

ОТЗЫВ

официального оппонента Стужина Павла Анатольевича о диссертационной работе
Захарко Марины Александровны на тему
«РАЗРАБОТКА ФЛУОРОФОРОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,8-НАФТАЛИМИДА
ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ И
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ»,

представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальностям 02.00.03-органическая химия и 02.00.04 – физическая химия.

Природные пигменты на основе порфиринового макроцикла активно исследуются в качестве эффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Ряд их производных допущен в клиническую практику для противоопухолевой ФДТ. Достоинством фотосенсибилизаторов на основе природных порфиринов по сравнению с синтетическими, например, производными фталоцианинов, является отлаженный природой механизм их метаболизма в организме. Важной задачей является и визуализация очагов новообразований. Порфирины, обладая тропностью к опухолевым тканям, могут использоваться и для их одновременной флуоресцентной визуализации. Однако высокий квантовый выход триплетных состояний, необходимый для эффективной генерации синглетного кислорода фотосенсибилизатором, снижает флуоресценцию, кроме того жесткость порфиринового макроцикла обуславливает небольшую величину Стоксова сдвига и близость максимума флуоресценции и длины волны возбуждающего источника для ФТД. Это затрудняет флуоресцентную визуализацию. Поэтому перспективным и активно развиваемым направлением исследований является создание бифункциональных систем, объединяющих эффективный фотосенсибилизатор с максимумом поглощения в ближней ИК области и флуорофор, испускающий в более коротковолновой области. Таким образом, разработка бисхромофорных конъюгатов нафталиimidных флуорофоров и порфириновых фотосенсибилизаторов для ФДТ, которой посвящена работа Захарко М.А., является **актуальной научной задачей.**

Диссертационная работа М.А. Захарко представлена на 229 страницах и состоит из Введения, Литературного обзора, Обсуждения результатов, Экспериментальной части, Выводов, Приложения (31 стр) и Списка литературы (204 наименования). В основной части диссертации имеются 21 таблица, 108 рисунков, 63 схемы, иллюстрирующие химические превращения, а Приложение содержит 2 таблицы (данные PCA) и 58 рисунков с оригинальными экспериментальными данными.

Во введении (6 стр.) сформулирована актуальность темы диссертации, поставлены цели и задачи, отражена научная новизна и практическая значимость полученных результатов и

личный вклад автора, а также дана информация о представлении результатов работы на научных конференциях.

Второй раздел диссертации (65 стр.) представляет собой обзор литературы, который охватывает 139 работ, опубликованных с 1873 по 2019 гг. В нём рассмотрены особенности спектральных свойств производных нафталимида; оптические сенсоры на их основе для детектирования катионов, анионов и биологически активных соединений; показаны подходы к молекулярному дизайну систем для направленной доставки флуорофоров с целью флуоресцентной визуализации тканей, а также проанализировано влияние структуры замещённых нафталимида на их связывание с молекулами ДНК.

В третьей главе диссертации (64 стр.), состоящей из восьми подразделов обсуждаются полученные в диссертационной работе результаты. В *разделе 3.1* представлены синтетические разработки автора по получению новых флуоресцентных красителей на основе 1,8-нафталимида, исходя из аценафтена в качестве исходного продукта. 4-Бромпроизводное, полученное по известным методикам, было функционализировано по нафталиновому фрагменту стирильными заместителями с использованием реакции Хека, а по имидному атому азота – различными азидсодержащими спейсерными группами путём амидирования нафталинового ангидрида. Особенно интересно получение производного с пептидным спейсером по четырёхкомпонентной реакции Уги. 4-Ацетилпроизводное были использовано в синтезе пиразолинил-замещённых нафталимидов, которые были получены при их последовательной конденсации с альдегидами и фенилгидразином. В ходе работы была обнаружена и исследована очень интересная реакция фотохимической ароматизации пиразолинильной группы до пиразольной. В *разделе 3.2* проведен подробный анализ влияние растворителей на спектры поглощения и испускания стирилзамещённых *N*-бутилнафталимидов. Убедительно, при помощи анализа спектров поглощения возбуждённых состояний, показано, что для данных соединений в полярных растворителях при возбуждении образуются т.н. «скрученные» состояния с переносом заряда, устойчивости которых способствуют электронодонорные заместители в стирильном фрагменте. В *разделе 3.3*. Автором представлены данные по исследованию спектрально-люминесцентных свойств конъюгатов нафталиimidных флуорофоров с бактериохлориновым фотосенсибилизатором, которые были получены в МИТХТ. При помощи время разрешённой спектроскопии показано, что в таких системах реализуется механизм резонансного переноса энергии с нафталиimidного флуорофора на бактериохлорин, что снижает флуоресценцию. В *разделе 3.4* было исследовано влияние длины цепочки, соединяющей нафталиimid и бактериохлорин, на эффективность резонансного переноса энергии возбуждения флуорофора. Показано, что как в растворе, так и в биологических жидкостях снижение эффективности переноса в длинноцепочечном полигликолевом конъюгате ниже теоретической. Предположено, что это является следствием сближения хромофорных систем за счет скручивания молекулы. В

