

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

 д.ф.-м.н. В.Б. Казанцев
«18» октября 2019 года



Отзыв

ведущей организации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» на диссертационную работу **Захарко Марины Александровны** «Разработка флуорофоров на основе производных 1,8-нафталимида для комбинированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальностям: 02.00.03 – органическая химия; 02.00.04 – физическая химия.

Актуальность темы исследования

Актуальность темы представленного диссертационного исследования обусловлена потребностью в создании новых бифункциональных тераностиков для применения в качестве агентов фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний. Молекулы-тераностики благодаря уникальному сочетанию в себе агента терапии и визуализации позволяют параллельно проводить лечение и диагностику.

На сегодняшний день большинство используемых в ФДТ фотосенсибилизаторов представляют собой высокоэффективные генераторы синглетного кислорода и кислородсодержащих радикальных частиц, способных разрушать опухолевые образования. Известный факт, что генерация данных окислителей зачастую сильно снижает выходы флуоресценции используемых фотосенсибилизаторов, лишая возможности до и во время лечения применять методы флуоресцентной навигации. Большинство используемых фотосенсибилизаторов ФДТ имеют

неудовлетворительные значения Стоксова сдвига, что затрудняет анализ флуоресцентного сигнала на фоне рассеянного света возбуждения.

Универсальным подходом, применяемым в данной диссертации к созданию тераностических систем, является дизайн конъюгированных структур, содержащих в своем составе одновременно генератор синглетного кислорода (фотосенсибилизатор), химически связанный с флуоресцентным красителем, обладающим интенсивной люминесценцией в необходимом диапазоне видимого света и приемлемые значения Стоксова сдвига. Использование данной системы позволяет, варьируя длину возбуждающего света, либо регистрировать флуоресцентный отклик, либо запускать процессы генерации синглетного кислорода. Однако наличие двух хромофоров, объединенных вместе, открывает целый спектр проблем связанных с протеканием различных фотофизических процессов между структурными единицами тераностика, что ухудшает флуоресцентные характеристики всей молекулы. Данный факт, несомненно, требует детального изучения и точной настройки химического строения (бис)хромофорных систем для создание высокоэффективных агентов.

Еще одним методом создания систем-тераностиков может быть использование наночастиц с иммобилизованными терапевтическим агентом ФДТ вместе с диагностом-люминофором. Благодаря отсутствию химических связей между действующими частями тераностика и их удаленности друг от друга на поверхности наночастицы, могут быть нивелированы в некоторой степени процессы переноса энергии, что в итоге многократно улучшит фотофизические параметры исследуемого агента. Данный подход представляет особый интерес в связи с быстроразвивающейся областью апконверсионно-индуцируемой флуоресцентной диагностики, которая использует свет ИК-области для возбуждения наночастиц с иммобилизованными флуорофорами.

В связи с этим, диссертационная работа М.А. Захарко, посвящённая разработке флуорофоров на основе производных 1,8-нафталимида для комбинированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии, является актуальным научным исследованием, направленным на решение самых острых проблем, стоящих перед современной химической наукой и медицинской химией.

Научная новизна.

В ходе выполнения своего исследования М.А. Захарко получила ценные научные результаты:

1. Предложены методы синтеза неописанных ранее производных 4-стирил- и 4-пиразолинил-1,8-нафталимида, содержащих различные алифатические заместители при имидном атоме азота нафталимида.
2. Изучено влияние природы растворителя на спектральные характеристики 4-стирилнафталимидов и их склонность к

образованию скрученных возбужденных состояний, для которых характерна безызлучательная релаксация.

3. В рамках работы впервые получены и исследованы конъюгаты нафталимидных флуорофоров и фотосенсибилизатора бактериохлорина, а также показано, что конъюгирование нафталимидных красителей с фотосенсибилизатором не снижает фотодинамической эффективности последнего.
4. Впервые описаны апконверсионные наночастицы, модифицированные хромофорами на основе нафталимида и бактериохлорина, открывающие возможность для проведения диагностики и терапии при возбуждении светом ИК-области.

Общая структура и апробация работы

Диссертационная работа М.А. Захарко построена по классической схеме: состоит из введения, обзора актуальной литературы по теме исследования (глава I), представления полученных результатов и их обсуждения (глава II), описания экспериментальной части (глава III), выводов, приложений и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 233 страницах, включает 204 ссылки цитируемой литературы, 21 таблиц, 63 схем и 108 рисунков. Работа опубликована в 8 научных статьях, доложена на 14 научных конференциях.

