

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 работы. Разработка нового лекарственного препарата, кроме химических, физических, технологических стадий, включает обязательные доклинические (фармакологические и токсикологические) исследования. Одним из важнейших этапов таких исследований, без которых невозможно дальнейшее продвижение новых фармацевтических разработок, является скрининг биологически активных соединений (БАС). На сегодняшний день для оценки БАС разработаны тест-системы различного уровня организации: организменного (лабораторные животные), тканевого (изолированные органы или ткани растений, животных и человека), клеточного (различные культуры клеток), микроорганизменного (различные виды бактерий, вирусов и грибов), а также молекулярного (рецепторы, ферменты и др.).

В качестве молекулярных биотест-систем обычно используются биомакромолекулы – ферменты, антитела, рецепторные белки, нуклеиновые кислоты. Каждая из тест-систем имеет свои методические особенности практического применения.

Диссертационная работа Лупановой И.А. посвящена разработке специфических ферментных биотест-систем (СФБТС) молекулярного уровня, для оценки БАС и контроля их качества не зависимо от происхождения и агрегатного состояния, формированию биологической коллекции на их основе и является актуальной, так как направлена на решение не только фундаментальных задач современной биотехнологии, но и для дальнейшего их использования в пищевых, медицинских, ветеринарных и других целях.

Цель диссертационной работы – теоретически обосновать, разработать методологию формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для *in vitro* тестирования биологически активных соединений, а также экспериментально оценить релевантность разработанных биотест-систем.

Научная новизна заключается в том, что соискателем впервые разработана методология формирования и применения СФБТС для оценки и контроля качества БАС различного происхождения и агрегатного состояния в условиях опытов *in vitro*.

Лупановой И.А. впервые обосновано применение разработанной методологии при определении биологической активности растительных объектов, полученных из нативного и биотехнологического сырья, а также экспериментальных лекарственных форм. Предлагаемая диссертантом методология позволяет оптимизировать оценку БАС в процессе их получения (включая выделение, фракционирование и очистку) и определить их перспективность для создания готовых лекарственных средств на их основе.

Диссертантом впервые сформированы Реестр Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, который состоит из 5 первичных и 5 вторичных СФБТС и Положение о них, а также разработана нормативная документация, касающаяся порядка использования, хранения и пополнения Биологической коллекции, которые приведены в приложении к диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной 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.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что предлагаемая диссертантом методология формирует общий алгоритм по созданию ферментных биотест-систем для оценки БАС, обладающих широким спектром биологической активности, что открывает большие возможности для дальнейшего развития данного направления.

Практическая значимость заключается в широком охвате возможности использования разработанной методологии как в создании, так и в применении специфических биотест-систем исследователями и практиками различных направлений, а также в учебном процессе в области биологических наук.

Диссертантом в соавторстве получены патенты на изобретение №№ 2676085, 2771028 и 2802434. Материалы исследования внедрены в работу ЗАО НАУЧНЫЙ ЦЕНТР «ФАРМВИЛАР», ЗАО «ВИФИТЕХ», АО «Фармцентр ВИЛАР», АО «ЭКОлаб», АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ», НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (г. Томск); в учебный процесс Института наук о жизни и биомедицине (Школе) ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; кафедр общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ; фармакологии им. ЗДН РФ профессора А.А. Лебедева ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ; фармакологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» МЗ РФ, а также используются в тематике научно-исследовательских работ ФГБНУ ВИЛАР (<https://vilarnii.ru/biokollektsii/>).

Рекомендации по использованию результатов для науки и практики. Результаты данной диссертационной работы открывают возможность как в области поиска чувствительных элементов для создания на их основе специфических ферментных биотест-систем для выявления разных видов биологической активности, так и их применения для оценки, стандартизации

и сертификации БАС в различных областях медицины, ветеринарии, косметологии и пищевой промышленности.

