

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Панфилова Михаила Андреевича
«Синтез флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров оксида азота (II)»,
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.3 – органическая химия.

Актуальность темы исследования. Оксид азота (II) является важнейшим регулятором и медиатором во множестве процессов в нервной, иммунной и сердечно-сосудистой системах. В частности, он критически важен для регуляции нормального сосудистого тонуса, как медиатор вазодилатации. Он также является важным нейромедиатором, его действие ассоциируется с активацией нейронов и с различными физиологическими функциями. Оксид азота (II) также частично опосредует цитотоксичность макрофагов против микроорганизмов и злокачественных клеток. Также известно, что неконтролируемая секреция NO вызывает выработку активных форм кислорода, которые вызывают большое количество патологий, таких как развитие раковых опухолей, ишемия, септический шок, воспаление и нейродегенерация. С учетом этого, для более глубокого понимания биологической роли оксида азота необходимы инструменты, которые бы могли помочь отслеживать его секрецию в режиме реального времени *in situ* как *in vitro*, так и *in vivo*. С другой стороны, огромный интерес представляют и соединения, способные к контролируемому выделению NO, в первую очередь с точки зрения создания новых лекарственных препаратов (здесь достаточно вспомнить хорошо известный нитроглицерин). Весьма перспективными с этой точки зрения являются фотоактивируемые NO-доноры, отличающиеся способностью создавать локальные концентрации NO, а также позволяющие легко контролировать количество высвобождаемого оксида азота (II). Для получения таких соединений в настоящее время используется целый подход, основанный на введении в фотоактивную молекул тех или иных групп, способных выделять оксид азота (N-нитрозосоединения, нитрозильные и нитритные комплексы переходных металлов, соединения со стерически загруженными нитрогруппами и т.д.). Таким образом, работа Панфилова М.А., имеющая целью создание новых NO-чувствительных флуоресцентных зондов на основе 9-акридона (крайне малоизученных на настоящий момент), а также разработку новых фотоактивируемых доноров оксида азота (II) на основе BODIPY и aza-BODIPY и исследование их свойств выполнена в **актуальной** области органической химии.

Общая структура и апробация работы. Представленная диссертация состоит из введения, четырех глав – литературного обзора (глава 1), обсуждения результатов (главы 2 и 3), экспериментальной части (глава 4), заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы, а также 10 приложений. Диссертация изложена на 164 страницах, содержит 83 схемы, 5 таблиц, 38 рисунков. Библиографический список цитируемой литературы состоит из 192 наименований. Основное содержание диссертационного исследования изложено в 3 статьях в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными библиографическими базами данных (Scopus, Web of Science). Полученные результаты были также доложены на 2 конференциях различного уровня.

Литературный обзор. Литературный обзор состоит из двух основных частей и включает рассмотрение классических и современных подходов в дизайне фотоактивируемых доноров оксида азота (II), а также в дизайне NO-чувствительных флуоресцентных зондов. В первой части рассмотрены фотоактивируемые доноры NO на основе *N*-нитрозосоединений, *o*-замещенных нитроаренов, защищенных диолатов диазения. Во второй части вкратце описаны классические методы детектирования NO. Более подробно описан флуоресцентный метод анализа NO, приведены примеры известных флуоресцентных зондов, в частности, *o*-диаминоароматические соединения, а также зонды на основе дигидропиридина. В целом, литературный обзор достаточно полно отражает текущее состояние исследований в этой области, позволяет сделать вывод об актуальности и перспективности выбранной автором темы и дает возможность сопоставить полученные автором результаты с уже известными данными.

Содержание работы и её научная новизна. Вторая и третья главы диссертации посвящены обсуждению собственных исследований и содержат полученные автором результаты. Вторая глава содержит описание предпринятого синтеза производных 9-акридона, содержащих *o*-диаминовый фрагмент с использованием в качестве исходных соединений 4-карбокси-9(10*H*)-акридона и 9-акридона. Последовательное алкилирование метилйодидом либо этиловым эфиром бромуксусной кислоты и нитрование исходных соединений позволило автору получить соответствующие нитро-производные. В дальнейшем было осуществлено восстановление нитрогруппы, её ацилирование с целью защиты, нитрование полученного таким образом *N*-ацилпроизводного, снятие защитной группы и, наконец, восстановление второй нитрогруппы. Результатом этой серии превращений явились ранее не описанные *o*-диамины на основе акридона. Следует отметить, что несмотря на возможность образования нескольких изомеров (при нитровании), автором был выделен преимущественно один, желаемый изомер. В этой же главе приводится описание спектральных характеристик полученных соединений, а также изучение возможности их использования в качестве NO-зондов *in vitro*. В ходе этих исследований автором было установлено, что одно из полученных соединений – 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9-акридон – способно улавливать NO в клетках Jurkat, и в, отличие от известных коммерческих зондов, способен растворяться в водных средах.

