

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01
ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 6 июня 2024 г. № 9
о присуждении Синицыной Дарье Андреевне, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Воздействие дигидрохинолиновых производных на патогенетические механизмы развития токсического поражения печени у крыс» по специальности 1.5.4 Биохимия принята к защите 5 апреля 2024 г. (протокол № 6) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года № 55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года № 222/нк; от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель:

Синицына Дарья Андреевна, 1995 года рождения, в 2017 году окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» с присвоением квалификации бакалавра по направлению подготовки 06.03.01 Биология. В 2019 году окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» с присвоением квалификации магистра по направлению подготовки 06.04.01 Биология. С 2019 по 2023 гг. обучалась в очной аспирантуре на кафедре медицинской биохимии и микробиологии (переименована в

кафедру медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии в соответствии с решением Учёного совета ФГБОУ ВО «ВГУ», приказ № 0515 от 09.06.2023 г. О внесении изменений в организационную структуру Университета) медико-биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет». С 2023 года и по настоящее время работает ассистентом кафедры патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация «Воздействие дигидрохинолиновых производных на патогенетические механизмы развития токсического поражения печени у крыс» выполнялась на кафедре медицинской биохимии и микробиологии медико-биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

Научный руководитель:

Попова Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, профессор, специальность 03.01.04. Биохимия (биологические науки), заслуженный деятель науки РФ, декан медико-биологического факультета, заведующий кафедрой медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии медико-биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет».

Официальные оппоненты:

Белослудцев Константин Николаевич, доктор биологических наук, специальность 03.01.02. Биофизика, доцент, проректор по инновационной деятельности, профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Марийский государственный университет".

Нестеров Семён Валерьевич, кандидат биологических наук, специальность 03.01.02. Биофизика, научный сотрудник лаборатории молекулярной биоэнергетики федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Выбор официальных оппонентов был обусловлен тем, что доктор биологических наук, доцент Белослудцев Константин Николаевич является одним из ведущих отечественных специалистов в области изучения свободнорадикального гомеостаза, митохондриального метаболизма и механизмов его регуляции; тем, что кандидат

биологических наук Нестеров Семён Валерьевич является одним из ведущих отечественных специалистов, изучающих структурно-функциональную организацию митохондрий, а также сигнальную роль активных форм кислорода в регуляции метаболизма в норме и при патологии.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Сеницыной Д.А.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» в своем положительном отзыве, подписанном доктором медицинских наук, профессором, членом – корреспондентом РАН по специальности «регенеративная медицина» Парфёновой Еленой Викторовной и утвержденном проректором – начальником Управления научной политики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» доктором физико-математических наук, профессором Андреем Анатольевичем Федяниным, указало, что диссертационная работа Сеницыной Д.А. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Сеницына Д.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» является признанным научным отечественным центром, в том числе в области естествознания, и в своем составе имеет несколько подразделений, занимающихся изучением роли окислительного стресса в развитии патологий различного генеза, а также поиском веществ с протекторным, противовоспалительным, иммуномодулирующим потенциалом. Таким образом, сотрудники ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» и, в частности, лаборатории постгеномных технологий в медицине факультета фундаментальной медицины, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, связанные с тематикой диссертационной работы Сеницыной Д.А.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Iskusnykh, I.Y., Kryl'skii, E.D., **Brazhnikova, D.A.**, Popova, T.N., Shikhaliev, K.S., Shulgin, K.K., Matasova, L.V., Popov, S.S., Zhaglin, D.A., Zakharova, A.A. Popova, N.R., Fattakhov, N. Novel Antioxidant, Deethylated Ethoxyquin, Protects against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Apoptosis. // *Antioxidants*, 2021, 10(1): 122. <https://doi.org/10.3390/antiox10010122>. Q1, WoS, Scopus, IF=7,6.

2. Kryl'skii, E. D., **Sinitsyna, D. A.**, Popova T. N., Shikhaliev, K.S., Medvedeva S. M., Matasova, L.V., Mittova, V. O. The new antioxidant 1-benzoyl-6-hydroxy- 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline has a protective effect against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. // *Journal of Biomedical Research*, 2022, 36(6): 423-434. doi: 10.7555/JBR.36.20220098. Q2, WoS, Scopus.

3. **Бражникова Д.А.**, Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Шульгин К.К., Матасова Л.В., Шихалиев Х.С., Попов С.С. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность ферментов окислительного метаболизма при токсическом поражении у крыс. // *Биомедицинская химия*, Москва, 2019, том 65, выпуск 4, стр. 331-338. Q4, WoS, Scopus.

4. **Бражникова Д.А.**, Крыльский Е.Д., Матасова Л.В., Шульгин К.К., Веревкин А.Н., Попов С.С., Попова Т.Н. Каталитические свойства глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени у крыс и введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина. // *Сорбционные и хроматографические процессы*, 19(4), 481-488. Q4, Scopus.

