

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научно-исследовательской работе  
ФГАОУ ВО Первый Московский  
государственный медицинский  
университет имени И.М. Сеченова  
Минздрава России  
(Сеченовский Университет)  
кандидат медицинских наук, доцент  
Д.В. Бутнaru



26 декабря 2021 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации - Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), о диссертационной работе Белозеровой Ольги Александровны «Синтез и биологическая активность природного лигнана севанола и его аналогов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

**Актуальность.** В настоящее время одной из важных задач, стоящих перед исследователями в отрасли разработки новых фармацевтических препаратов, является поиск и создание новых активных соединений, обладающих высоким терапевтическим эффектом и при этом низкой токсичностью для живого организма. НПВС (нестероидные противовоспалительные средства) представляют собой широкую группу препаратов, значимых для терапии человека с болевым синдромом, и обладают противовоспалительным и анальгетическим эффектом. Однако вероятные побочные эффекты данных препаратов на пищеварительный тракт, почки, а также влияние на артериальное давление ограничивает их применение для пациентов, наиболее чувствительных к подобному деструктивному воздействию на организм. Таким образом, поиск эффективных и безопасных противовоспалительных и обезболивающих средств, не обладающих яркими побочными действиями, представляется необходимой и актуальной проблемой на данный момент.



В качестве перспективных источников биологически активных соединений широко распространены различные природные ресурсы, в том числе растительного происхождения. Лигнаны являются вторичными метаболитами, обнаруживающихся в различных частях растений, обладают полифенольной структурой и проявляют разнообразный биологический эффект в организмах. На данный момент в российских и зарубежных публикациях часто встречаются примеры противовоспалительной, противоопухолевой, антиоксидантной, противовирусной, противогрибковой, антибактериальной и другой проявляемой лигнанами активности. Выделение подобных веществ, изучение их структурно-функционального взаимодействия с мишенями, а также дальнейшая химическая модификация является основной стратегией медицинской химии, позволяющей разработать качественный и высокоэффективный лекарственный препарат.

С данной точки зрения, диссертационная работа О.А. Белозеровой, посвященная синтезу и подробному исследованию биологической активности природного лигнана севанола и его аналогов, представляется весьма актуальной. Решаемый автором работы комплекс синтетических, электрофизиологических и прикладных задач без сомнения является приоритетным для развития биоорганической химии природных соединений и их последующего внедрения в фармацевтическую отрасль.

Проведение в рамках настоящей работы комплексного исследования по разработке и оптимизации метода синтеза дигидронафталинового лигнана севанола, а также выявление структурно-функциональной связи лиганд-рецепторного взаимодействия севанола и его аналогов и соответствующей эффективности ингибирования протон-чувствительных ионных каналов ASICs с последующим изучением анальгетической активности основной молекулы исследования севанола в тестах *in vivo*, определяют несомненную **актуальность** диссертационного исследования О.А. Белозеровой для биоорганической химии, медицинской химии и соответствующих практических приложений – биологических и фармацевтических. Работа является логической частью выполняемых в Институте биоорганической химии РАН системных исследований по поиску новых биологически активных соединений, являющихся модуляторами ASIC рецепторов. Благодаря проделанной О.А. Белозеровой работе по разработке и оптимизации синтеза природного лигнана севанола были проведены доклинические испытания перспективного лекарственного препарата «Севанол», обладающего противовоспалительными и обезболивающими свойствами.

**Цель работы** О.А. Белозеровой состояла в разработке оптимального метода синтеза нового природного лигнана севанола и в дальнейшем подтверждении ранее установленной структуры этой молекулы, выделенной из природного источника чабреца *Thymus*



*armeniacus*. Кроме того, **целью работы** являлось исследование структурно-функциональной связи между проявляемой активностью молекулы севанола, а также его аналогов и эффективности ингибирования ASIC-каналов. Особое внимание в работе уделено подбору наиболее эффективного синтетического метода получения изучаемых соединений, а также методам идентификации данных молекул (включающим  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопию, а также масс-спектрометрию высокого разрешения), что позволяет говорить о высокой степени достоверности получаемых автором результатов электрофизиологических экспериментов *in vitro* и качестве проведенного последующего исследования анальгетической активности севанола. Прделанная качественно синтетическая работа позволяла выполнить корректную оценку взаимодействия рецептора ASIC-канала с севанолом и его аналогами, а также провести доклинические испытания препарата на основе молекулы севанола. Все это определяет безусловную научную содержательность работы и ее практическую значимость для фармацевтической отрасли.

