

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Новосибирского
института органической химии им.
Н.Н. Ворожцова Сибирского
отделения Российской академии
наук (НИОХ СО РАН)



д.ф.-м.н., профессор
Е.Г. Багрянская
» июня 2023

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН).

Диссертация Панфилова Михаила Андреевича «Синтез флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров оксида азота (II)» выполнена в Лаборатории фотоактивируемых процессов НИОХ СО РАН.

Соискатель Панфилов Михаил Андреевич работает в НИОХ СО РАН с 01 июля 2019 года по настоящее время и занимает должность младшего научного сотрудника Лаборатории фотоактивируемых процессов.

В 2019 году Панфилов Михаил Андреевич окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Факультет естественных наук по специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия», кафедра органической химии.

С «01» сентября 2019 года зачислен на обучение в очную аспирантуру НИОХ СО РАН по направлению подготовки 04.06.01 «Химические науки», специализация «Органическая химия» (приказ о зачислении № 76 от «09» августа 2019 г.), с 09.12.2022 г. приказом № 46-асп от «09» декабря 2022 г. переведен на обучение по программам подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре, реализуемым в соответствии с федеральными государственными требованиями (ФГТ) по научной специальности 1.4.3

специальности 1.4.3 «Органическая химия» (химические науки) и по настоящее время продолжает обучение в очной аспирантуре НИОХ СО РАН.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана НИОХ СО РАН в 2023 году.

Тема диссертационной работы утверждена на заседании Ученого Совета НИОХ СО РАН (протокол № 7 от «17» сентября 2019 г.).

Научный руководитель: к.х.н, с.н.с. Воробьев Алексей Юрьевич, заведующий лабораторией фотоактивируемых процессов.

Отзыв рецензента к.х.н., доцента Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ТПУ Петунина Павла Васильевича на диссертационную работу – положительный.

При обсуждении диссертационной работы на научном семинаре были заданы следующие вопросы:

1. Что вы можете сказать о токсичности ваших N-нитрозо соединений и их предшественников?
2. Насколько глубоко проникает красный свет?
3. Что образуется при взаимодействии соединения 135 с NO?
4. Почему вы хотели получить именно четвертичные аммонийные соли соединений аза-BODIPY?
5. Насколько хорошим можно считать увеличение интенсивности флуоресценции вашего сенсора и можно ли его сравнить с коммерческими примерами?
6. Вы использовали люминесценцию для подтверждения выделения оксида азота?
7. Что вы имеете в виду говоря фразу «эффективность выделения»?
8. Чем можно объяснить низкий выход соединения 162 и пытались ли вы изменить условия проведения реакции?
9. Являются ли процессы флуоресценции и генерации синглетного кислорода побочными в реакции фото изомеризации нитрогруппы ваших соединений?
10. Какой продукт получается при выделении NO после фотоиндуцируемой изомеризации?
11. Проявляет ли оставшийся радикал цитотоксический эффект?

По итогам обсуждения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность темы. Благодаря широкому спектру биологических и физиологических действий оксида азота (II), углубленное изучение и понимание его роли в живых организмах представляет собой актуальную задачу, поскольку отклонение от нормального уровня оксида азота (II) может приводить к различным заболеваниям. Хотя

является относительно стабильным свободным радикалом, он легко и быстро реагирует со свободными радикалами и металлсодержащими белками в биологических системах, оказывая физиологические или патофизиологические эффекты. В связи с этим, 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*.

Флуоресцентная микроскопия с использованием NO-чувствительных флуоресцентных зондов является крайне привлекательным методом анализа, поскольку отличается высокой чувствительностью, высокой скоростью ответа, а также хорошим пространственным разрешением. Несмотря на достигнутый прогресс в области флуоресцентных NO-чувствительных зондов, их ограничения зачастую, по-прежнему, является их подверженность окислению, возможное взаимодействие с различными соединениями, присутствующими в клетках (глутатион, аскорбиновая кислота), «утекание» из клеток, а также растворимость, в связи с чем поиск новых зондов, основанных на различных красителях, по-прежнему является актуальной задачей.

