

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научной работе,
проректор по финансово-экономической
деятельности федерального
государственного бюджетного учреждения
высшего образования «Российский
биотехнологический университет»
(РОСБИОТЕХ)»

« 10 » июля 2026 г. А.Е. Алексеев

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Савина А.П.: «Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из них детоксифицированных липидов А», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 1.5.6 – Биотехнология, 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность работы.

В настоящее время антибиотикорезистентные бактерии представляют существенную угрозу для здоровья населения. Это обуславливает критическую необходимость поиска и разработки новых альтернативных стратегий профилактики заболеваний, одной из которых является применение вакцин на основе бактериальных полисахаридов. Однако, данный тип вакцин обладают низкой эффективностью у возрастных групп риска. А производство и контроль качества конъюгированных аналогов – полисахарид-белковые вакцины – сопряжены с высокой стоимостью. Добавление в состав полисахаридных вакцин адъюванта на основе алюминия также неспособно индуцировать полноценный клеточный иммунитет. В этой связи становится актуальной разработка новых, более эффективных бактериальных вакцин и адъювантов. Одним из наиболее мощных

природных иммуностимуляторов, способных выступить в этой роли, является липополисахарид (ЛПС) – компонент клеточной оболочки и фактор вирулентности грамотрицательных бактерий. Перспективным является использование детоксифицированных липополисахаридов (д-ЛПС) и детоксифицированных липидов А (д-ЛА) в качестве компонентов вакцин. Таким образом, исследование, цель которого состоит в разработке новых и безопасных методов экстракции ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, способов получения как их детоксифицированных производных, так и д-ЛА, и методов контроля качества и стандартизации д-ЛПС является своевременным и актуальным.

Новизна полученных результатов.

Установлена возможность использования спиртовых смесей для экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий как альтернативы классическим методам выделения. Показано, что применение водно-спиртовых систем позволяет получать ЛПС с меньшей контаминацией белками и нуклеиновыми кислотами при сохранении приемлемого выхода целевого продукта. Определены условия щелочной детоксификации ЛПС, обеспечивающие получение детоксифицированных производных с воспроизводимыми физико-химическими характеристиками. Обоснована возможность совмещения стадий экстракции и щелочной детоксификации ЛПС в рамках единой схемы получения д-ЛПС. Установлены параметры мягкого кислотного гидролиза деацилированного д-ЛПС, обеспечивающие направленное получение детоксифицированного триацильного дифосфорилированного липида А, а также параметры жесткого кислотного гидролиза ЛПС, позволяющие получать детоксифицированный монофосфорилированный липид А. Показана возможность удаления примесей фосфолипидов из высушенных клеток грамотрицательных бактерий и субстанций ЛПС с использованием этанола при получении д-ЛА. Разработаны показатели и нормативы качества низкомолекулярного д-ЛПС *Shigella sonnei* на уровне субстанции.

На разработанный способ экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных бактерий получен патент (Пат. RU 2832320C1).

Практическая значимость.

Практическая значимость работы состоит в разработке технологически применимых, безопасных и потенциально масштабируемых схем экстракции ЛПС и получения детоксифицированных производных (д-ЛПС) и детоксифицированных липидов А. Сформированные подходы к стандартизации и контролю качества д-ЛПС могут быть использованы при разработке и производстве вакцинных препаратов и адъювантов на основе д-ЛПС и д-ЛА. Подготовлена нормативная документация на соответствующие субстанции.

Оценка содержания работы, ее завершенность.

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Объем диссертации составляет 147 страниц машинописного текста.

Во введении изложена актуальность темы, поставлены задачи исследования и результаты по этим задачам. Представлены общая обоснованность решаемых задач, научная новизна и практическая значимость.

В первой главе традиционно расположен литературный обзор. Рассмотрено строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий, отражены сведения о способах экстракции полисахаридов из клеток, грамотрицательных бактерий, систематизированы методы получения д-ЛПС и д-ЛА, обоснована актуальность разработки безопасных, технологичных и стандартизируемых методов получения д-ЛПС и д-ЛА.

Во второй главе представлены объекты и методы исследования, применяемые в ходе выполнения диссертационного исследования

В третьей главе приведена сравнительная оценка водно-спиртовых смесей для экстракции липополисахаридов из клеток грамотрицательных

бактерий, предложены и апробированы две альтернативы водно-фенольному методу: 50% пропанол и смесь бутанол-пропанол-вода.

