

## **Отзыв**

официального оппонента на диссертационную работу Смирнова Александра Юрьевича «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия

### **Актуальность темы диссертационной работы**

На сегодняшний день флуоресцентная микроскопия является основным инструментом, позволяющим исследовать живые объекты на субклеточном уровне, не нарушая их жизнедеятельности. Малые времена жизни возбужденных состояний флуоресцентных красителей позволяют использовать их при изучении динамических процессов, таких как биохимические реакции. Ввиду развития применения лазерных микроскопов с фемтосекундными импульсными лазерами, флуоресцентная микроскопия становится мощным инструментом в исследовании физиологии клетки. Не мало важную роль флуоресцентная микроскопия играет в медицине для ранней диагностики различных патологий.

Научному сообществу удалось достигнуть значительных успехов в этой области, однако поиск новых красителей, удовлетворяющих современным условиям 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 Смирнова Александра на тему «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе хромофора GFP», направленная на изучение связи «структура-свойство» аналогов хромофора GFP для разработки и получения новых биосовместимых сольватохромных и флуорогенных красителей для биоимиджинга, является актуальным исследованием.

### **Научная новизна диссертационного исследования**

Одними из самых распространенных флуоресцентных меток, используемых в современных биологических исследованиях, являются разнообразные флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка (GFP), который был обнаружен у медуз *Aequorea victoria* в 1962 г. Центральной частью данного белка, отвечающей за флуоресцентные свойства, является хромофор, образующийся из собственных аминокислотных остатков и имеющий структуру бензилиденимидазолана.

В результате проведенной работы были впервые синтезированы аналоги хромофора GFP, проявляющие заметное варьирование квантового выхода флуоресценции в различных средах и ярко выраженный сольватохромизм. Предложены новые методы их модификации, в частности, реакция кросс-сочетания терминальных ацетиленов и 2-метилсульфанилбензилиден-имидазолонов. Впервые показана возможность использования производных хромофора GFP в качестве флуорогенных красителей, пригодных для флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Подробное изучение характеристик предложенных маркеров позволило сделать выводы о причинах селективности выявленного окрашивания, которые в дальнейшем могут быть использованы при создании новых флуорогенных маркеров.

### **Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, состоящую из четкого обоснованного введения, раскрывающего цели и задачи исследования, достаточно объемного литературного обзора, отражающего современное состояние исследований по данной тематике, обсуждения результатов, где автор анализирует экспериментально-теоретические данные своего исследования и делает выводы, и заключения, экспериментальной части с подробным описанием материалов, методов и физико-химических характеристик всех полученных автором соединений, выводов, благодарностей, списка работ, опубликованных по теме диссертации, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 165 источников. Работа изложена на 128 страницах и содержит 77 рисунков и 21 таблицу.

Литературный обзор автор разбил на 3 основные части. В первой части «Явление флуоресценции» автор кратко описывает физику основного полезного свойства соединений, синтезу и исследованию которых посвящена данная работа. Во второй части «Сольватохромные флуоресцентные красители» автор особенно выделяет во флуоресцирующих красителях способность к взаимодействию его молекул с растворителем, изменяя при этом свои флуоресцентные свойства. В этой части автором довольно подробно рассмотрено современное представление связи структура-свойство в сольватохромных флуорофорах. В заключительной части «Методы синтеза аналогов хромофора GFP» автор делает обзор основных методов синтеза рассматриваемого класса красителей.

Обсуждение результатов автор систематизировал по классической схеме поисковых исследований: синтез – свойство – применение. Стратегия синтеза производных хромофора GFP для дальнейшего анализа «структура-свойство» автором была разбита на 2 основных направления: изучение влияния заместителей в бензилиденовом фрагменте и модификация бензилиденимидазолонов, включающая в том числе кросс-сочетание 2-метилсульфанилимидазолонов с терминальными ацетиленами. Такой подход позволил систематически изучить возможные модификации бензилиденимидазолонов, которые приводили бы к увеличению их квантового выхода флуоресценции в том или ином микроокружении. Первая синтетическая часть данного исследования посвящена синтезу аналогов хромофора GFP с различными заместителями в бензилиденовом фрагменте, что позволило изучить влияние этих заместителей на оптические свойства бензилиденимидазолонов. Вторая часть синтетической работы посвящена поиску новых путей модификации молекулы бензилиденимидазолона, способных сместить максимумы абсорбции и эмиссии в длинноволновую область с сохранением сольватохромных и флуоресцентных свойств. А именно, создан ряд аминокпроизводных с заместителями разной геометрии и синтезированы соединения, содержащие более длинную цепь сопряжения: полиароматические аналогии и производные с ацетиленовыми заместителями. По итогам синтетического скрининга и первичной оценки физико-химических свойств было установлено что:

