

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.218.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ УФИМСКОГО
ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК, МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК
аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 05 июня 2024 года № 6

О присуждении Негановой Маргарите Евгеньевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний» по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) принята к защите 27 февраля 2024 года (протокол заседания № 4) диссертационным советом 24.1.218.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450054, город Уфа, Проспект Октября, 71, лит. 1Е; сайт организации: <http://ufaras.ru/>). Создание диссертационного совета утверждено приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 271/нк от 13 ноября 2018 года (частичные изменения от 30 октября 2020 года № 661/нк, 03 июня 2021 года № 561/нк, 25 января 2022 года № 75/нк, 22 марта 2022 года №257/нк, 14 февраля 2023 года №216/нк).

Текст диссертации размещен на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук 07 февраля 2024 года (<http://ufaras.ru>)

Соискатель Неганова Маргарита Евгеньевна, 1983 года рождения, в 2007 году с отличием окончила специалитет биолого-химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования «Ивановский государственный университет» по специальности «Биология». Диплом об окончании университета ВСА № 0471167. С 2007 по 2010 годы проходила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (в 2022 году организация была переименована в Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук) по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

В 2012 году Негановой Маргаритой Евгеньевной была защищена диссертация на тему «Производные алкалоида секуринина и изоалантолактонов в качестве потенциальных нейропротекторов» и присвоена степень кандидата химических наук по специальности 02.00.10 Биоорганическая химия в этом же учреждении. Диплом кандидата наук № 162878 от 28.02.2012.

С февраля 2006 г. по июнь 2007 г. работала в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт проблем химической физики Российской академии наук в должности инженера. С июля 2007 г по настоящее время основным местом работы является Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (в 2022 году организация была переименована в Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук). В период с июля 2007 г. по февраль 2020 г. работала в лаборатории нейрехимии физиологически активных веществ (03.2013 переименована в Лабораторию биомолекулярного скрининга) в должностях инженер-исследователь (07.2007-04.2011), младший научный сотрудник (04.2011 - 06. 2012 гг.), научный сотрудник (06.2012-10.2016 гг.),

старший научный сотрудник (10.2016-09.2019 гг.), ведущий научный сотрудник (09.2019- 02.2020 гг.). В период с 02.2020 по 01.2022 работала в должности ведущего научного сотрудника Группы ферментативных процессов патологических состояний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук. С 01.2022 и по настоящее время является ведущим научным сотрудником и исполняет обязанности заведующего Лаборатории ферментативных процессов патологических состояний (03.2022 переименована в Лабораторию биохимии патологических процессов) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук.

Научный консультант – доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Лаборатории медицинского оборудования в области ин витро диагностики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»
Балакин Константин Валерьевич.

Официальные оппоненты

Егорова Ксения Сергеевна - доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук; **Торопова Яна Геннадьевна** - доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Института экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии лечебного факультета Института медицинского образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский

центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; **Зоров Дмитрий Борисович** - доктор биологических наук, профессор, заведующий Отделом функциональной биохимии биополимеров Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, дали положительные отзывы на диссертацию (отзывы прилагаются).

Официальный оппонент, доктор химических наук Егорова Ксения Сергеевна в своём положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучила следующие основные вопросы (полный список вопросов и замечаний, касающихся оформительских недочетов подробно описаны в отзыве оппонента (отзыв прилагается)): **1.** В тексте диссертации автор утверждает, что представленная в работе усовершенствованная система биотестирования позволяет распределять химические соединения по двум группам - нейропротекторы и цитостатики. Но внутри этих групп заболеваний имеется большое разнообразие патологий, например, солидные и гематологические опухоли, или болезнь Хантингтона и боковой амиотрофический склероз и т.д. Данная система является универсальной для всех перечисленных болезней или же это частные случаи - болезнь Альцгеймера, Паркинсона и некоторые опухоли? **2.** В части работы, касающейся исследования противоопухолевого потенциала гидроксамовых кислот, автором были выявлены соединения-лидеры, представленные двумя кардинально разными хемотипами - спироциклическим и линейным. По мнению автора, какие из этих соединений имеют больший потенциал выхода в практическую плоскость - на этап клинических испытаний? **3.** Рис. 10 автореферата и рис. 46 диссертации: в эксперимент по оценке влияния веществ Лп 1 – Лп 16 на гликолитическую функцию опухолевых клеток было бы интересно включить данные, полученные на нормальных клетках. **4.** Таблица 4 диссертации: в примечании к таблице указано, что все данные представлены в виде процента активности относительно контроля, но не уточняется, что это за контроль. Поэтому непонятно, как следует трактовать полученные