Диссертационная работа О.А. Белозеровой изложена на 152 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных автором результатов в трех разделах, экспериментальной части и выводов. Список литературы включает 216 наименований. Работа написана четким и ясным языком, хорошо структурирована и содержит все необходимые для понимания материала схемы реакций, рисунки и таблицы. Количество опечаток и других технических ошибок незначительно и не затрудняет чтения работы. Хорошим вспомогательным материалом является приведенный автором список сокращений и условных обозначений, при этом в работе их сравнительно немного, и значительная их часть дополнительно расшифровывается в тексте диссертации.

Во введении определена **актуальность** исследования, четко сформулирована его **цель** и основные **задачи**, а также аргументированы его **научная новизна**, теоретическая и **практическая значимость**. Кроме того, лаконично описаны **методология и методы исследования**.

В литературном обзоре диссертантом проведен детальный анализ работ отечественных и зарубежных исследователей, преимущественно относящихся к последнему десятилетию, что наглядно демонстрирует актуальность выбранного автором направления и интерес мирового научного сообщества к данной теме. Обзор состоит из семи разделов, часть из которых посвящен описанию основных методов синтеза, используемых для димеризации до основного кора молекулы лигнана, а другая часть позволяет читателю подробнее вникнуть в функцию протон-чувствительных ионных каналов, а также проследить возможные варианты той или иной регуляции их работы в живых организмах. В разделах, посвященных обзору методов синтеза подобных



лигнанных структур, автор подробно рассматривает механизм димеризации, а также возможные варианты классической димеризации и отдельно подробно применяемые автором в работе опыт других исследователей в применении окислительной димеризации. Обзор достаточно подробен и хорошо структурирован, что облегчает чтение и оценку основной главы диссертации, помогает понять логику формулирования цели исследований автора, степень новизны предлагаемых практических решений. Таким образом, представленный обзор полностью соответствует тематике и логике построения работы, его структура представляется оправданной и целесообразной, формируя удобный справочный материал. В дальнейшем этот раздел вполне может быть трансформирован в отдельную обзорную статью.

Основная глава работы посвящена изложению и обсуждению собственных результатов О.А. Белозеровой по разработке и оптимизации методов синтеза и химической модификации севанола, а также исследованию их ингибирующей способности по отношению к ASIC-каналам и исследованию лиганд-рецепторного взаимодействия. Эта глава научно обоснована и содержит ряд достижений, позволяющих считать работу О.А. Белозеровой подлинно **оригинальной** и отличающейся **научной новизной**.

Первый раздел данной главы (3.1) посвящен разработке метода синтеза природного лигнана севанола. Автором предложена методика синтеза севанола, проведено подробное исследование подходящих условий проведения ключевой стадии окислительной димеризации, а также проведена оптимизация разработанного метода, позволяющая набирать целевое вещество в больших количествах для последующих биологических тестов. В разделе подробно рассмотрен момент подбора релевантных защитных групп к ключевым интермедиатам, а также наиболее эффективные условия снятия этих защитных групп, подробно изучены возможные условия окислительной димеризации. Разработанные стадии синтеза целевого лигнана севанола позволяли получить соединение с достаточно высоким выходом, что является перспективным моментом для дальнейшего переноса такой методики синтеза в полупромышленные масштабы. Также автором был впервые разработан эффективный метод синтеза три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты в три стадии, что не было опубликовано ранее, и является практически значимым фактом для исследователей, работающих в области органического синтеза. Кроме того, была изучена проблема разделения диастереомерной смеси и проведены соответствующие аналитические работы с использованием системы ВЭЖХ и метода ЯМР-спектроскопии по идентификации природного изомера севанола от его диастереомера.

