

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,  
по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_  
решение диссертационного совета от 12.10.2022 г. № 22

О присуждении **Баранову Михаилу Сергеевичу**, гражданину РФ, ученой степени доктора химических наук.

Диссертация **«Арилиден-имидазолонь: от структурно-функциональных исследований к созданию новых флуорофоров для живых систем»** принята к защите 29.06.2022 г. (протокол № 18) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997, Приказ Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013, а также Приказ Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.).

Соискатель **Баранов Михаил Сергеевич**, 29 марта 1986 года рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук «Физико-химические свойства хромофора GFP и флуоресцентные красители на его основе» по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» защитил в 2013 году, в диссертационном совете Д 002.019.01, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в соответствии с Приказом Минобрнауки России от 15 февраля 2013 г. № 75/нк, диплом кандидата наук серия ДКН № 197599. Работает старшим научным сотрудником в группе химии гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнена в группе химии гетероциклических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Научный консультант – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук Лукьянов Константин Анатольевич.

Официальные оппоненты:

**Ферштат Леонид Леонидович**, доктор химических наук, заведующий лабораторией азотсодержащих соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.

**Белоглазкина Елена Кимовна**, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Ощепков Максим Сергеевич**, доктор химических наук, заведующий кафедрой химии и технологии биомедицинских препаратов Федерального государственного

бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российского химико-технологического университет им. Д.И. Менделеева

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), г. Москва, в своем **положительном** отзыве, подписанном руководителем группы молекулярного моделирования, д.ф.-м.н., проф. РАН Хреновой Марией Григорьевной, и утвержденном директором ФИЦ «Биотехнологии РАН д.б.н. Федоровым Алексеем Николаевичем, указала, что диссертационная работа Баранова Михаила Сергеевича «Арилиден-имидазолон: от структурно-функциональных исследований к созданию новых флуорофоров для живых систем» соответствует требованиям, 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; 20.03.2021 г. № 426; от 11.09.2021 г. № 1539), а Баранов Михаил Сергеевич заслуживает присвоения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Соискатель имеет 113 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 50 работ общим объемом 25 печатных листов в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В 36 работах автор выступает в качестве последнего соавтора, как руководитель работы. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые соискатель внес основной, либо существенный вклад:

1) Baleeva N.S., **Baranov M.S.** Synthesis and properties of 5-methylidene-3,5-dihydro-4H-imidazole-4-ones (microreview) // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016. Т. 52. № 7. С. 444–446.

2) Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Mikhaylov A.A., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Mishin A.S., **Baranov M.S.** Environment-sensitive fluorogens based on a GFP chromophore structural motif // *Dyes and Pigments.* 2022. Т. 198. С. 110033.

3) Boulanger S.A., Chen C., Myasnyanko I.N., Sokolov A.I., **Baranov M.S.**, Fang C. Excited State Dynamics of a meta-Dimethylamino Locked GFP Chromophore as a Fluorescence Turn-on Water Sensor // *Photochem. Photobiol.* 2022. Т. 98 №2. С. 311-324

4) Boulanger S.A., Chen C., Tang L., Zhu L., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., **Baranov M.S.**, Fang C. Shedding light on ultrafast ring-twisting pathways of halogenated GFP chromophores from the excited to ground state // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021. № 23. С. 14636-14648.

5) Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavrikov A.S., Mishin A.S., **Baranov M.S.** NanoFAST: structure-based design of a small fluorogen-activating protein with only 98 amino acids // *Chem. Sci.* 2021. № 12. С. 6719-6725.

6) Chen C., Tachibana S.R., Baleeva N.S., Myasnyanko I.N., Bogdanov A.M., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Malyshevskaya K.K., **Baranov M.S.**, Fang C. Developing Bright Green Fluorescent Protein (GFP)-like Fluorogens for Live-Cell Imaging with Nonpolar Protein–Chromophore Interactions // *Chem. Eur. J.* 2021. № 27. С. 8946-8950.

