделе рассмотрены современные сольватохромные флуорофоры и их использование для визуализации биологических объектов. Третий раздел посвящен методам синтеза 5-бензилиден-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-онов – общего структурного ядра хромофоров флуоресцентных белков. В заключении обзора автор делает вывод о необходимости поиска новых красителей для целей биовизуализации и вывод о наиболее эффективном пути синтеза целевых молекул. Было принято решение систематически изучить возможные модификации бензилиденимидазолонов, которые приводили бы к увеличению их квантового выхода флуоресценции в том или ином окружении.

На основании тщательного критического анализа литературы и с учетом результатов, полученных в лаборатории ранее, **цель работы** автором сформулирована следующим образом: поиск новых флуорогенных производных хромофора GFP и изучения возможности их использования для флуоресцентного мечения биологических объектов. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- систематическое изучение влияния различных заместителей на оптические свойства аналогов хромофора GFP;
- разработка новых подходов к синтезу и модификации производных хромофора GFP и их более отдаленных аналогов;
- выявление веществ с наиболее выраженной флуорогенностью, а также их модификация, направленная на смещение максимумов абсорбции и эмиссии новых веществ в длинноволновую область;

- изучение возможности использования созданных флуорогенов в окрашивании живых систем и выявление закономерностей между их строением и свойствами.

Оппоненту очень понравилось краткое изложение предлагаемых путей решения задач диссертации, обозначенное на стр. 32-34 – это позволяет в целом оценить идею работы и пути ее реализации.

Изложение собственных результатов автор разделил на четыре подраздела. В первой части был синтезирован ряд новых аналогов хромофора GFP с различными заместителями в бензилиденовом фрагменте. Во второй части проведена модификация молекулы бензилиденимидазолонна с целью сместить максимумы абсорбции и эмиссии в длинноволновую область, сохранив при этом сольватохромные и флуоресцентные свойства. В третьей части проведено подробное исследование оптических свойств наиболее перспективных соединений с целью выявления перспективных флуорогенов, потенциально пригодных для меченья живых систем. Четвертая часть работы посвящена исследованию возможностей применения новых сольватохромных флуорогенов в качестве флуоресцентных меток различных органелл.

Крайне интересной представляется найденная реакция тиоимидазолирования ацетиленов. Вероятно, ключевую роль в протекании именно наблюдаемого процесса, а не кросс-сочетания типа Соногаширы, играет стехиометрия в отношении соли одновалентной меди (ср. с новейшими данными по механизму реакции CuAAC).

Любопытный факт обнаружен при сравнении квантовых выходов соединений **II.5a** и **II.5a***, имеющих одинаковый заместитель в арилиденовой части молекулы (4-пиридил), но разные заместители во 2-м положении гетероцикла (метил/фенил, соответственно) - второе обладает существенно большим. Не исключено, что именно в направлении разработки подобно замещенных систем следует работать коллективу лаборатории в будущем.

Тщательный анализа текста диссертации (**Обсуждение результатов, Экспериментальная часть**), автореферата и публикаций Смирнова А.Ю. убедительно показывает, что рецензируемую работу отличает высокий уровень научной новизны и очевидная практическая значимость. Действительно, в плане примеров *научной новизны и практической значимости* можно привести то, что впервые синтезированы аналоги хромофора GFP, проявляющие заметное варьирование квантового выхода флуоресценции в различных средах и ярко выраженный сольватохромизм. В результате проведенной работы впервые показана возможность использования производных хромофора GFP в качестве флуорогенных красителей, пригодных для флуоресцентного меченья эндоплазматического ретикулума и митохондрий.

Полученные в ходе исследований результаты и выводы являются в полной мере обоснованными и подтверждены данными с использованием современных физико-химических методов исследования структуры вещества и биологических тестов. Таким образом, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна не вызывают сомнений. Этот вывод оппонента также подтверждается наличием 6 публикаций в журналах, в том числе из списка Q1, и трех докладов на профильных научных конференциях.

При прочтении работы возникли следующие замечания и пожелания, носящие дискуссионный характер:

- *обзор литературы:* раздел 2.2.5 – указанные там красители принято называть *фотохромами*;
- *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;
- *обсуждение результатов:* Таблица 3 – указанные выходы скорее не «умеренные», а *низкие*;
- можно ли по цвету твердого соединения или его раствора качественно отнести его к удовлетворяющим требованиям поглощения в длинноволновой области?
- *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); очевидно, что стереохимия финального продукта определяется стадией восстановительного элиминирования;
- *экспериментальная часть:* не очень привычно выглядит обозначение массы в миллиграммах как «Мг»;
- *редакторские:* «4-пиридиновый альдегид» - надо *4-пиридинкарбальдегид*; «гиброксibenзилиден»; «пара-акцепторные производные»

Вышеизложенные вопросы и замечания, однако, не являются принципиальными, не умаляют значения проделанной Смирновым А.Ю. работы и носят рекомендательный характер.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационного исследования. Проделанная работа соответствует паспорту специальности 02.00.10 – биоорганическая химия в областях исследования: Выделение и синтез молекулярных ансамблей, моделирующих функции природных живых систем (например, фотосинтез, передача нервного импульса, лиганд-рецепторные взаимодействия и др.)

Полученные в диссертации теоретические и научные результаты могут быть использованы в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, Санкт-Петербургском государственном университете, Ивановском государственном химико-технологическом университете, Центре фотохимии РАН, Иркутском институте химии им. А.Е.Фаворского СО РАН, Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Институте органического синтеза им. И.Я.Постовского УрО РАН и в других организациях, где проводятся исследования в области люминесцентных красителей и биоорганической химии.

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 билюминесцентных меток. Диссертационная работа Смирнова Александра Юрьевича 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), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

Вацадзе Сергей Зурабович, профессор РАН
доктор химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия
заведующий Лабораторией супрамолекулярной химии (№2)

ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН

Адрес: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 47

Телефон: +7 (499) 137-2944

Электронный адрес: vatsadze@ioc.ac.ru

Дата «26» февраля 2021 г.

Подпись Вацадзе С.З. заверяю:
Ученый секретарь ИОХ РАН

к.х.н.




И.К. Коршевец