

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседание Диссертационного совета 24.1.037.01
20 октября 2021 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата химических наук

Мяснянко Ивана Николаевича

По теме: **«Производные хромофоров флуоресцентных белков как
флуорогенные красители для белка FAST»**

Специальность 1.4.9 - «биорганическая химия»

Москва - 2021

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 20 октября 2021 года

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов Вадим Тихонович

Учёный секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации - 8.

1. Академик РАН, д.х.н.	Иванов Вадим Тихонович	(1.4.9)
2. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3. Член-корр. РАН, д.х.н.	Липкин Валерий Михайлович	(1.5.6)
4. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
5. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
6. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.5.6)
7. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
8. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
9. Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
10. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
11. Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
14. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
15. Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
16. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
17. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(1.5.6)
18. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
19. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
21. Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
22. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
23. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Иванов В.Т., председатель: Защита Мяснянко Иван Николаевич. Мы должны заслушать, по-видимому, материалы личного дела, да?

Олейников В.А., учёный секретарь: Конечно.

Иванов В.Т., председатель: Да, давайте.

Олейников В.А., учёный секретарь: *(Зачитывает материалы из аттестационного дела Мяснянко Ивана Николаевича)*

Иванов В.Т., председатель: Принимается такая информация? Принимается. Спасибо. Ну, если все вопросы утрясены и уточнены, я передаю слово диссертанту. Иван Николаевич, прошу.

Мяснянко И.Н., соискатель: *(излагает основные положения диссертационной работы)*

Иванов В.Т., председатель: Спасибо за доклад. Переходим к обсуждению. У кого есть вопросы? Татьяна Владимировна, а потом я Вам дам слово. Татьяна Владимировна, прошу.

Овчинникова Т.В.: Да, спасибо большое, Иван. Прекрасная работа, я хочу поздравить Вас и Вашего научного руководителя Михаила Сергеевича, надеюсь, скоро мы услышим Вашу докторскую диссертацию в этом совете. Вопрос, если можно, вернитесь к слайду 17, он касается таких флуорогенов, которые Вы называете наиболее красными, 27a и 27b. Они имеют практически одинаковую структуру, по крайней мере, одинаковую брутто-формулу, но мы видим, что в одном случае пиридин приконденсирован по орто-положению, в другом по пара-положению. А теперь слайд 18, если можно. Если мы посмотрим на 27a и 27b, то мы увидим, что яркость у них отличается вдвое. Вот первый вопрос в том, чем это можно объяснить при такой близости структур, и потом, когда Вы ответите, я задам короткий второй вопрос.

Мяснянко И.Н., соискатель: К сожалению, да, это экспериментальные методы, то есть как-то, наверное, адекватно объяснить, почему они имеют такую значительную разницу в яркости, довольно тяжело. Как видно, на самом деле, разница в квантовом выходе не такая большая, а разница в степени экстинкции все-таки довольно велика, и именно это повлияло на значение яркости. То есть, причем именно яркости комплекса. Видимо, действительно, 2-пиридиновый заместитель что-то, как сказать, не позволяет лучше флуоресцировать и поглощать при возбуждении.

Овчинникова Т.В.: То есть какого-то объяснения такого рационального пока нет, разумно, что Вы выбрали 27a, понятно. И второй вопрос такой общего характера. При том множестве соединений флуорогенных, которые Вы синтезировали, предполагаете ли Вы найти какие-то, которые могли бы быть использованы для флуоресцентных белков-таймеров? Это очень важно сейчас, потому что это позволяет отслеживать процессы клетки в зависимости от ее возраста, перемещения белков и так далее.

Мяснянко И.Н., соискатель: Да, спасибо за этот вопрос. То есть мы взяли один конкретный объект, белок FAST, который как раз исследовали, именно для него мы искали флуорогены. Объектов, для которых можно искать флуороген, на самом деле довольно-таки много. А если конкретно говорить про белки-таймеры, то там уже флуорофор есть в составе белка, поэтому для того, чтобы использовать наши флуорогены и изучить их взаимодействие с белками-таймерами, наверное, стоит сначала из них этот флуорофор удалить, чтобы было место, куда встраиваться, соответственно, арилиден-имидазолонам, чтобы можно было протестировать. К сожалению, да, эта работа довольно на самом деле тяжелая, но это работа скорее связана с молекулярной биологией, с получением мутантов белков-таймеров.

Овчинникова Т.В.: Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Коршун.

Коршун В.А.: Вот понятно, что Вы разрабатываете флуорогенные соединения для белков, которые существуют и функционируют при физиологических значениях рН. Но, тем не менее, если шире посмотреть, у Вас в структуре там пиридиновые фрагменты, поэтому наверняка спектральные и фотофизические свойства должны быть рН-зависимы. Вот для этих *12a* и типа *27a* веществ не делали ли Вы при разных рН спектр флуоресценции, не смотрели? Если смотрели, то что там было видно?

Мяснянко И.Н., соискатель: Да, спасибо за вопрос. Я сознательно исключил из доклада изучение рН-зависимости данных соединений, зависимости степени флуоресценции в зависимости от рН среды, потому что в физиологических условиях рН в том же самом буфере, в PPS, мы исследовали взаимодействие с белком именно для него. Но хорошо известно, что при встраивании в белок происходит депротонирование флуорогена. Данное исследование, конечно же, было проведено, это есть в тексте диссертации в том числе, в зависимости от кислотности среды изменяются максимум абсорбции и эмиссии. Имеется в виду для свободных флуорогенов, потому что понятное дело, комплекс белков мы не можем менять кислотность среды. Поэтому в тексте диссертации данное исследование зависимости от рН среды у полученных соединений есть.

Коршун В.А.: Ну, в двух словах, при каких рН сильнее светилось?

Мяснянко И.Н., соискатель: Конечно же, когда происходит депротонирование парагидроксигруппы в бензилиденовом заместителе.

