

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Генералова Евгения Александровича «Биохимические основы биомедицинского применения полисахаридов из клубненосных растений», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности

1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы

Актуальность данной диссертационной работы на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия определяется тем, что она находится на стыке фундаментальной гликобиологии и передовой биомедицинской науки и соответствует наиболее приоритетным направлениям современной биохимии и биомедицины, а именно – поиску и молекулярно-биохимическому обоснованию использования новых природных соединений в терапевтических целях. Полисахариды являются универсальными и многофункциональными биомолекулами, играющими центральную роль в структурной организации живых систем, энергетическом обмене и, что особенно важно, в механизмах иммунного ответа и патогенеза многих заболеваний. В условиях современного роста заболеваемости, снижения эффективности стандартных методов лечения и необходимости разработки новых, безопасных терапевтических агентов, поиск и глубокое изучение биологически активных природных соединений приобретает первостепенное значение. Особую ценность работе придает комплексный подход, направленный не только на описание биологической активности, но и на установление механизмов действия на молекулярном и клеточном уровнях.

Диссертационное исследование сфокусировано на полисахаридных комплексах, экстрагируемых из доступного растительного сырья — топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.) и картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Актуальность работы подтверждается тем, что, несмотря на известность биологической активности растительных экстрактов, биохимические механизмы, лежащие в основе их потенциальной противоопухолевой, противовоспалительной, противоязвенной, радиопротекторной и противовирусной активности, остаются недостаточно исследованными. В задачи диссертанта входило не только описать биологический эффект, но и установить, какие физико-химические особенности этих полисахаридов (молекулярная масса, мономерный состав, тип гликозидных связей, наличие белковых примесей) детерминируют их многовекторное биологическое действие.

Особую значимость работе придаст исследование биохимических основ активности: установление взаимодействия полисахаридов с ключевыми рецепторами иммунокомпетентных клеток (Dectin-1 и TLR-2/6) и анализ изменений в экспрессии генов, регулирующих воспалительные, антиоксидантные и апоптотические каскады. Решение этих сложных биохимических задач позволяет перейти от описательного подхода к созданию научно обоснованных технологий производства и применения этих веществ в биомедицинских целях. Таким образом, данная работа вносит существенный вклад в теоретическую гликобиологию и открывает прямые перспективы для создания новых, эффективных и безопасных средств профилактики и терапии социально значимых заболеваний.

Степень обоснованности и научная новизна

Работа демонстрирует высокий уровень научной новизны. Автором впервые получены, охарактеризованы (включая молекулярную массу, моносахаридный состав, природу гликозидных связей и наличие белковых примесей) два различных по структуре и активности полисахаридных комплекса. Отмечено, что HTLP является высокомолекулярным β -глюканом (1–2 МДа) с β -(1→3)- и β -(1→4)-связями, тогда как STP – гликопротеин (70 кДа) с β -(1→4)-связями. Это структурное различие обуславливает разницу в паттернах их биологической активности.

В работе продемонстрирован широкий спектр *in vivo* специфической активности полисахаридов: иммуноадьювантная (по методу Эрне), противовоспалительная (в модели LPS-индуцированного воспаления в макрофагоподобных клетках THP-1, карманной гранулемы, каррагинанового и формалинового отека), противоязвенная (в моделях Селье и Охабо), противоопухолевая (в модели карциномы Льюиса и карциносаркомы Уокера) и радиопротекторная активность (в моделях абсолютной выживаемости, колониестимуляции KOE-C, микроядерном тесте при различных дозах и типах облучения).

Автором впервые предложены и экспериментально подтверждены гипотезы о механизмах активности: для HTLP – доказана зависимость активации макрофагов RAW 264.7 (продукция TNF- α) от экспрессии рецепторов Dectin-1 и TLR-6 и влияние на транскриптомный профиль клеток THP-1 (стимуляция *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IL12B*, *CSF-1*, *CD40*, *CD80*, *CD274*); для STP – продемонстрировано влияние на транскриптомный профиль клеток THP-1 (подавление *IL6*, *TNF*, *IL1*, стимуляция *IL10*, *NRF2*, *BCL2*), что согласуется с его противовоспалительными и репаративными эффектами.

