

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по науке и инновациям
федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет» (НИУ «БелГУ»), кандидат
экономических наук



Резниченко Т. Ю.

« 11 » апреля 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ») на диссертацию Негановой Маргариты Евгеньевны «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертации и новизна исследования

Диссертационная работа Негановой Маргариты Евгеньевны посвящена разработке и практическому применению рационального подхода к поиску противоопухолевых и нейропротекторных агентов на основе гипотезы о взаимосвязи биохимических каскадов ранних стадий патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

Онкологические и нейродегенеративные заболевания - одни из наиболее распространенных неизлечимых болезней, которые являются основной причиной смертности населения во всем мире. В 2020 году от онкологии умерло почти 10 миллионов человек, а число пациентов с наиболее распространенными нейродегенеративными заболеваниями (НДЗ), такими как

болезнь Альцгеймера и другими формами деменции, оценивалось примерно в 30-35 миллионов. По данным Всемирной организации здравоохранения общие мировые расходы на лечение пациентов с неврологическими расстройствами в 2015 году составили 818 миллиардов долларов США и потенциально могут вырасти до 2 триллионов к 2030 году. Поэтому обеспечение населения эффективными средствами терапии данных заболеваний является одной из приоритетных целей специалистов как в области науки, так и здравоохранения, при достижении которой произойдет повышение качества и продолжительности жизни пациентов.

Жизненный цикл лекарственного препарата включает многочисленные последовательные этапы от ранних стадий разработки до рыночного внедрения и обращения. Наиболее сложной и ответственной является первая ступень – создание и разработка потенциального лекарственного кандидата. В настоящий момент большинство научных групп проводят отбор эффективных соединений в рамках одного терапевтического направления, где производится поиск, ориентированный на конкретную мишень. Однако не всегда такая стратегия оказывается рациональной, так как подобная фокусировка может привести к потере ценной информации о потенциале данного соединения в другой терапевтической области. Поэтому разработка современных технологий отбора лекарственных кандидатов в ходе исследовательской фазы, включающих комплексы тестов, нацеленных на изучение многоплановой биологической активности химических веществ различной структуры, является актуальной задачей биохимии, фармакологии и многих смежных отраслей науки. В идеале такая система должна оценивать возможность влияния исследуемых молекулярных объектов как на поздние биохимические клеточные каскады, так и на ранние аспекты патогенеза, которые могут быть общими для различных заболеваний. Кроме того, важно не только определить теоретическую базу такой системы биотестирования, но и создать комплекс скрининговых методов, по возможности опираясь на высокопроизводительные исследовательские инструменты.

Научная новизна диссертационной работы Негановой М.Е. заключается в реализации именно такого интегрального подхода к биотестированию химических соединений, который основан на взаимосвязи биохимических каскадов ранних стадий патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний, таких как митохондриальная дисфункция, окислительный стресс и нарушения в эпигенетической регуляции, с целью совершенствования начальных исследовательских этапов поиска лекарственных препаратов.

Важным практическим результатом диссертационной работы является определение с помощью разработанного автором алгоритма ряда эффективных

агентов с нейропротекторной или противоопухолевой активностью среди производных гидроксамовых кислот и природных соединений, которые можно рассматривать в качестве перспективных лекарственных кандидатов для дальнейших доклинических и клинических испытаний.

Еще одним новым интересным практическим результатом является создание аннотированной базы, содержащей информацию о физико-химических и биологических свойствах тестируемых соединений. Данный информационный инструмент, благодаря своему функционалу, может стать важной составляющей в разработке новых лекарственных средств при помощи методов искусственного интеллекта и компьютерного моделирования.

Таким образом, не вызывает сомнения актуальность исследований, проводимых в рамках диссертации Негановой М. Е., а также значимый фундаментальный и практический выход работы.

Личное участие автора определяется в первую очередь соавторством в многочисленных научных статьях, содержащих основные результаты диссертации. Негановой М.Е. самостоятельно сформулированы цель и задачи исследования, спланированы и проведены большинство биологических испытаний, применены современные методы статистической обработки и анализа результатов. Кроме этого, под руководством автора защищена диссертация на соискание степени кандидата биологических наук.

Апробация работы проходила на многочисленных российских и международных научных конференциях в виде устных и стендовых докладов, включая такие крупные зарубежные конгрессы как Съезд нейропсихофармакологов (ЕСNP – Австрия, Франция, Испания и Дания) и конференцию «Митохондрия как мишень» (Targeting Mitochondria) в Берлине (Германия). Также впечатляет количество опубликованных работ (47 статей) с основными результатами исследования, большая часть которых напечатана в высокорейтинговых журналах индексируемых в Web of Science, Scopus, РИНЦ, кроме этого, написано 2 главы в монографиях и получен 1 патент.

