

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Золотова Николай Николаевича, на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук Дьяченко Игоря Александровича на тему: «Эффективность и безопасность потенциальных анальгетиков, действующих на кислото-чувствительные ионные каналы» по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

### Актуальность проблемы

Поиск новых эффективных и безопасных лекарственных средств является актуальной задачей фармакологии.

Известно, что в процессах прохождения болевого сигнала участвуют рецепторы и ионные каналы периферических терминалей и аксонов ноцицепторов. В качестве возможных мишеней для новых анальгетиков могут выступать кислото-чувствительные ионные каналы, являющиеся рецепторами боли сенсорных нейронов и каналов, в частности TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) и ASIC3 (Acid-Sensing Ion Channel 3). Считается, что нейроны с TRPV1 каналами, играют роль интегратора стимулов, воспринимающих боль, и генератора болевых сигналов.

ASIC3 в нейронах периферической нервной системы выполняют роль детекторов кислотности клеток и интеграторов сигналов, определяющих развитие болевой реакции при воспалительном процессе.

Для новых фармакологических веществ, которые снижают чувствительность к воспалительной, травматической и термической боли, показано взаимодействие с различными типами кислото-чувствительных ионных каналов. Это известно для антагонистов TRPV1 различной природы (A-425619), ВСТС, хинозалинового компонента и AMG9810. Активно разрабатываются модуляторы ASIC каналов пептидной природы: тетрапептид FMRF-амид и подобные ему по структуре динорфины, пептид MitTx из яда змеи *Micrurus tener tener*, пептид PcTx1, пептид APETx2.

Таким образом, изучение фармакологической активности и безопасности потенциальных модуляторов ионных каналов TRPV1 и ASIC3 является актуальной задачей экспериментальной фармакологии.

## Степень разработанности темы исследования

В качестве перспективного источника потенциальных новых анальгетиков рассматривают биологически активные вещества природного происхождения, оказывающие модулирующий эффект на кислото-чувствительные ионные каналы. В ИБХ РАН в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов из яда морских анемон впервые выделены лиганды, способные модулировать активность кислото-чувствительных ионных каналов TRPV1 и ASIC3.

Впервые из тропической анемоны *Heteractis crispa* выделены три новых полипептидных соединения, названные Analgesic Polypeptide *Heteractis Crispa* (АРНС1, 2, 3), полная аминокислотная последовательность которых определена секвенированием по методу Эдмана, масс-спектрометрией и пептидным картированием. Все три полипептида содержат по 2 положительно заряженных аминокислотных остатка на одной поверхности молекулы (для АРНС1 и 2 это Arg18 и Arg48, а для АРНС3 – Lys23 и Arg48). Положительно заряженные группы этих аминокислот расположены на одинаковом расстоянии друг от друга. У АРНС1 на этой поверхности так же расположен гидрофобный остаток Val 31, который, определяет большую ингибиторную активность по отношению к TRPV1 по сравнению с АРНС2. Связывающие участки этих полипептидов представляют комбинацию заряженных и гидрофобных аминокислот. Анализ первичной структуры полипептидов позволил отнести их к обширной группе ингибиторов трипсина типа Кунитца.

Для фармакологических исследований были получены рекомбинантные полипептиды АРНС1, АРНС2, АРНС3 путем гетерологичной экспрессии в составе гибридного с тиоредоксином белка в клетках *E.coli*. Для получения индивидуального пептида гибридный белок был очищен при помощи металл-аффинной хроматографии на  $Co^{2+}$ -сорбенте, расщеплен бромцианом, и целевой продукт выделен при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенной фазе.

Из яда морской анемоны *U. grebelnyi* был получен пептидный ингибитор ASIC3. В соответствии с номенклатурой токсинов из морских анемон новый пептид получил название Ugr 9a-1 с молекулярной массой 3135.1 Да, содержит 4 остатка цистеина, что характерно для этого класса пептидов и

имеет определенное сходство с первичной структурой других полипептидов из морских анемонов этого класса.

Из уксуснокислого экстракта чабреца был выделен активный компонент, содержащий пентафторфенильные группы, названный «севанолом» с молекулярной массой 706,5 Да, в структуру которого входили сложный эфир эпифилловой кислоты и два остатка изолимонной кислоты. Севанол является новым представителем класса полифенольных соединений – лигнанов с фенилдигидронафталеновым скелетом, являющимся производным кофейной кислоты и обладающим модулирующим действием на ASIC3 ионные каналы.

### **Новизна и практическая ценность диссертации**

Впервые установлено наличие анальгетического эффекта у рекомбинантных полипептидов АРНС1, АРНС2, АРНС3 - полипептидных модуляторов TRPV1 в экспериментах *in vivo*. Выявлены связи между структурой и их фармакологической активностью.

Доказано наличие анальгетического эффекта у сконструированного на основании знаний о закономерности связи «химическая структура – фармакологическое действие» генноинженерного полипептида А13, содержащего смешанный фармакофор модулятора кислото-чувствительных ионных каналов TRPV1.