Глава I диссертации посвящена литературному обзору, в котором обстоятельно описано современное состояние химии нафталимидных оптических сенсоров на катионы, анионы и различные биологические молекулы. Рассмотрены нафталимид-содержащие сенсоры для направленной флуоресцентной визуализации внутриклеточных структур. Также показаны основные направления дизайна новых нафталимидных люминофоров в зависимости от реализуемых механизмов переноса заряда и положений функционализации нафталимидного фрагмента. Сделаны выводы о том, какие системы будут наиболее перспективны в рамках решения задач диссертационного исследования. В литературном обзоре использованы данные по 139 литературным источникам, большинство из которых опубликованы в последние 10 лет.

Глава II посвящена представлению и обсуждению полученных диссертантом экспериментальных результатов. Проведен синтез красителей на основе пиразолил - и стирилзамещенных производных 1,8 -нафталимида; показаны схемы синтеза конъюгированных производных 1,8 - нафталимида с бактериохлорином. Кроме этого, приведены данные по получению апконверсионных тераностиков на основе наночастиц тетрафториттриата натрия. Необходимо подчеркнуть, что все описываемые соединения и их превращения подробно представлены на соответствующих схемах и рисунках. Для некоторых молекул, где это необходимо, показаны результаты рентгенструктурного анализа и спектров ЯМР. Для всех синтезированных

производных нафталимидов и их конюгатов были изучены спектрально-люминесцентные свойства в разных растворителях (зарегистрированы спектры поглощения, рассчитаны Стоксовы сдвиги, значения выхода генерации синглетного кислорода). Также следует отметить высококлассно проведенную работу по изучению механизма переноса энергии в данных молекулах методом регистрации спектров поглощения возбужденных состояний. Представлены и обсуждены результаты по изучению фотодинамической активности и флуоресценции целевых тераностиков *in vivo* и *in vitro*.

Глава III диссертации представляет собой описание экспериментальной части работы. Здесь приведена приборная база, использованная при выполнении работы, включая основные рабочие параметры. Подробно описаны методики синтеза полученных в ходе работы соединений, приведены все необходимые данные физико-химического анализа (описание ЯМР, ИК- и масс-спектров, результаты элементного анализа). Описаны методы регистрации спектров возбуждения и флуоресценции, расчета выхода генерации синглетного кислорода; приведены описания квантово-химических моделей, используемых в работе. Кристаллографические данные некоторых синтезированных молекул приведены в табличной форме в приложении. Также в приложение вошли некоторые спектры поглощения и флуоресценции наряду с двумерными спектрами ЯМР.

Выводы в полной мере соответствуют проведённому исследованию и **адекватно описывают** полученные результаты.

Достоверность полученных результатов

Результаты рецензируемой работы сомнений не вызывают, поскольку получены на основе квалифицированного применения современных методов органического синтеза и физико-химического исследования: ЯМР- и масс-спектрологии, рентгеноструктурного анализа и элементного анализа, проведен анализ спектрально-люминесцентных свойств. Часть работы, посвященная изучению биологической активности новых соединений, также не вызывает вопросов и выполнена с применением современных биомедицинских методик. Полученные результаты обсуждены с использованием новых данных современной химической литературы. Таким образом, приведённые в диссертации результаты и выводы полностью аргументированы **и не вызывают сомнений в их достоверности и доказанности.**

Практическая значимость

Синтезированные в рамках диссертационного исследования агенты-тераностики могут стать основой ряда препаратов комбинированного действия. Таким образом практическая значимость выполненной работы в приложении к биомедицинскому применению **не вызывает сомнений.**

Замечания

Работа М.А. Захарко выполнена на высоком экспериментальном уровне, тщательно оформлена, изложена четко и аргументировано. По работе **отсутствуют сколько-нибудь серьезные замечания**. Имеются вопросы, носящие дискуссионный характер:

1. Не до конца понятна мотивация синтеза соединения **16**, а также его конъюгата **34** в сравнении с конъюгатами **30-33**. Участвует ли в процессах переноса заряда донорное кольцо (соединенное с имидной группой) с двумя метокси-заместителями для данного конъюгата? Может ли данная структура влиять на фотоиндуцируемую биологическую активность соединения?
2. Хотелось бы выразить общее замечание касательно ошибок, связанных с записью *E,Z*-изомерии синтезированных стирилзамещенных производных 1,8-нафталимида. Например, для соединений **18 (а, б)**, **20** и **21** в обсуждении и экспериментальной части приведены диаметрально противоположные формы изомеров двойной связи, что вызывает некоторый диссонанс у читателя и желание рассмотреть спектры ЯМР в поисках КССВ. Необходимо поправить номенклатурные названия для данных соединений с учетом этого замечания.
3. Необходимо проверить всю нумерацию соединений в диссертации, особенно обратить внимание на соответствие текста рисункам. Например, на Рис. 6 приведены данные для соединений **8а-в**, однако в тексте идет речь про соединения **7а-в**. Но на самом деле соединений **7а-в** вообще не заявлено в ходе исследования. Необходимо проверить подписи на рисунках. Например, на Рис.10 отмечено соединение **28**, хотя из текста и по логике следует, что там должно быть **29**. Вообще стоит проверить все возможные места, где **28** может быть перепутано с **29**. Существует также некоторая проблема со сливанием слов в диссертации. Например, на стр 112 фраза «выходыхромофора-доноравприсутствиии вотсутствииакцепторасоответственно» явно требует вмешательства диссертанта. На Рис.26 (в) к сожалению пропала нижняя шкала (нм); плохо читаются буквы а, б, в, г и т.д. на объединенных рисунках.
4. При чтении абзацев, которые сопровождают рисунок 23, возникает ощущение, что перепутаны номера у соединений **30** и **31**.
5. Хотелось бы выразить признательность за качественно написанный литературный обзор по оптическим сенсорам на основе нафталимидов. Однако, название диссертации и канва, в рамках которой сделаны эксперименты, подразумевают практическое применение новых тераностиков в том числе, как агентов фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Было бы замечательно включить небольшой экскурс на эту тему в обзор современной литературы, в том

числе включить сюда некоторые свойства систем на основе тетрапиррольных фотосенсибилизаторов.

6. Из таблиц 8 и 9 и не понятно, в чем измеряется биораспределение конъюгатов в тканях.
7. Известно, что макроциклы на основе бактериохлоринов имеют свойство агрегировать, особенно, в водных растворах, что может серьезно снизить их фотодинамическую эффективность и увеличить темновую токсичность. В рамках работы на этапе биологических исследований применялся солубилизатор – кремофор. Насколько эффективно он справлялся с проблемой агрегации? Например, хорошим методом исследования агрегации подобных систем может быть изучение спектров поглощения при варьировании концентрации конъюгатов в водном растворе. Также косвенным фактом наличия серьезной агрегации может стать снижение выхода генерации синглетного кислорода в воде по сравнению с органическими растворителями. Данный эксперимент было бы отлично сделать и для понимания уровня эффективности синтезированных тераностиков во время биологического применения.
8. Хотелось бы выделить в отдельный пункт вопрос по необычным КССВ в протонных спектрах ЯМР для пиразолилзамещенных производных нафталимидов **19 (а, б), 22, 26, 27**. Например, для соединения **27** довольно сложно представить чем вызвано столь большое расщепление у протонов в положении 10 с константой $J = 16.6$ Hz.
9. Основная идея работы заключается в создании тераностических (бис)хромофорных систем, разные оптические и фотофизические свойства которых позволяли бы проводить диагностику и лечение одновременно действием одного препарата. Однако по результатам экспериментов оказалось, что наличие нафталимида и бактериохлорина внутри одной структуры сильно снижает флуоресценцию нафталимида за счет процесса FRET. При этом серьезного улучшения не наблюдалось даже в случае использования длинного ПЭГ-линкера, разделяющего фотоактивные части в пространстве. Можно ли было на этапе планирования дизайна соединений предсказать данный результат? Мог бы линкер на основе ПЭГов с более длинной цепью полностью нивелировать FRET для данных молекул? Показано, что сигнал нафталимида появляется вследствие разрушения фрагмента бактериохлорина. В связи с этим хочется уточнить, насколько может быть практично использование флуоресцентной навигации после того, как проведена ФДТ?
10. Чем был продиктован выбор агентов для биологических испытаний? Синтезированы конъюгаты **30-34**, однако *in vivo* тесты проведены только для молекул **30-32**? Ожидалась ли разная активность для данных соединений? Ведь фотофизические показатели у них примерно одинаковые.

11. В экспериментальной части отсутствуют данные по методам иммобилизации флуорофоров на поверхности наночастиц с последующей физико-химической характеристикой (определение кол-ва флуорофоров на поверхности, размера частиц и т.д.).

Тем не менее, **указанные замечания не носят принципиальный характер**, не вступают в противоречие с основными положениями диссертации и **не ставят под сомнение достоверность** полученных экспериментальных данных и сделанных выводов.

Апробация работы и публикации.

По теме диссертации опубликовано 8 статей (4 – в научных изданиях, рекомендованных ВАК, 4 – в журнале, включенном в РИНЦ). Из них 3 статьи опубликовано в журналах, индексируемых *Web of Science* (2 статьи в журнале *Phys. Chem. Chem. Phys.* и одна статья в журнале *Chem. Mater.*). Так же опубликовано 14 тезисов докладов на молодёжных, всероссийских и международных научных конференциях.