результаты. Например, антирадикальная активность, равная 12% от контроля, - это хорошо или плохо? 5. На рис. 23б диссертации представлено сравнение времени, которое тратят на распознавание нового объекта мыши контрольной группы и мыши с различными моделями амнезий. Насколько я понимаю, контрольная группа C57BL6/j должна была продемонстрировать схожие результаты в обоих экспериментах, однако графики б и в заметно различаются. С чем это связано? И о чем говорят результаты исследования, если разница в случае контрольной группы не была достоверной? 6. Диссертация, Таблица 9: немного смущает выбор культуры НЕК293 в качестве нормальных клеток для расчета индекса селективности. Для этого целесообразно использовать нормальные клеточные линии, имеющие общее происхождение с опухолевыми, на которых тестируется активность. 7. Диссертация, рис. 43 (индукция апоптоза в клетках Jurkat): согласно описанию в тексте диссертации и графикам на рис. б и г, контрольные клетки с интактными митохондриями должны давать только красный сигнал, однако на представленных графиках распределения контрольных клеток почти все клетки дают как красный, так и зеленый сигнал. То же самое касается образцов Ла 43 и Ла 44. Это требует пояснения.

Официальный оппонент, доктор биологических наук Торопова Яна Геннадьевна в своем положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучил следующие вопросы: 1. Будет ли доступна для других исследователей аннотированная база, составленная в ходе данной работы и модели виртуального скрининга? 2. Почему в качестве характеристик влияния соединений на митохондрии были выбраны мембранный потенциал и набухание? И связаны ли эти функции органелл между собой? 3. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является весьма широким понятием и включает в себя многочисленные процессы, связанные с изменением конформации ДНК, РНК и белков гистонов. Почему автор работы сконцентрировал своё внимание именно на изучении работы гистоновых деацетилаз? 4. По какой причине автор не использует вещество сравнения при

исследовании антипаркинсонического действия эпоксидиола в экспериментах *in vivo*? И почему в экспериментах на лабораторных животных нет группы мышей, получавших монотерпеновый диол для сравнения, как это приводилось в *in vitro* части работы?

Официальный оппонент, доктор биологических наук, профессор Зоров Дмитрий Борисович в своем положительном отзыве, отмечая актуальность, новизну, научную и практическую значимость работы сформулировал следующие вопросы: **1.** На рисунке 56 автор представляет результаты исследования биоэнергетического профиля митохондриальной р2 фракции из образцов головного мозга мышей, получавших лечение гидроксамовыми кислотами **ГКта 12** и **ГКта 23**. На графиках отчетливо видна разница между скоростью потребления кислорода органеллами нативных трансгенных животных 5xFAD, полученной в рамках разных экспериментов. Как автор может объяснить тот факт, что при проведении эксперимента для **ГКта 12** нарушения в работе отдельных комплексов дыхательной цепи были гораздо менее выраженными, чем для **ГКта 23**. **2.** При оценке HDAC6-ингибирующих свойств гидроксамовых кислот автор продемонстрировал способность ряда соединений приводить к 50% ингибированию активности фермента в субмикромольном интервале концентраций, в то время как для Трихостатина - известного ингибитора гистоновых деацетилаз - данная величина находилась в наномольном диапазоне. Является ли такое действие синтезированных в работе соединений недостатком, который сможет ограничить в будущем их внедрение в клиническую практику? **3.** Несколько вопросов, касающихся исследования влияния соединений класса гидроксамовых кислот на процесс гликолиза. При анализе гликолитического профиля клеток опухолевого происхождения под действием гидроксамовых кислот автор использовал соединения в концентрации 100 мкМ, в то время как при оценке других видов активности, данные вещества оказывали весьма выраженные эффекты при гораздо более низких концентрациях. По какой причине автором была выбрана именно данная концентрация гидроксамовых кислот и не связана ли

