

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, член-корреспондента РАН, заведующего НИЛ молекулярной фармакологии НИИ трансляционной медицины, заведующего кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева института биомедицины (МБФ) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации Шимановского Николая Львовича на диссертационную работу Лупановой Ирины Александровны «Методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности

1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертации

При поиске новых лекарственных веществ важнейшим составляющим их доклинических исследований является изучение фармакологической активности соединений-кандидатов, без которого невозможно дальнейшее продвижение новых фармацевтических разработок. Данные исследования могут быть проведены различными методами: *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. При выполнении доклинических исследований в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» рекомендуется в основном использование лабораторных животных. Однако в связи с принципами биоэтики и гуманности весьма актуален поиск альтернативных методов, позволяющих сократить количество используемых животных. Одними из таких методов являются методы *in silico*, позволяющие предварительно виртуально прогнозировать спектр биологической активности; модели *in vitro* для выявления целевого действия биологически активных веществ (БАВ) и *ex vivo* для поиска функциональных свойств.

На сегодняшний день особенно выделяют методы *in vitro*, так как они позволяют проводить более простой, удобный и подробный анализ, по сравнению с анализом в условиях целого организма, они могут быть миниатюрными и автоматизированными, что обеспечивает методам скрининга высокую пропускную способность для тестирования молекул, полученные *in vitro* данные могут быть использованы для аппроксимации фармакокинетики или фармакодинамики. В подобных методах используют различные биологические мишени – рецепторы, сопряженные с G-белком, ионные каналы и другие клеточные структуры, культуры клеток и изолированные ткани, а также рекомбинантные или изолированные ферменты. Каждая из тест-систем обладает строгой специфичностью и имеет ограничения в применении, в частности, при проведении скрининга биологической активности растительных лекарственных средств, так как по химическому составу они, в большинстве случаев, представляют собой комплекс БАВ и вследствие этого могут обладать широким спектром фармакологической активности.

В связи с вышеперечисленным, формирование методологических аспектов, направленных на разработку многоцелевых подходов для одновременного выявления и анализа нескольких активных компонентов, является важным и необходимым.

Диссертация Лупановой И.А. посвящена разработке методологии формирования и применения биотест-систем молекулярного уровня на основе ферментов для оценки БАВ, что, в контексте вышеизложенного, обуславливает высокую актуальность проведенной работы.

Новизна исследований и полученных результатов диссертации

Исследование носит фундаментально-прикладной характер, а новизна и практическая значимость полученных результатов не вызывают сомнений.

Впервые по результатам проведенных *in silico* (программа PASS), *in vitro* (специфические ферментные биотест-системы – СФБТС) и *in vivo* (экспериментальные модели с использованием лабораторных животных) исследований разработана методология как формирования, так и применения специфических ферментных биотест-систем *in vitro*. Автором впервые отобраны и охарактеризованы ключевые / лимитирующие ферменты гомеостаза в качестве тест-объектов, на основе которых сформированы первичные и, представляющие собой сочетание первичных – вторичные, специфические ферментные биотест-системы для оценки БАВ различного происхождения и агрегатного состояния в условиях опытов *in vitro*.

В результате проведенного комплекса исследований при сравнительном изучении результативности СФБТС и биотест-систем организменного уровня (экспериментальные модели с использованием лабораторных животных: острого экссудативного воспаления у мышей и крыс, «ватной гранулемы» у крыс, повышения сосудистой проницаемости кожи кроликов, экспериментального перитонита у крыс, АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, оценки влияния на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией, оценки влияния на сон мышей по стандартной методике с использованием хлоралгидрата, открытое поле норкового типа, гепатита, вызываемого 4-х дневным внутрижелудочным введением крысам тетрациклина однократным подкожным введением масляного раствора четыреххлористого углерода), экспериментально подтверждены приемлемость, достоверность и специфичность первичных и вторичных специфических ферментных биотест-систем на примере объектов, разработанных в ФГБНУ ВИЛАР.

Как итог, Лупановой И.А. впервые сформирована Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, использование которой позволяет оценить БАВ, в том числе из растений, по их фармакологической активности, выявить их возможные механизмы действия за счет связывания с активными центрами ферментов и др. Важно, что разработанная коллекция является универсальной и может быть использована в поиске соединений с широким спектром фармакологической активности различного происхождения, будь то природного или синтетического.

Следует подчеркнуть, что по результатам диссертационного исследования Министерство здравоохранения Российской Федерации (Департамент науки и инновационного развития здравоохранения) подтвердило право разработчиков тех или иных лекарственных средств использовать СФБТС в доклинических исследованиях.