- 7) Myasnyanko I.N., Gavrikov A.S., Zaitseva S.O., Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Sokolov A.I., Malyshevskaya K.K., Baleeva N.S., Mishin A.S., **Baranov M.S.** Color Tuning of Fluorogens for FAST Fluorogen-Activating Protein// *Chem. Eur. J.* 2021. № 27. С. 3986-3990.
- 8) Smirnov A.Y., Perfilov M.M., Zaitseva E.R., Zagudaylova M.B., Zaitseva S.O., Mishin A.S., **Baranov M.S.** Design of red-shifted and environment-sensitive fluorogens based on GFP chromophore core // *Dyes and Pigments.* 2020. Т. 177. С. 108258.
- 9) Mikhaylov A.A., Kuleshov A.V., Solyev P.N., Korlykov A.A., Dorovatovskii P.V., Mineev K.S., **Baranov M.S.** Imidazol-5-one as an Acceptor in Donor-Acceptor Cyclopropanes: Cycloaddition with Aldehydes. // *Org. Lett.* 2020. Т. 22. № 7. С. 2740-2745
- 10) Zaitseva S.O., Farkhutdinova D.A., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.Z., Shakhov A.M., Astafiev A.A., **Baranov M.S.**, Bochenkova A.V. Excited-state locked amino analogues of the green fluorescent protein chromophore with a giant Stokes shift // *RSC Adv.* 2019. № 9. 38730-38734.
- 11) Smirnov A.Y., Zaitseva E.R., Belozerova O.A., Alekseyev R.S., Baleeva N.S., Zagudaylova M.B., Mikhaylov A.A., **Baranov M.S.** Nitroacetic Esters in the Regioselective Synthesis of Isoxazole-3,5-dicarboxylic Acid Derivatives// *J. Org. Chem.* 2019. Т. 84. С. 15417–15428.
- 12) Baleeva N.S., Khavroshechkina A.V., Zaitseva E.R., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., **Baranov M.S.** Naphthalene derivatives of a conformationally locked GFP chromophore with large stokes shifts // *Tetrahedron Lett.* 2019 Т. 60. № 34. С. 150963.
- 13) Ermakova Y.G., Bogdanova Y.A., Baleeva N.S., Zaitseva S.O., Guglya E.B., Smirnov A.Y., Zagudaylova M.B., **Baranov M.S.** Pyridine analogue of fluorescent protein chromophore: Fluorogenic dye suitable for mitochondria staining // *Dyes and Pigments.* 2019. № 170. С. 107550.
- 14) Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., **Baranov M.S.** Red-shifted substrates for FAST fluorogen-activating protein based on the GFP-like chromophores // *Chem. Eur. J.* 2019. Т. 25. № 41. С. 9592-9596.
- 15) Ermakova Y.G., Sen T., Bogdanova Y., Smirnov A.Yu, Baleeva N.S, Krylov A., **Baranov M.S.** Pyridinium Analogues of Green Fluorescent Protein Chromophore: Fluorogenic Dyes With Large Solvent-Dependent Stokes Shift // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. № 9. С. 1958-1963.

#### На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**1. Отзыв официального оппонента Ферштат Л.Л.,** отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1. Чем обусловлено использование именно N-бензилазометинметилада в качестве 1,3-диполя в реакции [3+2]-циклоприсоединения с арилиден-имидазолонами? Известно, что азометинилиды могут быть сгенерированы из большого набора карбонильных соединений и аминокислот. 2. Из текста диссертации неясно разделение производных арилиден-имидазолонов 3.1.1 и 3.1.2 на первое и второе поколение, соответственно (стр. 27 автореферата и стр. 140 диссертации). Такое разделение вызвано хронологией их синтеза или же какими-то специфическими свойствами? 3. Исследовалась ли диссертантом возможность катализа реакции [3+2]-циклоприсоединения азидов к енаминам 2.5.5 для повышения выходов целевых соединений 2.5.6 и проведения реакции в более мягких условиях? 4. Выход соединения 3.1.7e, содержащего пиридинильный заместитель, существенно отличается от всех остальных соединений данного ряда (схема 39 автореферата и схема 2.3.6 диссертации).

Чем это может быть вызвано? 5. Для некоторых синтезированных соединений (1.6.2b, 1.6.3a, 1.6.3b) в приложении А (стр. 311-312 диссертации) отсутствуют спектральные и аналитические данные. Если это описанные соединения, то следовало привести ссылки на литературные данные. 6. Нумерация соединений в диссертации и автореферате, на первый взгляд, неочевидна и затрудняет общее восприятие. 7. В списке литературы под одним номером может значиться несколько литературных источников.

