

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Береговых Валерия Васильевича на диссертационную работу Лупановой Ирины Александровны «Методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений», представленную в диссертационный совет 99.0.027.03 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология

Актуальность темы исследования

В соответствии с Приказом Минздрава России № 66 от 13.02.2013 г. (с изменениями на 13 июля 2021 года) «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации» и Федеральной целевой программой «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2030 года и дальнейшую перспективу» признана необходимость совершенствования системы лекарственного обеспечения населения путем развития отечественной фармацевтической промышленности и создания инновационных лекарственных препаратов для медицинского применения. Наряду с этим, согласно дорожной карте «Превентивная медицина» Национальной технологической инициативы в период до 2035 года, на территории Российской Федерации, планируется развитие лекарственного растениеводства, производство лекарственных средств растительного происхождения. Источники биологически активных веществ (БАВ) как природного, так и биотехнологического происхождения, отличаются разнообразием состава по сравнению с веществами синтетического происхождения, они более безопасны и могут применяться длительными курсами. По данным Всемирной организации здравоохранения использование лекарственных средств растительного происхождения (ЛСРП) постоянно

растет. В последние годы активно развивается фитобиотехнологическое направление в медицине для получения активных БАВ из высших растений с использованием клеточных культур, бактерий и дрожжевых клеток.

Однако, разработка лекарственных средств растительного происхождения является более сложным процессом, чем для «стандартных» (общепринятых) фармацевтических препаратов, так как в них может содержаться более ста природных компонентов, а для выделения и изучения каждого из них возрастет потребность во времени и ресурсах. Для оценки эффективности ЛСРП следует применять соответствующие фармакодинамические и общие фармакологические методы с использованием моделей на животных или биологические исследования, которые тесно соотносятся с заболеванием человека.

Таким образом, проблема совершенствования методологических подходов к проведению исследований, заключающаяся в исключении или максимальном уменьшении лабораторных животных (за счет использования альтернативных методов), до сих пор является чрезвычайно актуальной. В связи с этим, работа Лупановой И.А. по разработке методологии формирования и применения специфических ферментных биотест-систем (СФБТС) в условиях опытов *in vitro* для оценки биологически активных веществ является актуальной и представляет научный и практический интерес.

Личный вклад соискателя

Диссертация представляет собой самостоятельный труд соискателя, ее структура, постановка рассматриваемой научной проблемы, сформулированные цели и задачи, основные результаты и выводы, положения, выносимые на защиту, отражают самостоятельную точку зрения Лупановой И.А. Она принимала непосредственное участие в экспериментах на всех уровнях: *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, в обобщении, систематизации и описании полученных результатов, разработке основных принципов методологии и всех необходимых нормативных документов, которые соискатель представил в приложении. Лично автором написаны диссертация и автореферат.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Данная работа открывает новые возможности в проведении доклинических исследований лекарственных средств, экономя время, деньги и количество лабораторных животных. В своей работе Лупанова И.А. усовершенствовала процесс поиска лекарственных кандидатов и определения их потенциала за счет создания специфических ферментных биотест-систем с использованием в качестве чувствительных элементов ключевых ферментов в гомеостазе организма человека, что позволяет оценивать биологическую активность субстанций в условиях *in vitro*.

Впервые соискателем методами *in silico* отобраны чувствительные элементы (ферменты) и показаны возможные сайты связывания тест-ферментов с исследованными растительными субстанциями различного фармакологического действия.

Лупановой И.А. впервые сформирована Биологическая коллекция СФБТС, разработан и утвержден порядок работы с ней и обосновано применение разработанного подхода при определении биологической активности экспериментальных экстрактов из нативного/биотехнологического сырья и готовых лекарственных форм с подтверждением полученных *in vitro* результатов на тест-объектах организменного уровня (лабораторные животные, микроорганизмы).

Научная новизна несомненна и подтверждена 3 патентами РФ.

Степень обоснованности и достоверности научных положений выводов по диссертации

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации Лупановой И.А. базируются на тщательном анализе отечественной и зарубежной литературы, продуманном дизайне исследования, достаточном объеме экспериментального материала, использовании высокоинформативных актуальных методов исследования (современные

физиологические, биохимические, фармакологические методы) и современного оборудования, применении адекватных статистических критериев для обработки полученных экспериментальных данных и грамотно сформулированных выводах. Статистическая значимость данных обусловлена проведением необходимого количества экспериментов. Выводы аргументированы, обсуждение результатов проведено обстоятельно и логично. Рекомендации убедительно обоснованы.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности

Указанная область научных исследований соответствует паспорту научной специальности 1.5.6. «Биотехнология» (биологические науки), а именно 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.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Значимость для науки и практики полученных результатов не вызывает сомнений. В диссертационной работе соискателем теоретически обоснована целесообразность использования биотест-систем молекулярного уровня на основе ключевых ферментов системы гомеостаза для оценки БАВ растительного происхождения и готовых лекарственных форм на их основе. Предлагаемый диссертантом новый подход позволяет наряду с первичным скринингом БАВ осуществлять оценку терапевтической эффективности лекарственного препарата, выявлять возможные механизмы действия за счет связывания БАВ с тест-ферментами, что чрезвычайно важно особенно на этапе разработки лекарственных средств.