В работе обоснован и успешно применен комплексный методологический подход, интегрирующий передовые методы физико-химического анализа (различные виды

спектроскопии и хроматографии, КД, SERS и др.), доклинические модели и транскриптомный анализ (RT-qPCR).

Диссертационная работа Генералова Евгения Александровича является примером комплексного и глубокого исследования в области биохимии природных полисахаридов. Автор не ограничился описанием биологической активности с использованием различных моделей, а провел разностороннее исследование биохимических механизмов действия выделенных полисахаридных комплексов, включая физико-химические характеристики, взаимодействие с клеточными рецепторами и влияние на экспрессию генов. Применение широкого спектра современных аналитических, биохимических и доклинических методов, таких как ВЭЖХ, ГПХ, ГЖХ, спектроскопические методы (оптическая, ИК, Рамановская, КД), атомно-силовая микроскопия, методы определения биологической активности *in vitro* и *in vivo*, а также молекулярно-биологические методы (RT-qPCR, нокаут генов целевых рецепторов) позволило получить важные результаты относительно биохимических основ биологической активности этих полисахаридных комплексов. Разработанные и использованные подходы и предложенные гипотезы могут быть экстраполированы и применены в отношении других биологически активных молекул.

Таким образом, научная новизна работы заключается в фундаментальном расширении знаний о природных полисахаридах, установлении новых молекулярных механизмов их действия, выявлении ранее не описанных биологических активностей, а также в разработке комплексного методологического инструментария для дальнейших исследований в гликобиологии и прикладной фармакологии.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Генералова Евгения Александровича представляет собой законченное исследование, которое изложено компактно на 260 страницах машинописного текста, иллюстрировано 63 рисунками, 18 таблицами. Работа имеет не классическое привычное построение, но хорошо структурирована и состоит из введения и 3 глав, а также включает в себя Заключение, Основные результаты и выводы, Список литературы. Каждая из глав завершается обобщающими выводами, сформулированными как на основе литературных, так и полученных автором данных. Список цитируемой литературы содержит 518 источников.

Раздел Введение содержит информацию об актуальности, цели и задачах, исследования, теоретической и практической значимости полученных результатов, приведены положения, выносимые на защиту диссертационной работы.

Научные положения, выносимые на защиту, в полной мере отражают ценность и новизну проведенного исследования.

Вторая глава диссертационной работы посвящена детальному описанию методологической базы исследования, обеспечивающей достоверность и всесторонность полученных результатов. Соискателем был применен подход, включающий методы органического анализа, биохимической очистки, фармакологического скрининга и молекулярно-биологического анализа. Для количественного определения углеводов использовался фенол-сервокислотный метод, а содержание белковой примеси определялось по методу Лоури. Выделение и первичное фракционирование полисахаридных комплексов HTLP и STP осуществлялось путем водной экстракции с последующей тангенциальной ультрафильтрацией с использованием мембран с различными порогами отсеки (300 кДа и 10–100 кДа), что позволило разделить фракции по молекулярной массе. Для дальнейшей очистки применялась гель-проникающая и ионообменная хроматография, а молекулярная масса конечных препаратов была определена методом гелепроникающей хроматографии с использованием стандартов декстранов. Физико-химические характеристики включали регистрацию оптических спектров поглощения, снятие ИК-Фурье спектров (с использованием ATR приставки), а также применение спектроскопии комбинационного рассеяния, в том числе поверхностно-усиленной (SERS). Конформационный анализ проводился методом КД. Для установления моносахаридного состава образцы подвергались кислотному гидролизу, после которого анализ проводился методами ВЭЖХ и ГЖХ (после дериватизации). Дополнительно использовались гель-электрофорез для приблизительной оценки молекулярная масса (MM) гликопротеина STP, а также аминокислотный анализ белковой примеси. Морфологию и характер агрегации молекул визуализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. Для определения типов гликозидных связей проводилась специфическая ферментативная обработка (α -амилазой, литиказой, целлюлазой) с контролем остаточной биологической активности по методу Эрне. Оценка биологической активности включала обширный комплекс моделей: иммуностимуляция, противовоспалительные модели (каррагинановый/формалиновый отек, гранулема), противоязвенные модели (Окабэ, Селье), противоопухолевая активность (карциносаркома Уокера, карцинома Льюиса), радиопротекторные тесты (выживаемость, микроядерный тест, КОЕ-С) и противовирусная активность (SARS-CoV-2 в модели сирийских хомячков). Биобезопасность оценивалась через цитотоксические тесты, тесты на анафилактическую активность, аллергизирующую активность, острую и субхроническую токсичность, мутагенность (тест Эймса), а также эмбриотоксичность. Исследование молекулярных механизмов

