

10	№ 1230/02-23-97
листов	22 09 20 25
Федеральное государственное бюджетное образование «Самарский государственный университет» федерального здравоохранения Российской Федерации (846) 374-00-00	

ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры физической химии и хроматографии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», доктора химических наук, профессора Курбатовой Светланы Викторовны, 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

Среди основных направлений современной фармации одним из наиболее важных является разработка новых технологий создания лекарственных препаратов различного физиологического действия. При этом в качестве приоритетов современного химического производства рассматривается концепция «зеленой химии», предполагающая в том числе использование принципов «зеленого синтеза». Значительная роль при реализации этих принципов отводится катализу и его оптимизации посредством использования биокатализаторов. Анализ фармацевтической отрасли в нашей стране свидетельствует о необходимости развития направления, связанного с разработкой биокаталитических реакций, с активным внедрением принципов зеленого синтеза в промышленное производство лекарственных средств. Следует отметить, кроме того, что решение этих задач приведет в конечном итоге к существенному сокращению использования токсичных растворителей, повышению чистоты целевых продуктов, к уменьшению энергозатрат и, таким образом, к снижению себестоимости продукции.

С этой точки зрения представленное в настоящей работе теоретическое и экспериментальное обоснование модификации структур биологически активных соединений путем получения их полусинтетических производных с

применением энзимного синтеза является весьма **актуальным** научным направлением.

2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

В процессе выполнения диссертационного исследования автором получены следующие результаты:

с применением методов *in silico* теоретически обоснована возможность химической модификации структуры некоторых ксантофиллов и флавоноидов;

предложена математическая модель энзимного синтеза сложных эфиров производных каротиноидов;

разработан способ энзимного синтеза сложных эфиров астаксантина, лютеина и зеаксантина, с использованием которого синтезирован 21 сложный эфир ксантофиллов, при этом 19 соединений получены впервые;

предложена математическая модель энзимного синтеза сложных эфиров флавоноидов и способ их получения. Таким образом синтезированы 22 сложных эфира нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина, из них 17 – впервые;

впервые проведен региоселективный синтез сложных эфиров кверцетина и мирицетина;

по реакции взаимодействия с радикал-катионами ABTS^{•+} (эксперимент *in vitro*) подтверждена антиоксидантная активность 43 синтезированных сложных эфиров и выявлены соединения-лидеры.

Научная новизна результатов, полученных при выполнении исследования, подтверждена пятью патентами РФ.

Достоверность научных положений и результатов обеспечена использованием современных химических, физико-химических, математических методов исследования, а также применением методов компьютерного моделирования *in silico*, методов *in vitro* и тщательно выполненной статистической обработкой данных.

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

Выводы, положения и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, подлинность результатов проведенных исследований обусловлены значительным объемом экспериментального материала, полученного с использованием современных инструментальных методов исследования, а также соответствием полученных экспериментальных данных теоретическим положениям современной фармацевтической науки и данным литературы, их непротиворечивостью с теоретическими положениями.

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

Проведено теоретическое обоснование возможности химической модификации структуры природных биологически активных соединений на примере некоторых каротиноидов и флавоноидов с применением методов *in silico*.

Предложенные математические модели энзимного синтеза сложных эфиров ксантофиллов и флавоноидов при их оптимизации с учетом производственных условий и мощностей могут способствовать дальнейшему масштабированию предложенных схем синтеза.

Разработанные подходы и схемы энзимного синтеза сложных эфиров лютеина, зеаксантина, астаксантина, нарингенина, кверцетина, гесперетина, мирицетина могут быть использованы в синтезе сложных эфиров других представителей ксантофиллов и флавоноидов.

Предложенный способ энзимного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина в виде *all-trans*-изомеров показал принципиальную возможность получения соединений только одной геометрической формы и может быть использован для синтеза других соединений, имеющих геометрические изомеры, в том числе полностью синтетического происхождения.

Сравнение результатов антиоксидантной активности, полученных методами *in vitro* и *in silico* с определением влияния введенных ацильных фрагментов в молекулы синтезированных сложных эфиров, дополняет и развивает уже имеющиеся данные о взаимосвязи структура - активность в ряду ксантофиллов и флавоноидов.

