

ОТЗЫВ

официального оппонента, к.б.н. Нестерова Семёна Валерьевича, на диссертацию Сеницыной Дарьи Андреевны «Воздействие дигидрохинолиновых производных на патогенетические механизмы развития токсического поражения печени у крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4.

Биохимия

Цель диссертационной работы Сеницыной Д.А. состояла в поиске и тестировании новых эффективных соединений для предотвращения и восстановления токсических повреждений печени. Автором работы были проанализированы в качестве возможных предшественников гепатопротекторных средств соединения дигидрохинолинового ряда с комплексной биологической активностью. Работа построена методически грамотно, так как на первом шаге был проведен поиск потенциально эффективных соединений с помощью компьютерных методов, а далее сложные и затратные эксперименты на животных выполнялись только для двух отобранных потенциально высокоэффективных веществ – 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ2). Их действие экспериментально исследовалось с помощью современных биохимических, молекулярно-биологических, гистологических и иммунологических методов с использованием хорошо известной модели тетрахлорметанового поражения печени. При этом также был проведен литературный анализ и выделены основные механизмы развития данной патологии, действие ДГХ1 и ДГХ2 на которые и подлежало подробному изучению. Важно, что помимо плацебо-контроля использовался также препарат сравнения, которым выступал карсил – широко применяемый в медицине растительный антиоксидант. Таким образом, были получены достаточно полные данные, позволяющие судить о механизмах действия и эффективности ДГХ1 и ДГХ2. Данное исследование представляет собой достаточно полную биохимическую работу, результаты которой могут быть полезны для углубления представлений о регуляции эндогенных защитных систем, а также для разработки новых способов терапии заболеваний печени.

Актуальность темы исследования

Актуальность выбранной темы обусловлена тем, что токсические повреждения печени могут быть вызваны множеством ксенобиотиков, широко применяющихся в промышленности, медицине и быту. В связи с этим, патологии, связанные с токсическим

повреждением печени часто встречаются и требуются эффективные методы их терапии. На российском фармацевтическом рынке в настоящее время большинство гепатопротекторных средств зарегистрировано как биологически активные пищевые добавки, а лечение острых и хронических токсических поражений печени до сих пор остаётся достаточно острой проблемой.

Научная новизна исследования

Так как диссертантом выбраны и исследованы новые, ранее широко не используемые соединения, то практически все результаты работы обладают несомненной новизной. Диссертантом впервые проведено комплексное исследование показателей цитолиза гепатоцитов и гистоморфологического состояния структур печени, интенсивности процессов свободнорадикального окисления и апоптоза, активности и регуляции антиоксидантной системы, а также выраженности воспалительного ответа и NLRP3-опосредованной сигнальной трансдукции при воздействии дигидрохинолиновых производных на фоне экспериментального токсического поражения печени. Показано, что использование ДГХ1 и ДГХ2 приводило к более выраженному по сравнению с карсилом снижению выраженности патогенетических изменений и оказывало более существенное регуляторное воздействие на эндогенную систему антиокислительной защиты при развивающейся патологии.

Научно-практическая значимость работы

Практическая значимость диссертационной работы достаточно очевидна – полученные данные показывают два новых эффективных гепатопротекторных средства для коррекции остро развивающихся токсических повреждений печени, которые далее могут более детально изучаться на возможность применения в медицине.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена согласно стандартным требованиям. Она включает обзор литературы, содержащий актуальные сведения об этиологии и патогенезе токсических поражений печени, о роли окислительного стресса и устройстве антиоксидантной системы, о вкладе апоптотических, некротических и воспалительных процессов в реализацию повреждающего действия гепатотоксических агентов. Проведен краткий обзор используемых на сегодняшний день гепатопротекторных средств, их биологической активности, а также перспектив применения соединений дигидрохинолинового ряда в гепатотерапии.

Экспериментальная часть работы выполнена на достойном научно-методическом уровне с использованием широкого набора современных лабораторных методов, описанию которых посвящена Глава 2. Для оценки биологической активности производных дигидрохинолина использовалась программа Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS), способная предсказывать несколько тысяч видов биологической активности. Токсичность соединений анализировалась при помощи программы ProTox-II. Остальные методы были экспериментальными и составляли ключевую часть работы. Ферментативную активность измеряли спектрофотометрически, интенсивность свободнорадикальных процессов оценивали с применением методов биохемилюминесценции, а также посредством анализа содержания продуктов свободнорадикального окисления биологических молекул. Для изучения изменений морфологии печени использовалась обзорная окраска срезов гематоксилином и эозином. Интенсивность апоптотических процессов определяли по активности каспазы-3, каспазы-8 и уровню транскриптов гена апоптоз-индуцирующего фактора. Экспрессия NLRP3-инфламмосомы, каспазы-1 и IL-1 β анализировались с применением иммунофлуоресцентного окрашивания. Активность антиоксидантной защиты организма изучалась с помощью измерения активности ферментативных и содержания неферментативных антиоксидантов, оценки уровня мРНК антиоксидантных генов методом ПЦР в реальном времени, а также посредством исследования каталитических и регуляторных свойств ферментов. Результаты экспериментальной работы подвергались математической обработке с использованием статистических критериев.

В Главе 3 представлены результаты анализа биологической активности исследуемых соединений, оценка ферментативных маркеров цитолиза и гистологическое изучение морфологических изменений в печени животных экспериментальных групп. Согласно полученным данным, введение дигидрохинолиновых производных оказывало более выраженное позитивное воздействие на оцениваемые показатели, чем препарат карсил.

