



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук»
(ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

РОССИЯСА НАУКА ДА ВЪЛЫС ВЕЛӖДЧАН
МИНИСТЕРСТВО

«Россияса наукаяс академиялӧн
Урал юкӧнса Коми наука шӧрин»
туялан удж нуӧдысь федеральной шӧрин
Федеральной канму
сьӧмкуд наука учреждение
(ТФШ РНА УрЮ Коми НШ)



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, д.б.н..

чл.-корр. РАН

С.В. Дёгтева

«06» декабря 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра "Коми научный центр Уральского
отделения Российской академии наук"

на диссертационную работу

Цветиковой Софьи Андреевны

«Исследование биологических свойств бактериального экзополисахарида
колановой кислоты», представленную на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Цветиковой Софьи Андреевны посвящена исследованию влияния колановой кислоты на основные параметры жизнеспособности, структурные показатели, уровень активных форм кислорода и функцию митохондрий в клетках млекопитающих *in vitro*, и субхроническую токсичность и физическую активность мышей. Существуют исследования, выполненные на беспозвоночных, свидетельствующие о том, что данный полисахарид является перспективной субстанцией в качестве потенциального геропротектора. Учитывая очевидную необходимость поиска новых геропротекторов, а также слабую изученность колановой кислоты с точки зрения достаточной безопасности, от которой зависит целесообразность дальнейших исследований, представленная работа имеет высокую актуальность.

Научная новизна

В рамках работы оптимизирован протокол выделения колановой кислоты с этапом очистки от белков из штамма-сверхпродуцента

гидроксibuтирата. В результате оптимизации получен увеличенный выход субстанции высокой степени чистоты. Впервые проведен комплексный анализ цитотоксичности колановой кислоты на различных клеточных линиях и выполнена оценка субхронической токсичности на мышах. Исследование показало, что колановая кислота обладает низкой антипролиферативной активностью по отношению к опухолевым клеткам (HCT-116, IMR-32), в то время как жизнеспособность неопухолевых линий клеток не изменяется. Также было выявлено влияние колановой кислоты на форму клеток и расположение митохондрий. Кроме того, впервые показано, что колановая кислота влияет на дифференцировку миоцитов в линии C2C12. Впервые осуществлена оценка безопасности перорального применения колановой кислоты на животных и описано её влияние на физическую активность мышей в плавательном тесте.

Теоретическая и практическая значимость

В исследовании Софьи Андреевны Цветиковой впервые комплексно оценены биологические эффекты колановой кислоты как *in vitro*, так и *in vivo*, знание которых необходимо для дальнейшего изучения потенциала данной субстанции в биомедицине. Относительно низкая токсичность субстанции высокой степени очистки, в совокупности с данными о биологической активности, известными из других исследований, свидетельствует о наличии такого потенциала. Разработанный протокол для культивирования, выделения и очистки колановой кислоты, очевидно, будет использован в дальнейших исследованиях данной субстанции сотрудниками медицинских научно-исследовательских институтов. Дальнейшие исследования в этой области приблизят ученых к разработке медицинских препаратов и пищевых добавок.

В случае, если колановая кислота станет основой для биодобавок или фармакологических препаратов, данные, полученные в представленной работе, могут быть использованы в учебном процессе высших учебных медицинских и фармацевтических заведений.

Степень достоверности результатов

Достоверность представленных в работе данных в целом не вызывает сомнений, так как для каждого эксперимента были использованы достаточные размеры выборок и применены адекватные и максимально простые методы статистики. Часть параметров проанализированы на нескольких клеточных линиях. Однако, есть вопросы, связанные со статистическим анализом данных МТТ-теста (указано в замечаниях ниже).

Основные результаты работы прошли апробацию в виде обсуждения на четырёх международных и двух всероссийских конференциях. Кроме того, по результатам, представленным в данном исследовании, опубликовано 10 работ, в том числе четыре статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов

диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и цитируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Общая характеристика работы

Работа Софьи Андреевны Цветиковой является комплексной, и затрагивает как биотехнологическую составляющую получения из бактерий-продуцентов субстанции высокой чистоты, так и обширное тестирование биологической активности колановой кислоты. При этом тестирование осуществлялось как в моделях *in vitro* (с использованием 5 различных клеточных линий), так и *in vivo* на мышах.

