

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
"Институт физиологически активных веществ
Российской академии наук"



С.Г. Клочков

«20» сентября 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Института физиологически активных веществ РАН, о диссертационной работе Мяснянко Ивана Николаевича «Производные хромофоров флуоресцентных белков как флуорогенные красители для белка FAST», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Флуоресцентная визуализация в настоящее время является одним из наиболее актуальных методов исследования биологических систем благодаря своей высокой чувствительности и селективности. В последние годы все большее распространение получают генетически кодируемые флуоресцентные метки, среди которых отдельный интерес представляют флуороген-активирующие белки. В отличие от классических флуоресцентных белков они не обладают собственной флуоресценцией и требуют введения в систему дополнительного компонента, флуорогена – вещества, активация флуоресцентных свойств которого происходит исключительно при связывании с целевым белком. Однако подобное усложнение системы имеет целый ряд неоспоримых преимуществ, которые делают ее одной из наиболее перспективных среди генетически кодируемых меток. Так, отсутствие флуоресценции у свободного флуорогена сводит к минимуму фоновый сигнал и позволяет активировать метку в нужный момент. Малые размеры флуороген-активирующих меток позволяют минимизировать возможное негативное воздействие на объект исследования. Кроме того, наличие большого числа флуорогенов и синтетических подходов для их модификации обеспечивает быстрый рост доступности и расширение оптического диапазона данного типа флуоресцентных меток.

С данной точки зрения, диссертационная работа И.Н. Мяснянко, посвященная созданию новых хромофоров бензилиденимидазолонового ряда и исследованию их применимости в качестве флуорогенов для флуороген-активирующего белка FAST, представляется весьма актуальной. Решаемый автором работы комплекс синтетических, фундаментальных и прикладных задач без сомнения является приоритетным для развития биоорганической химии флуорогенных красителей и их последующего внедрения в виде меток для флуоресцентной микроскопии живых систем.

Проведение в рамках настоящей работы комплексного исследования по расширению круга бензилиденимидазолоновых хромофоров, а также выявлению взаимосвязи строения получаемых соединений и эффективности их связывания с белком FAST с последующим усилением наблюдаемой флуоресценции, определяют несомненную **актуальность** диссертационного исследования И.Н. Мяснянко для биоорганической химии, химии флуорогенных красителей и соответствующих наукоемких приложений – биологических и медицинских. Работа является логической частью выполняемых в Институте биоорганической химии РАН системных исследований флуоресцентных меток различных типов.

Цель работы И.Н. Мяснянко состояла в расширении круга производных бензилиденимидазолонового ряда и исследовании их применимости в качестве флуорогенов для флуороген-активирующего белка FAST. Особое внимание в работе уделено синтетическим методам, а также методам идентификации получаемых соединений (включая ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопию, а также масс-спектрометрию высокого разрешения), что позволяет говорить о высокой степени достоверности получаемых автором параметров спектров поглощения и флуоресценции, которые, в том числе, позволяют проводить корректную оценку взаимодействия белка FAST с флуорогенами. Все это определяет безусловную научную содержательность работы.

Диссертационная работа И.Н. Мяснянко изложена на 156 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных автором результатов в двух разделах, экспериментальной части и выводов. Список литературы включает 249 наименований. Работа написана четким и ясным языком, хорошо структурирована и содержит все необходимые для понимания материала схемы реакций, рисунки и таблицы. Количество опечаток и других технических ошибок незначительно и не затрудняет чтения работы. Хорошим вспомогательным материалом является приведенный автором список сокращений и условных обозначений, при этом в работе их сравнительно немного, и значительная их часть дополнительно расшифровывается в тексте диссертации.

Во введении определена **актуальность** исследования, четко сформулирована его **цель** и основные **задачи**, а также аргументированы его **научная новизна**, теоретическая и **практическая значимость**. Кроме того, лаконично описаны **методология и методы исследования**.