Таким образом, диссертационная работа Лупановой И.А. имеет высокую степень научной новизны, а полученные при ее выполнении результаты характеризуются высокой практической значимостью.

Значимость для науки и практики полученных результатов

В диссертационном исследовании разработана новая методология получения информации о биологической активности веществ различного происхождения, позволяющая существенно облегчить первый этап доклинических исследований, а именно проведение скрининга БАВ и определение их целевой биологической активности.

В методологическом отношении существенными характеристиками ферментных биотест-систем являются их высокая специфичность и чувствительность, хорошая воспроизводимость и значительная экономичность. Результаты диссертационного

исследования показывают, что применение СФБТС целесообразно при оценке различных БАВ (из клеточных культур, нативных растений, в твердом и жидком состоянии), а, значит, они могут быть использованы при оценке других объектов с аналогичной биологической активностью.

Особое значение данной работе придает то, что она выполнена комплексно и логически последовательно:

1. В качестве чувствительных элементов выбраны наиболее значимые ферменты;
2. На их основе разработаны биотест-системы, которые возможно объединять при исследованиях многофакторных патологий, таких как заболевания печени или патологии венозной системы;
3. СФБТС объединены в Реестре Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем и разработана необходимая нормативная документация, касающаяся хранения, пополнения и контроля качества единиц хранения Биологической коллекции, что позволяет получать достоверные результаты исследований;
4. Все исследования *in vitro* подтверждены на разрешенных моделях с использованием лабораторных животных, где в качестве положительного контроля использованы коммерческие препараты с известной фармакологической активностью.
5. Показана высокая экономическая эффективность разработанной методологии.

Разработанная методология является реальным рабочим инструментом для поиска новых соединений-кандидатов любого происхождения, обладающих в перспективе широким спектром фармакологической активности, что доказывает большое количество Актов внедрения и проведенных работ с различными фармацевтическими и косметическими предприятиями.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), полученные диссертантом результаты опубликованы в рецензируемых Российских и международных научных журналах.

Таким образом, диссертационная работа Лупановой И.А. имеет высокую теоретическую и практическую значимость.

Обоснованность и достоверность основных положений, результатов выводов диссертации

Характеризуя диссертационную работу Лупановой И.А. в целом, следует указать на то, что она отличается самостоятельным подходом к решению актуальной проблемы по поиску и оценке БАВ, которая находит в настоящем исследовании логичное и завершенное исследование, подкрепленное содержательным анализом зарубежных и отечественных разработок. Это придает положениям и выводам исследования должную степень обоснованности и достоверности.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов, рекомендаций, представленных в диссертации, основаны на более чем достаточном объеме экспериментов *in vitro* и *in vivo*, подтверждается корректным использованием современных методов исследования в соответствии со всеми этическими нормами и правилами (в тексте присутствуют ссылки на Протоколы заседаний локальной Биоэтической комиссии ФГБНУ ВИЛАР), комплексным анализом полученных результатов и их статистической обработкой.

Ключевые разделы исследований были представлены автором на большом количестве международных и всероссийских конференций и симпозиумов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, замечания по оформлению

Диссертация оформлена в классическом стиле, в соответствии с существующими требованиями, изложена на 266 страницах, включая 54 рисунка и 51 таблицу. Работа состоит из Введения, главы I «Обзор литературы», включающий 5 разделов и выводов; главы 2 «Материалы и методы исследований», включающий 4 раздела и выводы по главе; глав 3, 4, 5, 6, 7 и 8, в которых представлены результаты собственных исследований и их обсуждение, каждая глава заканчивается выводами; Заключение; Общих выводов; Рекомендаций, Списка сокращений, Списка литературы и Приложений.

Список литературы включает в себя 343 источника, в том числе 242 – на иностранных языках, который охватывает период с 1974 по 2023 гг. Необходимо отметить значительный объем и временную широту литературного поиска.

В первой главе проведен обзор и анализ литературных данных по теме диссертации. Литературный обзор состоит из 5 разделов, в каждом из которых описаны биотест-системы различного уровня, а также виртуальные методы *in silico*; представлены преимущества и недостатки основных тест-систем для оценки БАВ.

Во второй главе подробно описаны растительные объекты, как экспериментальные разработки ФГБНУ ВИЛАР, препараты сравнения, так и стандартные образцы, даны характеристики специфических ферментных биотест-систем. Примененные диссертантом в данной главе методы соответствуют задачам исследования, отдельно по разделам приведены описания методов *in silico*, *in vitro*, *in vivo* и математические методы.

В третьей главе представлены результаты по созданию специфических ферментных биотест-систем.