**2. Отзыв официального оппонента Белоглазкиной Е.К.,** отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1). При изучении стереохимии реакции циклопропановых производных арилиденимидазолонов с альдегидами в присутствии толуолсульфокислоты (Схема 2.1.22, с. 62-63) желательно было бы подтвердить отсутствие рацемизации исходных и получаемых соединений в ходе синтеза (например, с помощью хроматографии на хиральной колонке), возможной в кислых или основных условиях проводимых реакций. 2). Объяснение борирования производного 2.6.18 в орто-положение к атому кислорода (продукт 2.6.20) электронным эффектом кислорода, способствующим электрофильному замещению в ближайшем к нему положении (Схема 2.2.45, с. 117), по мнению оппонента, не является достаточно убедительным, поскольку пара-положение к кислородному атому также активировано к электрофильному замещению, и при этом является пространственно более доступным. Возможно, в данном случае имеет место пре-координация борлирующего реагента по неподеленной паре атома азота имидазолонного фрагмента, или другие направляющие эффекты, обусловленные наличием имидазолонного фрагмента. 3). Чем объясняются низкие выходы продуктов конденсации с участием 2-метильной группы имидазолонов, например, на Схемах 2.3.28, 2.3.29? Из текста работы не вполне ясно, связано ли это с неполной конверсией исходных соединений, потерями при очистке, или в качестве основных продуктов образуются соединения иной структуры.

**3. Отзыв официального оппонента Ощепкова М.С.,** отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1) Не совсем полно и однозначно на страницах 125 и 131 объяснён и доказан механизм разгорания и тушения флуоресценции за счет изменения значения рН для соединений 2.6.33 и 2.6.37-38. Проводились ли квантово-механические расчеты или дополнительные эксперименты для доказательства данного механизма. 2) Отсутствует апробация работы с устными докладами на крупных российских и международных конференциях. 3) Замечания по доказательству структур, синтезированных соединений отсутствуют данные: не ясно почему автор не использовал для доказательства структуры соединений 2.4.4, 2.4.5, 2.6.35-37 11В ЯМР-спектроскопию; отсутствуют данные по доказательству структуры и соотношению стереоизомеров для продуктов реакции Кори-Чайвского Схема 2.1.18 стр. 59.

**4. Отзыв ведущей организации,** отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1). В работе отсутствуют примеры применения красок с триазольными линкерами, которые были разработаны в рамках данной работы в живых объектах. Связано ли это с невозможностью их применения или таких попыток не было? 2). Возможно ли применение предложенных соединений или вариантов комплексов с белком для FLIM микроскопии? 3). При изучении сенсоров полярности показано, что кривая фотообесцвечивания выходит на плато. Автор объясняет это установлением равновесия между процессом диффузии и обесцвечивание. Однако, чтобы вывод был более обоснованным, стоило провести дополнительные эксперименты с разными интенсивностями облучения.

5. **Отзыв на автореферат** доктора химических наук, профессора, заведующего лабораторией супрамолекулярной химии ФГБУН Института органической химии имени Н. Д. Зеленского РАН **Вацадзе Сергея Зурабовича**. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

6. **Отзыв на автореферат** доктора фармацевтических наук, доцента, ведущего научного сотрудника лаборатории трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУВО Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова **Балабаньяна Вадима Юрьевича**. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

7. **Отзыв на автореферат** кандидата химических наук, ведущего научного сотрудника химического факультета ФГБОУВО Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова **Латышева Геннадия Владимировича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: стоит отметить, что выходы некоторых промежуточных соединений, например, аминометиленимидазолонов 1.1.11a-f (8-15%) оставляют желать лучшего. Несмотря на то, что такие чрезвычайно низкие выходы не помешали автору изучить их борированные производные, стоило бы попытаться оптимизировать методику их синтеза, например, попробовать использовать в этой реакции трифторэтил арилимидааты.

8. **Отзыв на автореферат** доктора химических наук, профессора РАН, заведующего отделом медицинской химии и токсикологии НИИ трансляционной медицины, заведующего кафедрой химии лечебного факультета, ФГАОУВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации **Негребецкого Вадима Витальевича**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1. Раздел 1.6, стр.12. Безусловно автореферат является краткой выжимкой, что называется – сухим остатком, диссертации, тем не менее его читает даже большее число специалистов, чем саму диссертацию. В этой связи сообщение диссертанта о синтезе серии производных амидазолона, «характеризующихся заметным батохромным смещением максимумов поглощения и эмиссии» требует уточнения и пояснения. 2. Там же отмечается, что реакция конденсации может осуществляться как в присутствии кислот, так и оснований. Если выбор в качестве последних раствора пиперидина вопросов не вызывает, то выбор в качестве кислоты  $ZnCl_2$ , как представляется, требует некоторого обоснования и детализации.

