

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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

Создание флуоресцентных маркеров или сенсоров является сложной синтетической задачей, для решения которой требуются современные подходы органической химии. Несмотря на то, что в настоящее время известно и изучено большое количество флуорофоров, существует проблема создания высокоэффективных соединений для флуоресцентного мечения живых систем. Среди перспективных оптических платформ для создания таких систем особое место занимают арилиденимидазолон: благодаря малому размеру хромофлуорофорной системы, низкой степени гидрофобности, а также наличию возможности вариации оптических свойств (длинноволновый максимум поглощения, максимум флуоресценции, квантовый выход флуоресценции) путем изменения химической структуры.

В связи с этим, поиск новых подходов и методологий конструирования арилиденовых производных имидазолонов, а также создание новых флуоресцентных агентов на их основе, обладающих уникальными оптическими свойствами, для живых систем, является актуальной задачей современной органической и биоорганической химии.

В этом аспекте и следует рассматривать диссертационную работу Михаила Сергеевича Баранова, целью которой являлась всестороннее изучение этих производных, начиная от поиска новых методов синтеза и модификации, а также использования этих методов в синтезе модельных соединений, до создания новых флуоресцентных, а также флуорогенных красителей и использования их для флуоресцентного мечения живых систем.

Диссертационная работа построена по традиционному принципу и включает в себя литературный обзор, обсуждение собственных результатов, экспериментальную часть. Диссертация изложенная на 417 страницах, построена

традиционно и включает введение, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (200 наименований) и двух приложений.

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту, аргументирована достоверность результатов работы, приведены данные об апробации работы и информация о публикациях по теме диссертации.

В первой главе представлен анализ литературы, который содержит четыре раздела, в которых обобщены необходимые для понимания работы сведения. В первом разделе рассмотрены структуры хромофоров флуоресцентных белков. Во втором разделе изложены методы синтеза 5-арилиден-3,5-дигидро-4Н-имидазол-4-онов (арилиден-имидазолонов). В третьем разделе описаны арилметеновые флуоресцентные красители, а четвертый посвящен использованию флуорогенных красителей для мечения биологических объектов. Все это позволило автору сформулировать задачи и обосновать методологию исследования. К недостаткам данной главы можно отнести отсутствие общих выводов по всем разделам литературного обзора и, как следствия, постановки задач исследования.

Во **второй, главе** обсуждаются результаты собственных исследований, которые содержат необходимые для диссертационной работы сведения, **соответствующие критериям научной новизны и практической значимости.**

Третья глава содержит описание методов синтеза и разработанных автором оригинальных методик, все сведения о структуре синтезированных соединений подтверждены данными ^1H , ^{13}C , ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, рентгеноструктурного анализа и оптических методов исследования (спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии). Приведены методики флуоресцентного мечения живых систем, которое проведено с применением методов классической молекулярной и клеточной биологии. Для визуализации использованы современные широкопольные и конфокальные

флуоресцентные микроскопы. Поэтому **достоверность** представленных данных не вызывает никаких сомнений.

В результате проведённых в достаточно большом объёме собственных исследований, представленных в главе «Обсуждение результатов», М.С. Баранов

1) Разработал и осуществил схему синтеза арилиден-имидазолонов с использованием легкодоступных амидов азидоуксусной кислоты, или с применением О-алкилирования амидоацетатов солями триэтиоксония, что позволило ввести большой перечень заместителей в различных положениях имидазолонового цикла.

2) Показал возможность использования метильной группы во втором положении имидазолонового цикла арилиден-имидазолонов для модификации этих веществ с использованием реакций окисления, а также конденсации с карбонильными и карбоксильными производными. Это позволило получить производные с более длинноволновым максимумом поглощения.

3) Установил, что кратная экзо-связь арилиден-имидазолов может вступать в разнообразные реакции циклоприсоединения, в частности с азотинметилидом или илидами серы. Такая модификация может быть использована в построении геометрически жестких спироциклических производных перспективных в качестве основы для новых биологически-активных веществ.

4) Осуществил синтез арилиден-имидазолонов, содержащих внутренний фиксирующий мостик, что позволило существенно повысить интенсивность флуоресценции. Введение различных заместителей, а также увеличение размера хромо-флуоресцентной системы позволило варьировать свойства создаваемых соединений, в частности, сместить максимумы поглощения и эмиссии в длинноволновую область, и создать фотокислотные производные или производные чувствительные к рН и иным свойствам среды. Показана возможность использования данных соединений для флуоресцентного мечения компонентов живых систем.