Во всех ключевых публикациях Софья Андреевна является первым автором, что подтверждает личный вклад автора в представленную диссертационную работу.

По структуре рукопись содержит:

1. «Введение», отражающее актуальность исследования, чётко сформулированные цели и задачи, научную новизну, научно-практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, достоверность научных результатов, апробацию работы, число публикаций по результатам исследования, описание структуры и объёма рукописи и благодарности.
2. Главу 1 «Обзор литературы», в которой даны актуальные представления о влиянии полисахаридов оболочки бактериальных клеток на эукариотические клетки, основы синтеза колановой кислоты и её роль в физиологии бактерий, а также современные представления о биологической активности колановой кислоты по отношению к многоклеточным организмам.
3. Главу 2 «Материалы и методы», описывающую экспериментальный дизайн, процедуры и статистическую обработку данных с детализацией, достаточной для воспроизведения экспериментов.
4. Главу 3 «Результаты», содержащую основные результаты исследований и их обсуждение, а именно: оптимизацию протоколов выделения колановой кислоты, эффективность продукции и качество продукта; исследование *in vitro* токсичности колановой кислоты на различных клеточных линиях, влияние на структуру миоцитов, предположительно связанную с дифференцировкой, уровень клеточной гибели, дисфункцию митохондрий и уровень окислительного стресса; влияние колановой кислоты *in vivo* на массу животных, массу органов, физическую выносливость (плавательный тест) и ультраструктуру кардиомиоцитов. Внутри раздела приводится обсуждение полученных результатов. По каждому подразделу сформулировано заключение.

Работа также содержит оглавление, список сокращений, заключение, выводы и список литературы.

К работе имеются следующие вопросы и замечания:

1. Одной из поставленных задач является оценка влияния колановой кислоты на процессы, сопровождающие дифференцировку клеток линии миоцитов мыши. При этом, ни во введении, ни в обзоре литературы не указываются возможные причины влияния данной субстанции на дифференцировку. Более того, полученные результаты, косвенно свидетельствующие в пользу миогенной дифференцировки, почти никак не обсуждаются с точки зрения возможных механизмов наблюдаемого эффекта. Это необходимо учесть при написании результатов дальнейших исследований.
2. В обзоре литературы, в разделе 1.1.2 говорится о том, что бактериальные полисахариды с высоким содержанием фруктозы чаще выступают в роли антиоксидантов, тогда как бактериальные полисахариды с низким содержанием фруктозы – чаще наоборот. К сожалению, автор не приводит никаких гипотез или объяснений причин данных различий.
3. Формулировка третьего положения, выносимого на защиту, на наш взгляд не вполне точна. Совсем не исключено, что метаболическая активность митохондрий изменяется в связи со стимуляцией миогенной дифференцировки в результате действия исследуемого вещества, однако вопрос об «ассоциированности» этих явлений, на наш взгляд, является дискуссионным и напрямую в работе данная связь не продемонстрирована. Отметим, однако, что в выводе 4 формулировки даны более аккуратные «...что может отражать...» и «...характерное для...».
4. В описании результатов МТТ-теста отсутствует указание на оценку статистической достоверности снижения жизнеспособности клеток при воздействии колановой кислоты в концентрации свыше 64 мкг/мл. Однофакторный дисперсионный анализ с каким-либо апостериорным тестом был бы применим в данном случае.
5. В главе «Материалы и методы» почти отсутствует описание статистической обработки данных. При изложении конкретных результатов эта информация есть, но некое обобщение в соответствующих разделах Главы 2 было бы не лишним.
6. По какому принципу были выбраны концентрации 50 и 200 мкг/мл в исследованиях, выполненных с помощью микроскопии и проточной цитофлуориметрии (3.2.2., 3.2.3 и 3.2.4.)?
7. Описание процедуры перорального введения колановой кислоты мышам с питьевой водой оставляет некоторые вопросы: в какой концентрации субстанция содержалась в питьевой воде и какой объём

воды выпивали животные? Как этот объём контролировался и учитывалась ли разница в объёме выпитой воды в расчётах количества колановой кислоты, введённой мышам (в разделе 2.3.1.)?