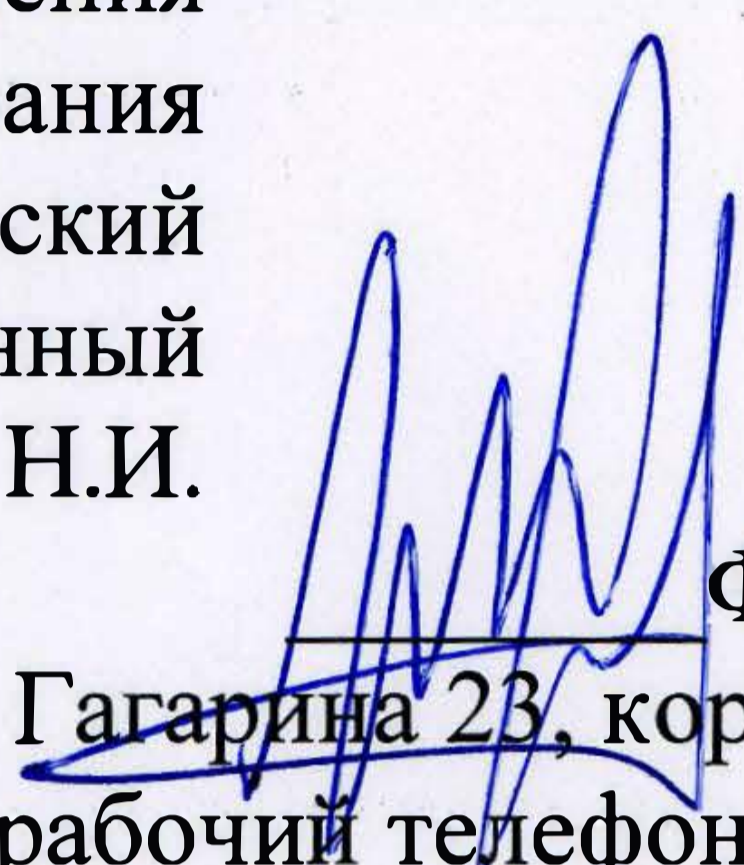
Результаты, полученные в данном диссертационном исследовании, представляют научный интерес и могут быть рекомендованы для использования в исследованиях ряда научных центров: Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Российского технологического университета (Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФГБУ Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Минздрава России и других ведущих научных коллективов, занимающихся исследованиями биологических применений флуоресцентных красителей, а также разработкой препаратов для фотодинамической терапии.

Представленная диссертация полностью **соответствует** требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335), 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, Захарко Марина Александровна, **заслуживает** присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.03 - органическая химия и 02.00.04 - физическая химия.

Отзыв подготовлен доктором химических наук, заведующим кафедрой органической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» А.Ю. Федоровым.

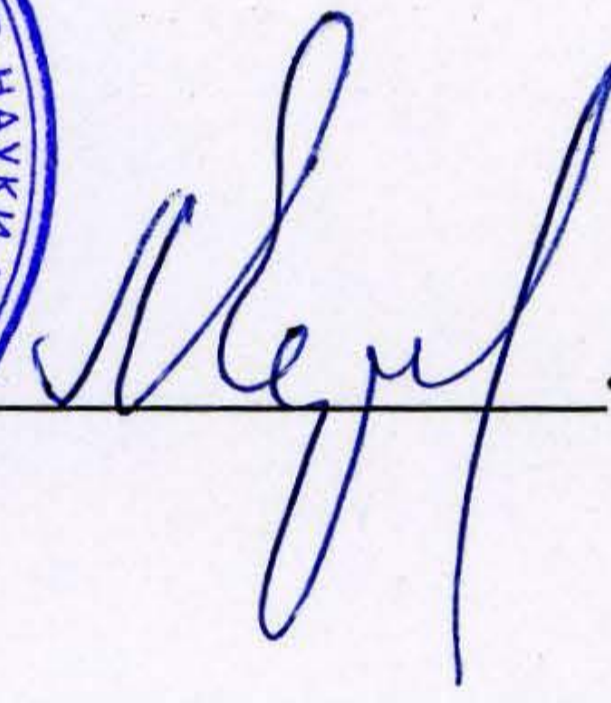
Отзыв обсуждён и утверждён на заседании кафедры органической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (протокол № 2 от «16» октября 2019 года).

Заведующий кафедрой органической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», д.х.н.



Федоров Алексей Юрьевич
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина 23, корп. 2, Химический факультет,
Кафедра органической химии; рабочий телефон: 8 (831) 462-32-32; личный телефон: +7-910-872-38-70; адрес электронной почты: afnn@rambler.ru

Подпись А.Ю. Федорова заверяю,
учёный секретарь Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского



Л.Ю. Черноморская