

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Юрьева Данила Юрьевича** на тему «Дизайн и синтез новых производных 1,8-нафталимида и их применение в нанотехнологии и флуоресцентной биовизуализации», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. «Органическая химия»

**Актуальность темы исследования.** Современные методы флуоресцентной микроскопии представляют собой важный инструмент для исследования биологических систем в биомедицине и требуют использования флуоресцентных меток, которые могут быть представлены органическими флуорофорами. Одним из перспективных классов люминофоров являются производные 1,8-нафталимида, нашедшие широкое применение в различных областях науки и техники, в частности, в получении флуоресцентных сенсоров, текстильных красителей, органических светодиодов, а также диагностических и терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний. Среди многообразия органических флуорофоров производные 1,8-нафталимида выделяются уникальным сочетанием свойств: химической активностью, перспективными спектрально-люминесцентными характеристиками и благоприятным биологическим профилем (низкая токсичность, наличие биологической активности). Варьирование заместителей в ароматическом ядре (введение *O*-, *S*- или *N*-содержащих групп) позволяет получать флуорофоры, люминесцирующие в широком диапазоне оптического спектра, что важно для решения различных научных задач.

Одной из активно развивающихся тем исследований является разработка систем адресной доставки лекарственных веществ с возможностью флуоресцентной визуализации *in vitro* и *in vivo*. Так, все большее применение находят системы, получаемые на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) и человеческого сывороточного альбумина благодаря их биосовместимости и низкой токсичности. Достоинство оптической платформы 1,8-нафталимида заключается в возможности относительно легкого введения реакционноспособных групп для последующей ковалентной функционализации полимерной матрицы. Более того, наличие векторных групп при имидном атоме азота позволяет увеличить избирательное накопление наносистем. Таким образом, синтез флуорофоров, отвечающих перечисленным требованиям, и получение на их основе флуоресцентных систем адресной доставки представляет собой одно из наиболее приоритетных направлений в современной науке.

**Целью** представленной диссертационной работы является разработка методов синтеза новых производных 1,8-нафталимида, обладающих флуоресценцией в широком диапазоне оптического спектра, и создание на их основе полимерных систем адресной доставки фармацевтических субстанций с возможностью флуоресцентной биовизуализации.

**Научная новизна** результатов исследования заключается в получении 23 новых соединений, среди которых 6 производных 4-(2-гидроксиэтилтио)-1,8-нафталимида, содержащих 4-(2-аминоэтил)морфолиновый, *N*-гозилэтилендиаминовый, *N,N*-диметилэтилендиаминовый, этилендиаминовый, гексаметилендиаминовый и пропилкарбоксийный заместители при имидном атоме азота для создания флуорофоров для ковалентной модификации PLGA. Введение в структуру флуорофоров векторных групп потенциально позволяет использовать их для селективного мечения клеточных органелл – лизосом, эндоплазматического ретикулума, митохондрий.

В работе синтезировано 6 новых производных 1,8-нафталимида, содержащих первичную аминогруппу, и 2 ранее неописанных флуорофора, содержащих карбоксийную группу. На основе соединений, излучающих в диапазоне 460-625 нм, осуществлена

ковалентная модификация PLGA с получением 12 новых конъюгатов, которые были использованы для получения флуоресцентных наночастиц.

Автором впервые получено 5 новых малеимидных производных 1,8-нафталимида для ковалентной модификации человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

Синтезировано 4 новых *O*-, *S*- и *N*-замещенных производных 1,8-нафталимида, содержащих бисфосфонатный фрагмент. Впервые в мировой практике проведена флуоресцентная визуализация остеотропной системы адресной доставки на основе PLGA на клеточной линии остеосаркомы Saos-2, что открывает возможность для разработки эффективных тераностических агентов для лечения заболеваний костной ткани.

**Теоретическая и практическая значимость** заключается в том, что синтез и исследование новых производных 1,8-нафталимида расширяют фундаментальные представления о взаимосвязи структуры и фотофизических свойств в ряду гетероциклических флуорофоров. Полученные данные о влиянии природы заместителей (*O*-, *S*-, *N*-содержащих, а также малеимидных и бисфосфонатных фрагментов) на спектрально-люминесцентные характеристики соединений вносят вклад в понимание механизмов фотофизических процессов, включая формирование ПИСТ-состояния, и создают основу для направленного дизайна флуорофоров с заданными свойствами.

В работе получены новые производные 1,8-нафталимида, содержащие векторные группы, обеспечивающие селективное нацеливание на лизосомы, эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Синтезированы флуорофоры с  $\alpha$ -гидроксифосфонатным фрагментом, которые могут быть использованы для визуализации гидроксиапатита в мягких тканях, а также при исследовании микрокальцинозов и метастатических поражений костной ткани.

Разработанные малеимидные производные 1,8-нафталимида позволяют осуществлять ковалентную модификацию человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), расширяя число флуоресцентных систем доставки на основе природных полимеров.