Соискателем решена научная задача по разработке методологии создания и применения биологических тест-систем молекулярного уровня,

открывая перспективы для поиска и оценки различных БАВ, что важно для значительного круга вопросов биологических наук, медицины, ветеринарии и косметологии.

В результате проведенной Лупановой И.А. работы была сформирована Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro* и подготовлены Методические рекомендации и Стандартные операционные процедуры на их применение при оценке БАВ (указанны в Приложении к диссертации), которые используются различными фармацевтическими и косметическими организациями: ЗАО «ВИФИТЕХ», АО «Фармцентр ВИЛАР», АО «ЭКОлаб» и др.

Содержание и оформление диссертации

Диссертация Лупановой И.А. представляет собой законченный труд, в котором полностью достигнуты поставленные цели и задачи исследования. Диссертация четко структурирована, построена по стандартному плану в соответствии с существующими требованиями ВАК РФ и ГОСТ. Диссертация изложена на 266 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы и его анализа, материалов и методов исследований, результатов исследований и их обсуждения (Главы 3-8), заключения, рекомендаций, общих выводов, списка сокращений, библиографического списка, включающего 343 источника, в том числе 242 зарубежных авторов, приложений. Работа содержит 51 таблицу, 54 рисунка.

Во **введении** представлены актуальность, степень разработанности проблемы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, публикации. Цель и задачи исследования сформулированы четко, соответствуют названию диссертации.

В **первой главе** проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Рассмотрены существующие на сегодняшний день биологические тест-системы, описана их классификация,

преимущества и недостатки каждого из уровней тест-систем. Более подробно рассмотрены биотест-системы молекулярного, тканевого и организменного уровней. В конце первой главы Лупанова И.А. провела обобщение в виде заключения по обзору литературы.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Подробно охарактеризованы специфические ферментные биотест-системы (молекулярный уровень) и экспериментальные животные (организменные тест-объекты), условия их содержания, соответствие биоэтическим нормам экспериментальных работ с лабораторными животными. Соискателем представлено подробное описание растительных объектов с помощью которых изучалась работоспособность, приемлемость и достоверность разрабатываемой методологии. Работа выполнена с применением широкого набора экспериментальных методов, адекватных поставленной цели и задачам. Приведены методы статистического анализа полученных результатов.

Третья глава содержит характеристику ферментов, выбранных соискателем с помощью методов *in silico* в качестве тест-объектов, чувствительных элементов в специфических ферментных биотест-системах, описание процесса разработки их состава, формирования биологической коллекции СФБТС и создания методологии их применения.

Четвертая глава содержит данные по испытаниям СФБТС для оценки БАВ из биотехнологического сырья – суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой. Также в данной главе представлены данные компьютерного прогнозирования биологической активности для выбора соответствующих мишеней, а также экспериментальное подтверждение работоспособности вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы, ее приемлемость и целесообразность применения для оценки адаптогенной активности БАВ, что подтверждается соискателем на экспериментальных моделях с использованием лабораторных животных.

В пятой главе представлены экспериментальные данные (*in silico*, *in vitro* и *in vivo*), подтверждающие целесообразность применения специфических ферментных биотест-систем для оценки готовых лекарственных форм, экспериментальных разработок ФГБНУ ВИЛАР в жидком (настойки, спреи) и твердом (таблетки) агрегатном состоянии. Данные *in vitro* подтверждены *in vivo*-результатами.

Шестая глава содержит результаты по испытаниям СФБТС для оценки БАВ из нативного сырья, данные прогноза биологической активности доминирующих БАВ в экстрактах, полученных Лупановой И.А. с помощью программы PASS Online. С помощью предлагаемых соискателем новых подходов убедительно продемонстрирована адаптогенная активность экстрактов травы серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.), дофаминергическая активность экстракта плодов витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.), вентропной активности экстрактов красных листьев винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) и гепатопротективной активности экстрактов травы володушки золотистой (*Bubleurum aureum* L.). Используя комплекс новых методик, соискатель показал, что примесь плодов витекса китайского не может быть использована для терапии совместно с плодами витекса священного.

В седьмой главе на примере двух экстрактов из надземной части культивируемого и дикорастущего цикория обыкновенного соискатель наглядно демонстрирует широкие возможности предлагаемого подхода к оценке БАВ с использованием специфических ферментных биотест-систем. Они могут быть использованы не только для скрининга биологической активности, но и для выявления целевых БАВ в экстрактах и фракциях. Также продемонстрирована возможность выбора тест-систем при исследовании биологической активности, что позволяет выявить возможные участки связывания действующего компонента с ферментом. Это, в свою очередь, позволяет предположить механизм действия активных веществ, входящих в состав растительных препаратов.