Третья глава посвящена синтезу и изучению производных BODIPY и aza-BODIPY, содержащих стерически загруженный нитро-ароматический фрагмент и *N*-нитрозо группу, в качестве фотоактивируемых доноров оксида азота (II). Подробно описан синтез мезо-замещенных производных BODIPY на основе *n*-нитробензальдегидов, содержащих метильные либо трифторметильный заместители в *o*-положении по отношению к нитрогруппе. Кроме того, осуществлен синтез производных BODIPY, содержащих в мезо-положении *N*-нитрозо фрагмент, связанный с гетероциклическим остовом через метиленовый спейсер, а также проведена модификация полученных соединений путем введения атомов йода в пиррольный цикл. Наконец, описан синтез aza-BODIPY, содержащего две *N*-нитрозогруппы, связанные с пиррольными циклами через фениловые спейсеры. Изучены фотофизические и фотохимические свойства полученных соединений. Показано, что изменения заместителей в производных BODIPY могут приводить к изменению интенсивности флуоресценции вплоть до двух порядков, а йодированное производное характеризуется высокой эффективностью генерации синглетного кислорода. Также показано, что для полученных соединений характерна агрегационно-индуцируе-

мая эмиссия с появлением дополнительной полосы флуоресценции в красной области. Продemonстрировано, что в случае производных BODIPY, содержащих *N*-нитрозометильный заместитель, введение атомов йода в остов BODIPY приводит к дополнительной генерации синглетного кислорода. Кроме того, на примере одного из соединений этого ряда показана возможность фотодезактивации тромбоцитов *in vitro*. Интересно, что в случае соединения, содержащего два *N*-нитрозо фрагмента, выделение NO является обратимым. С использованием этого эффекта удалось разработать устройство с системой обратной связи, позволяющее поддерживать заданную концентрацию оксида азота (II) в растворе.

Совокупность проведенных исследований и впервые обнаруженных превращений обеспечивает **научную новизну** работы. В частности, необходимо особо отметить обнаруженную автором обратимость элиминирования оксида азота (II) для соединения, сочетающего остов aza-BODIPY и два фрагмента NNO; продемонстрированную на примере одного из соединений способность *N*-нитрозо соединений на основе BODIPY к эффективному ингибированию активации тромбоцитов *in vitro* при облучении светом; а также выявленную способность *o*-диаминопроизводного акридона взаимодействовать с оксидом азота (II) *in vitro* в клеточной культуре Jurkat с образованием флуоресцирующего продукта.

Достоверность полученных результатов. Полученные результаты и выводы работы убедительны. Они основаны на данных, полученных с помощью современных методов исследования: ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F -спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения. Фотофизические свойства полученных соединений исследованы методами УФ и флуоресцентной спектроскопии. Экспериментальные данные грамотно и квалифицированно интерпретированы с использованием последних литературных данных. Достоверность представленных в работе результатов не вызывает никаких сомнений.

Практическая значимость работы заключается в создании NO-чувствительного флуоресцентного зонда на основе 9-акридона, работающего в диапазоне современных флуоресцентных микроскопов; получении фотоактивируемого донора на основе aza-BODIPY, способного обратимо выделять NO при облучении ближним инфракрасным светом, а также разработку установки с системой обратной связи, позволяющей поддерживать постоянную заданную концентрацию NO в растворе *in vitro*. В совокупности, это открывает возможности использования такого донора в качестве буферной NO-системы при проведении биологических исследований. Наконец, выявленные закономерности влияния заместителей в красителях BODIPY, содержащих *N*-нитрозо фрагменты, в перспективе позволят более точно настраивать свойства желаемых фотоактивируемых доноров как с точки зрения эффективности выделения NO, так и с точки зрения комбинационного действия NO и синглетного кислорода.

