

ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора химических наук Чканикова Николая Дмитриевича на диссертационную работу Пугачёва Дмитрия Евгеньевича на тему “Синтез и свойства гетероциклических комплексонов лантаноидов для иммунофлуоресцентного анализа”, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Иммунофлуоресцентный анализ (ИФА) с временным разрешением является современным способом определения широкого круга задач, касающихся ранней диагностики заболеваний, отклонений, патологий с помощью реакций биоспецифического взаимодействия. Как правило, в качестве аналитического маркера для определения данного взаимодействия чаще используются комплексы органических лигандов с лантаноидами. Уникальность данных систем заключается в наличии большого Стоксова сдвига (>200 нм), узких полос эмиссии и длительного времени жизни люминесцентного состояния (>300 мкс), что позволяет с высокой точностью определять биоаналиты.

Для развития и совершенствования методов иммунофлуоресцентного анализа необходим поиск новых комплексонов, имеющих спектральные преимущества по сравнению с применяющимися реагентами. На спектральные свойства используемых соединений сильное влияние оказывает сопряженная система, включающая в себя ароматический или гетероароматический фрагмент. Использование гетероароматических систем, является особенно перспективным, так как введение гетероатома сильно изменяет как химические, так и спектральные свойства образующихся соединений. Эффективность применения таких органических реагентов определяет возможности специфической диагностики заболеваний, **что определяет высокую актуальность** диссертационной работы Д.Е. Пугачёва.

Цель диссертационной работы Д. Е. Пугачёва заключалась в создании новых комплексонов редкоземельных элементов бензогетероциклического типа и дальнейшая оценка потенциальной возможности использования полученных соединений в иммунофлуоресцентном анализе с временным разрешением. Исследование велось по трем основным направлениям, каждое из которых включает синтез и изучение прикладных свойств бензогетероциклических комплексонов. Анализ литературных сведений об органических реагентах для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА), проведенный автором, представляется достаточно серьезным обоснованием для реализации данных направлений. Автором рассмотрено почти 200 оригинальных работ, из которых более 70% работ зарубежных научных школ.

Структура диссертации. Диссертация построена по классическому типу и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), обсуждения результатов (глава 2), экспериментальной части (глава 3), заключения, списка использованных сокращений, списка использованных источников и приложения. Работа изложена на 165 страницах, имеет 198 ссылок, 13 таблиц, 63 схемы, 17 рисунков.

Работа Д.Е.Пугачева содержит три подраздела в главе «Обсуждение результатов». В ходе разработки новых фторсодержащих енаминонов на основе бензофурана автору удалось получить и изучить региоизомерные бензофурантрифторметилсодержащие енаминоны. Такие енаминоны были получены по двухстадийной схеме через промежуточные галогенены в процессе получения которых и была выявлена различная региоселективность реакций в зависимости от типа использованного галогенирующего реагента: PBr_3 или $SOCl_2$. Доказательства различий региоизомеров осуществлено методом ЯМР-спектроскопии, что характеризует автора как подготовленного химика-органика умеющего использовать физико-химические методы анализа. При изучении комплексообразования и люминесцентно-спектральных характеристик енаминонов определено, что, несмотря на

образование комплексов, люминесценция наблюдается в слабой степени. В дальнейшем на основании спектральных исследований было высказано предположение, что происходит гидролитическое превращение комплексов енаминонов в комплексы β -дикетона.