- введение в бензилиденовый фрагмент акцепторных групп и некоторых сопряженных структур приводит к усилению сольватохромизма и многократному увеличению интенсивности флуоресценции в апротонных средах;
- введение аминокгруппы не приводит к батохромному смещению максимумов поглощения и эмиссии, однако позволяет создать стабилизированные дифторборильным мостиком 5-аминометиленимидазоны, которые

- демонстрируют интенсивную флуоресценцию и ярко выраженный сольватохромизм;
- взаимодействие 2-метилсульфанильных имидазолонов с терминальными ацетиленами приводит к образованию метилсульфанильных аналогов хромофора белка Kaede, которые характеризуются заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии.

Физико-химическая часть работы посвящена более подробному исследованию оптических свойств наиболее перспективных соединений, их сравнению друг с другом и выявлению перспективных флуорогенов, потенциально пригодных для визуализации живых систем.

Заключительная часть данной работы посвящена исследованию возможностей практического применения новых сольватохромных флуорогенов в качестве флуоресцентных меток различных органелл.

Экспериментальная часть работы изложена на 40 страницах и содержит данные <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения для всех органических молекул, а для некоторых данные рентгеноструктурного анализа. Стоит подчеркнуть, что в работе Смирнова Александра доказательная характеристика структур всех новых органических соединений соответствует требованиям стандартов предъявляемых всеми рейтинговыми международными научными изданиями. Этот факт свидетельствует о высоком уровне проделанной синтетической экспериментальной работы диссертанта.

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

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

Экспериментальные и теоретические данные проведенного исследования расширяют понимание связи «структура-свойство» во флуорогенных красителях на основе бензилиденимидазолонового хромофора и открывают перспективы создания новых уникальных флуоресцентных меток для биоимиджинга. Некоторые из полученных автором красителей проявили фотофизические свойства, показывающие их превосходство среди конкретных коммерческих аналогов для применения в биоимиджинге в биосистемах.

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

Результаты диссертационной работы представлены на трех конференциях различного уровня и опубликованы в 6 статьях с суммарным средневзвешенным импакт-фактором 3.5.

### **Содержание автореферата**

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

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

К диссертационной работе есть ряд замечаний:

- Автор обсуждает одну из важных для его красителей фотофизическую характеристику, 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 спектра, то характеристику Стоксова сдвига следовало бы приводить в энергетических единицах  $\text{см}^{-1}$ . Последнее давало бы более правильное представление вклада изменения структуры в величину Стоксова сдвига.

- стр. 45: Рисунок 58 для соединений **II.24-27** упущен индекс **a**, который расширяет радикал.

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

К диссертационной работе есть замечания по автореферату:

- стр. 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)»;

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**?

- Одной из задач работы является модификация соединений, направленная на смещение максимумов абсорбции и эмиссии новых веществ в длинноволновую область спектра. 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 имидазолона, которая на примере ауриноподобных флуорофоров выглядит более перспективным направлением для ИК смещения максимумов поглощения и флуоресценции?

## **Заключение**

В итоге, высказанные замечания никоим образом не снижают общего положительного впечатления от диссертации Смирнова Александра, а носят, скорее, рекомендательный характер. Стоит отметить высокий уровень проделанной синтетической работы, который соответствует международным стандартам, что и подтверждается его публикациями в высокорейтинговых международных журналах. Профессионально поставленные синтетические задачи и профессиональный уровень их выполнения предопределили такую результативность в диссертационной работе Смирнова Александра. Результаты исследовательской работы Смирнова Александра раскрывают перспективные направления создания уникальных флуорогенных и сольватохромных флуорофоров для биоимиджинга, а некоторые производные уже показали потенциал коммерческой

конкурентоспособности. Таким образом, по актуальности, новизне, достоверности результатов и их научно-практической значимости, а также оформлению диссертационная работа Смирнова Александра Юрьевича «Флуорогенные и сольватохромные красители на основе 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 химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени.

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

Адрес: 142432, Московская область,

г. Черноголовка, Северный проезд, 1

Тел.: +7(496)52-42593

Email: [tarakanov\\_pa@iras.ac.ru](mailto:tarakanov_pa@iras.ac.ru)

Тараканов Павел Александрович

2 марта 2021 года

Подлинность подписи Тараканова П.А. подтверждаю

Ученый секретарь ФГБУН Института

физиологически активных веществ

Российской академии наук



Великохатко Татьяна Николаевна