В первом разделе описаны ферменты, которые были выбраны Лупановой И.А. в качестве тест-объектов: НАДФН-оксидаза – ключевой фермент иммунной системы; каталаза и глутатионредуктаза – одни из ключевых антиоксидантных ферментов; пируваткиназа – один из важнейших ферментов глюконеогенеза; тирозингидроксилаза – лимитирующий фермент дофаминовой нейромедиаторной системы; ключевые ферменты первого и второго этапов системы биотрансформации и детоксикации – цитохром P450 и глутатионтрансфераза; индуцибельная NO-синтаза – важный фермент, который обеспечивает синтез оксида азота (NO).

Во втором разделе представлены Реестр первичных и сформированных на их основе вторичных специфических ферментных биотест-систем, оформленная Лупановой И.А. Биологическая коллекция СФБТС, описаны ее задачи, а также порядок работы с ней в соответствии с разработанной диссертантом и указанной в данной разделе Нормативной документацией со ссылками на соответствующие Приложения к диссертации.

В третьем разделе данной главы детально прописаны этапы диссертационного исследования, которые наглядно продемонстрированы в общей схеме на Рисунке 14.

С четвертой главы начинаются результаты, подтверждающие работоспособность сформированных СФБТС. В данной главе кратко описано изучение безопасности используемых далее в работе БАВ, что крайне важно для доклинических исследований, а также экспериментальные данные по испытанию вторичной СФБТС для оценки БАВ из биотехнологического сырья – суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой в сравнении с коммерческими препаратами на основе соответствующих нативных растений. Все результаты, полученные с помощью СФБТС, подтверждены на лабораторных животных.

В пятой главе в трех разделах представлена оценка целевой биологической активности разработанных в ФГБНУ ВИЛАР готовых лекарственных форм в сравнении с коммерческими препаратами.

Так, в первом разделе автор приводит результаты испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности настоек из растительного лекарственного сырья с пониженным содержанием спирта этилового в сравнении с фармакопейными настойками.

Во втором разделе описаны результаты испытаний СФБТС для оценки эффективности экспериментальных таблеток с жидким растительным экстрактом, где в качестве положительного контроля использован сам жидкий экстракт, реализуемый на фармацевтическом рынке России. Автором подтверждено сохранение антимикробной активности экстракта при разработке на его основе твердой лекарственной формы, что соответствует результатам, полученным микробиологическими методами.

Третий раздел посвящён испытаниям СФБТС для оценки эффективности спреев и таблеток с растительными экстрактами в сравнении с индивидуальными коммерческими субстанциями, входящими в состав указанных в разделе экспериментальных лекарственных форм. Автором доказано сохранение антимикробных свойств, что было подтверждено микробиологическими методами.

В шестой главе автор приводит результаты испытаний СФБТС для оценки БАВ из нативных растений. Каждый раздел данной главы посвящен испытаниям определенных СФБТС.

Так, в первом разделе показаны результаты оценки венотропной активности четырех экстрактов из красных листьев винограда различных сортов. Стоит подчеркнуть большой экспериментальный материал с использованием значительного количества фармакологических методик для подтверждения достоверности полученных с помощью СФБТС результатов.

Во втором разделе приводятся результаты *in vitro* исследований адаптогенной активности БАВ травы серпухи венценосной, а также в опытах *in vivo* на моделях «вынужденное плавание с грузом» и гипоксической гипоксии с гиперкапнией подтверждена достоверность полученных с использованных сформированных СФБТС данных.

В третьем разделе продемонстрированы результаты испытаний первичной СФБТС на основе тирозингидроксилазы для выявления дофаминергической активности двух экстрактов из плодов витекса китайского и витекса священного. Особенный интерес вызывают данные по отсутствию целевой биологической активности у экстракта из плодов витекса китайского. Кроме того, Лупанова И.А. демонстрирует также возможность использования СФБТС для выявления целевых БАВ, а именно агнузида, что позволило провести стандартизацию экстракта именно по этому соединению.

Испытание СФБТС для выявления гепатопротективной активности БАВ приведены в четвертом разделе шестой главы на примере изучения экстракта травы володушки золотистой. С использованием экспериментальных моделей *in vivo* подтверждена целесообразность использования СФБТС на основе каталазы, глутатионредуктазы и индуцибельной NO-синтазы для оценки данной целевой биологической активности.

