

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, заведующего отделом функциональной биохимии биополимеров Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова Зорова Дмитрия Борисовича на диссертационную работу Негановой Маргариты Евгеньевны на тему «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)

Актуальность темы исследования

Несмотря на то, что на сегодняшний день в клинической практике используется широкий ряд противоопухолевых и нейропротекторных препаратов как отечественного, так и зарубежного происхождения, до сих пор не существует эталонного лечения для достижения 100% эрадикации опухоли без выраженного воздействия на здоровое микроокружение или остановки прогрессирования нейродегенеративного процесса в головном мозге. Это обусловлено тем, что существующие терапевтические средства оказывают прямое влияние, главным образом, лишь на одну молекулярную мишень, в то время как данные заболевания характеризуются мультифакторной природой патогенеза. В связи с этим перед специалистами в области химического синтеза, медицинской химии и биохимии стоит крайне важная задача, связанная с созданием инновационных агентов согласно концепции мультитаргетных препаратов.

Более того, в настоящее время Российская Федерация претерпевает сложный этап адаптации к абсолютно новым социально-экономическим условиям в связи с введёнными против страны санкциями. В частности, это затронуло и рынок фармацевтических субстанций: ассортимент иностранных препаратов в 2023 году сократился почти на 30%, что послужило толчком к внедрению собственных оригинальных разработок на отечественный рынок. Более того, дефицит лекарственных средств ощутили и пациенты с такими заболеваниями, как онкология и нейродегенеративные расстройства. Серьёзное сокращение количества зарубежных препаратов в Российской Федерации ввиду санкций в экономическом секторе и трудностей во взаимодействии с иностранными представителями фармацевтической отрасли заметно ощутили потребители нашей страны.

Особое внимание системой здравоохранения уделяется вопросам доступности лекарственных препаратов для терапии социально значимых болезней.

Всё это приводит к необходимости разработки современных подходов к поиску противоопухолевых и нейропротекторных средств нового поколения путём совершенствования существующих на сегодняшний день терапевтических стратегий, не способных в полной мере обеспечить достаточную эффективность и безопасность.

В связи с этим актуальность и значимость диссертационной работы Маргариты Евгеньевны Негановой, посвящённой созданию рационального подхода к поиску лекарственных агентов для терапии нейродегенеративных и онкологических заболеваний, не вызывает сомнений, поскольку затрагивает решение остро стоящей проблемы расширения масштабов создания лекарственных кандидатов, обладающих высокой эффективностью в отношении социально значимых заболеваний и доступностью для отечественного рынка.

Научная новизна, теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Диссертационная работа Маргариты Евгеньевны Негановой имеет как существенное фундаментальное, так и уникальное прикладное значение. Оно определяется интеграцией теоретических знаний и инновационным практическим результатом, что позиционирует данную работу в качестве социально значимой.

Автором диссертационной работы с целью рационализации ранних исследовательских этапов поиска лекарственных препаратов впервые был реализован интегральный подход к биотестированию химических соединений, основанный на общности биохимических каскадов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний, что позволило в максимальной степени раскрыть терапевтический потенциал тестируемых объектов, повысить эффективность отбора и минимизировать потерю активных веществ.

Помимо яркого фундаментально-теоретического аспекта, в работе была создана уникальная аннотированная база - новый информационно-аналитический инструмент, содержащий комплексное описание физико-химических свойств молекулярных объектов и разносторонней биологической активности. Данный результат позволит 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.

В качестве ещё одного несомненно нового практического результата диссертационной работы М.Е. Негановой выступают идентифицированные с помощью разработанного автором уникального подхода эффективные нейропротекторные и противоопухолевые агенты среди соединений различных хемотипов: гидроксамовых кислот и производных природных молекулярных скаффолдов, которые выступают в качестве перспективных лекарственных кандидатов для дальнейшей доклинической и клинической разработки.