Личный вклад автора – диссертанту принадлежит ведущая роль в постановке научной проблемы исследования, цели и задач. Лупанова И.А. принимала непосредственное участие в проведении экспериментов *in silico*, *in vitro* и *in vivo*, обобщении и систематизации полученных результатов, формулировке основных принципов предлагаемой методологии и оценке ее релевантности. Диссертация, автореферат и нормативная документация написаны лично автором.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 266 страницах компьютерного текста (с учетом Приложений) и имеет традиционную структуру – состоит из Введения, Обзора литературы (Глава 1), Материалов и методов исследований (Глава 2), обсуждения результатов (Главы 3, 4, 5, 6, 7, 8), заключения, общих выводов, списка литературы, включающего 343 источника. Диссертация иллюстрирована 54 рисунками и 51 таблицей.

Во Введении обоснована актуальность выполнения данной научной работы, показана степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, четко обозначены научная новизна и практическая ценность полученных результатов, а также основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава является обзором литературы, в котором диссертант подробно рассматривает достоинства и недостатки существующих методов исследований БАС, в том числе растительного происхождения, с точки зрения определения их биологической активности. Упомянуты основные требования, изложенные в нормативной документации, при выполнении экспериментов *in vitro* и *in vivo*, рассмотрены их основные достоинства и недостатки. Сформулированы основные принципы компьютерного прогнозирования терапевтической активности в экспериментах *in silico*, продемонстрированы возможности этих методов, дополнительно продемонстрированы возможные

пути взаимодействия экспериментов *in vivo*, *in vitro*, *in silico* для решения поставленных диссертантом задач. На основании изучения литературных источников Лупанова И. А. формулирует проблему создания современной обобщенной методологии для разработки биохимических *in vitro*-методик, пригодных для оценки и контроля качества различных БАС.

Вторая глава представляет собой подробное описание методов экспериментальных испытаний СФБТС на объектах исследования, в том числе растительного происхождения.

В третьей главе обосновывается использование молекулярных чувствительных элементов (ферментов) и целесообразность применения сертифицированных стандартных биотест-систем для оценки БАС широкого спектра терапевтического действия. В этой главе автор описывает процесс создания Биологической коллекции и Реестра СФБТС, нормативной документации, необходимой для ее функционирования, а также этапы исследования по созданию методологии формирования и применения СФБТС.

В четвертой, пятой и шестой главах описаны результаты собственных экспериментальных исследований по подтверждению работоспособности разработанных СФБТС для оценки различных видов биологической активности: адаптогенной, антимикробной, антиоксидантной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, венотропной, гепатопротективной и др. В данных главах с помощью методов *in silico* автор выбирает в качестве мишеней соответствующие ферменты, проводя таким образом отбор соответствующей первичной или вторичной СФБТС, выявляет с ее помощью биологическую активность у БАС различного, в том числе, биотехнологического происхождения. Для доказательства осуществимости самостоятельного использования СФБТС при оценке БАС проведен блок исследований *in vivo* на лабораторных животных в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований. Полученные

результаты статистически обработаны. Материал изложен логично, вытекающие выводы научно обоснованы.

Седьмая глава раскрывает широкие функциональные возможности специфических ферментных биотест-систем. Диссертантом показаны возможности использования СФБТС для оптимизации процесса выделения БАС из растительного сырья, выявления маркерных соединений при его стандартизации, в процессе фармацевтической разработки лекарственных средств на их основе; с помощью молекулярного докинга Лупанова И.А. продемонстрировала возможность использования СФБТС для выявления вероятных механизмов действия некоторых БАС.

В восьмой главе на примере растительных экстрактов диссертант провела сравнительные расчеты стоимости исследования адаптогенной активности субстанций из травы серпухи венценосной и венотропной активности экстрактов красных листьев винограда культурного, учитывая затраты на материалы и реактивы, электроэнергию и воду, заработную плату и накладных расходов. Проведенные сравнительные исследования с использованием молекулярных ферментных биотест-систем и биотест-систем организменного уровня (лабораторные животные) показали значительную экономию временных и финансовых затрат, а также значительное сокращение использования лабораторных животных в эксперименте.