5. **Синицына Д.А.**, Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Шихалиев Х.С., Лебедева Ю.И., Жеребцова Е.В., Попова Д.А. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на показатели оксидативного статуса и активность ферментов метаболизма дикарбоновых кислот при токсическом поражении печени у крыс. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2023; (1): 43-
<https://doi.org/10.29296/25877313-2023-01-08>. ВАК, IF=0,2.

Результаты работы также были представлены на 11 международных конференциях (и опубликованы в материалах конференций).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной

работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, доцента, проректора по инновационной деятельности, профессора кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Марийский государственный университет" Белослудцева Константина Николаевича (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1. В диссертации автор говорит о том, что CCl_4 способен индуцировать некротическое повреждение ткани печени (глава 3.3). С другой стороны, автор демонстрирует развитие апоптоза (глава 6). Параллельно автор указывает на развитие адаптационных процессов при действии данного соединения (глава 7.1). Хотелось бы, чтобы автор уточнил, какие все-таки процессы происходят при токсическом повреждении печени четыреххлористым углеродом.

2. В разделе обзор литературы автор описывает лишь два типа клеточной гибели. Данные в этом отношении не слишком современные. Хотелось бы пожелать автору в будущем расширять этот раздел и описывать (или по крайней мере упоминать все типы клеточной гибели). Есть ли при повреждении печени четыреххлористым углеродом признаки такого типа клеточной гибели как ферроптоз?

3. В работе автор проводил анализ токсичности *in silico* дигидрохинолиновых производных с помощью программы PROTOX. Можно было бы порекомендовать автору использовать в будущем несколько предикативных программ для подобного анализа, поскольку использование лишь одного софта не всегда корректно может дать оценку токсичности. В частности, данный софт не описывает, например, токсичность такого соединения как бонгкрековая кислота.

4. Насколько активность дигидрохинолиновых производных, используемых в этой работе, превышает активность исходного этоксихинина?

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук, специальность 03.01.02. Биофизика, научного сотрудника лаборатории молекулярной биоэнергетики федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» Нестерова Семёна Валерьевича (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1. Лит. обзор диссертации имеет ряд недостатков. Во-первых, неправильно

расшифрована английская аббревиатура МОМР. В то время как в контексте митохондрий и апоптоза под этим термином имеется ввиду 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.

5. 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?

6. 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?

Отзыв **ведущей организации** федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы:

1. По какому принципу подбирались дозировки исследуемых соединений? Имеются ли сведения о фармакокинетических свойствах тестируемых веществ?

2. В ходе исследования функционирования компонентов антиокислительной защиты автор определял общую активность каждого исследуемого фермента в гомогенате ткани или сыворотке крови. В то же время, при анализе уровня мРНК в качестве мишеней были выбраны гены определённых изоферментов антиоксидантной системы. С чем был связан выбор именно этих изоферментов?

3. При выполнении исследовательской работы автором был определён уровень транскриптов гена фактора NF-κB. Известно, что активация транскрипционного фактора NF-κB осуществляется под действием различных стимулов, включая воспалительные лимфокины и антигены бактериального происхождения, и сопровождается сборкой различных субъединиц семейства NF-κB в активные димеры с последующей их транслокацией из цитоплазмы в ядро. Для точной оценки NF-κB-опосредованной регуляции воспалительного ответа целесообразно было бы провести исследование соотношения неактивной цитозольной и активированной ядерной фракции данного транскрипционного фактора.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Осипова Анатолия Николаевича, доктора биологических наук, профессора, члена–корреспондента РАН, профессора кафедры общей и медицинской биофизики медико – биологического факультета, заведующего отделом медицинской биофизики НИИ трансляционной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

Гуриной Ольги Ивановны, доктора медицинских наук, профессора РАН, члена – корреспондента РАН, руководителя лаборатории нейрoхимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

Проскурниной Елены Васильевны, доктора медицинских наук, доцента, главного научного сотрудника лаборатории молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Медико – генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

Акентьевой Натальи Павловны, доктора биологических наук, главного научного сотрудника Отдела кинетики химических и биологических процессов, руководителя подразделения биохимических и клеточных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук.

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

Вопросы задавали:

д.б.н., проф. Шишкин С.С.

д.б.н., проф. Шумянцева В.В.

д.х.н. Хомутов А.Р.

д.х.н., проф. Дзантиев Б.Б.

д.б.н. Терёшина В.М.

В дискуссии приняли участие:

д.б.н., проф. Шишкин С.С.

д.х.н., проф. Дзантиев Б.Б.

д.х.н., проф. Савицкий А.П.