Новизна результатов, представленных в диссертационном исследовании Маргариты Евгеньевны Негановой также подтверждается получением патента Российской Федерации на изобретение: № № 2783995 «4-(3-((2-Адамантил)амино)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-N-гидроксибензамид – новое средство для лечения болезни Альцгеймера». В свою очередь о практической значимости проведённой работы свидетельствует убедительный объём финансовой поддержки, полученной для реализации исследований, от Российского научного фонда (№17-73-10461 «Общность молекулярных мишеней комплексной системы биотестирования для разработки инновационных лекарственных препаратов с противоопухолевым или нейропротекторным действием»; №19-73-10195 «Синтез и мишень-ориентированный поиск полифункциональных молекул, обладающих избирательным действием на основные звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний»; №22-23-00995 «Разработка новых методологических подходов синтеза полифункциональных гидроксамовых кислот с нейропротекторными или противоопухолевыми свойствами путём варьирования Сар-группы и линкерной части»), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-33-01185 мол_а «Направленный молекулярный дизайн таргетных противоопухолевых агентов на основе гидроксамовых кислот – ингибиторов гистондеацетилазы»; № 18-33-20209 мол_а_вед «Синтез и изучение фундаментальных механизмов противоопухолевого действия рационально спланированных гибридных соединений на основе уникальных природных матриц»), а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-1128, от 30.06.2022 г.).

Достоверность, обоснованность и апробация результатов исследования

Степень обоснованности и объективности каждого научного положения, вывода и заключения не вызывает сомнений и логически вытекает из результатов исследования. Достоверность представленных результатов определяется рациональным дизайном исследования, комплексностью работ и тщательностью выполнения экспериментов, использованием современного сертифицированного оборудования, проведением автором

анализа большого количества материала, полученного в результате применения современных и общепризнанных *in silico*, *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* методов, которые позволили получить воспроизводимые и однозначные результаты, а также применением адекватных методов статистической обработки данных, что обеспечило корректную интерпретацию полученных данных.

Основные положения диссертационной работы Негановой М.Е. нашли отражение в 47 научных работах, в полной мере отражающих суть исследования и его научно-практическое значение, в том числе, опубликовано 2 главы в монографиях, 1 патент, 37 статей в журналах Q1 и Q2, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, а также 10 - в журналах РИНЦ. Результаты исследования были широко представлены научной аудитории на всероссийских конференциях и международных съездах.

Структура и оформление диссертации и автореферата

Диссертация М.Е. Негановой написана в классическом стиле и содержит 423 страницы машинописного текста, включающего следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы», который представлен 898 источниками.

Диссертационная работа содержит 76 рисунков, 27 таблиц и 7 схем. В конце диссертации имеется раздел «Приложения», содержащий дополнительные материалы.

В разделе «**Введение**» автор обосновывает актуальность темы диссертационной работы и степень её разработанности, формулирует цель и задачи, обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, формулирует положения, выносимые на защиту, и представляет данные об апробации результатов работы на различных научных мероприятиях, а также описывает личный вклад.

Раздел «**Обзор литературы**» посвящён подробному описанию современного состояния рассматриваемой автором в данном диссертационном исследовании проблемы. М. Е. Неганова осуществила впечатляющий анализ экспериментальных и обзорных работ ведущих исследователей со всего мира, благодаря чему удалось получить полное представление о сложных биологических связях между патогенезом злокачественных новообразований и нейродегенеративных расстройств. Благодаря детальному обоснованию потенциальных мишеней для действия перспективных терапевтических агентов нейропротекторной и противоопухолевой направленности, а также фокусированию внимания на существующих стратегиях лечения онкологических и

нейродегенеративных патологий, автору удалось улучшить понимание этиопатологических механизмов данных заболеваний и выявить новые перспективные направления в создании эффективных фармакологических агентов. Кроме того, данный раздел содержит достаточное количество качественных и детальных иллюстраций, помогающих более полно понять исследуемую проблему диссертации.

В разделе **«Материалы и методы»** автор представил детальное описание разнообразных современных методических подходов, использованных в диссертационном исследовании для решения поставленных задач. Скрупулёзное изложение автором методических сведений: условий и алгоритмов проведения экспериментов, обеспечило всестороннее представление о последовательности этапов работы, а также не позволило усомниться в объективности суждений о результатах исследований и формулировке обоснованных выводов.

Раздел **«Результаты и их обсуждение»** включает описание полученных автором научных результатов. Стоит отметить, что все результаты объединены единой научной концепцией, изложены грамотно и подвергнуты адекватной интерпретации и статистической обработке. Данный раздел иллюстрирован большим количеством графиков, таблиц и фотографий, что облегчает восприятие представленного материала. Особого внимания заслуживает исчерпывающий анализ полученных автором результатов, перетекающий во впечатляющее обсуждение, сопровождающееся отсылками к ранее опубликованным другими авторами данным - близкая аналогия и сравнительный анализ, оформленные в виде аргументированных пояснений, не позволяют усомниться в достоверности представленных результатов.