8. На каком основании был выбран диапазон доз колановой кислоты (0.1-1 мг/г) для исследований на животных? Если исследования данной субстанции при пероральном введении ранее не проводились, то почему, например, не был выбран более широкий шаг между дозами?
9. На наш взгляд данные об относительной массе органов из таблиц 11, 12 и 13 можно было бы отобразить в виде второго ряда столбцов (с дополнительной правой осью у), либо в виде второй диаграммы на рисунках 20, 21 и 22. Это позволило бы избежать частичного дублирования данных в указанных таблицах и рисунках. Аналогичным образом можно было бы избежать включения в текст диссертации таблицы 9.
10. Не ясно, по какому принципу было выбрано пороговое значение флуоресценции при оценке уровня АФК в клетках с помощью DCFDA (рисунок 17 Б, Г, Е), почему не было использовано среднее значение флуоресценции всех зарегистрированных событий? Не может ли снижение доли клеток с высокой флуоресценцией после воздействия колановой кислоты в дозе 200 мкг/мл (рисунок 17 Е) быть связано с повышением доли погибших клеток, зарегистрированным при той же концентрации (рисунок 16 Е)?
11. Почему при выборе полигонов для детекции событий на основе данных рассеяния проходящего света (рисунок 16 А, В, Д; 17 А, В, Д; 18 А) была выбрана зависимость FSC-H от FSC-A, тогда как обычно используется SSC-A от FSC-A, позволяющее учитывать боковое рассеяние лазера?
12. По тексту встречаются неточности в формулировках, например:
 - a. В подразделе «Научная новизна»: «Установлено, что КК влияет на дифференцировку клеточной линии миоцитов мышцы в клеточной линии C2C12».
 - b. Во введении: «Хотя полисахарид впервые был описан в 1963 году [11], он долгое время считался одним из структурных компонентов бактериальных биопленок и капсул, но в 2017 году были описаны его свойства в модели нематод и дрозофил [12].» Внутри предложения явно пропущена связующая информация.
 - c. В разделе 1.1.3: «Хотя антипролиферативная активность КК ранее не оценивалась, данных о ее цитотоксичности в литературе также не представлено. Однако описано [12], что КК может сокращать формирование герминогенных опухолей и увеличивать продолжительность жизни нематод линии *C. elegans* glp-1(ar202).» Не в полной мере согласованные по структуре и смыслу предложения.

Заключение

В целом, работа представляет собой логически целостное комплексное исследование. Биотехнологическая часть работы, очевидная актуальность исследования, комплексность, наличие экспериментов на модели *in vivo*, широкий спектр использованных методов – всё это сильные стороны работы, которые, несмотря на указанные выше замечания, позволяют не сомневаться в том, что работа соответствует требованиям, предъявленным к кандидатским диссертациям по действующему «Положению о порядке присуждения учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 № 1690; 26.01.2023 №101), а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Диссертационная работа и данный отзыв были обсуждены на заседании Отдела радиоэкологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (протокол № 4 от 5 декабря 2024 г.). Отзыв был утверждён единогласным голосованием 16 сотрудников категории «научный персонал», присутствовавшими на заседании.

Отзыв составили:

в.н.с. отдела радиоэкологии
ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО
РАН, д.б.н.

Ермакова Ольга Владимировна

н.с. отдела радиоэкологии
ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО
РАН, к.м.н.

Черных Алексей Анатольевич

Подпись О.В. Ермаковой и А.А. Черных «ЗАВЕРЯЮ»

Главный ученый секретарь
ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
к.и.н.



Милохин Дмитрий Владимирович

6 декабря 2024 г.

Организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН). Сайт: <http://www.komisc.ru>.
E-mail: info@frc.komisc.ru. Тел.: (8212) 24-10-26, факс: (8212) 24-22-64. Почтовый адрес: Коммунистическая ул., д. 24, Сыктывкар, ГСП-2, Республика Коми, 167982