включало анализ цитокинового профиля (ELISA) и количественную ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) для оценки экспрессии генов в клетках THP-1. Для установления рецепторной специфичности HTLP применялись методики с использованием лентивирусных конструкций для нокаута генов рецепторов (Dectin-1, TLR-2/6, CR3) и блокирование рецепторов специфическими моноклональными антителами на макрофагальной линии RAW 264.7. Статистическая обработка данных проводилась с применением как стандартных методов (t-критерий Стьюдента, Краскела–Уоллиса, Кокса) и поправок (Бонферрони), так и редко используемых (перестановочная энтропия), что обеспечивает высокую достоверность полученных выводов.

Третья глава представляет собой основную содержательную часть диссертации, где подробно изложены, визуализированы и критически проанализированы экспериментальные результаты, полученные в ходе решения поставленных задач. Глава логически разделена на два крупных блока: установление физико-химических свойств соединений и детальное изучение их биологической активности и молекулярных механизмов.

Раздел Физико-химические свойства полисахаридов посвящен идентификации и описанию физико-химических характеристик выделенных комплексов HTLP и STP. HTLP выделен как высокомолекулярный (1–2 МДа) полисахарид с примесным содержанием белка (0,5%). STP, напротив, был получен как гликопротеин средней молекулярной массы (около 70 кДа) с содержанием белка до 9%. Проведена сравнительная характеристика растворимости и pH водных растворов. Структурный анализ подтвержден методами спектроскопии: оптические и ИК-спектры выявили характерные для углеводов колебания, Рамановская спектроскопия и SERS дополнительно подтвердили наличие основных функциональных групп. Анализ кругового дихроизма (КД) позволил сделать предположения о конформационных особенностях цепей. Анализ моносахаридного состава методами ВЭЖХ и ГЖХ установил, что в HTLP основной моносахарид – глюкоза, а STP — галактоза и арабиноза. Гель-электрофорез показал MM STP 70 кДа, а анализ аминокислотного состава STP определил его аминокислотный состав. АСМ-изображения показали различную морфологию адсорбированных частиц HTLP и STP на поверхности. Эксперименты с ферментами показали наличие β -(1-3)- и β -(1-4)-связей в HTLP, что определяет его биологическую активность в модели Еrnc.

Раздел Биологическая активность содержит результаты, доказывающие терапевтический потенциал исследуемых соединений и их молекулярно-биохимические механизмы биологической активности.

Оба полисахаридных комплекса, HTLP и STP, продемонстрировали статистически значимую митогенную активность, стимулируя образование антителообразующих клеток в селезенке. При этом HTLP показал более высокий коэффициент стимуляции, что свидетельствует о более выраженной колониестимулирующей (иммуоадьювантной) активности.

В противовоспалительных моделях обнаружены различия в профиле действия. Оба вещества эффективны в модели каррагинанового отека. Однако только HTLP показал выраженную активность в модели формалинового отека (характерного для анальгетической активности), в то время как STP ее не проявил, а в модели карманной гранулемы STP показал более выраженное антиэкссудативное действие, превосходящее действие HTLP.

Для STP установлена характерная биологическая активность в различных моделях. Установлено, что STP проявляет выраженную противовирусную активность в *in vivo* модели инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомячков, значительно снижая вирусный титр в легких и предотвращая потерю веса. При этом STP не подавлял образование вируснейтрализующих антител, а, напротив, стимулировал их выработку, демонстрируя адьювантные свойства. Важно, что STP не показал прямой цитотоксичности в культуре клеток Vero. С другой стороны, STP продемонстрировал высокую эффективность в моделях хронической («ацетатной», Окабэ) и острой (Селье) язвы желудка. Наблюдался выраженный дозозависимый эффект, превосходящий по ряду морфологических показателей (качество регенерации, отсутствие фиброза) стандартные препараты (Омепразол, Ранитидин). Этот эффект связан с модуляцией цитокинового баланса (снижение уровней IL-1 β , IFN- γ , повышение – IL-4) и улучшением гистологической картины регенерации слизистой.

Для HTLP установлена характерная биологическая активность в других моделях. В противоопухолевых моделях HTLP проявил выраженную антиметастатическую активность (до 75% торможения метастазирования карциномы Льюиса) и ингибирование роста первичной опухоли. Монотерапия HTLP не вызывала прямого цитотоксического эффекта на опухолевые клетки *in vitro*. Совместное применение HTLP с химиопрепаратом ЛХС-1269 показало синергетический эффект, что подтверждает его роль как химиоадьюванта, а также его способность поддерживать лейкопоз в условиях цитостатической терапии. Кроме того, HTLP продемонстрировал выраженные радиопротекторные свойства. В моделях протонного и рентгеновского облучения HTLP существенно повышал 30-дневную выживаемость мышей, а в летальных дозах (8.0 и 8.5 Гр) увеличивал выживаемость в 3-5 раз по сравнению с контролем. Радиозащитный

эффект подтвержден в тесте на число колониеобразующих единиц спленоцитов (КОЕ-С), где НТЛР стимулировал пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток, и в микроядерном тесте, где он снижал цитогенетические повреждения ДНК.

Вместе с тем, было проведено доклиническое изучение биобезопасности полисахаридных комплексов в различных моделях (*in vitro* на RAW 264.7, *in vivo* на нескольких видах животных), которые показали, что ни STP, ни НТЛР не проявляют цитотоксичности, не обладают анафилактической, аллергизирующей, мутагенной, эмбриотоксической или тератогенной активностью. ЛД₅₀ для обоих веществ находятся в диапазоне граммов на килограмм массы тела, что свидетельствует об их малотоксичности.

В этой же главе приводятся данные об изучении молекулярных механизмов биологической активности. Этот раздел представляет собой логическую кульминацию исследования. Анализ генной экспрессии в клетках THP-1 показал комплексную модуляцию противовоспалительных, апоптотических и антиоксидантных путей. Для НТЛР было экспериментально доказано, что его способность индуцировать TNF- α в клетках RAW 264.7 полностью зависит от совместной активации рецепторов Dectin-1 и TLR-2/6, что было подтверждено как методами нокаута генов этих рецепторов, так и блокированием их специфическими антителами. Для STP механизмы, вероятно, связаны с ингибированием экспрессии генов провоспалительных факторов.

В целом, диссертация Е.А. Генералова заслуживает самой высокой положительной оценки, ее можно охарактеризовать как экспериментальное исследование высокого уровня с впечатляющими практическими результатами, связанными с внедрением полученных препаратов на основе природных полисахаридных комплексов в пищевую и фармацевтическую отрасль ЕАЭС. Работа имеет логичную структуру, целостна и содержит новые научные результаты. Проведенный анализ публикаций, текста диссертации и автореферата соискателя позволяет прийти к выводу, что поставленные задачи решены, цель работы достигнута, а опубликованные результаты и автореферат полностью отражают содержание диссертации. Представленные в работе научные положения, результаты и выводы достоверны и обоснованы.

Е.А. Генералов автор большого числа статей с хорошей цитируемостью как отечественными, так и зарубежными исследователями. По теме диссертационной работы им опубликовано 19 статей, из которых 15 статей – в рецензируемых, в том числе высокорейтинговых, отечественных и зарубежных изданиях, входящих в базу ядра «Library Science Index» и в международные базы цитирования Web of Science и Scopus, сделаны доклады на российских и международных конференциях, получен 1 российский патент. Материалы диссертации отражены в опубликованных автором работах.

При ознакомлении с текстом диссертационного исследования возникли некоторые замечания и вопросы:

1. В работе показано отсутствие прямой цитотоксичности обоих полисахаридов. Тем не менее, НТЛР проявляет противоопухолевую активность. Имеются ли данные по активации апоптоза в опухолевых клетках при совместном применении НТЛР и химиопрепарата ЛХС-1269, отличных от прямого цитотоксического действия самого ЛХС-1269? Как можно объяснить синергетический эффект химиопрепарата с полисахаридом?
2. Возможно, стоило обсудить в работе, какие методы, помимо использованных в работе, могли бы быть применены для более детального изучения структуры полисахаридных комплексов и определения молекулярного механизма их биологической активности?
3. Имеется ли хотя бы гипотетическое объяснение сходной иммуностимулирующей активности по методу Ерне обоих соединений и различной активности в противовоспалительных моделях?
4. Отсутствие прямой противовирусной активности STP *in vitro* (в клеточной культуре Vero), при наличии выраженного эффекта *in vivo* (у хомяков), убедительно указывает на иммуномодуляторный механизм. Однако, связь между модуляцией генной экспрессии в клетках ТНР-1 и защитой легких от вирусной репликации у хомяков требует более явного обсуждения. Как именно изменение в этих генах приводит к противовирусному эффекту *in vivo*?
5. В работе имеется некоторое количество грамматических и стилистических ошибок.

Однако данные замечания и вопросы несколько не умаляют значимости проведенного исследования и качества подготовленной диссертации. Они связаны с контекстным уточнением научных гипотез и полученных соискателем результатов, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку работы.

Диссертация Е.А. Генералова является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема установления биохимических механизмов биологической активности и физико-химических характеристик полисахаридных комплексов, полученных из клубненосных растений, с целью их биомедицинского применения и разработки новых лекарственных препаратов на их основе, что имеет большое социально-медицинское значение. Вклад проведенных исследований и разработок в развитие отечественного

биомедицинского комплекса подтвержден реализацией промышленного производства нескольких биологически активных добавок и одного лекарственного средства, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны. Тем самым работа Е.А. Генералова полностью отвечает критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова.

Заключение

Диссертация Генералова Евгения Александровича «Биохимические основы биомедицинского применения полисахаридов из клубненосных растений» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.4. Биохимия (химические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. В связи с этим соискатель Генералов Евгений Александрович заслуживает присуждения степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор, академик РАН,
научный руководитель, главный научный сотрудник
Института физиологически активных веществ
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН (ИФАВ ФИЦ ПХФ МХ РАН)

БАЧУРИН Сергей Олегович



«14» ноября 2025

Контактные данные:

Тел.: +7 (496) 524-26-50, e-mail: bachurin@ipac.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация:
03.00.04. – Биохимия

Адрес места работы:

142432, Российская Федерация, г. Черноголовка, Северный проезд, дом 1

Подпись сотрудника ИФАН ФИЦ ПХФ МХ РАН

Бачурина Сергея Олеговича удостоверяю

Ученый секретарь ИФАН ФИЦ ПХФ МХ РАН, к.б.н.



«14» ноября 2025

Л.В. Аникина