9. **Отзыв на автореферат** кандидата физико-математических наук, доцента кафедры физической химии химического факультета ФГБОУВО Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова **Боченковой Анастасии Владимировны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1. В тексте некоторые термины используются не совсем корректно для описания электронного строения исследуемых хромофоров. На схеме 26 и в тексте при описании фотофизических свойств борированных арииден-имидазолонов с заместителями в мета-положении было бы правильнее ссылаться на различные электронно-возбужденные состояния этих соединений и их характер, а не на орбитали. 2. В качестве общего пожелания к работе можно указать на возможность систематизации и построения разного рода теоретически обоснованных корреляционных соотношений для описания зависимости фотофизических свойств флуорофоров от растворителя и природы заместителей.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме диссертации. Это подтверждается наличием у них большого количества публикаций в ведущих международных и российских изданиях. Сотрудники группы молекулярного моделирования ФИЦ Биотехнологии РАН много лет ведутся исследования различных низкомолекулярных флуорофоров, а также флуоресцентных белков, основной которых являются арилиден-имидазолы. Фершат Л.Л. является специалистом в области химии азотсодержащих гетероциклических соединений, а также органической химии в целом и химии биологически-активных веществ. Белоглазкина Е.К. отличный специалист в области химии гетероциклических соединений, в частности химии пятичленных гетероциклов, химии спироциклических соединений, медицинской химии, а также химии биологически-активных веществ. Научные интересы Ощепкова М.С. лежат в области органической химии в целом, а также посвящены вопросам флуоресцентного мечения различных объектов. Наличие большого опыта, а также высокая квалификация в данных областях позволяют представителям ведущей организации и оппонентам объективно оценивать теоретическую и практическую значимость диссертационной работы, а также ее новизну.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных Барановым М.С. исследований проведено структурно-функциональное исследование арилиден-имидазолов, а также создание на их основе флуорофоров для мечения живых систем. В результате этой работы разработаны новые методы синтеза и модификации арилиден-имидазолов и иных гетероциклических соединений, разработаны подходы к созданию арилиден-имидазолов с внутренним фиксирующим мостиком. Установлено, что введение различных заместителей, а также увеличение размера системы сопряженных связей арилиден-имидазолов с фиксирующим мостиком позволяют варьировать свойства создаваемых соединений, в частности сместить максимумы поглощения и эмиссии в длинноволновую область, создавать фотокислотные производные или производные, чувствительные к рН и иным свойствам среды. Барановым М.С. изучены свойства созданных арилиден-имидазолов, определены возможности их использования в роли флуорофоров и флуорогенов для флуоресцентного мечения отдельных органелл живых клеток, а также для генетически-кодируемого флуоресцентного мечения в паре с флуороген-активирующими белками. В частности, анализ взаимосвязи между строением и свойствами созданных арилиден-имидазолов позволил впервые создать серию веществ, характеризующихся сольватохромным варьированием квантового выхода флуоресценции. Эти вещества были успешно использованы для селективного флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикула и митохондрий живых клеток. Созданный Барановым М.С. краситель для митохондрий является уникальным, так как позволяет проводить мечение равномерно вне зависимости от метаболического статуса, что было невозможно ранее при использовании других маркеров. Также в работе Баранова М.С. показано, что арилиден-имидазолы могут быть использованы в роли флуорогенов в паре с флуороген-активирующим белком FAST для генетически-кодируемого мечения живых систем. Выявление таких флуорогенов позволило впервые расшифровать структуру этого белка, а также предложить новый усеченный его вариант. Данный вариант белка получил название nanoFAST и в паре с флуорогеном HBR-DOM2 по состоянию на конец 2021 года является самой короткой генетически-кодируемой меткой для живых систем, содержащей всего 98 аминокислот.

**Теоретическая значимость** исследования состоит в том, что в представленной работе изучены фундаментальные вопросы химии азотсодержащих гетероциклических соединений, а также раскрыты ранее неизвестные подходы к синтезу и механизмы реакций. В частности, в работе раскрыты противоречия ранее предложенного механизма реакции Дорнова и предложен его более полный вариант. В работе изучены структурно-функциональные закономерности между строением и свойствами флуоресцентных и флуорогенных красителей, в результате чего предложены подходы к прогнозированию свойств новых веществ и созданию новых систем флуоресцентного мечения живых объектов.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработанные методы синтеза гетероциклических производных пригодны для создания самых разных биологически-активных веществ или новых лекарственных средств. Созданные автором флуоресцентные красители являются эффективными аналогами существующим красителям и пригодны для мечения различных биологических объектов. Предложенные автором уникальные системы флуорогенного мечения перспективны для генетически-кодируемого мечения живых систем, а также окрашивания органелл живых клеток в целом, что широко востребовано в современных биологических исследованиях. Выявленные автором закономерности являются отличной отправной точкой для создания широкого круга новых флуоресцентных меток и технологий мечения.

**Достоверность** полученных в работе результатов не вызывает сомнений. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, а результаты исследования являются воспроизводимыми в различных условиях. Методы исследований, использованные соискателем, являются общепринятыми и выполнены на современном оборудовании. В частности, результаты химического синтеза подтверждены независимыми физико-химическими методами исследования (спектроскопией ЯМР и масс-спектрометрией высокого разрешения).

