

11	№ 1230/02-23-100
листов	10 10 20 25
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации	
аналитической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации	

## ОТЗЫВ

оппонента, заведующего кафедрой фармацевтической, фармацевтической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, доцента Клен Елены Эдмундовны по диссертации Печинского Станислава Витальевича на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

### 1. Актуальность выполненного исследования

Диссертационная работа посвящена актуальной проблеме направленной модификации структуры природных биологически активных соединений (БАС) – ксантофиллов и флавоноидов – с использованием методов энзимного синтеза.

С учетом растущего давления на российскую экономику разработка путей синтеза отечественных лекарственных средств становится в один ряд с вопросами обеспечения национального технологического суверенитета. Учитывая современные тенденции разработки и производства лекарственных средств, внедрение «зеленых технологий», в частности, оптимизация процессов катализа имеет перспективу как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Рациональный катализ синтеза «*de novo*» или модификации структуры биологически активных соединений позволяет снизить количество стадий, уменьшить энергозатраты, избежать или сократить использование использования токсичных растворителей, повысить чистоту и снизить

себестоимость конечного продукта. Современным инструментом для реализации этого подхода является биокатализ.

Следует отметить, что в Российской Федерации исследования по применению биокатализа для направленной модификации структуры биологически активных соединений находятся на начальной стадии развития. Отсутствие фундаментальных работ, посвященных теоретическому и экспериментальному обоснованию таких процессов, подтверждает научную новизну и актуальность представленного диссертационного исследования.

## **2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность**

В соответствии с поставленной целью и задачами диссертантом теоретически обоснована возможность химической модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов методами *in silico*. Построена математическая модель ферментативного синтеза сложных эфиров производных ксантофиллов. Предложен способ ферментативного синтеза сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина – всего 21 соединение, 19 из которых получены впервые. Предложена математическая модель ферментативного синтеза сложных эфиров флавоноидов. Разработан способ получения сложных эфиров флавоноидов – всего 22 соединения, 17 из которых получены впервые. Впервые осуществлен региоселективный синтез сложных эфиров кверцетина и миритетина. Экспериментом *in vitro* по реакции взаимодействия с радикал-катионами ABTS<sup>•+</sup> подтверждена антиоксидантная активность синтезированных сложных эфиров лютеина, зеаксантина, астаксантина, нарингенина, кверцетина, гесперетина, миритетина и выявлены соединения-лидеры.

Научная новизна исследования подтверждена пятью патентами РФ на изобретение.

Достоверность полученных результатов определяется использованием комплекса химических, физико-химических и математических методов,

методов компьютерного моделирования *in silico*, методов скрининга *in vitro*, что позволило получить воспроизводимые и достоверные результаты. Результаты экспериментов обработаны математически и являются статистически достоверными.

### **3. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается обширным экспериментальным материалом, полученным с использованием современных химических, физико-химических, математических методов, методов компьютерного моделирования *in silico*. Научные положения, выводы и рекомендации, базирующиеся на собственном эксперименте, согласуются с данными литературы и с общетеоретическими положениями современной фармацевтической науки.

### **4. Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования**

В ходе диссертационного исследования разработан подход к синтезу модифицированных ксантофиллов и флавоноидов с применением энзимного катализа, позволяющий решить проблему разработки новых отечественных лекарственных препаратов.

С применением методов *in silico* на примере представителей двух обширных классов природных БАС – ксантофиллов и флавоноидов – проведено теоретическое обоснование возможности химической модификации их структуры путем получения сложных эфиров.

Предложенные математические модели энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов (на примере лютеина, зеаксантина, астаксантина) и флавоноидов (на примере нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина) будут способствовать дальнейшему масштабированию их синтеза и адаптации к производственным условиям.

Единый системный подход к разработке способов энзимного синтеза сложных эфиров на примере изученных ксантофиллов и флавоноидов позволяет использовать предложенные условия для синтеза сложных эфиров других соединений этих классов.

Разработанный способ энзимного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в форме *all-trans*-изомеров демонстрирует принципиальную возможность получения соединений в виде только одной геометрической формы, что может быть использовано для синтеза других соединений, которым присуще наличие геометрических изомеров.

Сравнительный анализ результатов антиоксидантной активности синтезированных соединений, полученных методом *in vitro* и теоретического прогноза *in silico* с определением влияния введенных ацильных фрагментов в молекулы исходных ксантофиллов и флавоноидов, дополняет уже имеющиеся данные по взаимосвязи структура-активность этих классов соединений.