Во второй части работы Д.Е.Пугачевым получены карбазолсодержащие тетракетоны с заместителями донорного и акцепторного характера у атома азота. Эта часть работы представляется основным достижением автора. В процессе работы были применены оригинальные синтетические методы для получения прекурсоров целевых соединений. Действительно, коммерческие реагенты на основе карбазола имеют ограниченную доступность, а работа с производными карбазола имеет свою специфику и здесь заметна подготовленность диссертанта, как химика-органика. Получен ряд N-спейсеросодержащих соединений с карбоксильными функциональными группами и перфторалкильными радикалами различной длины. Синтетические успехи при получении чистых гетероциклических комплексонов определили возможности изучения комплексообразования и люминесцентно-спектрального изучения этих перспективных комплексонов. Для всех полученных соединений были определены основные люминесцентно-спектральные характеристики (значение коэффициента экстинкции (ϵ), квантовый выход (Φ), показатель светимости ($\epsilon \times \Phi$), интенсивности люминесценции (I)), а также устойчивость образующихся комплексов с ионом Eu^{3+} во времени по сравнению с известными реагентами ряда гетероциклических и ароматических фторсодержащих β -дикетонов. В этой части работы выявлены закономерности изменения свойств комплексов полученных соединений с европием (III) в зависимости от заместителей у атома азота карбазольного фрагмента и величины перфторалкильных радикалов. В условиях реального иммуноанализа выявлены улучшенные показатели, которые могут служить основой для последующего применения представителей веществ изучаемого ряда. Кроме этого, N-спейсеросодержащий карбазол введен в конъюгирование со стрептавидином, а

меченный конъюгат является новым иммунореагентом, который послужил основой для подачи заявки на патентование. Для него приведена степень маркирования и значения интенсивности люминесценции полученного реагента с Eu^{3+} . Проведено исследование формирования нанодисперсий на основе аэрогеля Аэросила 380 с спейсерсодержащими карбазолами, которое выявило как высокую устойчивость, так и существенную интенсивность люминесценции получаемых наночастиц во времени. Таким образом, карбазолсодержащие тетракетоны с заместителями у атома азота получили комплексную оценку в качестве перспективных реагентов для ИФА.

Третья часть работы посвящена разработке методик получения новых симметричных и несимметричных 2,7- и 3,6-дизамещенных карбазолов, содержащих хелатирующий пиридин-2,6-дикарбоксильный фрагмент с использованием современных синтетических подходов органической химии. Были описаны люминесцентно-спектральные свойства полученных соединений и комплексообразование с Eu^{3+} и Tb^{3+} в водных растворах. Оценен квантовый выход ряда соединений с Tb^{3+} . Некоторые комплексы полученных соединений с Tb^{3+} , имеющие достаточно высокие квантовые выходы, имеют длины волн возбуждения ≥ 330 нм, что является преимуществом для массовой приборной реализации в условиях ИФА. Автором сделан оправданный вывод о том, что разработанные карбазолсодержащие пиридиндикарбоновые кислоты как реагенты могут найти применение для мультиплексного анализа заболеваний и патологий.

Научная новизна диссертации состоит в разработке ряда новых фторсодержащих комплексонов редкоземельных элементов бензогетероциклического ряда и оценке этих соединений в виде комплексов с европием (III) и тербием (III) в качестве реагентов для иммунофлуоресцентного анализа с временным разрешением.

Получен ряд новых фторсодержащих енаминонов на основе бензофурана. выявлены различия в региоселективности при их получении.

Показана сравнительно низкая люминесценция комплексов соединений этого ряда с европием (III).

По модифицированной методике получен ряд N-замещенных фторсодержащих тетракетонов на основе карбазола. Выявлена зависимость спектральных свойств комплексов этих соединений в зависимости от природы заместителя при азоте, определено, что люминесценция осуществляется при возбуждении в области 380-390 нм, и по своим люминесцентно-спектральным свойствам они могут быть использованы в качестве реагентов для серийного клинического иммуноанализа. Получены N-спейсерсодержащие тетракетоны карбазольного типа и оценены свойства в зависимости от размера перфторалкильного радикала и длины спейсера.

Разработаны методы получения новых карбазолзамещенных пиридин-2,6-дикарбоновых кислот симметричного и несимметричного строения и выявлены люминесцентно—спектральные свойства их комплексов с европием (III) и тербием (III) для мультиплексного анализа.

Теоретическая и практическая значимость исследования заключается в разработке препаративных методов получения новых N-замещенных карбазолсодержащих тетракетонов, выявлении высоких показателей люминесценции и устойчивости во времени их комплексов европия (III) в сравнении с известными применяющимися соединениями, в том числе нафтоилтрифторацетоном. Тетракетоны на основе карбазола, содержащие N-спейсеры с карбоксильными функциями успешно применены для создания универсального аналитического реагента – маркированного стрептавидина, позволяющего проявлять биоаналиты с помощью образования биотин-стрептавидинового комплекса. Результаты, полученные в этом исследовании оформлены в материалах заявки на патент РФ № 2019127178 «N-Спейсерсодержащие 3,6-бис-β-дикарбонилзамещенные карбазолы с фторированными заместителями, для использования в качестве маркеров и комплексонов».