Для исследования влияния NO удобно использовать вещества, которые могут высвобождать NO в контролируемых количествах. Для этой цели перспективным выглядит использование веществ, которые высвобождают оксид азота (II) под действием света. Преимуществами использования таких соединений являются возможность с их помощью создавать локальные концентрации NO, а с помощью химических модификаций можно улучшать средства их доставки. В настоящее время для синтеза фотоактивируемых доноров оксида азота (II) используются различные подходы, например, получение нитрозильных и нитрито-комплексов переходных металлов, *N*-нитрозо соединений, «упакованных»-NONO-атов и соединений, содержащих в своем остове стерически напряженную нитрогруппу. Также на основе вышеперечисленных подходов в настоящее время разрабатываются различные материалы, способные выделять NO под внешним воздействием.

Научная новизна работы. Синтезированы 2-диамино-10-(карбоксиметил)-9(10*H*)-акридон и 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10*H*)акридон – производных 9-акридона, содержащие NO-чувствительные фрагменты и исследованы их фотофизические свойства 1,. Было показано, что 7,8-диамино-4-карбокси-10-метил-9(10*H*)акридон способен успешно взаимодействовать с оксидом азота (II) *in vitro* в клеточной культуре Jurkat с образованием флуоресцирующего продукта.

Были впервые получены производные BODIPY, в остов которых напрямую через мезо-положение были введены арильные заместители, содержащие стерически

напряженную нитрогруппу. Для полученных соединений BODIPY, был показан эффект агрегационно-индуцируемой эмиссии при различных соотношениях растворителей (вода:этанол).

Были разработаны методы получения N-нитрозо соединений на основе остова BODIPY, позволяющие получать различные производные всего лишь в несколько стадий из общего стартового вещества. Наиболее эффективным фотоактивируемым донором NO оказался $N-((5,5\text{-дифтор-}1,3,7,9\text{-тетраметил-}5H\text{-}4\lambda^4,5\lambda^4\text{-дипирроло}[1,2\text{-}c:2',1'\text{-}f][1,3,2]\text{диазaborинин-}10\text{-ил)метил})\text{-}N\text{-фениламид азота}$, для которого квантовый выход высвобождения составляет $QY_{NO} = 5.5 \times 10^{-4}$, что сопоставимо с QY_{NO} для ранее описанных в литературе доноров. Было показано, что данное соединение способно эффективно ингибировать активацию тромбоцитов *in vitro* при облучении светом. Также было установлено, что алкилирование по атому бора и введение атомов йода в ядро хромофора уменьшает эффективность выделения NO, но влияет на способность к генерации синглетного кислорода.

Был осуществлен ряд превращений, которые позволили получить фотоактивируемый донор на основе аза-BODIPY, содержащий в своем остове два N-нитрозо фрагмента, способный выделять NO под воздействием ближнего инфракрасного света в зависимости от интенсивности используемого излучения. Также на основе полученного вещества была реализована система с обратной связью, позволяющая активно поддерживать заданную концентрацию оксида азота в образце, управляя интенсивностью лазерного излучения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанные подходы к модификациям остова 9-акридона позволили получить новый NO-чувствительный флуоресцентный зонд, работающий в диапазоне современных флуоресцентных микроскопов. Также полученные производные 9-акридона могут представлять интерес в качестве стартовых соединений для получения различных новых гетероциклов.

Установленные закономерности влияния заместителей в красителях BODIPY, содержащих N-нитрозо фрагменты, 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.