Коршун В.А.: Спасибо. Тогда еще один вопрос. Скажите, а флуорогенный эффект на белке, какова его молекулярная природа? Там какие-нибудь расчеты, вот предсказания флуоресценции в зависимости от конформационных изменений. Что-нибудь, какие здесь соображения у Вас есть?

Мяснянко И.Н., соискатель: Да, на этот счет я могу сказать следующее. К сожалению, к моменту подготовки диссертационной работы нативная структура данного белка еще не была известна, то есть вот только недавно ее расшифровали совместно с нашими коллегами из отдела Константина Минеева. И, соответственно, расчетов, в принципе, на тот момент быть не могло, потому что неизвестна нативная структура белка. На данный момент, конечно, проведены исследования, и какие-то взаимодействия известны, то есть то, что происходит депротонирование, что я уже сказал, определена структура белка, в том числе и с флуорогенами в связанном виде и в несвязанном виде.

Коршун В.А.: Это понятно, что связывание с белком, там можно что-то посчитать. А вот просто для конформации самих светящихся молекул, вот спектральные свойства в зависимости от, допустим, конформации, Вы это не рассматривали?

Мяснянко И.Н., соискатель: На этот счет я могу сказать только одно. Понятное дело, что когда флуороген встраивается в белок, он там жестко фиксирован, причем необязательно именно это плоская структура. Но именно фиксация флуорогена отвечает за флуоресцентные свойства. И конкретные какие-то взаимодействия, понятное дело, что там есть водородные связи, чтобы флуороген мог встроиться, понятно, есть и пи-стэкинг.

Коршун В.А.: Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Правильно я понимаю ситуацию, что для поисков флуорогенов Вы использовали метод библиотек? Причем структура библиотек, выбор объектов для синтеза, был, ну, более-менее случайным. То есть у Вас не было возможности делать направленный дизайн какой-то, поскольку не была известна структура белка, и поэтому Вы вынуждены были более-менее, учитывая возможности органохимического синтеза, брать всё то, что у Вас позволял делать синтез? А направленный дизайн Вы не могли делать из-за отсутствия информации о структуре белка.

Мяснянко И.Н., соискатель: Да, всё, что в исходном виде мы знали, это то, что существует роданиновые флуорогены для белка FAST, и они довольно похожи на структуры соединений, с которыми мы привыкли работать. Поэтому первая библиотека имела довольно широкое химическое разнообразие, и нам удалось найти эти два соединения, которые показывали разгорание все-таки.

Иванов В.Т., председатель: Но это чисто случайным образом, вы могли и не угадать. Правильно?

Мяснянко И.Н., соискатель: Ну, библиотека имела довольно-таки большой разброс, ну, конечно, да, мы могли и не угадать, если бы не повезло, но нам повезло.

Иванов В.Т., председатель: А сейчас уже у вас есть структура белка и уже есть возможность делать какой-то осмысленный дизайн наиболее подходящего флуорогена для белка с уже известной структурой. Не планируете ли Вы такие вещи делать? Или Вы уже перешли к поискам оптимального флуорогена?

Мяснянко И.Н., соискатель: Конечно, планируем синтезировать также еще производные, чтобы покрыть вообще весь спектральный диапазон, опять же, чем получить более красные, еще более красные производные.

Иванов В.Т., председатель: Ну, добро. Прошу еще вопросы.

Ефремов Р.Г.: Я, честно говоря, хотел бы продолжить ту тему, которая сейчас обсуждается. Честно скажу, что я немного причастен к этой работе, мои сотрудники, потому что с появлением структуры белка и комплекса с флуорогеном мы подключились, правда, не так быстро всё движется, как хотелось бы. Но вопрос все равно остается даже без наличия структуры мишени, то есть FAST-белка, когда она еще была неизвестна, вот то, о чем

Владимир Аркадьевич говорил и Вадим Тихонович, даже без сложных квантовых химических расчетов, чтобы оценить спектральные свойства в зависимости от структуры, не пробовали Вы, я так понимаю, что не пробовали, делать какой-то простой QSAR анализ? То есть вот у Вас есть комбинаторная библиотека, Вы меняете фрагменты молекулы и в качестве активности используете спектральные свойства. Но хотя бы объединить, можете ли Вы на основании вот этих критериев каких-то QSAR выделить вот эти 4 соединения из всего набора? Это первый вопрос, не вопрос даже, скорее, комментарий. Потому что, в принципе, это бы позволило, на мой взгляд, избежать этой случайности и массированного, может быть, перебора, опять-таки, если Вам повезло. Но для этого надо сейчас понять, что общего есть, какая модель может быть построена на основании найденных соединений.

Второй момент такой...

Иванов В.Т., председатель: Сейчас это вопрос или уже обсуждение идет какое-то?

Ефремов Р.Г.: Это вопрос, да.

Иванов В.Т., председатель: Сформулируйте.

Ефремов Р.Г.: Почему, Ваши мысли, что помешало? Или совсем другая область, и легче было синтезировать? И второй вопрос. На первом этапе скрининга, Вы сказали, наливали эти соединения химические на клетки и смотрели те, которые неспецифически могут связываться и начинают флуоресцировать, и у Вас единственное соединение оказалось не флуоресцирующим, вот это *12a*, и Вы его взяли в дальнейшую работу. Но другие-то были тоже очень похожи. Вот насколько все-таки эта неспецифика была отсеяна? Кстати, Вы не пробовали нагревать, допустим, комплекс, денатурируя, пытаясь денатурировать FAST и смотреть, как у вас ведет себя интенсивность флуоресценции? Вот хромофорный центр меняется, разрушается, вот Вы это можете отследить? Насколько «ключ-замок» здесь работает? Флуороген-FAST. Спасибо.

