

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Китаевой Марии Петровны «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.6 – Биотехнология

1. Актуальность исследований.

Биологически активные вещества, получаемые из растений, играют особую роль в противоопухолевой терапии. При этом источником этих БАВ могут быть не только дикорастущие и культивируемые растения, но и биотехнологические клеточные культуры.

Растения рода *Podophyllum* традиционно являются источником фенольных соединений (лигнанов и флавоноидов) с противоопухолевой активностью. Среди рассматриваемых АФИ в представителях данного рода присутствует лигнан подофиллотоксин, который применяется в медицинской практике и как самостоятельный препарат, и как субстрат при получении полусинтетических производных (этопозида, этопофоса и тенипозида). Эти вещества применяются при лечении остроконечных генитальных кондилом, опухолей яичек, болезни Ходжкина и неходжкинских лимфомах, лимфогранулематозе, остром нелимфоцитарном лейкозе, раке легкого, желудка, мочевого пузыря, нейробластоме, опухолях мозга, лимфомах.

Культивирование *P. peltatum* *in vivo* не позволяет получить необходимое количество подофиллотоксина, так как традиционное сырье (корневища с корнями) собирают раз в 4-5 лет. При регулярном (ежегодном) сборе листьев не удастся получить нужное количество подофиллотоксина. В связи с этим возникает необходимость поиска альтернативных источников подофиллотоксина, в том числе грибов. Однако все другие системы накопления данного вещества не выдерживают конкуренции с природной системой накопления данного вещества в растениях рода *Podophyllum*. Химический синтез подофиллотоксина и его производных оказался слишком трудоемким, длительным и дорогим и не был введен в промышленное производство.

Учитывая опасность истребления природных популяций растений рода *Podophyllum*, ученые обоснованно обратились к биотехнологии. Среди направлений исследований в разных странах мира можно отметить клональное микроразмножение, получение клеточных культур-продуцентов подофиллотоксина и культуры hairy roots, биотрансформацию субстратов в подофиллотоксин и его производные. Однако до настоящего времени не разработана рентабельная биотехнологическая производственная схема

получения подофиллотоксина. Продолжается поиск источников фенольных соединений с противоопухолевой активностью, являющихся альтернативой лекарственному растительному сырью, получаемому *in vivo*.

В связи с этим диссертационная работа Китаевой Марии Петровны, посвященная культивированию *in vitro* клеточных культур (калтус, суспензия) *P. peltatum* и оценке биохимического состава и цитотоксических свойств экстрактов из асептических растений и органов, представляется весьма актуальной.

2. Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста. Состоит из введения, 5 глав, заключения, рекомендаций, выводов, списка литературы (193 наименования, в том числе 139 иностранных) и приложений. Иллюстративный материал включает 7 таблиц и 46 рисунков.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формирует цель и задачи исследования.

В главе 1 представлена широкая характеристика рассматриваемого объекта – *Podophyllum peltatum* L. – а также различные системы культивирования растительных клеток. Рассмотрены ботанические и экологические особенности подофилла щитовидного, а в связи с этим и биохимические признаки, делающие данное растение ценным для биофармацевтики. Подробно рассмотрены калтусные и суспензионные клеточные культуры как удобные и производительные системы накопления ценных метаболитов, включая конкретные примеры наработки подофиллотоксина клетками представителей рода *Podophyllum*. Отдельно автор останавливается достаточно подробно на тех биологически активных веществах, которые накапливаются в органах растений и в клеточных культурах, рассматривается прежде всего медицинское применение этих веществ. Особое внимание уделено накоплению фенольных соединений, а также биосинтезу конкретно подофиллотоксина. Также автор описывает классические и современные физико-химические методы анализа накопления фенольных соединений и определения цитотоксичности веществ. Обзор литературы отражает фундаментальный и компетентный подход автора к решению поставленных перед ним задач, содержит ссылки на большое количество классической и современной литературы (67 % источников датированы последними 10 годами, а 45 % – последними 5 годами).

В главе 2 «Материалы и методы исследований» достаточно подробно изложены характеристики объектов исследования (органы, калтусные и суспензионные культуры), состав питательных сред, методики микроскопирования, получения экстрактов, изучения химического состава экстрактов и цитотоксической активности.