В Главе 4 приводятся результаты исследования влияния дигидрохинолиновых производных на уровень свободнорадикального окисления в тканях крыс с индуцированным поражением печени. Были показаны значимые изменения параметров, связанных с окислительным стрессом, что свидетельствует о проявлении антиоксидантных свойств тестируемыми соединениями.

В Главе 5 приведены данные о воздействии ДГХ1 и ДГХ2 на интенсивность воспалительного ответа у крыс при поражении печени тетрахлорметаном. Полученные исследователем данные показали, что тестируемые соединения способны снижать

активность миелопероксидазы и уровень мРНК провоспалительных цитокинов, а также подавлять активацию NLRP3-инфламмосомы, ингибируя тем самым опосредуемое ей созревание активных форм каспазы-1 интерлейкина-1 β .

В Главе 6 содержатся результаты исследования антиапоптотической активности дигидрохинолиновых производных на фоне токсического поражения печени у крыс. Было показано, что 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин способен тормозить развитие апоптоза, что подтверждалось снижением активности каспаз и содержания мРНК гена апоптоз-индуцирующего фактора у животных с патологией.

Глава 7 содержит данные об изменениях активности антиоксидантной системы и уровне транскриптов генов важнейших антиоксидантных ферментов при развивающейся патологии, которые были более выраженными под действием тестируемых соединений по сравнению с результатами, полученными при использовании карсила. Полученные результаты в ходе выполнения работы свидетельствуют также о нормализации активности НАДФН-генерирующих ферментов под действием дигидрохинолиновых производных.

В Заключении автор приводит гипотетическую схему, отражающую возможное воздействие дигидрохинолиновых производных на основные патогенетические механизмы развития токсического поражения печени. Полученные результаты могут быть полезны для обобщения и систематизации знаний о возможности регуляции апоптоза, окислительных процессов и воспаления при развитии печеночных заболеваний, а также для расширения методологических подходов и усовершенствования способов лечения и коррекции токсического поражения печени различной степени выраженности и происхождения.

Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации.

Замечания:

1. Лит. обзор диссертации имеет ряд недостатков. Во-первых, неправильно расшифрована английская аббревиатура MOMP. В то время как в контексте митохондрий и апоптоза под этим термином имеется в виду проницаемость внешней мембраны митохондрий, в тексте ошибочно написано, что это главный белок наружной мембраны. Такого белка нет в митохондриях, он имеется только в бактериях. Во-вторых, не удачно изложен механизм функционирования каталазы. С одной стороны делается попытка описать его подробнее, чем на уровне результирующей реакции, а с другой не приводятся ни упоминаемые стадии химических реакций, ни указывается роль аминокислотных групп активного центра. В результате из текста создается ложное впечатление, что в процессе

образуется свободный ион Fe^{+5} . Также в значительной части лит. обзора отсутствуют рисунки, формулы и схемы, использование которых могло бы наглядно показать суть описываемых процессов. Первый рисунок встречается только на 45 странице диссертации.

2. Выбран неудачный способ нумерации ссылок. При использовании алфавитной сортировки списка литературы ссылки обычно указывают по фамилии первого автора и году публикации. При использовании библиографического списка с номерами более удобным является обращение к нему в порядке появления в тексте. Хотя формально согласно ГОСТ запрет на использование смешанного стиля с числовыми ссылками и алфавитной сортировкой не прописан, это является неудобным.

3. Форматирование части формул в методах выполнено неудачно – без использования подстрочных индексов, что сильно осложняет восприятие.

4. Достаточно тяжело воспринимаемы таблицы сравнения результатов. В подобных случаях лучше использовать вспомогательную цветовую окраску для облегчения восприятия.

Вопросы:

1. В ходе работы автором была проведена оценка воздействия дигидрохинолинового производного на активацию сигнального пути NLRP3-инфламмосомы и интенсивность воспалительного ответа. В то же время известно, что NLRP3-инфламмосома участвует в реализации пироптоза. Проводилось ли исследование, насколько данный путь гибели гепатоцитов распространен у лабораторных животных? Планируется ли расширение работ в сторону изучения регуляции исследуемыми веществами различных механизмов программируемой клеточной смерти?

2. В ряде тестов ДГХ2 в концентрации 50 мг/кг оказывался менее эффективен, чем в концентрации 25 мг/кг. В то же время у ДГХ1, как правило, большая концентрация была более эффективна, что и можно ожидать для гепатопротектора вне диапазона токсических концентраций. Не является ли это свидетельством проявления прооксидантного действия при повышении концентрации ДГХ2, и не известен ли подобный эффект для карсила, концентрация которого в данной работе тестировалась только в одной концентрации 50 мг/кг?

Заключение

Диссертационная работа Синицыной Д.А. «Воздействие дигидрохинолиновых производных на патогенетические механизмы развития токсического поражения печени у крыс», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 1.5.4. Биохимия, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которого имеют высокую значимость для развития биологических и медицинских наук. По актуальности изучаемой темы, научно-практической значимости, методологическому объёму, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Сеницыной Д.А. соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с актуальными изменениями и дополнениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор работы, Сеницына Дарья Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:
Кандидат биологических наук
(03.01.02 – Биофизика),
научный сотрудник лаборатории
молекулярной биоэнергетики
отдела фундаментальной биоэнергетики
отделения биоэнергетики
Курчатовского комплекса
НБИКС-природоподобных технологий
НИЦ «Курчатовский институт»

Нестеров Семён Валерьевич

123182 Россия, Москва,
пл. Академика Курчатова, д. 1
Тел.: 8-915-401-44-12
E-mail: Nesterov_SV@nrcki.ru

Подпись Нестерова С.В. заверяю
Главный ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»

Дата: 13.05.24



Борисов Кирилл Евгеньевич