Ковалентная модификация сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) синтезированными флуорофорами представляет собой один из первых примеров создания систем адресной доставки с возможностью флуоресцентной визуализации на основе данного класса соединений. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что наночастицы PLGA–1,8-нафталимид характеризуются высокой флоростабильностью, сопоставимой со стабильностью частиц на основе коммерчески доступных маркеров, что позволяет проводить долговременные исследования распределения нанообъектов и их взаимодействия с клетками в сложных биологических средах.

Полученные в работе соединения могут рассматриваться в качестве доступной отечественной альтернативы зарубежным флуоресцентным маркерам, применяемым в нанотехнологии для визуализации систем адресной доставки, а также в микроскопии для исследования биологических объектов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработаны методы синтеза *O*-, *S*- и *N*-замещенных производных 1,8-нафталимида, содержащих амино-, карбокси-, гидрокси- и малеимидные функциональные группы. Полученные соединения позволяют осуществлять ковалентную модификацию полимеров природного (ЧСА) и синтетического (PLGA) происхождения с целью создания флуоресцентных систем адресной доставки.

2. Предложенные подходы к синтезу *O*-, *S*- и *N*-замещенных 1,8-нафталимидов, содержащих  $\alpha$ -гидроксифосфонатный фрагмент, обеспечивают возможность визуализации гидроксиапатита и создают основу для разработки остеотропных систем адресной доставки.

3. Ковалентное связывание синтезированных производных 1,8-нафталимида с сополимером молочной и гликолевой кислот (PLGA) и человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) приводит к образованию флуоресцентных конъюгатов, перспективных для создания систем адресной доставки биологически активных соединений.

4. Спектрально-люминесцентные свойства синтезированных флуорофоров (положение максимумов поглощения и эмиссии, квантовые выходы флуоресценции, фотостабильность) сохраняются после их ковалентного связывания с полимерами и при формировании наночастиц на основе полученных конъюгатов.

5. Наночастицы на основе PLGA, меченные производными 1,8-нафталимида, эффективно интернализируются клетками мышины карциномы молочной железы линии 4T1 и могут быть визуализированы методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, что подтверждает их пригодность для изучения внутриклеточного распределения *in vitro*.

6. Впервые экспериментально продемонстрирована способность S-замещенного 1,8-нафталимида с бисфосфонатным фрагментом и полученных на его основе PLGA-наночастиц, загруженных доксорубицином, к избирательному связыванию с гидроксипатитом и визуализации клеток остеосаркомы линии Saos-2, что свидетельствует о перспективности данных соединений в качестве флуоресцентных зондов для исследования костной ткани и создания тераностических систем.

**Общая характеристика диссертационной работы.** Диссертация включает в себя введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальную часть, заключение, список сокращений, список литературы из 169 источников. Работа содержит 23 таблицы и 63 рисунка.

**Во введении** четко обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость.

**Первая глава** – литературный обзор, посвященный последним достижениям в области флуоресцентных систем адресной доставки на основе полимеров природного и синтетического происхождения, модифицированных производными 1,8-нафталимида. Кроме того, автором представлены примеры разработки флуоресцентных зондов, содержащих векторные функциональные группы для селективного связывания с клеточными структурами. Обзор характеризуется строгой логической структурой и представляет собой целостный анализ, напрямую соответствующий тематике диссертации.

**Во второй главе** изложены основные результаты исследования. В первой части описаны подходы к получению малеимидных производных 1,8-нафталимида, рассмотрены условия реакций для введения малеимидной группы, исследованы спектрально-люминесцентные свойства флуорофоров и получены наночастицы на основе ковалентно модифицированного ЧСА. Вторая часть посвящена синтезу amino-, гидрокси- и карбоксильных производных 1,8-нафталимида для ковалентной модификации PLGA. Описан ультразвуковой метод получения наносомальных форм, проведено сравнительное исследование оптических свойств флуорофоров как в свободном виде, так и структуре наночастиц. Важным достоинством исследования является демонстрация успешной визуализации полученных частиц на клеточной линии карциномы молочной железы мыши 4T1. В третьей части представлены результаты по синтезу производных 1,8-нафталимида, содержащих  $\alpha$ -гидроксифосфонатный фрагмент, и получению на их основе остеотропной системы адресной доставки. С помощью PLGA-наночастиц, меченных S-замещенным бисфосфонатом и загруженных доксорубицином гидрохлоридом, на клеточной линии остеосаркомы Saos-2 было показано, что полимерная матрица связывается с отложениями гидроксипатита, в то время как лекарственное вещество локализуется в ядрах клеток.

В третьей главе представлены основные экспериментальные методики получения и исследования рассматриваемых соединений и систем адресной доставки на их основе.

В заключении сформулированы ключевые выводы и предложены перспективные направления для будущих разработок.

Таким образом, автором работы проведена комплексная экспериментальная работа по синтезу ранее неописанных производных 1,8-нафталимида и получению на их основе флуоресцентных систем адресной доставки. Достигнутые результаты отличаются новизной и достоверностью и подтверждены исследованиями *in vitro* на различных клеточных моделях.