В седьмой главе приводятся и обсуждаются широкие возможности применения СФБТС в доклинических исследованиях на примере двух экстрактов цикория обыкновенного, полученных как из культивируемого, так и из дикорастущего сырья. Показано, что трава цикория (дикорастущее сырье) является перспективным источником БАВ гепатопротективного действия, в то время как листья (культивируемое сырье) –

иммуномодулирующего действия. С помощью молекулярного докинга проиллюстрировано связывание доминирующих БАВ экстракта из дикорастущего сырья (гидроксикоричные кислоты) с ключевыми ферментами системы биотрансформации-детоксикации – цитохромом P450 и глутатионтрансферазой. На основе представленных экспериментальных данных сделан вывод о том, что СФБТС *in vitro* целесообразно применять при скрининге биологической активности, для выявления целевых групп БАВ, а также возможных механизмов их действия и для оценки безопасности субстанций. Результаты, полученные с помощью биотест-систем молекулярного и организменного уровней, являются сопоставимыми.

Восьмая глава диссертации состоит из двух разделов и демонстрирует экономическую эффективность использования СФБТС в доклинических исследованиях.

В первом разделе приведен расчет стоимости исследования адаптогенной активности и показана целесообразность использования СФБТС при оценке биологически активных соединений на примере трех экстрактов травы серпухи венценосной с различным содержанием фитостероидов. Применение СФБТС позволяет сократить затраты: временные в 3 раза, финансовые в 4,4 раза, количества лабораторных животных в 3 раза.

Во втором разделе продемонстрированы результаты проведенных экономических расчетов использования СФБТС при оценке БАВ венотропного действия на примере экстрактов красных листьев винограда культурного четырех различных сортов. При использовании СФБТС сокращаются затраты: временные в 6 раз, финансовые в 27 раз, количество лабораторных животных в 7 раз.

Соответствие работы паспорту специальности

Научное положение диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), пунктам: 1 – Молекулярная биотехнология, генетическая и метаболическая инженерия, 7 – Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии, 12 – Биотехнология растительных и животных клеток. Контроль качества и оценка безопасности пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических биопрепаратов.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты исследования опубликованы 48 научных работ, в том числе 19 статей – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них в базах данных Scopus и Web of science – 6 (Q1-1 статья), 2 монографии, получены 3 патента РФ на изобретение.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат и опубликованные научные работы соответствуют тематике исследования и отражают основное содержание диссертации.

Оценивая диссертационную работу Лупановой Ирины Александровны в целом положительно, хотелось бы получить от автора пояснения по следующим вопросам и замечаниям:

1. Автор утверждает, что с использованием СФБТС *in vitro* выявлена целевая группа БАВ в экстракте травы цикория обыкновенного, при этом в автореферате и диссертации приведены данные только для цикориевой и хлорогеновой кислот. Однако, в экстракте есть и другие гидроксикоричные кислоты: кафтаровая, кофейная, феруловая и, видимо, неохлорогеновая. Они покажут те же результаты?

2. Почему в качестве тест-объектов молекулярного уровня автор выбрала именно ферменты?

3. В работе не указаны сроки проведения экспериментов, а также возраст лабораторных животных, почему?

4. Почему в качестве референтного препарата использовали Силимар, а не другие известные препараты при испытании тест-системы для оценки гепатопротективной активности?

5. Могут ли помочь, полученные в работе результаты, в стандартизации лекарственных препаратов растительной природы?

Указанные замечания и вопросы носят уточняющий и дискуссионный характер и не снижают ценность диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Лупановой Ирины Александровны на тему «Методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема по формированию научного подхода к созданию высокочувствительных, селективных, быстрых и недорогих биологических тест-систем молекулярного уровня, что имеет важное научно-практическое значение для различных отраслей биологии, в частности, в молекулярной биологии.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Лупановой Ирины Александровны на тему «Методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук согласно пп. 9-14 «Положение о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 01.10.2018 № 1168), а его/её автор Лупанова Ирина Александровна достойна присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Доктор медицинских наук по специальности
14.00.25 - «Фармакология, клиническая фармакология»,
профессор, член-корреспондент РАН,
заведующий НИЛ молекулярной фармакологии
НИИ трансляционной медицины, заведующий
кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии
им. академика П.В. Сергеева ИБ (МБФ)
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Дата: 15.05.2025

Николай Львович Шимановский

117513, г. Москва, Ул. Островитянова, дом 1, стр. 6
Тел.: +7-495-434-03-29 e-mail: shimannn@yandex.ru <https://rsmu.ru/>

Подпись доктора медицинских наук, профессора, член-корр. РАН Шимановского Н.Л. заверяют:
Ученый секретарь ФГАОУ ВО РЦИМУ им. Н.И. Пирогова
(Пироговский Университет) Минздрава России,
к.м.наук, доцент

Ольга Михайловна Демина