она с токсическим воздействием на клетки? Нет ли вероятности того, что обнаруженные автором эффекты соединений на процесс гликолиза связаны не с влиянием на гликолитическую функцию, а с возможной способностью гидроксамовых кислот напрямую изменять рН среды? 4. *In vivo* исследование пространственной памяти животных в большинстве случаев автор осуществлял с использованием теста Водный лабиринт Морриса, который является золотым стандартом нейробиологических испытаний, предназначенных для проверки функций гиппокампа у лабораторных грызунов. Однако при анализе когнитивного статуса мышей под действием Эпоксидиола автор отдал предпочтение Y-образному лабиринту, проходящему в радикально других экспериментальных условиях. Большая просьба к автору объяснить, по какой причине была изменена стратегия использования поведенческих тестов.

В отзывах официальных оппонентов дано заключение, что диссертационная работа Негановой М.Е. «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний» по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, имеющей первостепенное значение для решения стратегически важной задачи государственной политики в сфере отечественного здравоохранения - развития и расширения доступности современных медицинских технологий за счёт получения перспективных кандидатов в лекарственные препараты. Диссертационная работа Негановой М.Е. отвечает критериям п. 9,10,11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени доктора наук, а ее автор Неганова Маргарита Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Соискатель Неганова Маргарита Евгеньевна согласилась с высказанными замечаниями и дала исчерпывающие ответы на вопросы д.х.н. Егоровой Ксении Сергеевны, д.б.н. Тороповой Яны Геннадьевны и д.б.н. Зорова Дмитрия Борисовича, которые полностью удовлетворили оппонентов.

При ответе на первый основной вопрос оппонента д.х.н. Егоровой Ксении Сергеевны Неганова Маргарита Евгеньевна указала на то, что представленная в диссертации усовершенствованная система биотестирования химических соединений является универсальной для большинства нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Отвечая на второй вопрос М.Е. Неганова выделила в качестве наиболее активных гидроксамовых кислот с противоопухолевым потенциалом две группы веществ - гидроксамовые кислоты линейной структуры и спироциклические соединения. Отвечая на третий вопрос Маргарита Евгеньевна объяснила, что нормальные клетки генерируют энергию в ходе окислительного фосфорилирования, а при трансформации в опухолевую происходит переход на гликолитическое энергообеспечение и именно такой aberrantный метаболизм позволяет опухолевым клеткам неконтролируемо и быстро делиться. Поэтому в данном эксперименте ингибирование гликолиза рассматривается как перспективное свойство противоопухолевых кандидатов и целесообразным его было исследовать именно на трансформированных клетках. При ответе на четвертый вопрос автор уточнила, что в качестве контроля выступали пробы, содержащие растворитель исследуемых соединений - диметилсульфоксид. Отвечая на пятый вопрос Неганова М.Е. отметила, что в качестве контрольной группы были использованы мыши разных возрастов: 3-месячные и 11-месячные, поэтому и наблюдалась разница в показателях когнитивной функции. Далее автор объяснила, что НЕК293 - это клеточная линия, полученная из эмбриональной почки человека, благодаря простоте культивирования является «золотым стандартом» в качестве псевдонормальных клеток для сравнения действия веществ на здоровую и опухолевую культуру, что и обусловило целесообразность ее использование.