Восьмая глава представляет собой убедительное доказательство экономической эффективности использования специфических ферментных биотест-систем. В данной главе соискатель приводит экономическое обоснование их использования по сравнению с лабораторными животными на примере оценки адаптогенной активности трех экстрактов травы серпухи венценосной с различным содержанием экидистероидов и венотропной активности четырех экстрактов листьев красных винограда культурного различных сортов. На основе полученных результатов Лупанова И.А. делает вывод, что применение СФБТС в оценке БАВ позволит значительно снизить финансовые и временные затраты, а также значительно сократит количество используемых в эксперименте лабораторных животных, что соответствует действующей концепции «3R» и всем современным биоэтическим нормам и правилам.

Соискатель последовательно описывает полученные результаты; числовые данные приведены в виде таблиц, наиболее значимые эффекты хорошо проиллюстрированы рисунками и гистограммами. Толкование всех представленных результатов является адекватным полученному фактическому материалу.

В разделе **«Заключение»** Лупанова И.А. подтвердила решение всех поставленных задач диссертационной работы. Соискателем убедительно доказано, что применение СФБТС целесообразно при оценке БАВ различного происхождения и агрегатного состояния для дальнейшего их использования в пищевых, медицинских, ветеринарных и других целях. В методологическом отношении существенными характеристиками ферментных биотест-систем являются их высокая специфичность и чувствительность, хорошая воспроизводимость и значительная экономичность.

Выводы полностью основаны на полученных диссертантом результатах, отражают цель и суть проведенного исследования, соответствуют поставленным задачам.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы Лупановой И.А. содержит исчерпывающую и хорошо иллюстрированную информацию по основным позициям выполненного исследования. В нем обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, четко определены новизна и практическая значимость работы, изложены основные положения диссертации. Представленные таблицы, рисунки и приложения способствуют легкому восприятию результатов работы.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертационной работы опубликовано 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.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

При использовании СФБТС для оценки БАВ необходимо учитывать, что каждая биотест-система позволяет оценить исследуемый объект по одному биологическому параметру. Поэтому для выявления спектра биологически активных свойств, соискатель рекомендует применять соответствующие первичные и вторичные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, каждая из которых коррелирует с определенным видом биологической активности.

Понятная и четко представленная методология исследования для оценки новых лекарственных кандидатов открывает новые возможности для разработки на их основе эффективных отечественных препаратов, в первую очередь на этапе доклинических исследований.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Несмотря на положительную оценку диссертационной работы, возник ряд вопросов и замечаний:

1. Чем обусловлен выбор растительных объектов для подтверждения работоспособности предложенной методологии?

2. Почему для компьютерного прогнозирования биологической активности из достаточно большого количества программ была выбрана именно программа PASS Online?

3. В работе недостаточно четко представлены условия хранения ферментных биотест-систем.

4. Почему Вы не остановились на выборе ферментов микробного происхождения?

5. В работе встречаются опечатки и неудачные длинные выражения, но нужно отметить их немногочисленность (например, стр. 21, 22, 197).

Перечисленные выше замечания и вопросы не носят принципиального характера, не снижают научной ценности и носят уточняющий характер.

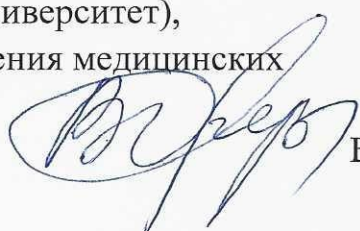
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Лупановой Ирины Александровны на тему «Методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для биологии, медицины и фармации. На основе проведенных исследований были предложены новые методологические подходы, обеспечивающие разработку новых биохимических методик, пригодных как для контроля качества растительных

субстанций и препаратов, так и для прогнозирования их биологической активности.

По актуальности, новизне, методическому уровню, объему и достоверности полученных результатов, научной и практической значимости диссертационная работа Лупановой Ирины Александровны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24. 09. 2013 г. (с изменениями и дополнениями от 25 января 2024 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент
гражданин Российской Федерации
доктор технических наук по специальности
05.17.04 – Технология органических веществ, академик РАН,
Профессор кафедры Промышленной фармации Федерального
Государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования Первый Московский
государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет),
Заместитель академика-секретаря Отделения медицинских
наук РАН
21.05.2025


Береговых В.В.

Подпись Береговых В.В. удостоверяю
заместитель начальника отдела медицинских
наук РАН
109240, Москва, ул. Солянка, 14, стр.5
Телефон: +7(495)698-56-50
beregovykh@pran.ru
www.ras.ru


Ульянова Н.А.