разделе 3.5 представлены данные по изучению способности нафталимид-бактериохлориновых конъюгатов к генерации синглетного кислорода. Величины квантовых выходов $^1\text{O}_2$, которые были получены при использовании дифенилизобензофурана в качестве ловушки, для конъюгатов, оказались достаточно высокими и сравнимыми с исходным бактериохлорином. Результаты экспериментального исследования флуоресцентных и фотохимических свойств полученных конъюгатов на клетках аденокарциномы обсуждаются в *разделе 3.6*. Установлено, что в клеточной среде также происходит ухудшение флуоресцентных характеристик за счет резонансного переноса энергии. Таким образом, исходный посыл создания эффективного бифункционального тераностика оказался нереализуемым в рамках данной работы. Вместе с тем было обнаружено, что за счет взаимодействия с активными формами кислорода, образующимися при высокой интенсивности облучения, используемого в ФДТ, может разрушаться бактериохлориновый фрагмент, что приводит к разгоранию флуоресценции нафталимидного флуорофора. Автором предложена оригинальная идея использования этого, по сути «отрицательного» результата, для флуоресцентной диагностики локализации подвергнутых ФДТ клеточных структур. В *разделе 3.7* представлены и обсуждаются результаты исследования фотодинамической эффективности конъюгатов *in vitro* и *in vivo*. По своей эффективности конъюгаты оказались сравнимыми с известным фотосенсибилизатором Бактериосенсом. Показано, что пришивка нафталимидных фрагментов не ухудшает их терапевтического эффекта в ФДТ. Очень оригинальные результаты представлены в *разделе 3.8*. Поскольку ковалентно связанные конъюгаты нафталимидов и бактериохлоринов оказались не применимыми в качестве бифункциональных тераностиков, была реализована идея одновременной модификации гибридных наночастиц тетрафториттрата натрия, способных к апконверсии за счет допирования ионами Yb, Er, Tm, флуорофором **196** и N-аминобактериопурпурином **35** в качестве фотосенсибилизатора. Исследования таких наночастиц на клеточной культуре показали, что они являются эффективными тераностиками и могут быть использованы как для диагностической флуоресцентной визуализации опухолей, так и так и для их контроля в процессе ФДТ.

Экспериментальная часть диссертации (*Глава 4*) изложена на 35 стр. В ней даны сведения об исходных соединениях, методах и аппаратуре, использованной для характеристики новых соединений, методиках исследования их фотохимических свойств. Приведены подробные методики синтеза нафталимидов и их конъюгатов. Для новых соединений приведены параметры ^1H и ^{13}C ЯМР спектров. Эта часть диссертации наглядно демонстрирует большой объем выполненной экспериментальной синтетической работы. В *Приложении* к диссертации (30 стр.) приводятся оригинальные данные корреляционной ЯМР спектроскопии, измерения квантовых выходов синглетного кислорода, спектры поглощения и флуоресценции, а также кристаллографические данные. Всё это подтверждает

достоверность представленных результатов и обоснованность выводов, которые сформулированы в заключении (Раздел 5).

Диссертационная работа очень хорошо иллюстрирована. Вместе с тем ее чтение затрудняет достаточно большое количество однотипных технических огрехов – очень часто в тексте можно встретить отсутствие пробелов между словами, а также орфографические и грамматические ошибки (...родаминовыми красителей ... (стр. 7), ...сенсор... описана в работе.. (стр 30), ... в присутствии аминокислотами.. (стр. 44), .. Важным результатов большой работы .. (стр. 63) и др.), стилистические несуразницы (стр. 48 стр. 10-11 снизу), терминологические неточности (..пиразидинового кольца.. (стр. 21), ..гипохлорид аниона... (стр 50)). Кроме того, при прочтении диссертации возник ряд небольших вопросов, которые не затрагивают существа полученных результатов и сделанных выводов, но требуют пояснения автора:

1. В своей работе автор получает бромзамещенное ацетафена при бромировании последнего N-бромсукцинимидом в ДМФА при комнатной температуре с выходом 82%. Это методика, о которой сообщалось ещё в 1958 году в работе Ross'a (<https://doi.org/10.1021/ja01549a053>), широко примсняется в последние годы (имеется более 10 работ: Patel (Heterocyclic Communications, 2001, vol. 7, # 6, p. 599 – 606, выход 79%), Shoyama (2017, <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02618>, выход 96%) и другие). Ссылок на эти работы я в диссертации не нашел. В чем отличие использованной в диссертации методики, которая была опубликована автором диссертации в 2019 году (Bioconjugate Chemistry, 2019, vol. 30, # 3, p. 741 – 750, выход 82%)?

