

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов»
д.м.н., профессор,
член-корреспондент РАН

А.А. Костин



2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» о значимости диссертационной работы Китаевой Марии Петровны на тему «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Актуальность диссертационной темы

Фенольные соединения, алкалоиды и полисахариды, полученные из растительного сырья, активно применяются при разработке лекарственных средств с противоопухолевым действием. Указанные биологические активные вещества получают не только из дикорастущих и культивируемых растений, но и из суспензионных клеточных культур, биоинженерных продуктов. Растения рода *Podophyllum* - традиционный источник фенольных соединений (лигнанов и флавоноидов) с противоопухолевой активностью. В том числе лигнана подофиллотоксина, который применяется в медицинской практике и как самостоятельный препарат, и как субстрат при получении полусинтетических производных (этопозида, этопофоса и тенипозида). Указанные вещества применяются при остроконечных генитальных

кондиломах, опухолях яичек, болезни Ходжкина и неходжкинских лимфомах, лимфогранулематозе, остром нелимфоцитарном лейкозе, раке легкого, желудка, мочевого пузыря, нейробластоме, опухолях мозга, лимфомах. Сбор дикорастущих растений для нужд медицины и фармации приводит к исчерпанию их природных запасов. Введение *P. peltatum* L. в полевую культуру не дает возможности получить необходимое количество подофиллотоксина. Традиционное сырье (корневища с корнями) собирают раз в 4-5 лет. Но и при ежегодном сборе нетрадиционного сырья (листьев) не удастся получить нужное количество подофиллотоксина. Продолжается поиск возможности заменить растения рода *Podophyllum* менее дефицитным растительным и грибным сырьем. Но в других растениях и грибах содержится меньшее количество подофиллотоксина. Химический синтез подофиллотоксина и его производных оказался слишком трудоемким, длительным и дорогим и не был введен в промышленное производство. Были разработаны биотехнологические способы решения этой задачи: микроклональное размножение, получение клеточных культур-продуцентов подофиллотоксина и культуры «волосатых корней», биотрансформация субстратов в подофиллотоксин и его производные. Но пока не удалось разработать рентабельную биотехнологическую производственную схему получения подофиллотоксина. Поиск альтернативных моделей получения подофиллотоксина и фенольных соединений из культур клеток растений и их стандартизация является актуальной биотехнологической задачей.

Научная новизна исследований

Описаны новые типы сырья с противоопухолевой активностью – суспензионные культуры *P. peltatum* L. ФГБНУ ВИЛАР. Обоснован выбор резазурин-теста (по сравнению с МТТ-тестом) для оценки цитотоксической активности экстрактов *P. peltatum* L. в отношении клеток *HeLa*. Для извлечения комплекса фенольных соединений из суспензионной культуры *P. peltatum* L. впервые был использован 80 % ацетон. Цитотоксический эффект ацетоновых экстрактов оказался выше, чем при использовании таких

экстрагентов, как хлороформ, метиловый и этиловый спирт, фосфатный буферный раствор. Впервые в экстрактах органов растения и культур *P. peltatum* L. были идентифицированы производные эллаговой, галловой и кофейной кислот, а также проведено сравнение выхода подофиллотоксина с выходом других фенольных соединений. Впервые были получены данные по изменению состава фенольных соединений в суспензионной культуре из корня *P. peltatum* L. в зависимости от срока культивирования.

Практическая значимость работы

На основе полученных результатов даны критерии оптимизации процесса культивирования исследуемых культур клеток, предложены варианты усовершенствования клеточной культуры *P. peltatum* как продуцента фенольных соединений с цитотоксической активностью, предложен оптимальный способ экстракции и определения цитотоксической активности экстрактов. Экспериментальные данные и методические приемы, используемые в работе, введены в спецкурсы для студентов фармацевтического и медико-биологического факультетов РНИМУ имени Н.И. Пирогова.

Практическая значимость работы также отражена в возможности применения результатов диссертации на производстве – разработана, усовершенствована суспензионная клеточная культура *P. peltatum*, изучен ее химический состав, цитотоксическая активность и подобран способ экстракции, что позволяет считать, что лабораторный этап разработки клеточной культуры пройден, и есть возможность перейти к промышленному этапу посредством масштабирования биотехнологических процессов.

Характеристика содержания диссертационной работы

Диссертационная работа, представленная к рассмотрению, включает введение, пять глав, заключение, рекомендации, выводы, список литературы (193 работы, из них 139 зарубежных) и восемь приложений. Работа изложена на 162 страницах, содержит 46 рисунков и 7 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, приведены цель и задачи, отражена научная новизна и практическая значимость работы, описан личный вклад автора.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором в логической последовательности приведены сведения по ботаническим, экологическим и лекарственным свойствам растения *P. peltatum*, по биотехнологическим особенностям каллусных и суспензионных культур, полученных из этого растения, указаны другие подходы к получению биотехнологического сырья из *P. peltatum*, подробно рассмотрены фенольные соединения, обнаруженные в *P. peltatum*, обладающие цитотоксической активностью, физико-химические методы анализа этих фенольных соединений, а также методы определения цитотоксической активности.