Мяснянко И.Н., соискатель: Да, спасибо за Ваш вопрос. Отвечу, наверно, сначала на первый вопрос. Конечно, стоило после получения первой библиотеки, которая имеет широкое разнообразие, составить модель, провести QSAR. Так сделать намного проще. Но вместо этого, да, пошли по пути рационального дизайна. Кроме того, нам несколько повезло, да, мы умудрились найти два соединения, которые обладают увеличением интенсивности флуоресценции, поэтому решили пойти по такому пути, так называемого рационального дизайна. Конечно, теперь, имея на самом деле довольно-таки большой массив данных, в том числе для соединений различной природы, в том числе успешных соединений, конечно же, строить, на данный момент построить модели именно для этого белка, провести QSAR, может быть, предсказать какие-то другие заместители во втором положении имидазолонна, потому что фактически из данных, полученных мной, данное положение можно варьировать, может быть, найти какие-то другие соединения, которые имеют тоже похожую структуру. Поэтому да,

конечно, QSAR нужно провести. Опять же, это на самом деле в наше время не является большой проблемой. Так что вот по поводу первого вопроса как-то так.

По поводу второго вопроса, да, извините?

Ефремов Р.Г.: Пробовали Вы денатурировать или как-то менять структуру белка в комплексе с флуорогеном? Вот что происходит, если белок начинает терять свою структуру пространственную или активный центр? Не пробовали? Насколько *I2a* у Вас зависит, именно определяются его свойства именно спецификой связывания хромофоры в центре?

Мяснянко И.Н., соискатель: Да, я сначала отвечу, действительно, наверно, на тот вопрос, который был задан вначале. По поводу эксперимента на живых клетках и, может быть, проницаемости или неселективного окрашивания. Дело в том, что работы по макробиологии проводил не я. Как раз проводили коллеги из отдела биофотоники, поэтому там эксперименты скорее были модельными. И там, скажем так, это позволило найти единственный флуороген. А по поводу денатурации белков и нагревания при взаимодействии с флуорогеном, при смешении с флуорогеном, к сожалению, такие эксперименты не проводились.

Иванов В.Т., председатель: Как бы кончили.

Мяснянко И.Н., соискатель: Ну, да.

Иванов В.Т., председатель: Просто не проводились, и всё, что там.

Мяснянко И.Н., соискатель: Не проводили, да, такие эксперименты.

Иванов В.Т., председатель: Просто не проводились.

Мяснянко И.Н., соискатель: По варьированию, да, температуры, чтоб денатурировать белок или как-то еще другим образом.

Иванов В.Т., председатель: Есть ли еще вопросы?

Олейников В.А., учёный секретарь: А вот скажите, пожалуйста, FAST - это уникальный какой-то белок или из этого класса что-то еще существует?

Мяснянко И.Н., соискатель: Белок FAST - это мутантный белок из медузы PYP, мутантный белок из медузы, которая в оригинале называется PYP. Как раз он разработан французской группой ученых Плэмонт в 2011 году. Оттуда как раз удален флуоресцентный хромофор.

Олейников В.А., учёный секретарь: Нет, я имел в виду то, что вот такие загорающиеся белки под действием химического, это единственное, уникальное свойство?

Мяснянко И.Н., соискатель: Нет, флуорогенных белков на самом деле довольно-таки много, даже простой там альбумин на самом деле тоже является флуорогенным, там довольно-таки много на самом деле мест, где может связываться флуороген, только единственное, что для альбумина также нужно подбирать соответствующие флуорогены. То есть флуорогенные белки не являются редкостью, белок FAST у него есть несколько достоинств, небольшая масса, для него известны были уже флуорогены некоторые, но которые не так эффективны, как

полученные в этой работе.

Иванов В.Т., председатель: Еще вопросы? Похоже, вопросы иссякли. Спасибо, отдохайте ненадолго. Дальше у нас по процедуре имеет право выступить научный руководитель. Будет ли Михаил Сергеевич рассказывать? Давайте.

Баранов М.С., научный руководитель: Добрый день, уважаемые коллеги, члены диссертационного совета, буду краток. Ваня молодец. Он у меня пришел в группу не так давно, на втором году аспирантуры, проработал буквально 3 года, но за эти 3 года отлично включился в работу, показал себя цельным химиком. Возможно, у него какие-то проблемы с докладами иногда бывают, это нам всем свойственно, но, тем не менее, характеризую Ивана со всех сторон положительно. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Понятно. Дальше у нас, по-видимому, отзывы, заключения.

Олейников В.А., учёный секретарь: *(излагает заключение организации, где выполнялась диссертация)* Да. Во-первых, работа выполнялась в нашем институте, поэтому заключение от нашего института у меня в руках. Соответственно, вначале, как всегда, биографические некие данные. Работает с 2017 года, когда он кончил Московский государственный университет. Руководитель Михаил Сергеевич Баранов. Тема диссертации утверждена на ученом совете еще в 2019 году. И дальше. По итогам обсуждения сделано следующее заключение, что основные результаты работы получены лично автором, созданы новые флуорогены для белка FAST, аналоги хромофоров GFP. Иваном Николаевичем разработаны новые методы синтеза и модификации производных хромофоры GFP с различными заместителями. Также Мяснянко составил первичную библиотеку веществ потенциальных флуорогенов для белка FAST. И так далее. Здесь довольно много того, что мы сегодня сейчас уже слышали. Далее. Диссертация Мяснянко обладает новизной и практической значимостью. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, выводы полностью отражают результаты работы. И далее сама работа рассмотрена, соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. И это заключение принято на открытом заседании отдела биофотоники, на котором присутствовало 15 человек, и подписано Балеевой Надеждой Сергеевной, кандидатом химических наук. Утверждено директором нашего института, академиком Габибовым Александром Габибовичем.