Таким образом, полученные Печинским С.В. результаты обладают теоретической значимостью и имеют практическое направление использования. Полученные результаты могут быть использованы в создании новых биологически активных соединений путем модификации природных соединений с применением энзимного синтеза в научно-исследовательских центрах и ВУЗах, занимающихся созданием новых лекарственных средств.

## **5. Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа Печинского Станислава Витальевича соответствует паспорту специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно: пунктам 1 и 3.

## **6. Личный вклад автора**

Как указано в диссертации, автор самостоятельно сформулировал цель и задачи диссертационной работы, определил приоритетные экспериментальные и теоретические направления исследования, провел

теоретическое обоснование выбора структур для стереоселективного синтеза субстанций и их химической модификации, планировал экспериментальную часть работы, при этом авторский вклад в реализацию практических задач является определяющим. Интерпретация экспериментальных данных, систематизация и теоретический анализ результатов исследования проведены лично автором, который непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикации, представлении результатов исследования на научных конференциях и конгрессах.

## **7. Оценка содержания диссертации**

Диссертация построена по традиционному принципу, изложена на 382 страницах печатного текста, состоит из введения, списка использованных сокращений, главы 1 (обзор литературы, 24 стр.); главы 2 (объекты, материалы, методы исследования); 4 глав собственных исследований; общее заключение; список литературы (389 источников, из которых 344 иностранных, 43 стр.), приложения (102 стр.). Работа иллюстрирована 83 рисунками и 14 таблицами.

Введение представлено традиционно и включает все требуемые подразделы.

Глава 1 «Современные принципы, перспективы направленного синтеза и модификации лекарственных средств» – обзор литературы. В этой главе охарактеризованы современные принципы дизайна лекарственных средств, биокатализ представлен как составляющая концепции «зеленой химии» и приведены примеры применения биокатализаторов в химическом синтезе. Диссертант представил характеристику и использование некоторых классов ферментов в фармацевтическом производстве, а также критически проанализировал преимущества и недостатки применения биокатализа в фармацевтической отрасли. В заключении по обзору литературы соискатель выделяет направления дальнейшего эксперимента.

Глава 2 «Объекты, материалы и методы исследования» содержит описание и ссылки на общепринятые методы и оригинальные авторские методики. Глава имеет традиционную форму изложения. Завершается дизайном исследования.

Глава 3 «Теоретическое обоснование отбора кандидатов для стереоселективного синтеза субстанций и химической модификации природных соединений» является основным теоретическим фрагментом работы, в которой автор проводит теоретический выбор структур ксантофиллов и флавоноидов для дальнейшей химической модификации. Диссертант обосновывает ряд органических кислот, которые в дальнейшем будут использованы в эксперименте, приводит результаты и обсуждение собственного теоретического прогноза биологической активности сложных эфиров ксантофиллов методом молекулярного докинга и PASS-прогноза видов фармакологической активности сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов.

В главе 4 «Экспериментальное обоснование энзимного синтеза производных каротиноидов» приведены результаты эксперимента по предварительному выбору условий энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов, оптимизации параметров синтеза производных ксантофиллов методом математического планирования эксперимента, что позволяет автору разработать методику и реализовать энзимный синтез эфиров астаксантина, лютеина, зеаксантина. Далее диссертант проводит идентификацию сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина методами ЯМР  $^1\text{H}$ , ЯМР  $^{13}\text{C}$  и масс-спектрометрии. В главе 4 обсуждаются результаты и перспективы хемоэнзимного синтеза *all-trans*-изомеров лютеина и зеаксантина.

В главе 4 «Синтез сложных эфиров флавоноидов с использованием биокатализаторов» на примере синтеза 22 соединений показана возможность экспериментального решения вопросов биокаталитического синтеза производных нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина.

Следует подчеркнуть, что для теоретического решение поставленных задач автор предложил математическую модель, которая в дальнейшем может способствовать промышленному трансферу предложенных схем синтеза.

Глава 6 «Определение антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов *in vitro* при взаимодействии с радикал-катионами ABTS<sup>•+</sup>» – это логичное экспериментальное подтверждение теоретических прогнозов фармакологической активности синтезированных сложных эфиров, в которой методом *in vitro* при взаимодействии с радикал-катионами ABTS<sup>•+</sup> изучена антирадикальная активность 21 сложного эфира каротиноида и 22 сложных эфиров флавоноидов. На основании полученных результатов автором сформулированы закономерности влияния вводимых заместителей на исходную структуру каротиноида или флавоноида, что позволит в дальнейшем получать их более активные производные.