5. Оценка содержания диссертации

Материал диссертационного исследования изложен традиционно и включает введение, список использованных сокращений, главы, посвященные обзору литературы и характеристике объектов, материалов и методов исследования; 4 главы собственных исследований; общее заключение; список литературы из 389 источников, приложение. Работа иллюстрирована 83 рисунками и 14 таблицами.

В Главе 1, посвященной анализу современных принципов, перспектив направленного синтеза и модификации лекарственных средств, обсуждаются проблемы современного дизайна лекарственных средств, преимущества и недостатки применения биокатализа в фармацевтической отрасли, возможности использования некоторых классов ферментов в фармацевтическом производстве. В заключении главы показана перспективность исследований выбранного диссертантом научного направления.

В Главе 2 представлена характеристика объектов и методов исследования; приведены методики синтеза и проведенных химических экспериментов, представлен дизайн осуществленного исследования.

В Главе 3 дано теоретическое обоснование отбора кандидатов для стереоселективного синтеза субстанций и химической модификации природных соединений. В этом теоретическом разделе приведены результаты выбора исходных структур для модификации, в частности, ксантофиллов – лютеина, зеаксантина и астаксантина, а также флавоноидов – кверцетина, мирицетина, нарингенина, гесперетина. Дано теоретическое обоснование

сформированного перечня органических кислот (11 кислот различной структуры), которые должны явиться ацилирующими агентами при энзимном синтезе сложных эфиров модельных ксантофиллов и флавоноидов.

Для обоснования запланированной экспериментальной части в диссертации предварительно методом молекулярного докинга осуществлено теоретическое прогнозирование. На основании результатов прогнозирования установлено, что с точки зрения фармакологической активности наиболее перспективными следует считать, в первую очередь, эфиры лютеина и зеаксантина, а получение сложных эфиров астаксантина интересно лишь с точки зрения химического эксперимента. При этом данные, полученные с помощью прогностической программы PASS, позволили предположить, что сложные эфиры исходных ксантофиллов и флавоноидов, должны проявлять антиоксидантную, мембранопротекторную и антиканцерогенную активности. Глава заканчивается заключением.

В Главе 4 представлено экспериментальное обоснование энзимного синтеза производных каротиноидов, приведен экспериментальный материал, подтверждающий принципиальную возможность получения полусинтетических производных ксантофиллов, в частности, сложных эфиров лютеина, зеаксантина и астаксантина. При этом автором проведен предварительный выбор условий синтеза, математическое планирование эксперимента, осуществлен синтез планируемых соединений, структура которых подтверждена методами ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и масс-спектрометрии. В данной главе, кроме того, представлены результаты стереоселективного синтеза субстанций лютеина и зеаксантина, реализованного с применением биокатализатора. Материалы главы сопровождаются обсуждением, в завершении раздела дано соответствующее заключение.

В Главе 5 отражены результаты синтеза сложных эфиров флавоноидов с использованием биокатализаторов, приведены особенности выбора таких параметров синтеза сложных эфиров флавоноидов, как соотношение количества реагентов, температурный режим процесса, время протекания

реакции, скорость перемешивания реакционной среды, количество энзима, вносимое в систему.

Представлены результаты оптимизации этих параметров при синтезе новых сложных эфиров флавоноидов с помощью математического планирования эксперимента, методом крутого восхождения выбраны оптимальные условия синтеза. На основании полученных результатов проведен синтез 4'- и 3'- производных кверцетина, нарингенина, гесперетина, проведен эксперимент по «защищенному синтезу» эфиров кверцетина и мирицетина по положению С3. Структуры всех 22 синтезированных сложных эфиров флавоноидов подтверждены методами ^1H и ^{13}C ЯМР и масс-спектрометрии. Глава 5 завершается заключением.

В Главе 6, посвященной определению антиоксидантной активности синтезированных сложных эфиров каротиноидов и флавоноидов при взаимодействии с радикал-катионами $\text{ABTS}^{+\cdot}$ методом *in vitro* изучена антирадикальная активность 21 сложного эфира ксантофиллов и 22 сложных эфиров флавоноидов.

Полученные автором результаты явились подтверждением теоретического прогноза *in silico*, при этом установлено, что синтезированные соединения превосходят родоначальные структуры по антирадикальному действию как в прогностической программе «PASS-online», так и в исследованиях *in vitro*.

На основании полученных результатов автором установлены закономерности влияния природы вводимых радикалов на фармакологическую активность исходных структур ксантофилла или флавоноида, использование которых позволило выбрать соединения-лидеры. В данной главе также представлено заключение.