В четвертой главе представлено экспериментальное обоснование подходов к детоксификации ЛПС, приведены данные, полученные при оптимизации условий щелочной детоксификации, разработан и экспериментально подтвержден метод совмещения экстракции и детоксификации в одном технологическом этапе.

В пятой главе подобраны условия мягкого кислотного гидролиза для получения дифосфорилированного триацильного липида А, установлены параметры жесткого гидролиза для получения монофосфорилированного липида А, разработан способ удаления фосфолипидных примесей.

В шестой главе представлены результаты разработки спецификации субстанции низкомолекулярного д-липополисахарида *S. sonnei*, валидации двух методов эксклюзионной ВЭЖХ в соответствии с требованиями ГФ РФ XV и ФЕАЭС.

В заключении представлены основные выводы, которые логично резюмируют приведенные в диссертации материалы исследований, полностью отвечают на вопросы, поставленные в целях и задачах работы.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, обеспечена комплексным применением независимых взаимодополняющих современных методов исследования, значительным объемом экспериментальных данных, согласованностью теоретических подходов с результатами практических экспериментов. Экспериментальная часть работы, выполненная Савиным А. П., демонстрирует использование широкого спектра химических и аналитических методов. Совокупность примененных подходов обеспечило получение необходимого объема данных, достаточных для подтверждения достоверности представленных в диссертации выводов и сформулированного заключения.

Результаты исследований Савина А.П. опубликованы в виде 5 печатных работ, в том числе 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus, Chemical Abstracts, 1 статья в рецензируемом научном издании из перечня ВАК Минобрнауки России, получен 1 патент, 1 публикация в сборнике материалов всероссийской научной конференции.

Автореферат диссертации и публикации соискателя полностью отражают содержание диссертационной работы, которая соответствует специальностям 1.5.6 – Биотехнология и 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Личный вклад автора. Детализация описания приемов и методов показывает, что основная часть обсуждаемых в диссертации результатов представляет собой личный вклад автора в работу. Рассматриваемая квалификационная работа свидетельствует о проведенном автором достаточно глубоком анализе литературы по теме исследования. Анализ диссертации показывает, что соискатель (Савин А.П.) сформировал широкий спектр экспериментальных, аналитических и технологических компетенций.

Замечания по тексту по диссертационной работе.

В качестве замечаний можно отметить следующий:

1. Цель работы заключалась в разработке способов получения ЛПС из клеток грамотрицательных бактерий, методов получения их детоксифицированных производных, детоксифицированных липидов А и методик контроля качества и стандартизации д-ЛПС. Однако, исследование выполнено на 5 штаммах (*E. coli* O157, *E. coli* M-17, *S. sonnei*, *S. boydii* 6, *S. typhi*), все из которых относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. Структурные особенности липида А у представителей других родов (например, *Pseudomonas*, *Haemophilus*) могут существенно влиять на эффективность экстракции выбранными смесями. В связи с этим универсальность предложенных методов для всей группы грамотрицательных бактерий остается недоказанной.

2. В работе отсутствует четкое методологическое обоснование выбора конкретных штаммов для отработки отдельных технологических стадий. Не пояснено, чем руководствовался автор при распределении объектов исследования: почему для сравнительной оценки методов экстракции выбран штамм *E. coli* O157, для оценки эффективности экстракции 50% водным пропанолом и смесью бутанол-пропанол-вода - *Escherichia coli* M-17, а для стандартизации - *S. sonnei*, фаза I.

3. Выбор *Shigella sonnei* в качестве объекта для разработки стандартного образца и спецификации является практически значимым (с учетом наличия зарегистрированных в РФ вакцин на его основе), однако в тексте диссертации отсутствует четкое обоснование этого выбора. Автор не приводит сравнительной характеристики *S. sonnei* с другими исследованными штаммами, которая подтверждала бы его преимущество для целей стандартизации именно по таким показателям, как стабильность, воспроизводимость состава или технологическая доступность.