Далее. *(Зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный)*. Второй документ, который у меня в руках, это отзыв ведущей организации, в качестве которой выступает Институт физиологически активных веществ Российской академии наук. Далее здесь указано, что важность, актуальность работы, в частности, флуоресценция, флуоресцентная визуализация является очень важной, очень важным представляется этот класс флуороген-активирующих белков. Активируемых, наверное, да. В отличие от классических флуоресцентных белков, они

не обладают собственной флуоресценцией, требуют введения в систему дополнительных компонентов, которые дают флуоресценцию, это дает ряд преимуществ. Исследования в этом направлении являются очень актуальными, потому что это новый инструмент. Цель работы состояла в расширении круга производных, которые позволяют активировать флуороген-активируемого белка FAST. Изложена работа на 156 страницах, обзор литературы, классическая совершенно структура. Обзор литературы, обсуждение, результаты, хорошо работа структурирована. Литературный обзор проведен детально, и в нем анализ работ отечественных и зарубежных исследователей. Обзор достаточно подробен, хорошо структурирован, что облегчает чтение и понимание. И указывается, что в дальнейшем этот раздел может быть вполне трансформирован в отдельную обзорную статью или главу в монографии. Основная глава работы посвящена изложению и обсуждению собственных результатов Мяснянко по оптимизации методов синтеза и химической модификации этих соединений. И далее достаточно подробно по разделам рассматриваются те результаты, которые были представлены сегодня, мы об этом слышали. Экспериментальная часть содержит все требуемые данные, что позволяет при необходимости воспроизвести все результаты. И здесь очень хорошо описано в разделе «Научная новизна и практическая ценность», прямо перечислено, что новизна состоит в разработке новых методов синтеза ранее труднодоступных производных хромофоров флуоресцентных белков; в создании большой библиотеки потенциальных флуорофоров; в создании расширенной библиотеки эффективных флуорофоров белка FAST, равномерно перекрывающих диапазон 570–645 нм; в первой демонстрации возможности использования производных хромофоров флуоресцентных белков в роли флуорогенов белка FAST; в общем повышении доступности флуоресцентных меток для многоцветного мечения в живых системах.

Вместе с тем, диссертационная работа не лишена некоторых недостатков, вот они перечислены. Первое. Сравнительно невысокие выходы реакций с участием диоксида селена (это схемы 1б и 2.10) вероятно связаны, прежде всего, с протеканием побочных реакций окислительного ароматического сочетания, для которых особенно благоприятно наличие донорных гидроксид- и алкокси-групп в бензилиденовом фрагменте. Чем обусловлен выбор именно диоксида селена в качестве окисляющего агента? Проводились ли попытки оптимизации условий окисления бензильных заместителей (Схема 2.6) и получения циклических имидов (Схема 2.10) с использованием других окислительных систем? Второе. В Таблице 2 автореферата допущены ошибки в названиях столбцов, содержащих значения максимумов в спектрах поглощения/флуоресценции, которые могут ввести читателя в заблуждение и затруднить оценку приведенных данных. В аналогичной таблице в диссертации данные ошибки исправлены. Третье. Не совсем понятна формулировка первого абзаца 2.2.1, в котором

объясняется мотивация выбора 4-гидроксibenзилидензамещенных имидазолонов как основы для поиска новых флуорогенов белка FAST. Ясно, что основа данной мотивации лежала в максимальном структурном подобии получаемых автором производных хромофоров флуоресцентных белков и известными роданиновыми флуорогенами белка FAST, содержащих гидроксигруппы. Однако в использованной формулировке речь идет об отличиях, что несколько уводит от основной мысли. Четвертое. Отличие соединений 10 и 11 (на схеме 2.15) состоит лишь в строении фрагментов «Ar». Обычно, чтобы не вводить читателя в заблуждение, таким структурам дают один порядковый номер. Кроме того, по такой нумерации, если бы какое-либо соединение было получено по обоим представленным методикам, у него бы оказались два разных номера. Автору следует учесть этот момент при оформлении публикаций. Пятое. В текст диссертации следовало бы добавить небольшие комментарии к вкладкам Б и В Рисунка 2.2 аналогично соответствующей вкладке А. Такую краткую информацию на вкладках А, Б, В следовало бы поместить в подпись к Рисунку 2.2.

Высказанные замечания никоим образом не умаляют исключительно высокой научной оценки диссертационной работы И.Н. Мяснянко в целом. Результаты могут быть использованы, назван целый ряд организаций, где. Содержание диссертации изложено в виде 6 научных работ. Соответственно, 6 научных работ, из них 4 статьи и 2 тезиса докладов научной школы. И в целом заключение ведущей организации, что диссертация представляет завершённую научно-квалификационную работу, соответствует всем положениям о присуждении ученых степеней и, несомненно, заслуживает присуждения Мяснянко Ивану Николаевичу ученой степени кандидата химических наук по специальности «биоорганическая химия». Подписано заведующим лабораторией фталоцианинов и их аналогов федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ Российской академии наук», доктором химических наук Пушкарёвым Виктором Евгеньевичем. Данное заключение утверждено ВРИО директора Института физиологически активных веществ РАН Ключковым.

Иванов В.Т., председатель: Были замечания у Виктора Евгеньевича.

Олейников В.А., учёный секретарь: Целых пять.

Иванов В.Т., председатель: Просьба ответить на них.

Мяснянко И.Н., соискатель: Да. Для начала мне хотелось бы поблагодарить сотрудников «ИФАВ РАН» за написание отзыва, в особенности Пушкарёва Виктора Евгеньевича и Тараканова Павла Александровича, которые взяли на себя большую часть работы по его составлению. Я, безусловно, согласен со всеми высказанными замечаниями и рекомендациями и постараюсь в будущем учесть их в своей последующей работе, не допускать подобных ошибок.

Теперь более конкретно. У Виктора Евгеньевича в отзыве был вопрос по поводу окисления диоксидом селена. Это метод давно используется в нашей научной группе, в их еще до моего прихода, скажем так, работах использовался. Выходы там действительно небольшие, зато этот подход точно работает на самых разных субстратах. Попытки, конечно, еще до моего прихода были окислить как-то иначе, но ничего хорошего, как правило, в этих случаях не получалось. Так что этот метод получается самым простым и универсальным.