Апробация работы. Результаты работы апробированы на следующих международных и всероссийских конференциях: Международный конгресс по химии гетероциклических соединений "Кост-2015" (МГУ, 2015), Всероссийская молодежная школа-конференция "Успехи синтеза и комплексообразования" (РУДН, 2016), Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы биоэкологической и химической экологии" (МГОУ, 2016), Международная молодежная конференция "Ломоносов 2018" (МГУ, 2018), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Экология родного края: проблемы и пути их решения" (Киров, ВятГУ, 2019). По материалам диссертации выпущено 4 статьи в рецензируемых журналах, в том числе входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК РФ.

В работе отсутствуют ошибки и недостатки, которые могли бы сказаться на обоснованности выводов и заключений. Следует отметить несколько моментов, которые могли бы помочь автору усовершенствовать исследования в будущем. Не до конца понятна логика выбора использованных аминов при синтезе енаминонов, с учетом необходимости сравнения региоизомеров. Возможно, что было бы правильней использовать одинаковые амины для обоих региоизомеров.

В разделе 2.1.3 высказано утверждение, основанное на спектральных данных, что комплексы енаминонов гидролизуются в комплексы бензофуранилтрифторметилдикетона, что весьма вероятно, однако в будущем это положение интересно было бы подтвердить хромато-масс-спектральным методом.

Можно также сделать несколько мелких замечаний, касающихся оформления работы:

- 1) Пропущены гласные в словах на странице 6, 46, 47;
- 2) Лишние запятые на странице 17, 23, 135;
- 3) На странице 73 в таблице 5 не указан радикал N-H;

4) На странице 102 в таблице 13 формула 175 не поместилась в графе;

5) В большинстве таблиц при переносе их на следующую страницу нет дублирования заголовка столбцов (например, таблица 2 на стр. 54). Сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы Пугачёва Д. Е., которая является законченной научно-квалификационной работой.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. В процессе исследования были получены 72 соединения, из них 45 ранее не были описаны. Строение и чистота обсуждаемых в работе соединений подтверждены данными элементного анализа, спектроскопией ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{19}F , высокоэффективной жидкостной хроматографии. Данные спектральных исследований получены с применением современных физико-химических методов и методик, реализованных с использованием стандартного оборудования.

Диссертационная работа соответствует заявляемой специальности 02.00.03 -органическая химия. Пугачёв Д. Е. в своем исследовании выполнил синтез большого количества гетероциклических комплексов РЗЭ с описанием свойств этих веществ. Всё перечисленное соответствует пунктам 1 «Выделение и очистка новых соединений», 3 «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул» и 7 «Выявление закономерностей типа «структура - свойство» паспорта специальности 02.00.03 — Органическая химия.

Автореферат и публикации соответствуют содержанию диссертационной работы.

Представленная работа Пугачёва Д. Е. является завершённым исследованием, сочетающим высокий теоретический и экспериментальный уровень и практическую значимость. Материал в диссертации и автореферате подан четко и логично – цель каждого раздела диссертации обоснована и каждый раздел является закономерным продолжением предыдущего.

Диссертация написана квалифицированным научным языком и достаточно аккуратно оформлена.

Диссертационная работа Дмитрия Евгеньевича Пугачёва по актуальности поставленной задачи, выполненным исследованиям и практической значимости полностью соответствует требованиям пункта 9 постановления №842 о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Правительством Российской Федерации 24 сентября 2013 г., как научная квалификационная работа. Автор диссертации, **Дмитрий Евгеньевич Пугачёв**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия.

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией физиологически активных фторорганических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук (ИГЭОС РАН), доктор химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия
Чкаников

Подпись официально _____

Чканикова Н.Д.

заверяю:

Ученый с _____

Чканикова

Почтовый адрес: 119 _____

Чканикова, 28.

Телефон: (499) 135-9 _____

Эл. почта: larina@inec _____