При ответе на седьмой вопрос Маргарита Евгеньевна пояснила, что агрегаты и мономеры флуоресцентной метки JC 1 светятся в зеленом свете. Однако агрегаты также светятся и в красном свете и гистограммы демонстрируют процент клеток с агрегатами и мономерами среди всех клеток в образце.

В ответе на первый вопрос Негановой Маргариты Евгеньевны д.б.н. Тороповой Яне Геннадьевне прозвучало, что в настоящее время модели виртуального скрининга продолжают «обучаться», а аннотированная база - активно обновляться и обогащаться новой информацией о биологической активности других структур. Что касается второго вопроса, автор пояснила, что мембранный потенциал является основным критерием функциональности митохондрий, снижение которого рассматривается в качестве показателя их повреждения. Более поздним событием, происходящим с дисфункциональными митохондриями, является их набухание. Оба этих события напрямую связаны с патогенезом рассмотренных заболеваний. При ответе на третий вопрос Неганова М.Е. пояснила, что акцентирование внимания на работе гистоновых деацетилаз обусловлено наличием бесспорных предпосылок к проявлению данного типа активности исследуемыми в работе соединениями. Отвечая на четвертый вопрос диссертант указала, что использование вещества сравнения не являлось целесообразным, поскольку одобренные на сегодняшний день антипаркинсонические агенты направлены на коррекцию дефицита дофамина или ингибирование моноаминоксидаз, что кардинально отличается от выявленного механизма действия для эпоксидиола. Что касается использования диола в *in vivo* тестировании: в серии экспериментов *in vitro* не было обнаружено для него положительных эффектов, поэтому не представлялось целесообразным продолжать его исследования на животных.

В ответах Негановой Маргариты Евгеньевны д.б.н. Зорову Дмитрию Борисовичу на вопросы прозвучало, что: первый вопрос. Наблюдаемые на рисунке 56 отличия, очевидно, обусловлены разницей в возрасте трансгенных мышей линии 5xFAD (в первом случае возраст животных составлял 11

месяцев, во втором - 13 месяцев). При ответе на второй вопрос Неганова М.Е. пояснила, что Трихостатин А, будучи мощным ингибитором гистоновых деацетилаз, обладает выраженной системной токсичностью для здорового микроокружения, в связи с чем помимо положительной функции несёт ряд побочных эффектов. Обнаруженное в работе менее выраженное действие гидроксамовых кислот не может рассматриваться в качестве отрицательного, поскольку целью работы был поиск не радикальных ингибиторов HDACs, а соединений обладающих несколькими механизмами действия. На третий вопрос диссертант ответила, что по окончании экспериментов при исследовании гликолиз-ингибирующей активности проводили МТТ-тест для подтверждения, что соединения не приводили к гибели клеток, а непосредственно влияли на метаболизм, а использование концентрации 100 мкМ является золотым стандартом. Что касается возможности собственного закисления среды гидроксамовыми кислотами, то при анализе образцов, содержащих исключительно соединения и растворитель, значения скорости внеклеточного закисления среды в образцах не отличались от контроля. На четвертый вопрос Маргарита Евгеньевна пояснила, что тест Y-образный лабиринт в большей степени подходил для проведения экспериментов на животных с нарушениями координации движений, вызванными ротеноном, так как водная среда может вызывать чрезмерный стресс и дискомфорт у мышей.

Ведущая организация – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» – в своем положительном отзыве, подписанном заведующим кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородского государственного национального исследовательского университета», директором НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ», доктором медицинских наук, профессором, заслуженным деятелем науки Российской

Федерации Покровским Михаилом Владимировичем, и утвержденным проректором по науке и инновациям федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), кандидатом экономических наук Резниченко Татьяной Юрьевной, указала, что на основании выполненных автором исследований была разработана усовершенствованная система биотестирования, которая позволила обнаружить среди широкого ряда химических соединений вещества-лидеры с перспективным профилем фармакологической активности. Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на заседании кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ» протокол № 9б от 9 апреля 2024 г.