По поводу вводной части обсуждения результатов благодарю за дельное замечание, постараюсь в своей дальнейшей более четко и тщательно подходить к написанию введений. Также у Виктора Евгеньевича был вопрос по поводу нумерации соединений. Это довольно болезненный вопрос всегда при оформлении в том числе публикаций, статей. Мы постарались максимально отделить полученные вещества по методам. Такой подход не всегда удобен, постараюсь учесть это замечание в будущем.

По поводу описания Рисунка 2.2, описание рисунка действительно выполнено достаточно скупно. Конечно, стоило, наверное, написать подробности, как проводился этот эксперимент. Я учту это замечание при подготовке публикаций.

Также Виктор Евгеньевич заметил ошибки в автореферате. К сожалению, при переносе текста диссертации в автореферат произошла досадная ошибка, досадная опечатка. Я учту это замечание в своей работе. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Есть ли отзывы на диссертацию, на автореферат?

Олейников В.А., учёный секретарь: На автореферат, диссертацию отзывы не поступали.

Иванов В.Т., председатель: Не поступало. У нас есть все основания заслушать отзывы официальных оппонентов. Олег Алексеевич Ракитин, Институт органической химии имени Зелинского, доктор химических наук, профессор.

Ракитин О.А., оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный)* Уважаемые коллеги, добрый день. Мне очень приятно выступать в этом замечательном зале, где я впервые нахожусь. Мне напоминает Кремлёвский дворец съездов по его величию. Я благодарен руководителю за приглашение меня выступить оппонентом по этой замечательной работе. И первое, о чем я бы хотел сказать, это о современности этой работы и о современности очевидно направления, которое ведется в этой лаборатории. Вы знаете, у нас буквально несколько месяцев назад выступал известный американский биолог, как ни странно, он все-таки сумел к нам приехать. Он из России, приехал в Штаты 30 лет назад. Он удивительную вещь сказал, о которой я начал задумываться только после его лекции. Что если раньше 30 лет назад мы считали наиболее перспективными работами на стыке наук, например, химия и биология, химия и физика, биология и физика и так далее, то сейчас этот подход в современной науке существенным образом, по его мнению, и я с ним согласен, изменился. То есть ставится какая-

то задача, обычно очень хорошая, очень высокая, и под нее уже подбираются методы отдельных наук – химии, физики и биологии. И данная работа представляет собой совершенно блестящий пример такого рода подхода.

Извините, еще на секунду вас отвлеку от обсуждения работы. Когда он обсуждал эту проблему со своим отцом, академиком, это было лет 40 назад, он как раз об этом и сказал. И вот насколько же изменилось время, насколько изменились подходы к науке. Я совершенно восхищен именно этим подходом.

А в этой работе мы видим сочетание подходов как химических реакций, поскольку лаборатория, как я понимаю, химическая, так и тут же привлекаются физические методы, что очень важно для этой работы. Ну, и далее уже близко к прикладной части биологическая часть работы. Мне кажется, это очень современная часть. Я не хочу зачитывать вам какие-то, перечислять то, что, например, работа была изложена на 156 страницах, она состоит и так далее, что показана актуальность вообще рассматриваемой темы, которая, по-моему, настолько очевидна и не только для биологов, но и для химиков в том числе, про литобзор, который написан очень хорошо, есть сопоставление полученных автором результатов с литературными данными. Но о недостатках я должен сказать, что к мелким недостаткам литобзора следует отнести отсутствие данных по превращению оксазолонов в имидазолы. Но это совершенно, может быть, мелкий недостаток. Еще раз я хочу сказать о комплексности работы. И, наверное, имеет смысл перечислить достижения диссертации Ивана Николаевича, к которым можно отнести следующее. Поскольку я химик, то первое и главное это химическая часть, это разработка эффективного метода получения бензилиденимидазолон с помощью реакции *O*-алкилирования. Но это действительно, вы знаете, изюминка, но здесь не торт, а диссертация все-таки, это вообще с точки зрения химика наиболее привлекательная часть работы.

Синтез нескольких типов замещенных бензилиденимидазолонов, которые обладают заметным фотохромным сдвигом, максимумом абсорбции и эмиссии по сравнению с исходными соединениями. Я как человек, работающий немного в этой области, хочу сказать, что это сложная вообще задача. Здесь были очень интересные обсуждения, грамотное обсуждение, почему именно эти соединения. Но уже был ответ дан. Я хочу сказать, что это, вы знаете, проблема большая не только у биохимиков, но и, например, и физиков, которые в принципе не хотят работать с новыми веществами. Но вот начали с этого и получили отличный результат. И далее я думаю, что будет вообще развитие этой работы.

Впервые обнаружено, что синтезированные производные хромофоров флуоресцентных белков эффективно связываются с флуороген-активирующим белком FAST с более чем десятикратным возрастанием интенсивности флуоресценции. Это не так просто предсказать. Вы знаете, я тоже пробовал найти товарищей, вообще расчетчиков, которые это бы всё просчитали, но задача

оказалась... Вы знаете, вообще проще синтезировать и проверить, чем отдавать их на расчет, которые выдадут такие данные, что не надо лучше таких данных.

И установлена связь между строением производных хромофоров флуоресцентных белков, способностью связываться с белком FAST и свойствами образующихся комплексов. Экспериментальная часть, на мой взгляд, вообще написана профессионально, поэтому структура соединения подтверждена с помощью комплекса современных спектральных методов. И главное, что обнаруженная автором группа соединений, использованных в роли флуорогена белка FAST, которые могут применяться для окрашивания живых систем во флуоресцентной микроскопии, что однозначно свидетельствует о перспективности данного исследования.

