

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора химических наук, ведущего научного сотрудника
Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.
Д. Зелинского Российской академии наук Егоровой Ксении Сергеевны на диссертацию
Негановой Маргариты Евгеньевны «Рациональный подход к поиску лекарственных
агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза
нейродегенеративных и онкологических заболеваний», представленную на соискание
ученой степени доктора биологических наук по специальности
1.5.4. Биохимия (биологические науки)**

Диссертация Маргариты Евгеньевны Негановой посвящена рационализации подхода к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Несмотря на то, что нейродегенеративные и онкологические заболевания относятся к разным группам болезней человека, в последние годы выявлен ряд общих патогенетических механизмов и биохимических каскадов, позволяющих использовать однотипные тест-системы для поиска новых лекарственных препаратов для борьбы с данными патологиями. Создание единой скрининговой платформы для определения типа биологической активности потенциальных лекарственных агентов различной химической природы позволит значительно сократить время раннего биоскрининга, более точно определить их терапевтическую направленность, а также существенно снизить экономическую нагрузку. Предлагаемый подход, направленный на рационализации ранних исследовательских этапов поиска терапевтических средств, безусловно, актуален и заслуживает особого внимания. Более того, определённые с помощью данного подхода вещества среди гидроксамовых кислот и производных природных соединений в ближайшем будущем будут переданы на доклинические испытания и в дальнейшем могут стать перспективными лекарственными препаратами.

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день одними из ведущих причин смертности населения являются нейродегенеративные и онкологические заболевания, терапия которых не обеспечивает достаточной эффективности и безопасности. По этой причине разработка современных подходов для получения противоопухолевых и нейропротекторных средств является одним из необходимых и востребованных направлений современной науки. Существующая схема ранней стадии разработки лекарственных препаратов основана на реализации методов виртуального компьютерного скрининга с последующим химическим синтезом и созданием библиотек молекулярных объектов, а также биологическим скринингом полученных образцов. Результатом данного этапа является идентификация соединений-лидеров с установленным

типом биологической активности в рамках одного лекарственного профиля. Несмотря на применимость вышеописанной стратегии, она не учитывает фармакологический потенциал тестируемых соединений в других терапевтических областях. Поэтому актуальной проблемой раннего этапа поиска потенциальных лекарственных препаратов является создание комплексной системы биологического тестирования химических веществ, способной определять терапевтический потенциал соединений в рамках нескольких патологических состояний и позволяющей минимизировать исключение потенциально активных соединений из общего пула тестируемых молекулярных объектов. В рамках гипотезы о взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний был усовершенствован стандартный подход к поиску лекарственных агентов, позволяющий решить указанные задачи. Полученные данные обладают актуальностью как на фундаментальном уровне, так и с точки зрения практического применения в сфере здравоохранения.

Степень новизны, обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Автором грамотно сформулирована цель работы, отражающая суть исследования, поставлены конкретные, логически обоснованные задачи. Научные положения и выводы, представленные в диссертации, полностью обоснованы и базируются на обширном анализе теоретических данных и полученном автором экспериментальном материале.

В диссертации впервые был реализован основанный на общности биохимических каскадов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний подход к биотестированию химических соединений, позволяющий рационализировать ранние исследовательские этапы поиска лекарственных препаратов. В рамках работы была создана аннотированная база, позволяющая определить терапевтическое действие исследуемых соединений в качестве потенциальных нейропротекторных или противоопухолевых агентов, прогнозировать их влияние на биохимические каскады патогенеза данных заболеваний, а также определять необходимость химической модификации для улучшения фармакологических характеристик тестируемых веществ. При помощи разработанного подхода идентифицированы эффективные нейропротекторные и противоопухолевые агенты, рекомендованные для дальнейшей оценки в качестве лекарственных кандидатов в рамках доклинических и клинических испытаний.

Достоверность и апробация результатов исследования

Научные положения и выводы характеризуются достаточной для докторской диссертации обоснованностью и новизной. Достоверность полученных результатов в диссертационной работе определяется адекватным подбором объектов исследования, использованием современных валидированных методов и корректностью статистического анализа данных. Большая часть представленного в диссертации материала опубликована в научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus - 37 статей, 10 публикаций в журналах РИНЦ, имеются 2 главы в монографиях и получен 1 патент. Все основные положения диссертации представлены на престижных научных конференциях российского и международного уровней.

Оценка содержания, завершённости и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена на 423 страницах, включая введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитированной литературы, содержащий 898 источников, и 3 приложения. В тексте содержится 27 таблиц и 76 рисунков. Структура работы соответствует предъявляемым к докторским диссертационным работам требованиям.