Впервые экспериментально установлено наличие анальгетического эффекта у модуляторов кислото-чувствительных ионных каналов ASIC3 полипептида Ugr 9a-1 и севанола.

Впервые установлено, что по анальгетической активности модуляторы кислото-чувствительных ионных каналов рекомбинантный полипептид АРНС3 и севанол имеют преимущества перед диклофенаком. В модельных экспериментах MIA-индуцированного остеоартрита и CFA-индуцированного ревматоидного артрита показана противовоспалительная и анальгетическая активность, выше чем у диклофенака, мелоксикама и ибупрофена.

Показано, что в диапазоне доз, значительно превышающих дозы вызывающие анальгетический эффект, модуляторы кислото-чувствительных ионных каналов рекомбинантный полипептид АРНС3 и севанол не вызывают

достоверных отклонений морфо-функциональных показателей состояния лабораторных животных в условиях острых и хронических экспериментов.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость**

Разработаны теоретические положения, обосновывающие перспективность использования кислото-чувствительных ионных каналов TRPV1 и ASIC3 сенсорных нейронов в качестве молекулярных мишеней для поиска анальгетических фармакологических веществ нового поколения.

Результаты исследования расширяют теоретические представления о молекулярных основах функционирования болевого каскада и физиологической роли кислото-чувствительных ионных каналов как рецепторов боли в организме.

Модулятор TRPV1 рекомбинантный полипептид APCN3 и модулятор ASIC3 севанол обладают выраженной анальгетической активностью, не оказывают побочных эффектов на центральную нервную, сердечно-сосудистую, дыхательную и другие системы у лабораторных животных. Результаты проведенных фармакологических и токсикологических исследований позволяют рекомендовать эти вещества для изучения в качестве перспективных анальгетических лекарственных средств.

Полученные результаты могут внести существенный вклад в фундаментальные исследования молекулярных основ функционирования TRPV1 и ASIC3 каналов и физиологическую роль данных каналов в организме.

### **Степень достоверности и апробации результатов**

Исследования выполнены в соответствии с требованиями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», (ред. – А.Н. Миронов, 2012). Методология доклинических исследований проведена согласно ГОСТ 31883–2012, 33044–2014, 31881–2012. Используются аутбредные животные SPF-статуса, полученные в «Питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН», г. Пущино. Используемое в исследовании оборудование, находилось в технически исправном состоянии, проходило плановое сервисное обслуживание, калибровку и поверку. Для автоматизированных анализаторов использовали



программу внешнего контроля качества, позволяющую оценить качество используемых реагентов, компетенции оператора и техническое состояние прибора. В исследовании использованы реактивы, имеющие регистрационные свидетельства РФ с актуальным сроком годности на момент проведения исследования. Полученные результаты могут считаться достоверными на уровне современных требований экспериментальной фармакологии.

Основные результаты работы доложены на: XXI съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Калуга, 2010), конференция «Современные проблемы биофизики сложных систем» (Воронеж, 2013), XXII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Волгоград, 2013), 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013), Конференция «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств» (Москва, 2015), XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2015), 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015), XII научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование» (Светлые горы, 2016), XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016), V съезд фармакологов России: «Научные основы поиска и создания новых лекарственных средств» (Ярославль, 2018), 4th «Russian Conference on Medical Chemistry» with International participants (Ekaterinburg: 2019)

### **Структура и общая характеристика работы диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 7 глав результатов исследования с их обсуждением, выводов и списка литературы, содержащего 442 источника отечественных и зарубежных исследователей. Диссертация изложена на 274 страницах машинописного текста, содержит 40 таблиц и 54 рисунка.

Во введении приведено обоснование актуальности темы, исследования. Обозначена цель и задачи раскрыта научная новизна исследования, а также сформулирована теоретическая и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» представлен анализ современных концепций роли ионных каналов в ноцицепции, а также представлены новые препараты, действующие на ионные каналы.

Глава «Материалы и методы» посвящена подробному описанию материала, дизайна экспериментов, всех методов, необходимых для подтверждения анальгетической, противовоспалительной активности, а также биохимических, гистологических методов исследования, позволяющих решить поставленные задачи.

Главы «Результаты исследований и их обсуждение» представляет собой классическое фармакологическое исследование - скрининг, изучение эффективности в методах и тестах анальгетической и противовоспалительной активности. Доклинические исследования и рекомендации для клинических исследований.