Ну, я не буду читать про личный вклад, достоверность, что диссертация выполнена на высоком экспериментальном и методологическом уровне, опубликовано две совершенно блестящие работы в высокорейтинговом журнале.

Вот теперь о недостатках. Кроме первого, о котором я сказал уже, вы знаете, что касается недостатков, это показывает, я бы сказал, насколько оппонент внимательно читал работу. Поэтому они не являются принципиальными, в принципиальном плане всё хорошо. Такие есть мелкие недостатки.

В обсуждении результатов отсутствуют схемы синтеза соединений, и перечислено: 9, 17, 20, 22 и 68. В экспериментальной части отсутствуют спектральные данные для соединения bf, а с другой стороны, нет сравнения полученных автором данных с литературными данными для трех известных соединений. Термин «более красные метки», на мой взгляд, является неудачным. Возможно, это калька с английского языка, не совсем удачно переведен.

И далее заключительная часть, что сказанное, конечно, не имеет принципиального характера и ни в коей мере не умаляет высокой научной оценки диссертационной работы Ивана Николаевича. И таким образом, я обязан это произнести, диссертационная работа Мяснянко Ивана Николаевича, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия, является законченной научно-квалификационной работой и по актуальности, новизне, практической значимости, достоверности результатов и обоснованности выводов удовлетворяет всем требованиям Положения, я не буду его зачитывать, а ее автор, Мяснянко Иван Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности «биорганическая химия». Спасибо за внимание.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо, Олег Алексеевич. Иван Николаевич, Ваша реакция на замечания, которые были. Либо Вы их принимаете просто, либо готовы поспорить.

Мяснянко И.Н., соискатель: Я очень благодарен Олегу Алексеевичу за отзыв. Я, безусловно,

согласен со всеми замечаниями и рекомендациями и постараюсь учесть их в своей последующей работе. Что касается синтетических методик, методы получения некоторых веществ из работы все-таки хорошо известны в литературе и не требуют обсуждения. Но я, конечно, согласен, что стоило в обсуждение результатов вынести краткую схему синтеза данных соединений и охарактеризовать более подробно. Что касается соединения *bf*, к сожалению, оно в работе вообще не представлено, а путаница, к сожалению, произошла и в тексте и на схеме из-за того, что из одного из исходных получается два продукта. По поводу «красных производных», конечно, это жаргонизм, и стоит использовать выражение «производные с более длинноволновыми максимумами абсорбции или эмиссии». Я учту замечание это в дальнейшей своей работе. Я, конечно же, согласен, опять же, со всеми замечаниями и постараюсь учитывать их в своей дальнейшей деятельности. Спасибо большое.

Иванов В.Т., председатель: Отлично, спасибо. У нас есть второй оппонент, Алексей Дмитриевич Аверин, это химфак МГУ, кафедра органической химии.

Аверин А.Д., оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный)* Глубокоуважаемый председатель, члены диссертационного совета, работа Ивана Николаевича Мяснянко, как уже много раз отмечалось, находится в русле очень важной, интересной и чрезвычайно сложной задачи – визуализации процессов, которые проходят в живых системах. И, соответственно, надо сказать, что именно спектроскопия флуоресценции во многом позволяет решать очень многие амбициозные задачи, как в данном случае. И, кроме того, здесь использован весьма элегантный метод, когда слабофлуоресцирующие низкомолекулярные соединения флуорогены образуют либо молекулярные комплексы, либо ковалентно связываются с флуороген-активирующими белками, которые сами по себе также не обладают значимой флуоресценцией, и дают соединения уже комплексные, которые обладают высоким квантовым выходом и, соответственно, их можно распределение в молекуле анализировать с помощью флуоресцентного микроскопа.

И главная научная задача диссертанта заключается именно в том, чтобы разработать новый тип флуорогенов, которые раньше не были для этого использованы, это 4-арилиден-имидазолы, с которой он, как вы видите, очень успешно справился.

Но, тем не менее, я все-таки расскажу немножко о основных вехах этой работы. Во-первых, задача поставлена очень четко, она сформулирована совершенно правильно. Необходимо максимальным образом разнообразить структуру этих арилиден-имидазолов, вводя самые различные заместители, в первую очередь отличающиеся по электронным свойствам, для того, чтобы модифицировать электронные свойства этих флуорогенов и в определенной степени влиять на то, что мы имеем на выходе при образовании конъюгатов с белком FAST. Поэтому и актуальность и логичность исследования не вызывают никаких сомнений.

Литературный обзор действительно очень хорошо написан, он содержит описание 271 ссылки, очень многие из них это работы последних 2-3 лет, что показывает лишний раз актуальность этой работы. Ну, и, кроме того, он не занимает слишком много места, это означает, что диссертант умеет правильно структурировать имеющийся в его распоряжении материал. Во-первых, литобзор очень полезен для тех людей, которые не совсем в теме, потому что, во-первых, рассказывается в нем о методах введения флуоресцентных меток в белки, ну, и вторая часть подробно рассматривает имеющиеся в литературе сведения о методах синтеза 4-бензилиден-замещенных имидазолонов, 7 основных методов рассмотрено. И, кроме того, рассмотрены методы их модификации, что тоже очень важно, потому что это необходимо для как раз получения наиболее широкой гаммы производных.

Следует отметить, что основные достижения автора, естественно, в обсуждении результатов описаны. Работа строится по в значительной степени рекуррентному принципу, потому что сначала получается одна выборка соединений, проверяются их возможности в деле образования флуоресцирующих комплексов с белком, затем делаются определенные выводы, определенные заместители рассматриваются как приоритетные, и на основании этого получается следующая уже группа соединений. Здесь неоднократно подчеркивалось, что метод синтеза, который был в значительной степени модифицирован реакцией циклоприсоединения, и новый метод образования промежуточных имидацетатов, это очень важно, действительно, это позволило автору максимально расширить круг заместителей, которые вводятся как положения 2 гетероцикла, так и в арильные заместители, так и к атому азота. Ну, и, естественно, окисление бензильной группы до кетона позволило решить задачу смещения максимума абсорбции и эмиссии в более длинноволновую область.

Что еще интересно в этой работе с точки зрения, опять же, химии. С точки зрения химии здесь интересно то, что автор, несмотря на то, что ему приходилось фактически не вслепую, но в значительной степени не имея данных о структуре белка, перебирать заместители для того, чтобы добиться нужного результата. Тем не менее, это был не совсем хаотичный перебор заместителей, потому что автор вполне отдает себе отчет в том, какие заместители в каком положении каким образом должны приводить к изменениям в длине волны абсорбции и эмиссии. Естественно, предугадать, как будут вести себя комплексы с белком, невозможно, но, тем не менее, автор хорошо разбирается в основах спектроскопии флуоресценции, поэтому введение тех или иных заместителей в изначальные молекулы флуорогенов, на мой взгляд, были вполне осознанные. И это не было простой случайностью.

Интересно, что, конечно, в результате образования комплексов мы видим, как смещение максимумов эмиссии в красную область, так в некотором случае в небольшие гипсохромные сдвиги максимумов, но это не плохо, как подчеркивает автор в своей работе, это расширяет

спектр веществ, у которых имеются различия в максимумах эмиссии, и, соответственно, можно использовать соответствующие флуоресцентные фильтры для более удобного наблюдения тех или иных объектов в клетках. И, соответственно, это те биологические исследования, которые достаточно кратко описаны в данной диссертации, они полностью подтверждают, что действительно автор получил некоторое количество очень полезных и эффективных соединений, на основе которых может и дальше продолжаться исследование в этом же направлении. То есть работа сама по себе, естественно, достаточно цельная и в определенной степени завершенная, конечно, но, тем не менее, она открывает большие перспективы и для дальнейших исследований в этом направлении, что важно для любой научной работы.

Что касается экспериментальной части, то мне, конечно, очень понравилось, что соединения практически все очень тщательно охарактеризованы спектрально, даны физико-химические характеристики. Очень интересно, что самое первое соединение под номером *1a*, как оказалось, соединение ранее не описанное, и оно имеет молекулярную массу всего-навсего 146. В настоящее время, когда известно почти 100 миллионов органических соединений, химику-синтетику нечасто выпадает возможность синтезировать новое соединение с молекулярной массой 146. Это тоже, можно сказать, интересная изюминка данной работы. Что касается выводов и оформления списка литературы, то здесь, в общем-то, всё нормально, по выводам я скажу там одно замечание. Список литературы оформлен тщательно, по правилам. И вообще в работе немного грамматических, скажем так, опечаток, встречаются некоторые неудачные выражения, одно из них было уже здесь озвучено, но в целом работа производит впечатление очень не просто хорошо написанной, но еще тщательно выверенной, аккуратно сделанной, аккуратно оформленной, что также добавляет очков в пользу автора.

Ну, а теперь позвольте, я зачитаю замечания, потому что их надо зачитать четко. Первое. На схемах в обзоре литературы не указаны выходы соединений, что затрудняет анализ данных и препятствует сравнению с данными, полученными автором диссертации. Второе. В обсуждении результатов автором не проводится анализ различия в выходах целевых соединений, разброс которых зачастую весьма велик. Для читателя было бы интересно и познавательно узнать, чем обусловлено такое отличие, тем более, что это является хорошо знакомой проблемой для каждого химика-синтетика. Третье. В работе есть ряд терминов, которые не получили должной расшифровки и не совсем понятны читателю, который не является специалистом в области флуоресцентной визуализации белков, а без пояснений они могут быть неправильно истолкованы. Например, выражение «генетически кодируемые метки» даже в пояснительной соответствующей фразе не совсем проясняется. К этому стоит добавить и термин «константа диссоциации», который используется для характеристики образующихся молекулярных комплексов флуорогенов с белком FAST. Является ли обратная ей величина обычной

константой устойчивости? И почему именно оперирует величиной «константа диссоциации»? Четвертое. В экспериментальной части можно было бы привести данные спектров поглощения, тем более что очень значительная часть соединений была ими охарактеризована, как следует из обсуждения результатов и таблиц. Пятое. Выводы 3, 4 и 5 можно было бы сформулировать более содержательно, избегая таких неопределенностей, как «некоторые производные», «группа веществ», «направления для структурной модификации». Ну, естественно, что данные замечания никоим образом не уменьшают значимость проведенной работы и не ставят под сомнение новизну, практическую значимость полученных результатов.

И на основании вышеизложенного, конечно, можно сделать вывод совершенно однозначный, что работа полностью соответствует всем критериям, а диссертант, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук. Спасибо за внимание.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо, Алексей Дмитриевич. Мы успешно продвигаемся по повестке дня. Я даю слово диссертанту для ответов на замечания.

Мяснянко И.Н., соискатель: Спасибо большое Алексею Дмитриевичу за отзыв. Я, безусловно, согласен со всеми замечаниями и рекомендациями и постараюсь учесть их в своей последующей работе. По поводу выходов в обзоре литературы. В обзоре рассмотрены препаративные и широко используемые методы синтеза. В целом я согласен с замечанием, и для большего понимания и сравнения с моей работой, конечно, стоит впредь указывать выходы для литературных методов. По поводу выходов реакции в зависимости от заместителей, речь идет про реакцию конденсации. Вопрос, безусловно, интересный для химика-синтетика, но, к сожалению, далеко не всегда просматривалась вообще какая-то логика, а приводить голословные утверждения в зависимости от заместителей я посчитал лишним. По поводу КД. Классически при изучении белок-лигандных взаимодействий в молекулярной биологии используют константу диссоциации комплекса. Так принято в литературе, эта величина более физически осмыслена, так как измеряется в молях на литр, а не в литрах на моль. Также из нее можно грубо оценить количество лиганда, необходимое для полного связывания белка. Что касается терминов. Сожалею, что так получилось, действительно, для нас эти слова привычны, стороннему же читателю они оказываются неясны. Мы учтем это замечание в дальнейшем. По поводу спектров, которые стоило внести в экспериментальную часть. Да, конечно, стоило бы привести спектры абсорбции и эмиссии для соединений, вряд ли бы удалось представить их все, не сильно раздувая диссертацию, но какую-то часть точно стоило. Я учту это замечание в своей дальнейшей работе. По поводу формулировки выводов. Данные выражения были использованы сознательно для того, чтобы не загромождать выводы в избыточной нумерации или же конкретными названиями конкретных веществ. Спасибо большое за отзыв.

Иванов В.Т., председатель: Спасибо. Своим исследованием Вы открыли почву для общей

дискуссии. Кто хотел бы высказать свои соображения о том, как голосовать? Какие общие ощущения, уроки на будущее? У Вас есть желание? Прошу. Давайте на трибуну.

Михайлов А.А., выступающий: Не совсем по работе. Я, собственно, работаю в группе, которая сотрудничает с группой гетероциклических соединений, имел удовольствие общаться и сотрудничать с Ваней. Сегодня много говорили про работу, про текст диссертации и тому подобное, но мне кажется, что квалификация кандидата наук — это не только умение выполнить работу, но и общая заинтересованность в получении нового научного знания и в том, что человек делает. Я хочу охарактеризовать, дать дополнительную характеристику Ивану Мяснянко, что он крайне заинтересован в том, чем он занимается, он горит научной работой, и это качество, которое характеризует аспиранта с лучшей стороны. И, соответственно, необходимое кандидату наук для продолжения научной деятельности. Наверное, всё, что я хотел сказать.

Иванов В.Т., председатель: То есть Вы констатируете энтузиазм в работе, я так понял. Кто-нибудь еще хотел бы высказаться? По-видимому, ситуация достаточно ясная, и я могу дать слово диссертанту для заключительного слова. По-видимому, так. Не ошибаюсь? Не ошибаюсь. Продолжим дискуссию, всем всё ясно. Иван Николаевич, еще разок на трибуну, пожалуйста.

Мяснянко И.Н., соискатель: В заключение мне хотелось бы выразить благодарность всем собравшимся, людям, которые прослушали защиту моей работы. Также я выражаю огромную благодарность всем тем людям, без которых эта работа была бы невозможна. Конечно же, в первую очередь я должен сказать огромное спасибо своему научному руководителю, Михаилу Сергеевичу Баранову. Он поддерживал меня на всех этапах исследования, помогал ценными советами и критикой. Также я хочу особо отметить и особо отблагодарить Балееву Надежду Сергеевну за всестороннюю помощь в проведении работы. Также я очень сильно благодарю коллектив группы химии гетероциклических соединений, Александра Смирнова, Эльвиру Зайцеву, Анатолия Соколова за создание непередаваемой рабочей атмосферы. Большое спасибо. Также я благодарю Михайлова Андрея Андреевича за помощь в финальной подготовке диссертационной работы. Также, разумеется, ни одна большая синтетическая работа не проходит без привлечения современных методов анализа и подтверждения структур полученных соединений. Поэтому я особую благодарность выражаю сотрудникам группы Лаборатории молекулярной ЯМР спектроскопия, особенно Константину Сергеевичу Минееву, за регистрацию спектров ядерного магнитного резонанса. Также особо благодарю коллектив лаборатории биофотоники, Константина Анатольевича Лукьянова, и группу молекулярных меток для оптической наноскопии, Александра Мишина, благодаря которым наши флуорогены находят широкое применение в реальной практике. На этом всё. Спасибо.

Иванов В.Т., председатель: Всё понятно. Спасибо. Следующий этап у нас тайное голосование.

Я прошу всех членов диссертационного совета осуществить свою обязанность, объявляю перерыв очень короткий, прошу сделать своё дело и не расходиться, поскольку нам еще нужно принять к защите две работы. Это не очень длительная процедура, но, тем не менее, мы обязаны заслушать два сообщения. Прошу голосовать.

(Идёт тайное голосование)

Сейчас будет возможность заслушать итоги голосования, но перед тем как это сделать, у меня вопрос такой. У всех на руках есть проект заключения по заслушанной диссертации. Полагается голосовать за эти проекты после того, как уже объявлено об итогах голосования. Я хочу предварительно мнение присутствующих, есть какие-то коррективы к тем проектам, которые были? Обычно Николай Владимирович Бовин комментирует и исправляет. Сегодня, по-моему, нет в явном виде. Да, его нет.

Олейников В.А., учёный секретарь: И в Зуме его нет.

Иванов В.Т., председатель: Соответственно, у нас более миролюбивое настроение по отношению к предлагаемым нам вариантам заключений. Предварительно нет никаких замечаний. Тогда мы готовы к тому, чтобы за них тоже проголосовать. Итоги голосования по поводу заслушанных диссертаций.

Олейников В.А., учёный секретарь: Итоги голосования по Мяснянко Ивану Николаевичу. Присутствовало на заседании 23 члена диссертационного совета, роздано бюллетеней 23, оказалось в урне бюллетеней 23. За – 23, против, недействительных – нет.

Иванов В.Т., председатель: Такие красноречивые итоги. Но опасные, потому что если хоть одна ошибка есть, тут же будут возражения против утверждения. Давайте так. Кто за то, чтобы утвердить итоги голосования? Есть ли против? Подсчет был правильный. Спасибо. Давайте сразу голосовать за проект заключения, который был нам представлен до начала работы. Кто за то, чтобы утвердить проект заключения? Кто против? Мы завершили повестку дня. Спасибо всем.

Председатель
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В.А.