Автореферат и приведенные публикации автора полностью отражают содержание диссертации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе данных научного цитирования Scopus, и 9 тезисов международных и всероссийских конференций.

Тем не менее, несмотря на общее положительное впечатление о работе, по ее содержанию имеются вопросы и замечания.

1. На стр. 24 автор упоминает метилкарбитоловые фрагменты для нацеливания на лизосомы. Может ли автор привести конкретный пример использования этих групп (в диссертации отсутствует ссылка на литературный источник) и предложить механизм удерживания модифицированных ими молекул в лизосомах?

2. На чем основана чувствительность к изменениям pH бисфосфонатов 29, 32 и как изменяется интенсивность флуоресценции при снижении pH для BODIPY?

3. Почему для получения 4-хлор-1,8-нафталевого ангидрида (2) диссертант не использовал прямую обработку 1,8-нафталевого ангидрида гипохлоритом натрия в воде?

4. стр. 51 «Образующийся 4-морфолинил-1,8-нафталевый ангидрид 15 на второй стадии подвергали ацилированию 4-кратным избытком соответствующих аминов при кипячении в этиловом спирте в течение 8-10 часов». Данная реакция представляет собой или ацилирование амина или аминирование ангидрида, но не ацилирование ангидрида амином.

5. При обсуждении спектральных свойств соединений, например, в тексте обсуждения со ссылкой на таблицы 6-9, отсутствует сравнение яркости предложенных флуорофоров с имеющимися в литературе аналогами.

6. Стр. 75: «Для получения более гидрофильного бисфосфоната 53 в положение 4 ароматического кольца вводили этоксиэтильный заместитель по реакции соединения 51 с этилцеллозольвом в присутствии безводного карбоната калия.» Действительно ли введение четырех метиленовых звеньев (как в этоксиэтиле) повышает гидрофильность по сравнению с компактной метоксигруппой?

7. Данные, представленные на рисунке 54, не соответствуют данным, приведенным в таблице 14. Вероятно, автором нарушена нумерация соединений. Согласно таблице, флуорофоры 52 и 53 имеют самые длинноволновые спектры излучения, а на рисунке они – самые коротковолновые. Кроме того, в таблице необходимо приводить оба максимума поглощения. Например, для флуорофора 53 максимум при 436 нм – минорный (вряд ли КМЭ при 436 нм составляет  $8400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

8. Для повышения значимости полученных результатов желательно было бы оценить цитотоксичность наночастиц PLGA-57-Dox для дифференцированных и недифференцированных клеток Saos-2.

9. Для однозначной атрибуции накопления доксорубина в ядрах необходимо было использовать красители (DAPI, Hoechst), окрашивающие ядра, в синем канале микроскопа.

10. Стр. 87: «Спектры ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  регистрировали на спектрометрах компании Bruker с рабочей частотой 300, 400 МГц (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского ИОХ РАН), внутренний стандарт – тетраметилсилан.» Для  $^{31}\text{P}$  спектров в качестве

внутреннего стандарта обычно используется 85%-я ортофосфорная кислота. Не указано, при какой частоте регистрировали спектры  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$ .

11. По возможности на спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР необходимо было указать сигналы, соответствующие эквивалентным атомам углерода так, чтобы суммарное количество углеродов соответствовало брутто-формуле.

12. В тексте работы присутствует незначительное количество опечаток, не влияющих на общее качество изложения материала.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают положительную оценку диссертационной работы в целом.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация Юрьева Д. Ю. соответствует паспорту научной специальности 1.4.3. «Органическая химия» в части: п. 1. Выделение и очистка новых соединений; п. 7. Выявление закономерностей типа «структура – свойство».

Диссертация Юрьева Данила Юрьевича на тему «Дизайн и синтез новых производных 1,8-нафталимида и их применение в нанотехнологии и флуоресцентной биовизуализации», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. «Органическая химия», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой решается актуальная научная проблема, связанная с разработкой эффективных флуорофоров для флуоресцентной биовизуализации.

Диссертационная работа Юрьева Данила Юрьевича на тему «Дизайн и синтез новых производных 1,8-нафталимида и их применение в нанотехнологии и флуоресцентной биовизуализации» отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, определенным Положением о порядке присуждения ученых степеней в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», утвержденным приказом и.о. ректора РХТУ им. Д.И. Менделеева от 14.09.2023 г. № 103 ОД, а её автор, Юрьев Данил Юрьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. «Органическая химия».

### Официальный оппонент

**Аралов Андрей Владимирович**

доктор химических наук, доцент, старший научный сотрудник (группа молекулярных инструментов для исследования живых систем) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук

« 1 » июня 2026 г.

Подпись д.х.н., доц. А. В. Аралова заверяю:  Олейников Владимир Александрович  
Ученый секретарь ГНЦ ИБХ РАН,  
доктор физико-математических наук

### Контактные данные

Тел.: +7! \_\_\_\_\_

l.ru

Почтовый адрес: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1