Во введении обоснована актуальность выбора соискателем темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи для ее достижения. В этом же разделе подчеркнуты научная новизна и значимость работы и представлены основные положения, выносимые на защиту. Степень достоверности результатов исследований, описание ключевой роли автора в выборе направления исследования и получения результатов также представлены в конце раздела.

В первой главе, являющейся обзором литературы, выполнен детальный анализ современного состояния исследований в области поиска эффективных путей лечения нейродегенеративных и онкологических заболеваний, а также приведены доказательства общности мишеней данных патологических состояний, которые позволили определить основное направление диссертационной работы - рационализацию подхода к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

Существенным достоинством этой главы диссертационной работы является детальное изложение и критический подход к существующим стратегиям поиска эффективных нейропротекторов и цитостатиков, исследованию механизмов действия известных препаратов и перспективных химических соединений. На основе современных литературных данных автор показал роль окислительного стресса, митохондриальной дисфункции, эпигенетической

регуляции и изменений биоэнергетического метаболизма в развитии как онкологических, так и нейродегенеративных заболеваний, а также на основе сформулированной гипотезы о единстве ранних этапов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний построил дальнейшее экспериментальное исследование.

Вторая глава представляет собой детальное описание используемых в работе моделей исследования *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, материалов и методов, а также способов обработки полученных результатов. Автор продемонстрировал широкое владение современными высокочувствительными методами исследования, включая разнообразные биохимические методики, молекулярный докинг и работу с модельными лабораторными животными.

Полученные в ходе исследования результаты представлены в третьей главе диссертационной работы. К наиболее существенным достижениям следует отнести усовершенствование интегральной системы биологического тестирования химических соединений с определением скрининговых тестов для распределения соединений по фармакологическим группам. На основе предложенной схемы выполнена оценка биологической активности широкого ряда химических соединений различной структуры, выделены наиболее перспективные соединения-лидеры и проведена полноценная характеристика их эффективности в соответствующем фармакологическом направлении. На основании полученных данных определены вещества, готовые для передачи на доклинические исследования. Кроме того, практическим выходом диссертационного исследования является создание аннотированной базы, позволяющей определить связь «структура-свойство» для тестируемых молекул, и предложены валидированные QSAR-модели для предсказания антиоксидантных свойств новых химических объектов.

Автореферат полно отражает материалы диссертационного исследования. Оформлен в соответствии с требованиями ВАК, включает все необходимые основные подразделы: общая характеристика работы, результаты и обсуждение, выводы и список публикаций по теме диссертации.

Общая оценка работы, замечания и вопросы

В целом диссертация отражает широкий круг научных интересов автора, который представил работу как масштабное междисциплинарное исследование, выполненное на стыке представлений современной биохимии, медицинской химии и фармакологии. Успешной реализации работы удалось достичь благодаря проведенному автором глубокому теоретическому анализу современных данных, на котором и базируется основная гипотеза диссертации. Впоследствии эта гипотеза легла в основу многолетнего научного эксперимента, преследующего стратегически важную цель поиска потенциальных лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

Диссертационная работа написана достаточно грамотным слогом, описание и интерпретация экспериментов подробны и обстоятельны, исследовательские идеи четко изложены. Вместе с тем в самой диссертационной работе и в автореферате можно выделить некоторые недостатки. Большинство из них являются оформительскими, однако есть и несколько вопросов по сути работы. Так, в виду ограниченности объема автореферата автор не уточняет принципы использованных в работе методик, что приводит к сложностям в интерпретации результатов.

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. Обсуждая рис. 4 автореферата, автор делает вывод, что «Д 2 наиболее эффективно нормализовал нарушения мембранного потенциала», но из сравнения представленных графиков это не очевидно, поскольку не ясна схема эксперимента. Что именно показывает уровень флуоресценции в данном случае?

4. 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.

5. Автореферат, стр. 22: в тексте упомянуты две группы животных в экспериментах с ротеноном: (1) одна получала соединение Д 2 ежедневно, начиная с 8 дня эксперимента в условиях уже сформированной патологии, а (2) вторая – ежедневно в течение всего периода эксперимента. Однако неясно, результаты для какой группы приведены на рис. 6 и 7. Аналогичный вопрос – к рис. 37 диссертации.

6. 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?

7. На стр. 144 автор указывает, что «были получены целевые продукты, сочетающие в своей структуре два фармакофорных компонента - лактоновые фрагменты и бензилазиды». На самом деле, целевые соединения несут бензилтриазольный фрагмент.

8. 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?

9. 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.

10. 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.