Каких-либо существенных возражений, касающихся сути работы, по прочтении диссертации Панфилова М.А. не возникает. Тем не менее, имеются некоторые **замечания**:

1. Чем обусловлен выбор исходных соединений, использованных для синтеза диаминопроизводных 9-акридона? Обращает на себя внимание, что оба соединения (**122** и **130**), содержат в своей структуре карбоксильную группу, причем в случае соединения **130** этот фрагмент вводился предварительно. Играет ли эта группа какую-либо роль, и в чем она заключается?

2. На стр. 68, при обсуждении синтеза соединения **133** путем нитрования соединения **132**, приводится его выход – 23%. В следующем предложении говорится, что «Региоселективность нитрования была... подтверждена...». Не вполне понятно, о какой региоселективности идет речь – низкий выход целевого продукта говорит, на мой взгляд, как раз об отсутствии таковой. Для сравнения – выход аналогичного продукта нитрования **127** (и в тех же условиях) составил 75%.
3. На стр. 87 говорится, что «Данный метод (*прим. – образование продукта замещения по метильной группе при обработке соединения **141** гидридом натрия и амином*)... может быть использован для получения...» и тут же сообщается о «весьма незначительном» выходе продукта в этой реакции. На мой взгляд, первая часть предложения противоречит второй – если выход продукта настолько низок, вряд ли метод может рассматриваться как препаративный.
4. Вызывает некоторое недоумение упомянутое на стр. 100 использование эфирата трёхфтористого бора для генерирования енолята кетона. На мой взгляд, для генерирования енолята необходима основная среда, а не наличие кислоты Льюиса. Этот момент требует отдельного пояснения.
5. В работе имеется ряд неудачных фразы, стилистических погрешностей и оформительских недочетов. Так, не вполне понятно, что имелось в виду под «соединениями-донорами» (стр. 99); на стр. 75 упомянуты «напряженные нитрогруппы» – термин, смысл которого мне неясен; часто при описании спектров ЯМР автор употребляет фразы вида «дубликаты от водородов», «широкий сигнал», тавтологичная фраза «характерно появление характерного сигнала» и т.д.
6. У некоторых соединений в экспериментальной части отсутствует спектр ЯМР ^{13}C . Не вполне понятно, являются ли эти соединения ранее описанными (тогда стоило бы привести ссылку на опубликованные данные), либо его не удалось зарегистрировать по каким-то другим причинам (низкая растворимость, нестабильность соединения и т.д.). В этом случае стоило бы это также отдельно отметить.

Указанные замечания не влияют на общую высокую оценку работы, не ставят под сомнения ценность полученных автором результатов и ни в коей мере не умаляют научную значимость диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Панфилова Михаила Андреевича на тему «Синтез флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров оксида азота (II)» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи, имеющей большое значение для органической химии, а именно – создание новых фотоактивируемых доноров оксида азота (II) на основе BODIPY и aza-BODIPY, а также создание нового NO-чувствительного флуоресцентного зонда на основе 9-акридона. Автором проведено актуальное исследование, выполненное на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Автореферат и публикации соответствуют основному содержанию диссертации. Полученные автором результаты и сделанные на их основе выводы достоверны и не вызывают сомнений. Автором корректно цитируются как литературные данные, так и собственные публикации, вероятность плагиата полностью исключена. Диссертация соответствует специальности 1.4.3 – Органическая химия.

Учитывая актуальность, научную и практическую значимость представленной работы, достоверность полученных результатов и обоснованность выводов, считаю, что диссертационная работа «Синтез флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров оксида азота (II)» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Панфилов Михаил Андреевич – заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия.

Официальный оппонент,
ведущий научный сотрудник лаб.
Элементоорганического синтеза им А.Н.
Пудовика ИОФХ им. А.Е. Арбузова –
обособленного структурного подразделения
ФИЦ КазНЦ РАН,
доктор химических наук по специальности
1.4.3. (02.00.03) Органическая химия

Газизов Альмир Сабинович

13 сентября 2023 г.

Подпись Газизова А.С.
Заверяю вед. документов орг. б.а.о.
Л.И. Гизатуллина
" 13 " сентября 20 23 г.



Газизов Альмир Сабинович, ведущий научный сотрудник лаборатории Элементоорганического синтеза им А.Н. Пудовика Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

420088, РФ, г. Казань, ул. Арбузова, 8. Телефон: +7 (843)272-73-24; e-mail: agazizov@ioprc.ru