В отзыве ведущей организации подробно проанализированы все аспекты работы и в качестве основных вопросов отмечены следующие: **1.** Автор указывает, что в первичном скрининге должно быть два и более видов биологической активности для того, чтобы в дальнейшем можно было отнести соединение к одной из двух групп и отправить на более подробное изучение. Однако непонятно, что делать с веществами, которые на этом скрининговом этапе оказали действия только на один показатель? Будут ли такие вещества исключены из дальнейшего исследования? **2.** Планирует ли автор в дальнейшем расширять методическую базу, разработанной системы биотестирования и исследовать биологическую активность не только в рамках противоопухолевого или нейропротекторного потенциала, но и других заболеваний человека? **3.** Чем руководствовался автор при выборе доз соединений-лидеров для *in vivo* испытаний с использованием лабораторных животных, в частности, нейропротекторов- алломаргаритарина и эпоксидиола, и противоопухолевого агента – спироциклической гидроксамовой кислоты, с валиновым заместителем?

Неганова М.Е. согласилась с замечаниями и исчерпывающе ответила на вопросы ведущей организации (подробные ответы на все замечания и вопросы изложены в стенограмме заседания).

Отвечая на первый вопрос, соискатель отметила, что для перехода на следующие этапы вещества действительно должны были обладать двумя или более видами биологической активности, а соединения, оказавшие влияние только на один показатель или не проявившие активности, были исключены из дальнейшего исследования, поскольку не представляют интереса в рамках рассматриваемых видов терапевтической активности. При ответе на второй вопрос автор сообщила, что в будущем продолжится работа над совершенствованием созданной системы биотестирования в направлении расширения базы как биомишеней, так и потенциальных терапевтических свойств. Отвечая на третий вопрос, Маргарита Евгеньевна отметила, что при выборе доз для алломаргаритарина и эпоксидиола ориентировались на представленные в литературе данные и на собственные наработки.

В заключении отмечается, что диссертационная работа Негановой Маргариты Евгеньевны «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний» по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, а представленные в диссертации положения, выносимые на защиту, четко аргументированы и основаны на большом объеме полученного экспериментального материала. Диссертационная работа соответствует требованиям п.9-11,13,14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор Неганова Маргарита Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки). Отзыв прилагается.

По теме работы соискателем опубликовано 47 статей в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus, РИНЦ, из них 37 в 16 журналах Q1 и Q2, 10 в журналах РИНЦ, 2 главы в монографиях и получен 1 патент.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Neganova, M.E.** Neuroprotective effects of the securinine-analogs: identification of allomargaritarine as a lead compound / **M.E Neganova**, S.G Klochkov, S.V. Afanasieva, T.P Serkova, E.S. Chudinova, S.O. Bachurin, V.P. Reddy, G. Aliev, E.F Shevtsova // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. - 2016. - V. 15. - № 1. - P. 102-107. - 7. - DOI: 10.2174/1871527314666150821111812 – WoS, SCOPUS, Q2, IF= 3.
2. Mishchenko, D.V. Chemosensitizing activity of histone deacetylases inhibitory cyclic hydroxamic acids for combination chemotherapy of lymphatic leukemia / D.V. Mishchenko, **M.E. Neganova**, E.N. Klimanova, T.E Sashenkova, S.G Klochkov, E.F Shevtsova, I.V Vystorop, V.V Tarasov, V.N Chubarev, Anna N Samsonova, G.Md Ashraf, G. Barreto, N.S. Yarla, G. Aliev // *Current Cancer Drug Targets*. - 2018. - V. 18. - № 4. - P. 365-371. - DOI: 10.2174/1568009617666170623104030 - WoS, SCOPUS, Q1, IF=3.
3. **Neganova, M.E.** The Hydroxamic Acids as a Potential Anticancer and Neuroprotective Agents. / **M.E. Neganova**, S.G. Klochkov, Y.R. Aleksandrova, G. Aliev // *Current Medicinal Chemistry*. - 2021. V.28. - № 39. - P. 8139-8162. - DOI: 10.2174/0929867328666201218123154 – Scopus, Q1, IF=4,1.
4. **Neganova, M.** Novel Multitarget Hydroxamic Acids with a Natural Origin CAP Group against Alzheimer's Disease: Synthesis, Docking and Biological Evaluation / **M. Neganova**, Y.Aleksandrova, E. Suslov, E. Mozhaitsev, A. Munkuev, D. Tsypyshev, M. Chicheva, A. Rogachev, O. Sukocheva, K. Volcho, S. Klochkov // *Pharmaceutics*. - 2021. - V. 13. - № 11. - P. 1893. - DOI: 10.3390/pharmaceutics13111893, WoS, Scopus, Q1, IF=5,4.
5. **Neganova M.** Development of Neuroprotective Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease Using Conjugates of Serotonin with Sesquiterpene Lactones / **M. Neganova**, J. Liu, Y. Aleksandrova, N. Vasilieva, A. Semakov, E. Yandulova,