**Личный вклад** соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов. Весь экспериментальный материал был получен лично автором или под его руководством. Анализ полученных данных, а также подготовка основных публикаций по данной работе проведены соискателем лично.

На основании вышеизложенного Диссертационный совет 24.1.037.01 заключает, что диссертационная работ **Баранова Михаила Сергеевича** «Арилиден-имидазолон: от структурно-функциональных исследований к созданию новых флуорофоров для живых систем», представленная на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия, является законченным научно-квалификационным исследованием в области биорганической химии, в результате которого были получены новые фундаментальные знания о флуоресцентных и флуорогенных красителях и их использовании для мечения живых систем, открыты новые подходы к синтезу ряда гетероциклических соединений с важной прикладной значимостью. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, личному вкладу и полноте изложения результатов диссертация полностью удовлетворяет всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к докторским диссертациям «Положением о присуждении учёных 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; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426;

от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Были заданы следующие уточняющие вопросы:

1. Нашелся ли в вашей библиотеке краситель который флуоресцентно метит эндоплазматическую мембрану?

2. Вопрос про BF<sub>2</sub> мостик. Насколько быстро происходит гидролиз фтора до OH? Есть ли какая-то четкая закономерность в зависимости от структуры? Есть ли у вас практика использования таких соединений в водных средах на биологических объектах, на клеточных объектах? Видите ли вы какие-то ограничения?

3. Можете ли вы сказать, что лучше – фиксировать хромофор путем введения дополнительных групп, создания связей, или за счет взаимодействия с белками? Есть ли какие-то количественные соотношения? Каким путем надо идти - рассчитывать на атомы белка в окружении или создавать жесткую молекулу?

4. Существуют коммерческие системы мечения в который флуоресцентный сигнал пропадает при действии аналита. В вашем случае сигнал наоборот всегда возникал за счет специфического воздействия? Не было обратной ситуации?

5. Изучалась ли цитотоксичность красителей? Изучался ли возможный механизм токсичности?

6. Какие преимущества имеет ваш белок, который на 27 аминокислот меньше, по сравнению с исходным?

7. Какие времена жизни флуоресценции ваших красителей?

8. Какая фотостабильность ваших красителей? Насколько быстро они деградируют?

9. Пытались ли вы провести многофотонные процессы для ваших красителей?

Соискатель Баранов М.С. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1. Такого красителя не нашлось.

2. Да, у этих красителей есть такая проблема - они действительно гидролизуются. Масштабных исследований на живых системах с этими красителями не проводилось. В любом случае, такой гидролиз - это проблема этих красителей, ее скорее всего невозможно никак решить и это будет ограничением их использования.

3. Это зависит от задачи. Если нужен флуоресцентный краситель, который будет флуоресцировать всегда, тогда нужно фиксировать все заместители. Если нужен краситель флуорогенный, который не будет флуоресцировать в свободном виде, тогда наоборот, эти заместители фиксировать не нужно.

4. Были идеи на этот счет. Во-первых, бороновые кислоты потенциально способны окисляться до фенолов, что в нашем случае могло привести к потере флуоресценции. Мы пытались реализовать это, но на данный момент безуспешно. Во-вторых у нас есть pH-сенсорные соединения, сигнал которых пропадает при увеличении pH.

5. Цитотоксичность изучалась. Красители оказались малотоксичны. Иногда они подавляли деление клеток, но не приводили к гибели. Механизм не изучали.

6. Меньший размер метки снижает влияние на меченные объекты. Мечение этим белком с N-конца также должно быть более стабильно.

7. Времена жизни флуоресценции у наших красителей очень разные. В зависимости от строения арилиденовой части оно может варьировать - для некоторых ближе к одной наносекунде, для других может достигать четырех.



8. Наши красители конечно же деградируют под действием света. Однако, у флуорогенных красителей на смену выгоревшей молекуле может прийти новая молекула из раствора. Мы проводили сравнительные исследования с флуоресцентными белками, фотостабильность оказалась сопоставимой.

9. Не пытались.

На заседании 12 октября 2022 года диссертационный совет принял решение: за проведение фундаментальных исследований гетероциклических соединений, а также достижение уникальных результатов в химии флуоресцентных и флуорогенных красителей и создание прорывных технологий флуоресцентного мечения живых систем, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области биоорганической химии, присудить Баранову Михаилу Сергеевичу ученую степень доктора химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человека, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9 – биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель  
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А. И.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В. А.



13 октября 2022 г.