Второй раздел обсуждения результатов (3.2) связан с синтезом аналогов природного севанола путем химической модификации основной структуры преимущественно по



карбоксильным группам изолимонной части молекулы и гидроксильным группам ароматической части севанола. Методы синтеза аналогов севанола были основаны на разработанной в первом разделе (3.1) схеме синтеза севанола и существенно не отличались новизной в рамках проведенной диссертационной работы. Однако автор утверждает, что синтез эпифиловой кислоты путем окислительной димеризации ранее описан не был, что отчасти позволяет рассматривать этот раздел с точки зрения научной новизны. Однако данные результаты имеют высокую значимость в рамках проделанной работы в третьем разделе данной главы, где модифицированные аналоги севанола использовались в качестве моделей для изучения лиганд-рецепторного взаимодействия с протон-чувствительным ионным каналом.

Третий раздел обсуждения результатов (3.1) посвящен подробному исследованию ингибирующей способности севанола и его аналогов по отношению к протон-чувствительным ионным каналам. В данном разделе автор приводит результаты электрофизиологических тестов исследуемых соединений, с помощью которых наглядно показал влияние стереохимии основного ядра севанола, а также влияние гидроксильных групп ароматической части севанола и влияние числа карбоксильных групп на изолимонной части севанола на эффективность проявляемой биологической активности, а именно ингибирования ASIC-каналов. Кроме того, автор совместно с коллегами из другой лаборатории показал возможный сайт связывания севанола в ASIC1a-канале на основе метода молекулярного моделирования и конкурентного эксперимента с нейропептидом (FRRFa) – известным потенциатором протон-чувствительных ионных каналов. Также в этом разделе описана анальгетическая способность севанола, показывающая его возможность использования в пероральной форме, что дает ему конкурентное преимущество при дальнейшей разработке лекарственного средства на его основе.

Экспериментальная часть содержит все требуемые данные, что позволяет при необходимости воспроизвести результаты автора. Исследования проведены с привлечением классического для подобных работ комплекса физико-химических методов ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, а также высокоэффективных хроматографических методов для очистки целевых соединений). Высокое качество полученных спектров ЯМР обуславливается их регистрацией на приборах с рабочей частотой 600 и 800 МГц.

**Достоверность результатов и обоснованность итоговых заключений**, в полной мере отражающих основное содержание работы О.А. Белозеровой, не вызывает сомнений.

**Научная новизна и практическая значимость** полученных О.А. Белозеровой результатов состоят:



- в разработке и оптимизации метода синтеза нового природного лигнана севанола;
- в создании набора химически модифицированных аналогов севанола для изучения лигнад-рецепторного взаимодействия с ASIC-каналом;
- в разработке эффективного метода получения три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты;
- в проведении электрофизиологических тестов, показывающих существенное влияние числа карбоксильных групп в изолимонной части молекулы на проявляемую севанолом и аналогами ингибирующую способность по отношению к ASIC-каналам;
- в исследовании структурно-функциональной связи строения молекулы и ее ингибирующих свойств;
- в изучении анальгетической способности различными методами дистрибьюции в живой организм.

Вместе с тем, диссертационная работа О.А. Белозеровой не лишена некоторых недостатков, которые связаны не с качеством проделанных исследований, а скорее относятся к недочетам, обусловленным комплексным охватом работы, не носят принципиального характера и могут быть отнесены к пожеланиям для дальнейшего ее развития.

1 – В главе 2, посвященной литературному обзору, а именно в разделе 2.6, на мой взгляд, слишком много уделено внимание описанию структуры протон-чувствительного ионного канала и его функционированию. Данный раздел можно было бы существенно сократить и уделить основную часть внимания рассмотрению структур, являющихся регуляторами изучаемых ASIC-каналов.