Структура и характеристика работы

Диссертационная работа Негановой М.Е. построена в соответствии с требованиями ГОСТ, предъявляемыми к оформлению докторской диссертации, и состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованной литературы, который содержит 898 источников. Материалы диссертации изложены на 423 страницах машинописного текста, включают 76 рисунков, 27 таблиц и 3 приложения.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность темы, определяет цель и задачи исследования, подтверждает новизну, теоретическо-практическую

значимость работы, описывает степень достоверности и апробацию результатов, методологию исследования, указывает структуру работы.

Глава «Обзор литературы» обоснована и сфокусирована на общей теме исследования, состоит из трех разделов, каждый из которых включает от 3 до 5 подразделов. В первом разделе автор систематизирует современные научные данные об источниках свободных радикалов и механизмах окислительного стресса, нарушении в работе собственной антиоксидантной системы защиты клетки; рассматривает свободно-радикальную теорию возникновения патологического состояния в клетке и АФК-опосредованные сигнальные пути при онкологии и нейродегенерации. Кроме этого, Неганова М.Е. подробно характеризует известные в настоящий момент потенциальные терапевтические кандидаты, которые нацелены на АФК, а также механизмы окислительного стресса и митохондриальную дисфункцию при онкологических и нейродегенеративных заболеваниях. Второй раздел включает в себя описание общих аспектов эпигенетической регуляции развития патогенеза НДЗ и онкологических патологий с отдельным подробным анализом структуры, функции и роли гистоновых деацетилаз в качестве основных эпигенетических регуляторов как в здоровом организме, так и при вышеуказанных заболеваниях. Также в этом разделе рассматриваются достижения в разработке ингибиторов гистоновых деацетилаз в терапии онкологических и нейродегенеративных расстройств. В третьем разделе литературного обзора описаны известные современной науке нарушения в биоэнергетическом метаболизме клеток при онкогенезе и нейродегенерации; охарактеризованы основные метаболические процессы клетки, энергетический обмен, а также рассмотрены молекулярные тонкости метаболизма опухолевых клеток; рассмотрена коррекция аномалий процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях в качестве перспективного терапевтического подхода при создании нейропротекторных препаратов.

Во второй главе диссертации «Материалы и методы» автором подробно охарактеризованы используемые в работе лабораторные животные, биообразцы (их получение) и экспериментальные методы, включающие комплекс биохимических, гистологических, гистохимических и поведенческих методик, которые в полной мере соответствуют поставленным задачам. Особое внимание уделено описанию используемого компьютерного моделирования и разработки QSAR-модели, которая была осуществлена с использованием Python версии 3.90 и ряда библиотек (sklearn; matplotlib и seaborn; PyTorch; shap), а также графовой нейронной сети AttentiveFP.

Глава «Результаты и обсуждение» изложена понятным, корректным профессиональным языком, а полученные данные сопровождаются соответствующими рисунками и таблицами. Важно отметить логичность и правильность проведения экспериментальных работ, грамотную статистическую обработку данных и их подробное описание. В разделах 3.1.1-3.1.3 автор подробно описывает усовершенствование системы биологического тестирования химических соединений для поиска как противоопухолевых, так и нейропротекторных агентов. Данная система включает в себя ранний скрининговый этап, аналитический этап, этап определения влияния соединений на выживаемость клеточных культур, этапы определения специфической активности *in vitro* и *in vivo*. Представлено подробное обоснование выбора скрининговых тестов для раннего скринингового этапа, а также принципы и алгоритм отнесения соединений к категориям активности. В разделе 3.2. охарактеризованы молекулярные объекты исследования, которые относятся к различным химическим классам веществ. Исследованы разнообразные по структуре производные природных соединений (более 100 веществ, среди которых аминопроизводные алкалоида секуринина, амино- и азинопроизводные сесквитерпеновых лактонов, производные монотерпенового диола пара-ментанового остова и биоконъюгаты лактонов с полиалкоксибензолами); гидроксамовые кислоты (спироциклические гидроксамовые кислоты, содержащие остатки аминокислот; циклические гидроксамовые кислоты на основе хиназолина; гидроксамовые кислоты, содержащие монотерпеновый и адамантановый фрагменты). Раздел 3.3. включает в себя описание экспериментальных данных биологического тестирования с использованием усовершенствованной интегральной схемы скрининга. В разделе 3.3.1. представлен ранний скрининговый этап и распределение веществ по фармакологическим группам: потенциальные противоопухолевые или нейропротекторные агенты. В разделах 3.3.2.-3.3.5 описаны *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* исследования целевой эффективности соединений-хитов в группах потенциальных нейропротекторных и противоопухолевых агентов среди соединений на основе природных скаффолдов и гидроксамовых кислот. В разделе 3.4. отображён процесс составления и хемоинформационного анализа аннотированной базы данных, которая содержит комплексную информацию о соединениях и их влиянии на биохимические каскады ранних стадий развития нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Кроме этого, автор описывает разработку и валидацию двух созданных им регрессионных QSAR-моделей (модель GA-RF и модель Attentive FP), которые позволяют быстро и эффективно прогнозировать антиоксидантные свойства новых соединений с точностью,

