



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

13 СЕН 2022

№ 85-01-19/683

На № 4.10-36-504

от 07.06.2022

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Федерального
исследовательского центра
«Фундаментальные основы
биотехнологии»
Российской академии наук
доктор биологических наук
Федоров Алексей Николаевич
«13» сентября 2022 г.

Федоров А.Н.



Ведущей организации на диссертационную работу Баранова Михаила

Сергеевича на тему «Арилиден-имидазолон: от структурно-функциональных исследований к созданию новых флуорофоров для живых систем», представленную на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия

Разработка флуорофоров, способных работать в клетках, является важной и актуальной задачей биоимиджинга. Широкое распространение получили флуоресцентные белки, в которых хромофор формируется автокаталитически из аминокислотных остатков белка. Перспективной альтернативой являются синтетические соединения, способные флуоресцировать в условиях *in vivo*, что и является предметом данной диссертации. Автор диссертации предлагает в своей работе обширный круг новых соединений с широким диапазоном фотофизических свойств, оригинальные способы их синтеза, структурно-функциональные исследования и конкретные приложения в клетках, что, безусловно, имеет важное фундаментальное и прикладное значение.

Представленные в работе результаты вносят существенный вклад в развитие области, поскольку предлагает систематический подход к разработке и применению флуоресцентных красителей для применения в клетках. Представленные результаты обобщают исследования по возможным модификациям арилиден-имидазолоновых красителей, включая возможные сайты модификации этих соединений для варьирования положения полос поглощения и флуоресценции, а также увеличения жесткости каркасов соединений для повышения целевого параметра – квантового выхода флуоресценции.

Диссертационная работа Баранова М.С. построена классическим образом и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов из работы, списка литературы, списка сокращений и приложений.

Обзор литературы состоит из четырех частей: в первой части проводится анализ данных по флуоресцентным белкам, как альтернативе предлагаемым в данной работе органическим флуорофорам. Далее представлены известные в литературе методы синтеза 5-арилиден-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-онов (арилиден-имидазолонов), изучению которых посвящена данная работа. В третьей части литературного обзора обсуждаются арилметеновые красители, а в заключительной, четвертой части – известные в литературе применения флуоресцентных красителей для исследования биологических объектов.

В главе, посвященной экспериментальной части, представлено подробное описание всех методов, использованных в работе.

Обсуждение результатов состоит из трех больших разделов. В первом разделе представлены новые подходы к синтезу и модификации арилиден-имидазолонов, включая производные азидуксусной кислоты, использование

солей триэтилоксония, металло-комплексного катализа, окисление алкильного остатка во втором положении, реакции кратной экзо-связи, и конденсации алкильного остатка во втором положении. В работе показано, что метильная группа во втором положении имидазолонового кольца является перспективным положением для проведения модификаций, приводящих к расширению сопряженной π -системы, что приводит к смещению полос поглощения и флуоресценции в более длинноволновую область.

Во второй части результатов обсуждаются результаты, полученные для арилиден-имидазолонов с фиксирующим мостиком. Автором использован синтетический подход, позволяющий увеличить жесткость хромофора за счет введения борсодержащего фиксирующего мостика. Такие соединения характеризуются высоким квантовым выходом флуоресценции даже в растворе, что связано именно с отсутствием каналов деактивации за счет изомеризации, что обычно наблюдается в гибких флуорофорах в растворе. Автор работы использует BF_2 фрагмент в качестве мостика, что практически не влияет на спектральные свойства, а только приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции. Такой подход реализован им для большого спектра флуорофоров и стабильно демонстрирует хороший результат, проявляющийся в увеличении квантового выхода. Важно отметить, что автором не просто разработаны методики синтеза, но и проведена структурно-функциональная характеристика, что позволяет систематизировать и обосновать получаемые результаты.

В третьей части представлены результаты применения сенсоров биологическим задачам. В частности, показано, что некоторые из разработанных соединений могут проявлять флуоресцентные свойства в определенных органеллах с определенной полярностью/липофильностью среды, что позволяет избежать появления ненужного шума. Разработанные красители могут селективно окрашивать ЭПР или митохондрии. Ещё одним

вариантом применения синтезированных красителей является их связывание с белком, в результате чего увеличивается жесткость структуры флуорофора и повышается квантовый выход флуоресценции. Помимо выбора подходящих флуорофоров автором также осуществлена оптимизация самой структуры белка, в частности, показано, какие фрагменты являются структурно незначимыми и могут быть убраны для уменьшения размера. В итоге была создана самая короткая белковая конструкция, которая вместе с красителем образует флуоресцирующий комплекс.

Выводы диссертационной работы логично следуют из поставленных цели и задач исследования. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Несмотря на общую высокую оценку, есть некоторые замечания и вопросы к диссертационной работе:

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.

Указанные замечания не носят принципиального характера, не влияют на выводы и не снижают высокой научной ценности диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 50 статьях, в том числе двух обзорных, в отечественных и иностранных рецензируемых научных журналах, внесенных в Перечень журналов и изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Результаты диссертационной работы могут быть рекомендованы для использования в научных и научно-образовательных организациях, занимающихся органическим синтезом, а также изучением биологических объектов методом флуоресцентной спектроскопии: МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт органической химии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Таким образом, диссертационная работа Баранова Михаила Сергеевича на тему «Арилиден-имидазолы: 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 удовлетворяет всем требованиям (в том числе, п.9), предъявляемым к докторским диссертациям "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 – биорганическая химия.

Диссертационная работа была заслушана на межлабораторном семинаре Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (Протокол № 1 от 19 июля 2022 г.).

Руководитель группы молекулярного
моделирования, д.ф.-м.н., проф. РАН



Хренова Мария Григорьевна

Институт биохимии им. А.Н. Баха
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.
119071 Российская Федерация
Тел: +7 (495) 954-52-83
E-mail: mkhrenova@lcc.chem.msu.ru

Подпись *Хренова М.Г.*
ЗАВЕРЯЕТСЯ
Заведующий канцелярией
« 13 » 08 2022