Диссертационная работа завершается выводами и списком литературы. Кроме того, в ней присутствуют Приложения в количестве 16 документов, подтверждающие основные положения, научную новизну и практическую значимость данного диссертационного исследования.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, рекомендаций и выводов: научные положения и выводы обоснованы достаточным количеством экспериментального материала, полученного с использованием современных биотехнологических, фармакологических,

биохимических, морфологических методов, а также адекватными приемами статистической обработки полученных результатов, что позволяет сделать заключение о достоверности представленных результатов исследований.

Главы и разделы в диссертационной работе и автореферате изложены последовательно, написаны грамотным языком. Материал проиллюстрирован таблицами и рисунками, в том числе микрофотографиями. Содержания диссертации и автореферата полностью совпадают.

Результаты выполненных исследований обсуждались на международных и всероссийских конференциях, по ним опубликовано 48 научных работ, в том числе 3 патента РФ, 6 статей опубликованы в журналах в базах данных Scopus и Web of science, 19 статей – в периодических изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования России по специальности 1.5.6 – биотехнология. Опубликованные научные труды автора полностью отражают основные положения и выводы диссертации.

В целом диссертация И.А. Лупановой является законченным исследованием, представляет собой решение научной проблемы в медицинской биотехнологии, имеющей важное социально-экономическое значение.

Наряду с положительной оценкой работы Лупановой И.А. необходимо сделать ряд замечаний и пожеланий.

1. Возможно ли представить экономическое обоснование используемых в работе методов в сравнении с физико-химическими методами анализа (включая стоимость стандартных образцов БАВ, колонок ВЭЖХ и реактивов)?
2. Какова целесообразность в использовании литературных источников более 10 летней давности? Желательно обосновать.

3. В работе рассматриваются только БАС, перспективные для медицинского применения. Возможно ли более широкое использование предлагаемой методологии?
4. В автореферате недостаточно четко сформулированы итоговые методики для проведения экспериментов *in vitro* (не приведены массы навесок, объемы растворов и т. д.).
5. В таблицах экспериментальные данные представлены как $M \pm m$. В частности, в таблице №3 приведены данные о скорости реакций глутатионтрансферазы с числовыми значениями $340,3 \pm 1,46$. Округление числовых значений M и m выполнено с разной точностью. Желательно, чтобы точность округления этих величин была одинаковая.

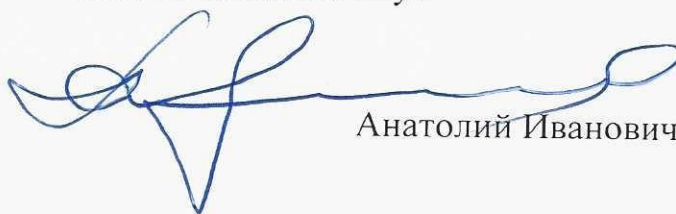
Указанные выше замечания носят рекомендательный характер и не снижают степень научной новизны и практической значимости представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Лупановой Ирины Александровны «Методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений» является самостоятельно выполненной, законченной научно-квалификационной работой и имеет важное значение для биотехнологии, в частности медицинской и сельскохозяйственной, а также для практического здравоохранения. Диссертантом предложена методология разработки и применения биологических систем для оценки БАС различного происхождения и агрегатного состояния, в том числе растительного происхождения, что создает платформу для разработки и производства лекарственных средств. Разработанная методология отличается относительной простотой, дает воспроизводимые результаты и сокращает сроки доклинического исследования лекарственных средств.

В целом, диссертационная работа Лупановой И.А. по актуальности темы, объему проведенных исследований, научно-методическому уровню, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), а её автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология.

Официальный оппонент,
гражданин Российской Федерации,
доктор химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия,
академик РАН,
Научный руководитель направления «Биотехнология»,
заведующий отделом биотехнологии Федерального
бюджетного учреждения науки Государственного
научного центра Российской Федерации Института
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)



Анатолий Иванович Мирошников

26.05.2025

Подпись Мирошникова А.И. удостоверяю:

Ученый секретарь ГНЦ ИБХ РАН,
доктор физико-математических наук



Владимир Александрович Олейников

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10
Телефон: +7 (495) 335-01-00
office@ibch.ru, www.ibch.ru