вполне достаточной для практического применения на исследовательском этапе разработки новых агентов.

В «Заключении» подробно проанализированы и систематизированы полученные результаты, изложенные в предыдущих главах.

Выводы диссертации закономерно вытекают из основных научных положений, защищаемых автором, соответствуют цели и задачам исследования, имеют несомненное научное и практическое значение. Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов работы не вызывают сомнений.

Общее впечатление от работы

Диссертационная работа логически структурирована, содержательна и написана грамотным научным языком. Впечатляет подробное изложение и обсуждение материала и качество иллюстраций. Высокой оценки заслуживает список литературы, представляющий собой полную и хорошо систематизированную подборку многочисленных актуальных научных источников. Таким образом, данная диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне, а представленные в диссертации положения, выносимые на защиту, четко аргументированы и основаны на большом объеме полученного экспериментального материала.

Замечания и вопросы по диссертации

Серьёзных замечаний к тексту работы не выявлено, однако присутствуют некоторые недочеты по оформлению:

1) Не приведено к единому стилю написание названия поведенческих методик и нейротоксина ротенона. Ротенон написан и «ротенон», и «РОТ», и «Ротенон». Кроме этого, название теста «ускоряющийся ротарод», также имеет разный вид, в одних местах употребляется с маленькой буквы, в других - с большой.

2) На Рисунке 31 — *Ex vivo* анализ образцов головного мозга трансгенных мышей 5xFAD post-mortem, получавших С 2 в экспериментах *in vivo* — практически не видно амилоидных отложений на срезе мозга, а также ни в подписи к рисунку, ни в тексте не указано каким методом исследовали отложения А β – иммуногистохимическим или с помощью окрашивания конго-красным.

3) На Рисунках 35 и 37 присутствуют плохо различимые подписи, что затрудняет понимание сути полученных результатов.

4) В таблице 44 в тексте диссертации качество формул оставляет желать лучшего, в автореферате эта проблема хорошо исправлена.

5) На Рисунке 53 непонятно наличие нейрона черного цвета.

Также в тексте диссертации присутствует небольшое количество опечаток и стилистических ошибок.

Также по тексту диссертации имеется ряд вопросов:

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, нейропротектора — алломаргаритарина и эпоксидиола, и противоопухолевого агента — спироциклической гидроксамовой кислоты, в валиновым заместителем?

Стоит отметить, что указанные замечания в целом не влияют на научную ценность диссертации Негановой Маргариты Евгеньевны и, возможно, послужат импульсом к расширению круга исследований в дальнейшей работе.

Заключение

Диссертационная работа Негановой М.Е. на тему «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработана система биотестирования соединений различной химической структуры, предназначенная для оценки их влияния на биохимические каскады патогенеза как онкологических, так и нейродегенеративных заболеваний, что способствует рационализации ранних исследовательских этапов поиска лекарственных препаратов. Более того, среди широкого ряда химических соединений обнаружены вещества-лидеры с перспективным профилем фармакологической активности, готовые к передаче на доклинические испытания.

Таким образом, по актуальности темы работы, объёму проведённых исследований, новизне полученных фундаментальных и практических результатов, обоснованности научных выводов и научной значимости диссертация соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Неганова Маргарита Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсуждён и одобрен на заседании кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ» 9 апреля 2024 г., протокол № 9б.

Отзыв составил:

Покровский Михаил Владимирович, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, директор НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ», д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации



Контактные данные:

Телефон: +74722301373

e-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Адрес места работы:

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»),

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

8(4722) 30-12-11, Info@bsu.edu.ru