Полученный фотоактивируемый донор на основе аза-BODIPY эффективно выделял NO при облучении ближним инфракрасным светом. Особенностью полученного донора является возможность обратного захвата оксида азота (II), что открывает перспективы использования такого донора в качестве буферной системы при проведении биологических исследований. Также на основе полученного донора была разработана установка с системой

обратной связи, позволяющая поддерживать постоянную заданную концентрацию NO в растворе *in vitro*.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы использовались как классические, так и современные методы органического синтеза, основанные на реакциях конденсации, ароматического электрофильного замещения, аминирования и других классических реакциях органической химии. Выделение и очистка соединений осуществлялись методами экстракции, осаждения, хроматографии и кристаллизации. В работе использовались физико-химические методы установления структуры и чистоты химических соединений: ЯМР и масс-спектрометрия высокого разрешения.

Достоверность результатов проведенных исследований. Степень достоверности обеспечена тщательностью проведения эксперимента и применением современных физико-химических методов исследования структур. Строение всех впервые полученных веществ доказано методами ^1H , ^{13}C , ^{19}F ЯМР, и масс-спектрометрии высокого разрешения. Достоверность результатов подтверждается независимой экспертизой опубликованных материалов в рецензируемых научных изданиях и апробацией на российских и международных конференциях.

Диссертационная работа соответствует научной специальности 1.4.3 «Органическая химия» (химические науки), предусмотренной номенклатурой научных специальностей, по которым присуждаются ученые степени, утвержденной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Полнота опубликования результатов. По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и 2 сообщения в виде тезисов докладов.

Список статей в рецензируемых журналах:

1. Design and Synthesis of New Acridone-Based Nitric Oxide Fluorescent Probe / M. Panfilov, D. Chernova, I. Khalfina [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 14. – P. 4340.
2. Photophysical properties of BODIPYs with sterically-hindered nitrophenyls in meso-position / M. A. Panfilov, T. Yu. Karogodina, Y. Songyin [et al.] // *Journal of Luminescence*. – 2022. – Vol. 246. – P. 118837.
3. Photocontrolled release of nitric oxide for precise management of NO concentration in a solution / E. O. Zhernolenko, T. Yu. Karogodina, A. Yu. Vorobev [et al.] // *Materials Today Chemistry*. – 2023. – Vol. 29. – P. 101445.

Конференции, на которых представлены материалы диссертационной:

1. М.А. Панфилов, А.Ю. Воробьев. Дизайн и синтез новых NO чувствительный флуоресцентных зондов на основе 9-акридона. Сборник тезисов Всероссийского конгресса по химии гетероциклических соединений, «КОСТ-2021», С. 253. Сочи, Россия, 2021. (стендовый доклад)
2. М.А. Панфилов, Т.Ю. Карогодина, И.С. Третьякова, А.Ю. Воробьев, А.Е. Москаленский. N-Nitroso-BODIPY derivatives as effective light activated NO donors. Сборник тезисов международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» – «BGRS/SB-2022», С. 793. Новосибирск, Россия, 2022 г. (стендовый доклад)

Личный вклад соискателя. Во всех публикациях вклад, внесенный соискателем в химическую часть исследования (выполнение экспериментальной работы, обсуждение результатов химического эксперимента и подготовку материала к публикации), является основным.

Личный вклад соискателя состоит в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении всех химических экспериментов, обработке экспериментальных данных, анализе и интерпретации полученных результатов, подготовке научных статей и тезисов к публикации.

Факт соответствия/несоответствия диссертации Критериям, установленным в соответствии с Федеральным законом от 23.08.1996 № 127-ФЗ «О науке и государственной научно-технической политике»: соответствует.

Диссертационная работа «Дизайн флуоресцентных индикаторов и фотоактивируемых доноров оксида азота (II)» Панфилова М.А. рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 «Органическая химия» (химические науки).

Заключение принято на заседании Объединенного научного семинара ФГБУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Присутствовало на заседании 42 чел., в том числе 19 кандидатов наук и 10 докторов наук. Результаты голосования: «за» - 42, «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол заседания № 9 от «09» июня 2023.

Председатель семинара

Зам. директора по научной работе

НИОХ СО РАН

к.х.н,

Секретарь семинара

с.н.с. лаборатории гетероциклических соединений НИОХ СО РАН

к.х.н

Морозов Д.А.

Оськина И.А.

«9» июня 2023