2 – В тексте работы встречаются опечатки в названиях и номенклатуре изучаемых соединений, которые не влияют на понимание описания процесса синтеза и скорее связаны с невнимательностью автора при создании текста диссертационной работы.

3 – Недостаточно подробно описан подбор защитных групп для метода синтеза ключевого интермедиата три-трет-бутилового эфира изолимонной кислоты. Пробовал ли автор введение других защитных групп и к каким результатом это приводило? Или же изначально выбранный третбутиловые группы в качестве защит не предусматривали альтернативного варианта?

4 – В разделе 3.2 на схеме 39 отражены структуры, которые были исследованы в диссертационной работе. Однако там оказывается структура s358, описание как синтеза, так и биологических свойств которой в самой работе не приведено. На аналогичной схеме 29 в введении к главе 3 данной структуры не обнаруживается. Что это за структура, являлась ли



она также неким неисследованным продуктом реакции димеризации ключевого мономера три-трет-бутилового изоцитрата кофейной кислоты? Проявляла ли она ингибирующую способность?

5 – В разделе 3.2.3, посвященном синтезу производных и аналогов севанола s414 и EA на схеме 43 не обозначена стереохимия получаемых соединений. Однако в автореферате данная ошибка уже исправлена, поэтому данный недочет является невнимательностью автора при формировании схемы в диссертационной работе.

6 – В целом, цифровые обозначения изучаемых аналогов путают читателя и не позволяют с первого взгляда понять, о какой структуре в данный момент идет речь. Возможно, стоило отразить структурные изменения в самом названии разделов, посвященных синтезу той или иной структуры аналога севанола.

7 – В разделе 3.3.3, посвященном описанию анальгетического эффекта севанола в тестах *in vivo*, не хватает сравнения проявляемой обезболивающей активности с уже существующими на фармацевтическом рынке обезболивающими препаратами. Отражение сравнительной характеристики позволило бы более детально понять конкурентную способность севанола по сравнению с существующими НПВС. Есть ли данные и проводились ли исследования, указывающие на то, является ли севанол лучше или на таком же уровне по сравнению с аналогичными препаратами?

Высказанные замечания никоим образом не умаляют исключительно высокой научной оценки диссертационной работы О.А. Белозеровой в целом.

Результаты диссертационной работы О.А. Белозеровой могут быть использованы в научных организациях, занимающихся исследованием биологической активности природных соединений и разработкой новых лекарственных препаратов, а также их дальнейшими биологическими и медицинскими приложениями, в том числе в фармацевтической отрасли – Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Московском технологическом университете, Российском Химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева, Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (техническом университете), Химическом институте им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета, Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Институте биоорганической химии НАН Беларуси, Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН и ряде других.



Содержание диссертации изложено в виде 3 научных работ, из них 3 статьи в высокорейтинговых зарубежных журналах, 1 патент и 3 тезиса докладов в международных тематических конференциях. Автореферат и публикации достаточно полно отражают основное содержание работы.

Таким образом, диссертационная работа **Белозеровой Ольги Александровны** «Синтез и биологическая активность природного лигнана севанола и его аналогов» представляет собой **завершенную научно-квалификационную работу** и по объему, качеству проведенного эксперимента, новизне и оригинальности полученных результатов, а также научному уровню их обсуждения, соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ: от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. №748; от 29.05.2017 г. №650; от 20.03.2021 г. № 426), предъявляемым ВАК Российской Федерации к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук. Автор работы, **Белозерова Ольга Александровна**, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 - биорганическая химия.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании научного семинара Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова 3 декабря 2021г.

Заместитель директора Института  
трансляционной медицины и биотехнологии

**Трухан**  
**Владимир Михайлович**

*«Подпись В.М. Трухана заверяю»*

Ученый секретарь ФГАОУ ВО Первого  
МГМУ им. И.М. Сеченова  
доктор медицинских наук

3.12 2021



**Воскресенская**  
**Ольга**  
**Николаевна**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Минздрава России (Сеченовский Университет)

**Адрес:** Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

**Тел.:** +7(499) 248-05-53 **E-mail:** rektorat@sechenov.ru