Диссертационная работа заканчивается общим заключением, приведен список литературы и приложения.

Работа обладает внутренним смысловым единством, характеризуется общностью построения и выполнения экспериментальных разделов и показывает перспективы дальнейшего развития, выбранного диссертантом научного направления.

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, включая 11 статей, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получено 5 патентов РФ на изобретение.

Результаты работы широко апробированы на международных и всероссийских конференциях.

Результаты диссертационного исследования используются в научной работе ФГБНУ «Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений», в научной и учебной работе: кафедры фармакологии и фармации Института НМФО ФГБОУ ВО ВоГМУ Минздрава России, кафедры

органической химии ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова», кафедры органической химии и кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Пятигорский медико-фармацевтический институт» – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Несмотря на общую положительную оценку диссертационной работы Печинского Станислава Витальевича возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Для расчета энергии связывания эфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина с лютеинсвязывающим белком STARD3 в работе предложена модель молекулярного докинга, которая характеризуется «валидированными результатами». Однако данные по разработке модели и по RMSD для докированных лигандов относительно кристаллографических структур в диссертации не приведены.
2. Согласно расчетам (табл. 3.1) моноэфиры ксантофиллов обладают лучшей энергией связывания с белком STARD3, чем диэфиры. Почему для синтеза отобраны только диэфиры ксантофиллов?
3. В тексте диссертации указано, что чистота синтезированных соединений составляет более 90% (конкретные данные приводятся только для некоторых соединений). Однако в проектах ФС для соединений С.9, С.19, F.7, F.22 регламентировано содержание действующих веществ не менее 99,0%. Как проводилась их очистка?
4. Почему при проведении ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа реакционных смесей ксантофиллов использовали изократический режим элюирования, а при проведении ВЭЖХ/МС градиентный? Почему в ВЭЖХ для УФ-детектирования ксантофиллов выбрали длину волны 210 нм, хотя лютеин, как и другие каротиноиды, имеет максимумы поглощения в диапазоне 440 - 500 нм?

5. Для установления структуры синтезированных соединений использовался метод ЯМР–спектроскопии, совпадали ли данные ЯМР-спектров исходных ксантофиллов и флавоноидов с литературными? Проводилось ли определение стереохимии синтезированных соединений (например, методом ЯМР NOESY)?
6. Для дальнейшего промышленного масштабирования энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов необходимы лабораторные регламенты на производство наиболее активных соединений С.9, С.19, F.7, F.22.
7. В приложении приведены 4 проекта фармакопейных статей на наиболее активные соединения С.9, С.19, F.7, F.22. Однако в тексте работы не приводится разработка методик их анализа и стандартизации.
8. При обсуждении результатов исследования антиоксидантной активности в табл. 6.1 не приводится значение стандартного отклонения и уровень значимости результатов. Имеются ли для наиболее активных соединений статистически значимые отличия от препарата сравнения Тролокса? Также возникает вопрос о целесообразности построения графика зависимости антиоксидантной активности от расчетного значения вероятности наличия активности, что он подтверждает?
9. Поскольку Вами в структуру ксантофиллов и флавоноидов были введены фрагменты известных НПВС ибупрофена и кетопрофена следовало, на наш взгляд, проверить не только антиоксидантную, но и противовоспалительную активность этих соединений.
10. В работе имеются опечатки и неудачные выражения. В выводе 2 утверждается о перспективности эфиров лютеина и зеаксантина на основании связывания с лютеинсвязывающим и зеаксантинсвязывающим белками, хотя в диссертации приводятся

данные относительно лютеинсвязывающего белка. На стр. 147 утверждается об «отсутствии сигналов или их сдвигов, характерных для образования сложноэфирной связи». При описании масс-спектров соединений молекулярная масса указывается с до 0,0001, однако на рисунках (например, рис. 4.44) массы приведены с точностью до 0,01.

Указанные замечания и вопросы носят только уточняющий характер и не снижают ценности большой и актуальной работы.

#### **8. Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы, соответствует ее основным положениям и выводам, отвечает всем формальным требованиям, предъявляемым к автореферату диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

#### **9. Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»**

Таким образом, диссертационная работа Печинского Станислава Витальевича на тему: «Теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов путем энзимного синтеза», представленная на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение крупной научной проблемы современной фармацевтической химии по модификации структуры биологически активных соединений путем энзимного синтеза на примере некоторых ксантофиллов и флавоноидов.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Печинского Станислава Витальевича соответствует требованиям п. 9 «Положения о