5) Показал, что арилиден-имидазолы с сольватохромным варьированием интенсивности флуоресценции могут быть использованы как флуорогены для селективного флуоресцентного мечения эндоплазматического ретикулума или митохондрий живых клеток. Мечение митохондрий выявленным флуорогеном

происходит потенциалнезависимо, что выгодно отличает предложенный флуороген от существующих маркеров для митохондрий.

6) Показал, что арилиден-имидзолон, содержащий в четвертом положении арилиденового фрагмента гидроксильную группу, может быть использован как лиганды флуороген-активирующего белка FAST. Выявлено несколько арилиден-имидазолонов с различной окраской, которые могут быть эффективно использованы в паре с этим белком для генетически-кодируемого мечения компонентов живых систем.

7) Установил структуру белка FAST в свободном виде и в комплексе с флуорогеном с использованием одного из выявленных флуорогенов методом спектроскопии ЯМР. В ходе связывания происходит значительная перестройка и организация N-концевой части белка.

8) Предложено и доказано, что усеченная версия белка FAST также может быть использована в роли флуороген-активирующего белка для генетически-кодируемого мечения компонентов живых систем в паре с найденным в настоящей работе флуорогеном. Такой белок является одной из самых маленьких генетически-кодируемых меток для живых систем.

Экспериментальная часть диссертации выполнена на высоком научном уровне, приведены методики получения выделения и очистки исходных и новых синтезированных соединений, их характеристики, описана использованная автором инструментальная база для получения спектров поглощения и флуоресценции, а также условия их регистрации. Выводы, сделанные автором по результатам исследования, вполне обоснованы.

Практическая значимость диссертации определяется важным вкладом в методологию гетероциклического синтеза и заключается в создании серии новых методов синтеза и модификации арилиден-имидазолонов, которые могут быть использованы широким кругом исследователей для создания новых флуоресцентных и флуорогенных производных. Выявлены взаимосвязи между строением и свойствами, что позволяет предсказывать характеристики новых арилиден-имидазолонов.

Так же важным является вклад в область биологических исследований. М.С. Барановым создана серия красителей, пригодных для флуоресцентного мечения

эндоплазматического ретикулула. Также в работе создан уникальный краситель, пригодный для флуоресцентного мечения митохондрий, который позволяет окрашивать митохондрии независимо от их метаболического статуса и мембранного потенциала, что может быть важно для проведения различных исследований. Создана серия флуорогенных арилиден-имидазолонов разнообразной окраски, которые могут быть использованы в паре с флуороген-активирующим белком FAST для генетически-кодируемого мечения живых систем. Разработан уникальный флуороген-активирующий белок nanoFAST, который является одной из самых маленьких генетически-кодируемых меток, что позволяет заметно снизить влияние метки на поведение изучаемых объектов.

Таким образом, изложенное выше позволяет считать теоретические и практические результаты диссертации **достоверными и значимыми**, а ее **высокая научная новизна** не вызывает сомнений. Автор успешно решил все поставленные в работе задачи.

Работа хорошо оформлена. Язык и стиль диссертации заслуживают высокой оценки. Работа содержит незначительное количество технических ошибок (опечаток).

К работе можно высказать некоторые замечания, не имеющие принципиального характера.

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.

Изложенные выше замечания не влияют на общую высокую оценку диссертационной работы, которая выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне и вносит ценный вклад в развитие органической и биорганической химии. В целом соискателем выполнено оригинальное, интересное и полезное исследование, имеющее теоретическое и прикладное значение.

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 организациях, занимающихся общим органическим синтезом, а также химией азотсодержащих гетероциклических соединений: ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН, Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ГосНИИОХТ.

Работа соответствует заявленной специальности 1.4.9 – биорганическая химия. Результаты, полученные диссертантом, имеют существенное научное значение. В диссертации на основании выполненных автором исследований **разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области направленного синтеза нового поколения флуоресцентных, а также флуорогенных красителей и использования их для флуоресцентного мечения живых систем, имеющей важное теоретическое и хозяйственное значение.**

Таким образом, диссертационная работа Баранова Михаила Сергеевича на тему «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 и удовлетворяет требованиям пп. 9-14, предъявляемым к докторским диссертациям согласно «Положению 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), а её автор – Баранов Михаил Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой химии и
технологии биомедицинских препаратов
РХТУ им. Д.И. Менделеева,
доктор химических наук,



М. С. Ощепков

Подпись д.х.н. Ощепкова М.С. заверяю:
Учёный секретарь РХТУ
им. Д.И. Менделеева



Н.К. Калинина

Адрес:

ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева
125047 Москва, Миусская площадь, д. 9
Телефон: 8-916-850-80-35
E-mail: oshchepkov.m.s@muctr.ru

02 сентября 2022 г.