2. На стр. 92 и 93 (последние абзацы) говорится о спектральных свойствах соединений 7a-в (т.е. бромпроизводных, согласно Схеме 2 на стр. 79), и даётся ссылка на рис. 6 и табл. 2, на которых приводятся спектры и данные для соединений 8a-в, т.е. для стирильных производных. В чем причина такого несоответствия?

3. Конъюгаты замещённых нафталимидов с бактериохлорином охарактеризованы методами ЯМР. Проводился ли их масс-спектрометрический анализ?

4. Можно было бы ожидать, что резонансный перенос энергии возбуждения с нафталимидного фрагмента на бактериохлориновый будет повышать и генерацию синглетного кислорода последним. Однако этого не наблюдается, за исключением конъюгата 34, в котором как раз перенос несколько снижен за счет более длинной полиэтиленгликолевой цепочки. Как это можно объяснить?

5. Литературный обзор очень подробно, может быть даже избыточно для данной кандидатской диссертации, рассматривает свойства нафталимидных флуорофоров. Но это только – один из компонентов конъюгатов. Имеются достаточно многочисленные исследования порфириновых конъюгатов различного строения, в т.ч. и как фотосенсибилизаторов. Почему этот аспект оказался опущенным в литобзоре?

Заключение

Работа Марины Александровны Захарко выполнена на высоком научном уровне, имеет несомненную научную и практическую значимость. Она представляет собой завершённое исследование, в котором решены задачи синтеза новых нафталимидных флуорофоров и их конъюгатов с бактериохлоринов, а также получения модифицированных ими апконверсионных гибридных наночастиц, с целью разработки перспективных тераностиков для визуализации и ФДТ опухолей. Важной частью работы является исследование спектрально-люминесцентных и фотохимических свойств полученных соединений. Полученные результаты и выводы вносят значительный вклад в развитие синтетической органической химии нафталимидов и в понимание особенностей физико-химических свойств их конъюгатов с тетрапиррольными макроциклами. Диссертантка проявила себя не только как химик-органик, способный решать сложные синтетические задачи, но и как квалифицированный физико-химик.

Содержание диссертации и представленных в ней выводов полностью соответствует паспорту специальности 02.00.03 – Органическая химия (п. 1 – «Выделение и очистка новых соединений», п. 3 – «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», п. 7 «Выявление закономерностей структура-свойство», п. 9 «Поиск новых молекулярных систем с высокоспецифическими взаимодействиями между молекулами») и паспорту специальности 02.00.04 – Физическая химия (п. 1 «Экспериментальное определение и расчет параметров строения молекул и пространственной структуры веществ», п. 4. «Теория растворов, межмолекулярные и межчастичные взаимодействия», п. 5. «Изучение физико-химических свойств систем при воздействии внешних полей, а также в экстремальных условиях высоких температур и давлений»).

Публикации в рецензируемых научных журналах (8 статей), в полном объеме раскрывают содержание диссертационной работы, 4 статьи опубликовано в рекомендованных ВАК изданиях, что соответствует пп. 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ. Результаты диссертации неоднократно представлялись на научных конференциях различного уровня. Автореферат в целом отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Марины Александровны Захарко на тему «Разработка флуорофоров на основе производных 1,8-нафталимида для комбинированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии» по научной новизне полученных данных, обоснованности научных выводов, их значению для науки и практики соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 «● порядке присуждения ученых степеней», предъявляемых к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук, полностью соответствует

паспортам специальностей ВАК 02.00.03 - органическая химия и 02.00.04 - физическая химия, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.03-органическая химия и 02.00.04-физическая химия.

Отзыв составлен 25 октября 2019 года:

Заведующим кафедрой органической химии
профессором, доктором химических наук по специальностям
02.00.03 – органическая химия и 02.00.04 – физическая химия

Стужиным Павлом Анатольевичем

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановский государственный химико-технологический университет»

Адрес: Россия, 153000, г. Иваново, Шереметевский пр-т,7

Тел.: +7(4932) 477765, E-mail: stuzhin@isuct.ru

Подпись П. А. Стужина заверяю:

Ученый секретарь

А 212.063.0



Александрова Е. А.