Глава 3 «Усовершенствование клеточных культур *P. peltatum* L.» посвящена исследованию ростовых параметров суспензионной культуры клеток подофилла, полученных из различных органов, характеристике фаз роста культуральной биомассы; завершает главу анализ морфофизиологических особенностей полученных суспензионных культур рассматриваемого объекта. Автором определена форма клеток в суспензионной культуре, полученной из различных органов, размер конгломератов клеток, различия в окраске суспензий, а также жизнеспособность клеток на 14-е и 28-е сутки культивирования. Автор отмечает преимущества роста суспензионной культуры, полученной из плода и почки, по сравнению с таковой из корня.

Глава 4 «Цитотоксическая активность экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L.» посвящена культивированию клеточных линий фибробластов и опухолевых линий *HeLa* (рак шейки матки человека) и *K562* (миелогенная лейкемия человека), получению экстрактов органов растений и клеточных культур, а также собственно изучению цитотоксичности всех объектов исследования. Показана высокая эффективность резазурин-теста для оценки жизнеспособности клеток при проверке цитотоксической активности. Для каждой группы объектов (экстракты из органов, каллусных клеточных культур и суспензионных клеточных культур) дифференцированно оценено цитотоксическое действие.

В главе 5 «Физико-химический анализ экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L.» рассматриваются результаты анализа экстрактов методом тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии с масс-спектрометрией, ультраэффективной жидкостной хроматографии различных групп объектов (экстракты из органов, каллусных клеточных культур и суспензионных клеточных культур). В результате методом ТСХ о всех вариантах экстрактов на пластинках были детектированы зоны адсорбции, соответствующие по положению и окраске стандарту (подофиллотоксин), при этом наибольшей интенсивностью окраски характеризовались зоны на уровне стандарта у экстрактов на основе ацетона, хлороформа и этилацетата, при сравнении клеточных культур – у экстрактов культур из плода. Методом ГХ-МС в экстрактах 14- и 28-суточных суспензионных клеточных культур на основе метилового спирта идентифицированы азотсодержащие соединения и алкалоиды, эфиры жирных кислот, стероиды, углеводы, гликозиды, углеводороды, кетоны. Методом УЭЖХ в ацетоновых экстрактах органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L. были идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой, кофейной и галловой кислот, подофиллотоксина и флавоноидов. Все обнаруженные группы соединений способны, согласно данным научной литературы,

проявлять противоопухолевую активность, что наряду с другими характеристиками позволило автору сделать вывод о перспективе использования клеточных культур, полученных из корня, в качестве потенциального источника сырья с противоопухолевой активностью.

3. Степень обоснованности научных положений и выводов, их достоверность и новизна.

Автором впервые описаны новые типы сырья с противоопухолевой активностью – суспензионные культуры *Podophyllum peltatum* коллекции ВИЛАР. Впервые обоснован выбор резазурин-теста для оценки цитотоксической активности экстрактов *P. peltatum*. Обосновано использование 80 %-ного ацетона для извлечения комплекса фенольных соединений из суспензионной культуры *P. peltatum* с последующим подтверждением цитотоксического эффекта именно ацетоновых экстрактов. Впервые в экстрактах органов растения и культур *P. peltatum* были идентифицированы производные эллаговой, галловой и кофейной кислот, 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* в зависимости от срока культивирования. Работа имеет как теоретическое, так и практическое значение. 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.

4. Подтверждение опубликованных основных результатов в научной печати и соответствия содержания автореферата основным положениям диссертационной работы.

Результаты исследований прошли апробацию на международных и всероссийских конференциях и симпозиумах, достаточно полно отражены в рецензируемых научных изданиях (5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из них две, индексируемые в БД Scopus, из которых одна также индексирована в БД Web of Science).

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Выводы аргументированы и в целом объективно отражают полученные экспериментальные данные. Текст автореферата отражает основные

результаты и выводы диссертационной работы.

5. Замечания по содержанию, стилю изложения материала диссертационной работы и ее оформлению.

По работе имеются следующие замечания и вопросы:

1. Автор приводит все данные в формате среднее плюс-минус стандартное отклонение, но в главе 2 автор указывает, что использовал непараметрический критерий Манна-Уитни, однако в работе значение данного критерия нигде не приведено.

2. В списке сокращений и условных обозначений приводятся аббревиатуры, которые встречаются в тексте всего один раз (B5, LSC, mPMS, PES, QSAR-models, SASP, ВПЧ, ГЖХ), в связи с чем было бы достаточно просто расшифровки в тексте.

3. На с. 16 автор пишет «Высшая разовая доза подофиллина составляет 0,1 г, высшая суточная доза – 0,3 г». Хотелось бы уточнить: данная доза рассчитана на человека или на килограмм?