Во второй главе описаны изучаемые объекты исследования (листья, корни с корневищами растения; каллусные и суспензионные культуры, полученные из почки, плода и корня растения), методы биологического анализа клеточных культур и физико-химического анализа (тонкослойная, газовая и ультраэффективная жидкостная хроматография) экстрактов, полученных на их основе, а также методы определения цитотоксической активности этих экстрактов (МТТ- и резазурин-тесты).

В третьей главе описаны особенности полученных каллусных и суспензионных культур, приведены результаты исследования ростовых и морфофизиологических характеристик суспензионных культур.

В четвертой главе приведены особенности получения и культивирования опухолевых клеточных культур HeLa, K562 и фибробластов, а также результаты определения цитотоксической активности экстрактов органов растения и растительных клеточных культур *P. peltatum* в отношении указанных опухолевых культур и фибробластов.

В пятой главе показаны результаты исследования экстрактов, полученных из органов растения и клеточных культур, методами

тонкослойной, газовой и ультраэффективной жидкостной хроматографии, приведен химический состав указанных экстрактов.

Все результаты исследований изложены автором достаточной подробно, проиллюстрированы, исчерпывающе научно обсуждены.

В заключении автор обобщает научные результаты. Выводы логически следуют из анализа экспериментальных данных и отражают основные положения диссертации.

Диссертация построена в логичном порядке, написана грамотно, автор использует современную научную терминологию.

В автореферате, изложенном на 18 страницах, отражается основное содержание диссертации и выводы, а также приводится список публикаций, которые отражают основное содержание работы. Материалы диссертации прошли широкую апробацию на конференциях всероссийского и международного уровня.

По основным результатам работы опубликована 21 печатная работа, из которых 5 публикаций в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ, включая 3 печатные работы в журналах, представленных в международных базах данных Scopus и WoS.

Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 - Биотехнология по п. 7 (в части: системы выращивания клеточных культур растений и животных для направленного синтеза биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, биологически активных соединений), по п. 9 (в части: оценка качества и безопасности новых видов продуктов, полученных биотехнологическими методами; методы контроля подлинности биотехнологических продуктов).

Вопросы и замечания

1. Клеточная культура *P. peltatum* разрабатывалась как альтернатива лекарственному растительному сырью. Какие практические шаги предприняты автором в направлении внедрения клеточной культуры в биотехнологическое производство?

2. Чем обусловлен выбор опухолевых клеточных культур и фибробластов в качестве тестовых систем для определения цитотоксической активности?

3. Проводили ли фракционный анализ частиц биотехнологического сырья перед экстракцией?

4. Положения, вынесенные на защиту, и выводы содержат очень конкретную информацию. Возможно, их можно было бы сократить.

Сделанное замечание и заданные уточняющие вопросы носят дискуссионный характер и не могут изменить общую высокую оценку работы.

Заключение

Таким образом, диссертация Китаевой Марии Петровны на тему «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью», выполненная под руководством д.м.н. Федотчевой Татьяны Александровны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача - исследованы морфологические и физиологические особенности, состав и содержание фенольных соединений, в том числе подофиллотоксина, а также цитотоксическая активность суспензионных клеточных культур *Podophyllum peltatum* L. как источников сырья для получения противоопухолевых лекарственных препаратов, являющихся альтернативой лекарственному растительному сырью.

По объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, актуальности, новизне, значимости для науки и практики полученных результатов диссертационная работа «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью», представленная на официальное оппонирование, полностью удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного

постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции от 26.09.2022), предъявляемым ВАК Министерства науки и высшего образования РФ к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор – Китаева Мария Петровна – заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Настоящий отзыв подготовлен заведующей кафедрой Общей фармацевтической и биомедицинской технологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», доктором фармацевтических наук, доцентом Суслиной Светланой Николаевной, обсужден и утвержден на заседании кафедры Общей фармацевтической и биомедицинской технологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», протокол № 4 от «05» декабря 2022 года.

Отзыв составили:

Заведующая кафедрой
Общей фармацевтической и
биомедицинской технологии
ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов»
доктор фармацевтических наук
(14.04.01 – Технология получения лекарств),
доцент



С. Н. Суслина

Директор Медицинского института
ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов», доктор медицинских наук



А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.
Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82
e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru