

ОТЗЫВ

**Официального оппонента Татарского Виктора Вячеславовича
На диссертационную работу Цветиковой Софьи Андреевны «Исследование
биологических свойств бактериального экзополисахарида
колановой кислоты», представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия**

Актуальность исследования. Диссертация Софьи Андреевны Цветиковой посвящена исследованию механизма действия колановой кислоты (КК) и ее производства и очистки. КК является бактериальным полисахаридом, с потенциальными геропротективными и митотопротективными свойствами, которые тем не менее слабо охарактеризованы в организмах млекопитающих. Безопасность применения, противоопухолевые и другие свойства КК также мало описаны. Таким образом диссертация С.А. Цветиковой является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 103 страницах и построена по традиционному принципу, включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 25 рисунков и 17 таблиц. Список литературы включает 142 источников, включая самые современные публикации.

Характеристика диссертации.

В разделе «Обзор литературы» автор вначале описывает свойства бактериальных полисахаридов и механизм их влияния на иммунную систему. Затем автор переходит к влиянию полисахаридов на митохондрии, и их антиоксидантные свойства. В следующей части описываются противоопухолевые свойства бактериальных полисахаридов. В следующем разделе разбираются статьи про саму КК, ее структуру, регуляцию ее синтеза в бактериях и роль в формировании биопленок. В последней части литературного обзора рассматривается влияние КК на многоклеточные организмы. Обзор хорошо и грамотно написан и время легко для чтения. Также облегчают понимание материала иллюстрации. Некоторым недостатком является краткость этого раздела, которая, обусловлена небольшим количеством литературы про КК.

В разделе «Материалы и методы» диссертант подробно описывает использованные в работе методы: культивирование бактериальных и эукариотических клеток, получение, очистка и характеристика КК, оценка цитотоксичности КК, ее влияние на морфологию клеток, проточная цитофлуорометрия, анализ субхронической токсичности на мышах, оценку физической активности, электронная микроскопия и другие методы. Приведенные протоколы очень подробны и позволяют воспроизвести полученные результаты. Данный раздел показывает высокий технический уровень диссертации, и владение диссертанта передовыми методами биохимии.

Затем автор представляет результаты своего исследования. Вначале автора сравнивает пять протоколов наработки и выделения КК. Оптимизация протокола с трихлоруксусной кислотой позволила получить чистую КК со снижением количества примесей, прежде всего ДНК и белков, что позволяет снизить иммуногенность полученного препарата. Полученные образцы анализировались методом ГХ-МС, что также подтвердило, высокую степень чистоты препарата КК, полученного в оптимизированном протоколе.

В следующей части работы автор оценивал влияние КК на жизнеспособность эукариотических клеток. В клетках не опухолевого происхождения (человеческие фибробласты, мышинные миобласты, и почечные эпителиоциты африканской зеленой мартышки) КК не оказала существенной цитотоксичности во всем диапазоне концентраций, и показала небольшой цитостатический эффект на двух опухолевых линиях (который тем не менее не превышал 15%). По утверждению авторов КК увеличивала признаки дифференцировки миобластов C2C12 по морфологическим параметрам, однако, для точного установления такого эффекта необходимо показать увеличение маркеров этого процесса. Автор показывает небольшое увеличение количества погибающих клеток C2C12 при культивировании в присутствии высоких концентраций КК (до 11%). Затем автор показывает увеличение количества активных форм кислорода, но только в средней концентрации КК, в то время как высокая концентрация показывает сниженное количество АФК. При этом также увеличивалось количество или активность митохондрий (оценено по окраске на митохондриальный потенциал).

Затем диссертант оценивает влияние КК на модели мышей CD1. Показано что КК является малотоксичным, однако в высоких дозировках и при длительном введении имеет влияние на появление зон аллопеции. Мыши проявляли повышенную физическую активность, имели повышенный аппетит и потребление воды. В высоких дозах КК оказывала влияние на вес животных, кроме дозы 0.5 мг/г, где масса тела была увеличена.

При вскрытии животных отмечалось увеличение массы сердца в высоких дозах препарата, увеличение массы печени в высоких дозах препарата, и снижение массы почек. Природа этих изменений пока не описана, и требует дальнейших исследований. Особенно интересным было увеличение силы животных в соответствующем тесте, но снижение индекса восстановления. При анализе ультраструктуры митохондрий отмечено увеличение слияния митохондрий и увеличение митофагии.

В конце автор делает конкретные выводы, которые являются логичными и обоснованными и вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Ключевые итоги исследования изложены в разделах «Заключение» и «Выводы».

К работе имеется ряд вопросов и замечаний:

- 1) Характеристика дифференцировки миобластов C2C12 значительно усилилась измерением маркеров такой дифференцировки. Интересным вопросом для дальнейшего изучения является можно ли КК увеличить эффективность в уже описанных протоколах такой дифференцировки.
- 2) На рисунках 14 и 15, необходимо добавить сведения об окраске и шкалу.
- 3) На рисунке 16, в панелях Б и Г, наблюдается двугорбое распределение при окраске иодидом пропидия и при окраске на размер/гранулярность, которая исчезает в высоких дозах КК. Есть ли предположения о природе такой популяции?
- 4) В исследовании на АФК было бы целесообразно показать отрицательные и положительные контроли (без окраски, в присутствии перекиси, и в присутствии антиоксиданта), т.к. высокий процент клеток окрашенных на АФК в контроле может быть артефактом измерения или окраски.
- 5) Предполагает ли автор что увеличение окраски на митохондриальный потенциал связано с увеличением количества митохондрий или их активности? В дальнейшем