4. В работе присутствуют неудачные выражения и предложения: «Из-за их гидрофильности и отрицательного заряда они непроницаемы для клеток» (с. 41, по-видимому, клетки были непроницаемы для указанных веществ), «земля» (с. 46, корректнее писать «почва»), «качалка» (с. 47, корректнее писать «ротационный шейкер»).

5. В таблице 2.1 автор указывает, что питательные среды для поверхностного и глубинного культивирования отличаются по содержанию хлорида кальция на 33 %. С чем это связано? В той же таблице микроэлементы следовало бы указать, как и макроэлементы, в мг/л, а не в мл/л. По классической прописи питательной среды Мурасиге и Скуга в состав витаминов входят также глицин, пиридоксин и мезоинозит. Почему автор не добавлял эти компоненты?

6. В разделе 3.1 автор пишет про использование 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Однако в главе 2 упоминания об использовании этого вещества не было. Какова была концентрация 2,4-Д?

7. Если учесть «правило трех сигм», то таблица 3.2 должна выглядеть иначе: в частности, для с.к.к. из плода для 0-5, 5-10, 10-15 суток различия имеются только на уровне значимости 0,05, для 15-20, 35-40, 40-45 – НЗР, для с.к.к. из почки для 10-15 – 0,05, для 15-20 и 25-30 – НЗР, для с.к.к. из корня для 0-5, 10-15, 25-30 – НЗР.

8. В тексте отсутствует ссылка на таблицу 3.3.

9. На рис. 3.1 было бы целесообразно отметить фазы роста римскими или арабскими цифрами, тем более что в тексте они обозначены цифрами.

10. В основных выводах по главе 3 или в тексте самой главы 3 не хватает обсуждения: другие исследователи получали аналогичные

результаты или нет?

11. На с. 75 есть абзац «Криоконсервация клеточных культур», однако по сути это не описание методики криоконсервации, к тому же в работе криоконсервация никак не упоминается.

12. В основных выводах по главе 4 автор пишет: «На основе сравнения данных, полученных методом микроскопии, и результатов оптической плотности растворов, оцененных методом спектрофотометрии, для определения цитотоксической активности экстрактов из двух методов оценки жизнеспособности клеток (МТТ- и резазурин-тесты) был выбран резазурин-тест как метод, в котором эти две группы данных оказываются сходными», однако в тексте работы нет сравнения указанных двух методов. При этом в главе 2 есть описание обоих методов.

13. В разделе 5.1 «Анализ экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L. методом тонкослойной хроматографии» не хватает фотографий самих хроматограмм.

14. В «Рекомендациях...» автор пишет, что предложил способы усовершенствования клеточных культур «посредством изменения состава питательной среды: добавление фенольных соединений, которые являются предшественниками в шикиматном пути биосинтеза фенольных соединения и алкалоидов, обладающих цитотоксической активностью, идентифицированных в растительном и биотехнологическом сырье *P. peltatum* L.», однако такие эксперименты не описаны ни в главе 2, ни далее в тексте работы.

Однако сделанные замечания не снижают научную и практическую значимость проделанной диссертантом работы.

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).

6. Общее заключение о диссертационной работе.

Представленная диссертационная работа Китаевой Марии Петровны «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью» является законченной научно-квалификационной работой, которая отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа выполнена автором самостоятельно на высоком методическом и научном уровне. Полученные диссертантом результаты представляют научный

интерес, достоверны, выводы и заключение обоснованы. Материал в диссертационной работе изложен структурировано и логично. Работа аккуратно оформлена, приведен качественный иллюстративный материал. Основное содержание диссертации отражено в автореферате.

Диссертационная работа Китаевой Марии Петровны «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью» по своей актуальности, научной новизне, а также теоретической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г № 842 (в редакции от 26.09.2022), а ее автор Китаева Мария Петровна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Кандидат биологических наук
по специальности 03.00.23 –
Биотехнология, доцент, доцент,
и.о. заведующего кафедрой
биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-
МСХА имени К.А. Тимирязева

Чередниченко Михаил Юрьевич

« 11 » сентября 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева). Почтовый адрес: 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. Телефон: +7(499)976-04-80, 976-04-28; E-mail: info@rgau-msha.ru, сайт: <https://www.timacad.ru/>

Подпись
заверяю

губернатор службы кадровой
политики и приема персонала