В литературном обзоре диссертантом проведен детальный анализ работ отечественных и зарубежных исследователей, преимущественно относящихся к последнему десятилетию, что наглядно демонстрирует актуальность выбранного автором направления и интерес мирового научного сообщества к данной теме. Обзор состоит из двух разделов, первый из которых посвящен описанию основных генетически кодируемых флуоресцентных меток. Данный раздел последовательно описывает пептиды, флуоресцентные белки и завершается описанием флуороген-активирующих белков, причем автор проводит краткий анализ преимуществ и недостатков каждой из меток, тем самым, обосновывая актуальность разработок, на которые нацелена и его работа. Второй раздел посвящен описанию современных методов синтеза и модификации 4-бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов – общего структурного ядра хромофоров флуоресцентных белков. Обзор достаточно подробен и хорошо структурирован, что облегчает чтение и оценку основной главы диссертации, помогает понять логику формулирования цели исследований автора, степень новизны предлагаемых практических решений. Таким образом, представленный обзор полностью соответствует тематике и логике построения работы, его структура представляется оправданной и целесообразной, формируя удобный справочный материал. В дальнейшем этот раздел вполне может быть трансформирован в отдельную обзорную статью или главу в монографии.

Основная глава работы посвящена изложению и обсуждению собственных результатов И.Н. Мяснянко по оптимизации методов синтеза и химической модификации бензилиден-1*H*-имидазол-5(4*H*)-онов, а также поиску среди получаемых соединений новых флуорогенов белка FAST. Эта глава научно обоснована и содержит ряд достижений, позволяющих считать работу И.Н. Мяснянко подлинно **оригинальной** и отличающейся **научной новизной**.

Первый раздел данной главы (2.1) посвящен синтетическим исследованиям бензилиденимидазолоновых производных. Так, автором предложена модифицированная методика синтеза имидаатов (иминоэфиров), которые являются непосредственными предшественниками целевых имидазолонов. В качестве исходных соединений в отличие от классически применяемых нитрилов в данной методике используются более доступные амидоацетаты, которые по реакции *O*-алкилирования тетрафторборатом триэтилоксония уже при комнатной температуре формируют требуемые иминоэфиры. Кроме того,

предложенная модификация позволяет фактически избежать стадии выделения иминоэфиров и с минимальной обработкой реакционной смеси вводить их в финальную реакцию циклоприсоединения с основанием Шиффа. С использованием данного подхода автором было получено три серии бензилиденимидазолоновых производных с варьированием заместителей в первом, втором и четвертом положениях имидазолонана. На примере некоторых из полученных соединений, содержащих бензильный заместитель во втором положении, осуществлено окисление диоксидом селена до соответствующих 2-ароилпроизводных, что привело к батохромному сдвигу максимумов поглощения в среднем на 50 нм для нейтральных форм и на 110–125 нм – для соответствующих депротонированных форм, с достижением длинноволновых значений более 600 нм. Также реакция окисления диоксидом селена была использована автором для конвертирования бензилиденимидазолонов с амидными заместителями в первом положении в соответствующие циклические имиды, что также привело к заметному, до 80 нм, батохромному смещению пиков поглощения и к порядка 100 нм красному сдвигу максимумов флуоресценции. Наконец, было показано, что квантовые выходы флуоресценции получаемых соединений в свободном виде не превышают 0.1–0.2%, что определяет перспективность их применения в качестве флуорогенных красителей.

Второй раздел обсуждения результатов (2.2) связан с созданием на основе производных 4-гидроксибензилиденимидазолонана новых флуорогенов для белка FAST в широком спектральном диапазоне и определением среди них наиболее перспективных представителей. Вышеописанная группа бензилиденимидазолонов была дополнена рядом 2-арилэтиленовых производных, в полученной общей группе было определено соединение-лидер, содержащее 2-(*n*-пиридилэтиленовый) фрагмент. Далее уже на его основе получена библиотека родственных аналогов, которые не только эффективно связываются с белком FAST с многократным разгоранием эмиссии, но и имеют максимумы поглощения в области 530–620 нм и флуоресценцию в диапазоне 570–645 нм, равномерно перекрывая оба указанных диапазона. В завершении, было показано, что достигнутая разница спектральных характеристик позволяет отслеживать меченые объекты с использованием разных флуоресцентных фильтров. Данные результаты имеют высокую научную значимость и свидетельствуют об успешном выполнении автором поставленных в работе задач.