4. В работе недостаточно обоснован выбор экстрагирующих смесей — 50% водного пропанола и смеси бутанол-пропанол-вода. Кроме того, не проведен сравнительный скрининг других низших спиртов, что не позволяет утверждать, что выбранные экстрагенты являются оптимальными. Отсутствие данных о влиянии концентрации пропанола (например, в диапазоне 30–70%) и соотношения компонентов тройной смеси на выход и чистоту ЛПС снижает доказательность сделанных выводов о предпочтительности предложенных методов.

5. Выбор 50% водного пропанола в качестве основного экстрагента для дальнейшей оптимизации не имеет достаточного экспериментального и теоретического обоснования. Автор переходит от тройной смеси бутанол-пропанол-вода к 50% водному раствору пропанола на основании лишь технологического удобства (отсутствие расслоения), однако не проводит сравнительного анализа эффективности этих двух методов в одинаковых условиях на одном и том же объекте. Более того, в работе отсутствует

скрининг концентраций пропанола (например, в диапазоне 30–70%), что не позволяет утверждать, что выбранные 50% являются оптимальными. Не изучено также влияние температуры и времени экстракции для 50% пропанола, хотя для тройной смеси такие эксперименты проводились. Таким образом, выбор 50% пропанола носит характер субъективного решения, а не результата системной оптимизации.

6. В технологической части работы недостаточно полно описаны ключевые параметры стадий лиофильной сушки и ультрафильтрации. Для лиофилизации не указаны температура сублимации, давление в камере, профиль сушки и конечная остаточная влажность. Для ультрафильтрации не приведены трансмембранное давление, тип и материал мембраны, скорость потока.

7. В диссертации используется термин «оптимизация» применительно к экспериментам, в которых проводился лишь подбор условий (варьирование одного параметра при фиксированных остальных). В работе отсутствуют математические методы планирования эксперимента (полный факторный эксперимент, поверхность отклика), не построены уравнения регрессии и не оценены доверительные интервалы для найденных параметров. В связи с этим утверждения об «оптимальных условиях» являются некорректными; правильнее говорить о «подобранных условиях» в исследованном диапазоне значений.

Тем не менее, указанные замечания не снижают общей положительной оценки научно-методических результатов диссертационной работы.

Заключение.

Таким образом, на основании вышеприведенного можно заключить, что диссертационная работа Савина Андрея Павловича: «Разработка способов экстракции из клеток грамотрицательных бактерий липополисахаридов, их детоксифицированных производных и получение из них детоксифицированных липидов А», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 1.5.6 –

Биотехнология, 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – разработка эффективных, экономически обоснованных и экологически безопасных методов выделения д-ЛПС и д-ЛА из грамотрицательных бактерий как компонентов вакцин, имеющей существенное значение для биотехнологии и фармацевтической химии, что соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0692/Р от 06.06.2022 года (с изменениями, утвержденными: приказом №1179/Р от 29.08.2023г., приказом №0787/Р от 24.05.2024г., приказом №1085/Р от 10 июля 2025 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Савин Андрей Павлович заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям - 1.5.6 – Биотехнология, 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры биотехнологии и биоорганического синтеза Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ)» протокол № 8 от «07» июля 2026 года.

Отзыв составили

Кандидат биологических наук, доцент
кафедры биотехнологии и биоорганического
синтеза Института прикладной биотехнологии
и пищевой инженерии им. имени академика

АН И.А. Рогова ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ

Ядерев Вера Владимировна

Контактные данные: тел.: +7 (915) 290 56 99;

e-mail: yaderecvv@mgupp.ru

Адрес места работы:

125080 г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

Кандидат технических наук, и.о. заведующего
кафедрой биотехнологии и биоорганического
синтеза

Института прикладной биотехнологии и
пищевой инженерии им.
имени академика РАН И.А. Рогова ФГБОУ
ВО РОСБИОТЕХ

Вольнова Екатерина Романовна

Контактные данные: тел.: +7 (965) 352 10 81;

e-mail: volnovaer@mgupp.ru

Адрес места работы:

125080 г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

Подписи сотрудников кафедры биотехнологии
и биоорганического синтеза Института
прикладной биотехнологии и пищевой
инженерии им. имени академика РАН И.А.
Рогова ФГБОУ ВО РОСБИОТЕХ

Ядерц В.В., Вольновой Е.Р. заверяю

ПОДПИСЬ Ядерц В.В.; Вольновой Е.Р.
УДОСТОВЕРЯЮ
НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА КАДРОВ
"10" 07 2026
О. В. Борщ