д.б.н., проф. Левицкий Д.И.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

1. Отобранные на основе компьютерного прогнозирования биологической активности соединения – ДГХ1 и его структурный аналог ДГХ2 – оказывали значительно более

выраженное гепатопротекторное действие при тетрахлорметановом поражении печени у крыс по сравнению с карсилом, что выражалась в более существенном снижении активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов и степени гистопатологических изменений в ткани печени.

2. ДГХ1 и ДГХ2 проявляли антиоксидантное действие при токсическом поражении печени, о чём свидетельствовало уменьшение параметров биохемилюминесценции, содержания первичных продуктов пероксидного окисления липидов и уровня карбонильных остатков аминокислот в белках, а также восстановление активности аконитатгидратазы.

3. Тестируемые дигидрохинолиновые производные тормозили развитие воспалительного ответа в условиях токсического поражения печени у крыс посредством уменьшения уровня транскриптов гена фактора NF-κB и экспрессии NLRP3-инфламмосомы, что сопровождалось снижением содержания мРНК провоспалительных цитокинов и активности миелопероксидазы.

4. ДГХ1 снижал активность каспаз и содержание мРНК апоптоз-индуцибельного фактора AIF у животных с патологией, что говорит о наличии у тестируемого соединения способности регулировать интенсивность апоптоза.

5. Введение дигидрохинолиновых производных крысам с ТПП способствовало нормализации активности ферментов антиокислительной защиты и концентрации неферментативных антиоксидантов. Наблюдалось изменение активности НАДФН-генерирующих ферментов в направлении контроля под действием ДГХ1 и ДГХ2, что могло вносить существенный вклад в снижение выраженности дисбаланса в функционировании глутатионовой АОС.

6. Применение ДГХ1 и ДГХ2 на фоне ТПП приводило к сдвигу в направлении значений контрольной группы уровня транскриптов генов ферментов АОС, а также содержания мРНК транскрипционных факторов Nrf2 и FOXO1. ДГХ2 оказывал дополнительное стимулирующее воздействие на экспрессию генов *Sod1*, *Gpx1* и *Gsta2*.

Научная новизна работы заключается в том, что:

Впервые было изучено влияние 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на показатели цитолиза гепатоцитов, морфологию ткани печени, интенсивность свободнорадикального окисления и апоптоза, активацию NLRP3-инфламмосомы, а также на транскрипционную регуляцию функционирования АОС и активность НАДФН-генерирующих ферментов при экспериментальном токсическом поражении печени у крыс.

Было обнаружено снижение интенсивности свободнорадикального окисления в

печени и сыворотке крови крыс с индуцированным поражением печени после применения тестируемых дигидрохинолиновых производных. Также было установлено, что снижение активности свободнорадикальных процессов под воздействием протекторов сопровождалось торможением воспалительного ответа и активации NLRP3-инфламмосомы, каспазы-1 и интерлейкина 1 β , а также уменьшением выраженности апоптоза. В ходе работы было выявлено положительное влияние дигидрохинолиновых производных на функционирование АОС в условиях патологии, которое проявлялось в изменении показателей активности антиоксидантных ферментов, уровня мРНК их генов и концентрации неферментативных антиоксидантов в направлении контрольных значений. Для 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина также была продемонстрирована способность индуцировать транскрипцию ряда генов антиоксидантных ферментов, что могло способствовать снижению уровня окислительного стресса у животных с патологией.

В результате исследования было установлено, что 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин обладают более выраженной гепатопротекторной, антиоксидантной и противовоспалительной активностью по сравнению с препаратом сравнения карсиллом, а также способностью регулировать антиоксидантный ответ в условиях оксидативного стресса.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

Результаты исследования расширяют понимание возможностей коррекции патогенеза токсических поражений печени, а также способствуют углублению представлений о способах регуляции воспалительных процессов, апоптоза и антиоксидантного ответа при окислительном стрессе с помощью протекторов дигидрохинолинового ряда. Полученные в рамках работы данные о гепатопротекторной активности 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина могут быть использованы для разработки новых терапевтических средств для лечения и профилактики острых поражений печени. Использованные при проведении исследования подходы могут представлять интерес для клинической лабораторной диагностики состояния оксидативного статуса при заболеваниях печени и мониторинга эффективности их лечения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя заключался:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке основных публикаций по теме диссертации совместно с соавторами и научным руководителем автора.

Заключение.

Диссертация Сеницыной Д.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью сделанных выводов и полученных результатов. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в публикациях в ведущих рецензируемых журналах (5 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

На заседании 6 июня 2024 года диссертационный совет принял решение присудить Сеницыной Дарье Андреевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 11 докторов биологических наук, 7 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав диссертационного совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени - 19 человек,

«Против» — нет,

Недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета
ФИЦ Биотехнологии РАН
доктор химических наук, профессор

Б.Б. Дзантиев

Ученый секретарь диссертационного совета
ФИЦ биотехнологии РАН
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

«6» июня 2024 г.