Диссертационная работа завершается общим заключением, списком литературы и приложением.

В целом для диссертационной работы характерно общее смысловое единство теории, теоретических прогнозов, экспериментального материала и

сделанных на их основе выводов. Работа демонстрирует хорошие перспективы и возможности дальнейшего развития выбранного в диссертации научного направления.

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

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 ВолГМУ 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 ВолГМУ Минздрава России.

Несмотря на общую положительную оценку, по диссертационной работе С.В. Печинского возник ряд вопросов и замечаний.

1. Как выбирали качественный и количественный состав элюента для ВЭЖХ, поскольку он изменялся в зависимости от исследуемых объектов. Так, при анализе эфиров ксантофиллов методом ВЭЖХ применяли ПФ – метанол - трет-бутилметиловый эфир - вода (45:52:3); при анализе изомеров лютеина или зеаксантина подвижная фаза – метанол - трет-бутилметиловый эфир - ацетонитрил (90:5:5); трет-бутилметиловый эфир - метанол - ацетонитрил (90:5:5); эфиры флавоноидов анализировали при составе подвижной фазы ацетонитрил – фосфорная кислота (30:70).

2. На стр. 55 диссертации указано, что «Общий дизайн исследования разрабатывался с соблюдением системного подхода и применением универсальных научных методов ... ». Что подразумевается под понятием «системный подход» в данном контексте?

3. На стр 59 диссертации указано: «Другая проблема, требующая решения, – это *стереоспецифичность* сложных эфиров, т. к. крайне велика вероятность *изомеризации* ксантофиллов и их производных в процессе синтеза». На стр.66: «Как синтетические, так и природные астаксантин, лютеин и зеаксантин, как правило, представляют собой *смеси геометрических изомеров*, что оказывает существенное влияние на их биодоступность ...». И далее «Другой, не менее важной проблемой использования субстанций с большим диапазоном изомерных форм является получение образцов одного из типов изомеров с высоким уровнем чистоты». Как при этом контролировали возможность изомеризации веществ в процессе их синтеза? Как контролировали наличие только одного типа изомеров (или их смеси) при проведении синтеза?

4. Как определяли концентрацию целевого продукта при изучении влияния катализаторов на выход продукта (рис. 4.1-4.3), тем более, что далее, на стр. 102 указано, что «... самой важной проблемой, на наш взгляд, является то, что в реакционной среде одновременно происходит высвобождение не только фермента, но и полимерных компонентов подложки-носителя»

5. Там же на стр. 102 указано: «Продолжительность синтеза, как и предполагалось, оказывает влияние на выход основного продукта реакции». С чем связано влияние продолжительности синтеза? Это возможность разложения участников реакции? Или протекание побочных реакции? Образование примесей? Изучали ли кинетику процесса?

6. Из текста диссертации следует, что в результате синтеза получены образцы с высоким содержанием *транс*-изомеров – более 99 % и, соответственно, с высокой чистотой продукта (Таблица 4.7), что подтверждает высокую энантиоселективность способа. За счет чего реализуется высокая энантиоселективность?

7. Представляется несколько излишним (по крайней мере, для диссертации такого уровня) подробное описание материалов и методов, в частности, перечисление таких материалов, как «баня комбинированная лабораторная;

колбы для синтеза; колбы конические вместимостью 25, 50 ... мл; колбы мерные вместимостью 5, 10, мл, пипетки градуированные...» и т.п.

В то же время в некоторых случаях хотелось бы более подробного описания действий. Так, например, в диссертации указано, что: «Учитывая высокую светочувствительность и способность к окислению лютеина и зеаксантина, на всех этапах исследования реакционные смеси предохраняли от действия света и кислорода воздуха» – Каким образом осуществляли предохранение от действия света и кислорода воздуха?

8. В тексте присутствуют неудачные выражения и опечатки (например, стр. 63, 174 и др.).

Следует заметить, что перечисленные вопросы носят преимущественно уточняющий характер, а высказанные замечания не принципиальны.

6. 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.

7. 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 научной квалификационной работой, в которой содержится решение крупной научной проблемы современной фармацевтической химии по изучению биокаталитического синтеза сложных эфиров на примере некоторых природных ксантофиллов и флавоноидов.