O. Sukocheva, K. Balakin, S. Klochkov, R. Fan // Current Medicinal Chemistry. - 2024. V. 31. - № 5. - P. 529-551. - DOI: 10.2174/0929867330666221125105253 – Scopus, Q1,IF=4,1.

6. Aleksandrova, Y. Monoterpenoid Epoxidol Ameliorates the Pathological Phenotypes of the Rotenone-Induced Parkinson's Disease Model by Alleviating Mitochondrial Dysfunction / Y. Aleksandrova, K. Chaprov, A. Podturkina, O. Ardashov, E. Yandulova, K. Volcho, N. Salakhutdinov, **M. Neganova** // International Journal of Molecular Sciences. - 2023. V. 24. - № 6. - P. 5842. - DOI: 10.3390/ijms24065842 –WoS, Scopus, Q1, IF=5,6.

Полный список опубликованных работ представлен в автореферате.

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов:

Все полученные отзывы положительные, их прислали:

1. Доктор химических наук, доцент кафедры химии, теории и методики преподавания химии, директор Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», **Корсаков Михаил Константинович.**

2. Доктор биологических наук, старший научный сотрудник Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»», **Выштакалюк Александра Борисовна.**

3. Доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, **Голубева Елена Константиновна.**

4. Доктор медицинских наук, профессор, начальник управления экспертизы безопасности лекарственных средств Федерального

государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, **Аляутдин Ренад Николаевич**.

5. Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией экологии и молекулярной биологии микроорганизмов, профессор кафедры биохимии и микробиологии Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет», **Сазыкина Марина Александровна**.

Соискатель Неганова Маргарита Евгеньевна ответила на все вопросы и замечания, указанные в отзывах на автореферат диссертации.

В ответе на вопрос **Выштакалюк А. Б.**, о проведении предварительного исследования острой токсичности соединений перед *in vivo* экспериментами, **Неганова М.Е.** отметила, что перед *in vivo* испытаниями были проведены предварительные исследования токсикологического профиля веществ: для молекул, рассматриваемых в качестве потенциальных нейропротекторов, путём внутрибрюшинного введения веществ в диапазоне концентраций от 1 до 300 мг/кг, СцГК 3 был проанализирован полный спектр токсикологических параметров (МПД, ЛД50 и ЛД100).

Во всех отзывах на автореферат отмечается, что работа Негановой Маргариты Евгеньевны является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач на стыке биохимии, фармакологии и медицинской химии. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном и методическом уровне, выводы диссертации достоверны и полностью отражают поставленные задачи. Во всех отзывах указано, что диссертационная работа отвечает критериям п. 9-11, 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени доктора наук, а ее автор Неганова

Маргарита Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки) (отзывы прилагаются).

Выбор официальных оппонентов обосновывается следующим:

Егорова Ксения Сергеевна - доктор химических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук, является высококвалифицированным специалистом в области биоорганической химии и медицинской химии, а также автором многочисленных публикаций в высокорейтинговых журналах.

Торопова Яна Геннадьевна - доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Института экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии лечебного факультета Института медицинского образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, является высококвалифицированным специалистом в области патофизиологии, имеет большое количество публикаций и обширный опыт работ на стыке экспериментальной биологии и прикладной медицины.

Зоров Дмитрий Борисович - доктор биологических наук, профессор МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующий Отделом функциональной биохимии биополимеров Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, является одним из ведущих в России и мире специалистом в области биохимии клетки, и, в частности, имеет колоссальный опыт работы по изучению роли

митохондрий в норме и патологии, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

Все оппоненты имеют соответствующие публикации в журналах из Перечня ВАК и дали свое согласие быть оппонентами диссертационной работы Негановой Маргариты Евгеньевны.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» является ведущим в Российской Федерации научным учреждением в разных областях науки, включая биохимию, фармакологию и медицинскую химию. Результаты работ сотрудников данного учреждения широко известны как в российских, так и международных научных кругах.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложена усовершенствованная система биотестирования новых химических соединений, учитывающая фундаментальную взаимосвязь биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний, которая позволяет рационализировать ранний исследовательский этап разработки лекарственных препаратов;

идентифицирован ряд веществ-лидеров среди новых гидроксамовых кислот и производных природных соединений, обладающих комплексным типом нейропротекторного или противоопухолевого действия;

показано, что оригинальные производные гидроксамовых кислот линейной структуры, содержащие фрагменты адамантана и монотерпенов, способны восстанавливать когнитивный дефицит трансгенных мышей линии 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера, за счет мультитаргетного типа нейропротекторного действия, включающего антиоксидантную активность, а также способность ингибировать гистоновую деацетилазу 6 и препятствовать агрегации патологической формы β -амилоидного пептида 1-42;

отмечено, что монотерпеновый эпоксидиол на основе *para*-ментанового остова является перспективной платформой для создания лекарственных препаратов для терапии болезни Паркинсона за счет антиоксидантных и митопротекторных свойств;

доказано, что спироциклические гидроксамовые кислоты ряда 1,4,8-триазаспиро[4.5]декан-2-она проявляют хемосенсибилизирующую активность к действию циклофосфана за счет HDAC1-ингибирующих, Fe(II)-хелатирующих свойств и способности приводить к деградации митохондрий;

выявлены бифармакофорные производные сесквитерпеновых лактонов и полиалкоксибензолов, демонстрирующие ранее не описанный комплексный профиль противоопухолевой активности, в основе которого лежат антиоксидантные свойства, способность изменять метаболический фенотип опухолевых клеток и деполяризовать митохондриальную мембрану;

создана аннотированная база, содержащая химико-биологическую информацию об исследованных молекулярных объектах, позволяющая прогнозировать структурно-функциональные закономерности проявления целевой биологической активности новых соединений при помощи современных алгоритмов хемоинформатики и машинного обучения.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

проанализирована существующая взаимосвязь определенных биохимических каскадов, вовлечённых в ранние этапы патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний; развитие данной гипотезы позволяет рационализировать поиск и отбор перспективных потенциальных лекарственных кандидатов среди большого числа молекулярных объектов различной химической структуры;

раскрыта роль структурных модификаций молекул (в частности, изменения структуры молекулярных скаффолдов, комбинирования фармакофорных фрагментов, варьирования длины линкерной части, снижения конформационной подвижности путем циклизации) в проявлении спектра биологического действия соединений;

применительно к проблематике диссертации результативно **использован** комплекс современных высокотехнологичных методов *in silico*, *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* анализа, микроскопии, цитогенетики, статистики и др.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Разработана и экспериментально апробирована система биологического тестирования, учитывающая фундаментальную взаимосвязь биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний, что позволяет в максимальной степени раскрыть терапевтический потенциал тестируемых объектов и повысить эффективность отбора нейропротекторных и противоопухолевых лекарственных кандидатов.

Создана уникальная аннотированная база, содержащая комплексное описание физико-химических и иных расчетных свойств молекулярных объектов и их разностороннюю биологическую активность, что позволяет прогнозировать структурно-функциональные закономерности влияния молекулярных объектов на биохимические каскады и получать информацию, необходимую для дальнейшей направленной химической модификации соединений с целью улучшения фармакологических характеристик.

Показано наличие эффективных нейропротекторных и противоопухолевых агентов среди соединений различных хемотипов: гидроксамовых кислот и производных ряда природных молекулярных скаффолдов, которые выступают в качестве перспективных лекарственных кандидатов для дальнейшей доклинической и клинической разработки;

Получен патент на изобретение – № 2783995 Неганова М.Е., Александрова Ю.Р., Мункуев А.А., Суслов Е.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. «4-(3-((2-Адамантил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-N-гидроксибензамид – новое средство для лечения болезни Альцгеймера».

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что: достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследований на репрезентативных выборках, с надлежащим числом

повторов, с использованием валидированных методов, а также надежных методов статистической обработки данных, и последующим детальным анализом полученных результатов. Все экспериментальные данные получены на современном высокотехнологичном оборудовании, благодаря чему удалось обеспечить воспроизводимость результатов исследования.

Корректность и высокий научный уровень проведённых исследований подтверждены публикацией основных результатов исследования в высокорейтинговых международных и отечественных рецензируемых журналах. Также материалы диссертации были представлены на Всероссийских и международных конференциях и конгрессах.

Теория работы построена на верифицируемых данных и фактах, согласующихся с ранее опубликованными материалами по теме диссертации;

идея базируется на глубоком анализе современной литературы, освещающей достижения в области исследования биохимических механизмов развития нейродегенеративных и онкологических заболеваний, молекулярного конструирования и разработки перспективных молекул на основе гидроксамовых кислот и природных соединений, а также мишень-ориентированного поиска противоопухолевых и нейропротекторных агентов;

использованы современные данные научных исследований по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, а также информация из баз данных для сравнения полученных в работе данных с результатами предшествующих исследований;

установлена сопоставимость результатов настоящего исследования с данными, полученными в других, более ранних работах зарубежных и отечественных научных коллективов;

использованы современные биохимические, гистохимические, поведенческие, компьютерно-расчетные и статистические методы.

Личный вклад соискателя заключается в ключевой роли в выработке цели и направления исследования, определении общей концепции, постановке задач, выборе плана работы и методологии исследования, проведении

экспериментов. Описанные в диссертационной работе результаты, касающиеся всех проведенных биологических испытаний, статистическая обработка, анализ данных и их публикация проведены автором лично, либо при его непосредственном участии.

В ходе защиты диссертации критические замечания высказаны не были, заданы вопросы уточняющего и конкретизирующего характера. Соискатель Неганова Маргарита Евгеньевна ответила на все вопросы в ходе заседания.

На заседании 05 июня 2024 года Диссертационный совет пришёл к выводу, что совокупность защищаемых положений позволяет заключить, что диссертация Негановой Маргариты Евгеньевны «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний имеет важное научное теоретическое и практическое значение, а именно, реализован интегральный подход к биотестированию химических соединений, основанный на взаимосвязи биохимических каскадов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний для рационализации ранних этапов поиска лекарственных препаратов, что обладает несомненной актуальностью на фундаментальном уровне и с точки зрения практического применения в сфере российского и мирового здравоохранения. Диссертация является цельным и законченным научным исследованием, обладающим внутренним единством изложения, а выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Таким образом диссертационная работа Негановой Маргариты Евгеньевны представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 05 июня 2024 года диссертационный совет 24.1.218.01 принял решение присудить Негановой Маргарите Евгеньевне ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., профессор член-корреспондент РАО	 / Хуснутдинова Эльза Камилевна
Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., доцент	 / Корытина Гульназ Фаритовна
	«5» июня 2024 года