В данном разделе автор представляет детальное описание созданной им усовершенствованной системы биологического тестирования химических соединений различной природы, предназначенной для оценки их влияния на биохимические каскады, вовлечённые в патогенез как онкологических, так и нейродегенеративных заболеваний, и позволяющей на самых ранних исследовательских этапах оценить потенциал веществ в терапии данных патологий. Благодаря разработанной системе в широком ряду соединений на основе природных матриц и гидроксамовых кислот автору удалось идентифицировать молекулы, являющиеся перспективной платформой для создания лекарственных препаратов как нейропротекторной, так и противоопухолевой направленности.

В итоговом разделе **«Заключение»** автор успешно систематизирует полученные им данные и кратко резюмирует основные результаты диссертационного исследования.

Работа М. Е. Негановой завершается сформулированными **выводами**, построенными на полученных результатах, которые в краткой форме полностью отражают содержание диссертационного исследования и отвечают на поставленные в работе задачи.

Автореферат по структуре и содержанию в полной мере отражает представленную диссертацию и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями. Выводы и выносимые на защиту основные положения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны.

Общая оценка работы, замечания и вопросы

Диссертационная работа Негановой Маргариты Евгеньевны написана хорошим литературным языком, обладает внутренним единством, производит крайне благоприятное впечатление и не позволяет усомниться в значительной степени личного вклада автора в науку. Автор продемонстрировал превосходные способности в организации материала исследования и умении доступно представить его в систематизированном виде.

Незначительные стилистические неточности и неаккуратность при оформлении некоторых рисунков ни в коей мере не умаляют значимости и не снижают общей ценности проделанной Негановой Маргаритой Евгеньевной работы.

В продолжение дискуссии хотелось бы получить от автора ответы на следующие концептуальные вопросы:

1. На рисунке 56 автор представляет результаты исследования биоэнергетического профиля митохондриальной р2 фракции из образцов головного мозга мышей, получавших лечение гидроксамовыми кислотами лидерами **ГКта 12** и **ГКта 23**. На графиках отчётливо видна разница между скоростью потребления кислорода органеллами нативных трансгенных животных 5xFAD, полученной в рамках разных экспериментов. Как автор может объяснить тот факт, что в условиях одного эксперимента (для **ГКта 12**) хотя и наблюдались нарушения в работе отдельных комплексов дыхательной цепи, но были гораздо менее выраженными, чем при проведении эксперимента 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, которое сможет ограничить в будущем их внедрение в клиническую практику?

3. Несколько вопросов, касающихся исследования влияния соединений класса гидроксамовые кислоты 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 pH 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.

5. В качестве замечания рекомендательного характера также хотелось бы отметить, что поскольку митохондрии являются одним из доминирующих объектов экспериментального исследования данной диссертационной работы и рассматриваются как ключевая мишень действия рассматриваемых соединений, было бы полезным более детальное описание получения митохондриальной p2 фракции из образцов головного мозга мышей после *in vivo* экспериментов.

Заключение

Несмотря на минорные замечания и вышеуказанные вопросы, вызванные исключительным научным интересом к представленному материалу, можно с уверенностью утверждать, что диссертационная работа производит крайне благоприятное впечатление и заслуживает высокой оценки. Широкая научная эрудиция автора позволила представить данное исследование как многогранную комплексную работу, способную обогатить новыми идеями и наблюдениями целый ряд современных научных направлений.

Таким образом, диссертационное исследование к.х.н. Негановой Маргариты Евгеньевны «Рациональный подход к поиску лекарственных агентов на основе взаимосвязи биохимических механизмов патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний», представленное на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является завершенной, самостоятельной научно-квалификационной работой, имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение и выполненной соискателем на высоком методическом уровне. Диссертационная работа полностью 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, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом функциональной биохимии биополимеров Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Зоров Дмитрий Борисович

«9» апреля 2024 г.

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1; тел.: +7(495)939-59-44; e-mail: zorov@belozersky.msu.ru

Согласен 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)

Подпись Д. Б. Зорова заверяю:

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ. КАПЦЕЛ. УЧ. ИЕН
И. И. СИДОРОВА