Для скрининга были исследованы – АРНС1, АРНС2 и АРНС3, природные объекты выделенные из нематоцистов анемоны *Heteractis crispa*, А13 гибрид (комбинация функционально важных аминокислотных остатков АРНС1 и АРНС3), которые принимают участие в модулировании TRPV1, а также полипептиды Ugr 9-1 Ugr 9-2 Ugr 9-3, идентифицированы и выделенные из морской анемоны *U. Grebelnyi*; особый интерес представляет низкомолекулярное соединение выделенное чабреца (*Thymus armeniacus*) - (1R,2S)-1-[(1R,2S)-1-(3,4-дигидроксифенил)-6,7-дигидрокси-3-[(1R,2S)-1,2,3-трикарбокситпропокси] – севанол. На основе основного вещества севанол были созданы производные (II – севанол с метилированными карбоксильными группами (s788); III – севанол, укороченный на две уксуснокислотные группы (s590); IV – эпифилловая кислота (ЭА). Благодаря биотехнологическим подходам были созданы рекомбинантные соединения методом гетерологической экспрессии в составе гибридного с тиоредоксином белка в клетках *E. coli*. Проведен скрининг, выявлена связь «структура-активность», на основании которого для дальнейших углубленных исследований были выбраны соединения-лидеры, данные изложены с 3 по 6 главы.

В 3 и 4 глава посвящены изучению фармакологической активности и токсичности соединения лидера, рекомбинантного полипептида АРСНЗ в модельных экспериментах. Было показано, что соединения- лидеры в диапазоне доз от 0,01 до 10 мг/кг на многих экспериментальных моделях превосходят рефересные препараты - (диклофенак, ибупрофен и мелоксикам), вводимые в десятки раз в больших дозах, по анальгетической и противовоспалительной активности. Полипептид АРСНЗ, оказал превосходство в сравнении с диклофенаком по терапевтической широте анальгетического эффекта; не оказывает нежелательного действия на состояние жизненно важных систем организма в анальгетически активных дозах, обладает более продолжительным анальгетическим эффектом, чем диклофенак.

В токсикологических исследованиях модулятор TRPV1 рецепторов – полипептид АРСНЗ вводили в дозах в 10 тыс раз превышающих фармакологическую активную и изучали фармакологическую безопасность (влияние на центральную нервную систему, дыхательную и сердечно-сосудистую систему), было не обнаружено влияние на изучаемые системы лабораторных животных.

В 5 и 6 главе приведены данные собственных исследований исследователя по изучению соединения оказывающего потенциальный эффект через ASIC3 ионные каналы – севанолу. Представлены исчерпывающие данные по активности в тестах анальгетической активности и фармакодинамики, а также токсикологические исследования.

Модулятор ASIC3-каналов севанол был выявлен как лидер. В модельных экспериментах на лабораторных животных (тепловая гиперчувствительность спровоцированной полным адьювантом Фрейнда, укусыные корчи, горячая платина) определена активная доза 1 мг/кг. Фармакодинамические показатели севанола были сопоставимы с диклофенаком на протяжении 24 часов по анальгетической и противовоспалительной активности.

Севанол, изучали при парентеральном введении в дозах 500 мг/кг при однократном введении и 35 мг/кг при курсовом введении, показано отсутствие побочных эффектов со стороны центральной нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной и других систем организма лабораторных животных.



Таким образом, результаты собственных исследований диссертанта. Выявили фармакологически активную дозу тестируемых соединений, определены фармакодинамические активности соединений лидеров и проведены токсикологические исследования, что позволяет рекомендовать для изучения в качестве перспективных анальгетических лекарственных средств.

В заключении представлены обобщающие данные и обоснована фармакологическая активности и токсичность полученных собственных результатов.

Выводы соответствуют цели и задачам работы, отражают полученные результаты.

Содержание автореферата соответствует диссертации и отражает основные результаты, необходимые для суждения об обоснованности выводов.

Принципиальных замечаний к работе Дьяченко И.А. нет. На дискуссию выносятся следующие вопросы:

1. Достаточно ли времени введения (14 дней) в эксперименте хронической токсичности для оценки потенциального токсического эффекта?
2. Какое основное фармакологическое действие соединения лидера АРНСЗ-анальгетическое или противовоспалительное возможно рекомендовать в клинической практике?
3. Возможно ли экстраполировать полученные данные в эксперименте фармакологической активности на клиническую практику?

#### **Заключение:**

Таким образом, диссертационная работа **Дьяченко Игоря Александровича** на тему: «Эффективность и безопасность потенциальных анальгетиков, действующих на кислото-чувствительные ионные каналы», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой. В которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, которые можно квалифицировать как решение актуальной научной проблемы, имеющей важное значение для фармакологии – изучение анальгетической активности потенциальных веществ обладающих анальгетическим и



противовоспалительным действием с последующим доклиническим исследованием лидеров, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в ред. от 18.03.2023 № 415) «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Дьяченко Игорь Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

**Официальный оппонент:** Золотов Николай Николаевич

Главный научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор

Место работы и адрес работы:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», отдел нейробиофармакологии. Телефон рабочий: +7(910)4066322

Адрес эл почты рабочей zolotov\_nn@academpharm.ru

Специальность, по которой защищена диссертация оппонентом.

14.00.25– Фармакология

*Золотов*

**Подпись д.б.н. Н.Н.Золотова заверяю**

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», кандидат биологических наук



*Handwritten signature of V.A. Kravneva*

В.А.Крайнева

19

февраля 2024 г.