Экспериментальная часть содержит все требуемые данные, что позволяет при необходимости воспроизвести результаты автора. Исследования проведены с привлечением классического для подобных работ комплекса физико-химических методов (^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, ЭСП в УФ и

видимой области, спектрофлуориметрии). Высокое качество полученных спектров ЯМР обуславливается их регистрацией на приборах с рабочей частотой 700 и 800 МГц, один из которых снабжен криодатчиком.

Достоверность результатов и обоснованность итоговых заключений, в полной мере отражающих основное содержание работы И.Н. Мяснянко, не вызывает сомнений.

Научная новизна и практическая значимость полученных И.Н. Мяснянко результатов состоят:

- в разработке новых методов синтеза ранее труднодоступных производных хромофоров флуоресцентных белков;
- в создании большой библиотеки потенциальных флуорогенов и выявлении соединений, эффективно взаимодействующих с белком FAST;
- в создании расширенной библиотеки эффективных флуорогенов 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 И.Н. Мяснянко не лишена некоторых недостатков, которые связаны не с качеством проделанных исследований, а скорее относятся к недочетам, обусловленным комплексным охватом работы, не носят принципиального характера и могут быть отнесены к пожеланиям для дальнейшего ее развития.

1 – Сравнительно невысокие выходы реакций с участием диоксида селена (Схемы 2.6, 2.10) вероятно связаны, прежде всего, с протеканием побочных реакций окислительного ароматического сочетания, для которых особенно благоприятно наличие донорных гидрокси- 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?

2 – 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 (Таблица 2.2) данные ошибки исправлены.

3 – Не совсем понятна формулировка первого абзаца п. 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, содержащими гидроксигруппы. Однако, в использованной формулировке речь идет об отличиях, что несколько уводит от основной мысли.

4 – Отличие соединений **10** и **11** (Схема 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 оказалось два разных номера. Автору следует учесть этот момент при оформлении публикаций.

5 – В текст диссертации следовало бы добавить небольшие комментарии к вкладкам Б и В Рисунка 2.2 аналогично соответствующей вкладке А. Также краткую информацию о вкладках А, Б и 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 диссертационной работы И.Н. Мяснянко могут быть использованы в научных организациях, занимающихся химией флуоресцентных меток, а также их биологическими и медицинскими приложениями – Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Московском технологическом университете, Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (техническом университете), Ивановском государственном химико-технологическом университете, Институте химии Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, Химическом институте им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета, Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Институте биоорганической химии НАН Беларуси, Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН и ряде других.

Содержание диссертации изложено в виде 6 научных работ, из них 4 статей в высокорейтинговых зарубежных журналах и 2 тезисов докладов молодежной научной школы. Автореферат и публикации достаточно полно отражают основное содержание работы.

Таким образом, диссертационная работа **Мяснянко Ивана Николаевича** «Производные хромофоров флуоресцентных белков как флуорогенные красители для белка FAST» представляет собой завершенную **научно-квалификационную работу** и по объему, качеству проведенного эксперимента, новизне и оригинальности полученных результатов, а также научному уровню их обсуждения, 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; от 20.03.2021 г. № 426), предъявляемым ВАК Российской Федерации к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук. Автор работы, **Мяснянко Иван Николаевич**, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 - биорганическая химия.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании Ученого совета ФГБУН ИФАВ РАН (протокол № 5 от 06.09.2021).

Заведующий Лабораторией фталоцианинов и их аналогов федерального государственного бюджетного учреждения науки "Институт физиологически активных веществ Российской академии наук", доктор химических наук (специальность 02.00.03 – органическая химия)

**Пушкарев
Виктор Евгеньевич**

«Подпись В.Е. Пушкарева заверяю»

Ученый секретарь ФГБУН "ИФАВ РАН"

кандидат химических наук



**Великохатко
Татьяна Николаевна**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт физиологически активных веществ Российской академии наук" (ФГБУН "ИФАВ РАН")

Адрес: 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1

Тел.: +7(496)542-2546

Е-mail: ipac@ipac.ac.ru