11. Диссертация, Таблица 14: согласно тексту, «ни одно из исследованных соединений не обладало выраженной цитотоксической активностью в отношении использованной культуры клеток». Однако для некоторых из приведенных в таблице веществ IC_{50} весьма низки – около 50 мкМ. Где проходит граница между «выраженной» и «невыраженной» цитотоксической активностью?

Из оформительских недочетов в первую очередь следует отметить очень мелкие рисунки как в автореферате, так и диссертации. Например, в диссертации на рис. 1, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 29, 31, 33, 34, 35, 37, 42, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 54, 56, 61, 68, а также на схемах 1, 5, 7 использован слишком мелкий, нечитаемый шрифт, что затрудняет их интерпретацию. Также автор не отделяет пустыми строками начало новых разделов и заголовки таблиц, что затрудняет чтение. Есть и другие недочеты, например:

1. В автореферате не приведена расшифровка большинства использованных аббревиатур, хотя их следует расшифровывать при первом упоминании в тексте. Также автор при обсуждении биологических свойств ряда соединений использует их тривиальные названия и не приводит структурные формулы.

2. Также в некоторых таблицах не приведены единицы измерения указанных активностей и данные контролей для сравнения (см., например, Табл. 2, 4, 6 автореферата и Табл. 12 диссертации). В случае экспериментов на клеточных культурах не приведено время инкубации клеток с исследуемыми веществами.

3. Автореферат, Таблица 7: смысл таблицы неясен, поскольку не указаны исследованные клеточные линии, а вся значимая информация дана в тексте.

4. Раздел по аннотированной базе данных в автореферате написан слишком кратко; следовало бы привести конкретные данные, такие как количество записей в базе, типы веществ и активностей и т.п.

5. Первая часть раздела «Перспективность использования природных скаффолдов для создания потенциальных лекарственных агентов» диссертации (стр. 137-140) по сути представляет собой часть литературного обзора, а не результаты, полученные автором диссертационной работы.

6. Диссертация, схема 3: не расшифрованы заместители R_1 и R_2 , а также гетероатомы X, Y, Z; не приведены условия синтеза. Неясно, фрагменты каких именно «известных физиологически активных веществ» были использованы при синтезе.

7. Диссертация, схема 4: судя по всему, в верхней части схемы пропущено бензильное производное, использованное при синтезе. В данной части работы было бы уместно более подробно объяснить выбор спейсеров, соединяющих лактонный фрагмент с бензильным производным.

8. Диссертация, Таблицы 5 и 6 и соответствующий текст: непонятно, что показывает docking score. Не переведены и не расшифрованы сокращения Salt br., Pi-Pi, Pi-Cat.

9. Диссертация, рис. 26 и соответствующий текст: в тексте и на рисунке для обозначения гиппокамп-зависимых и гиппокамп-независимых паттернов навигации указаны прямо противоположные цвета. Очевидно, текст относится к рис. 27? А на рис. 28 также появляется зеленый цвет, соответствие которого не поясняется.

10. Диссертация, рис. 40: отсутствует легенда.

11. Диссертация, рис. 41: непонятно, к чему относится указанная в подписи концентрация 4 мг/мл.

12. Диссертация, рис. 52а: подписи не переведены на русский. Рис. 52в: непонятно, какие именно ГКТа представлены на данном рисунке, и не совсем ясно, почему их так много.

Тем не менее, эти недостатки не умаляют ценности работы и не влияют на общую высокую оценку диссертации в целом.

Заключение

Диссертационное исследование Негановой Маргариты Евгеньевны «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний», представленная на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

(биологические науки), выполненное при консультации доктора химических наук Балакина Константина Валерьевича, является завершённой научно-квалификационной работой. Учитывая актуальность, новизну, объём и высокий научный уровень проведенного исследования, можно заключить, что рассматриваемая диссертация полностью отвечает 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).

Официальный оппонент:

Егорова Ксения Сергеевна

доктор химических наук по специальности 1.4.9
Биоорганическая химия, ведущий научный
сотрудник Лаборатории металлокомплексных и
наноразмерных катализаторов Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института органической химии им. Н. Д. Зелинского
Российской академии наук

10.04.2024 г.

Подпись Егоровой Ксении Сергеевны

УДОСТОВЕРЯЮ

Учёный секретарь ИОХ РАН, к.х.н.



И.К. Коршевец

Контактные данные:

Телефон: +7(925)047-30-44,

E-mail: egorova-ks@ioc.ac.ru

Адрес места работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН; 119991, г. Москва, Ленинский проспект, дом 47; <https://zioc.ru>; secretary@ioc.ac.ru; служебный телефон – +7 499 137-29-44

Согласна на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе 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 специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).