

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Югай Юлии Анатольевны
«Использование клеточных культур растений для получения биологически активных наночастиц металлов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Актуальность темы диссертации и научная новизна полученных результатов

Исследование всевозможных наночастиц претерпевает бурное развитие. Благодаря своим уникальным оптическим, каталитическим, электрическим и биологическим свойствам они обладают большим потенциалом применения в различных отраслях промышленности. Вместе с тем, существующие способы получения наночастиц не всегда отличаются простотой реализации, отсутствием токсичных побочных продуктов и высоким выходом основных продуктов реакции. Поэтому, диссертационная работа Югай Юлии Анатольевны, посвященная исследованию возможности использования растительных клеточных культур для получения наночастиц серебра и золота, а также изучению их свойств и возможности применения в медицине и биотехнологии, несомненно, является **актуальной задачей**.

Результаты данного исследования имеют несомненную **научную новизну**. Югай Ю. А. определила восстановительный потенциал ранее неизученных клеточных культур лекарственных и модельных растений. Автором впервые показано, что для изменения восстановительного потенциала клеток растений могут быть успешно использованы методы генетической инженерии. В совокупности полученные данные вносят существенный вклад в разработку биотехнологического метода получения металлических наночастиц и исследование их физико-химических свойств и биологической активности.

Структура и объем работы. Диссертационная работа содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение» «Материалы и методы», «Заключение» «Выводы» и «Список литературы». Диссертация изложена на 140 страницах, содержит 19 таблиц

и 44 рисунка, список литературы включает 404 источника.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность работы и формулирует задачи исследования. Обзор литературы посвящен оценке использования различных методов получения наночастиц, методам их анализа и применения. В целом, обзор литературы дает полную и исчерпывающую информацию по теме исследований, подчёркивает актуальность и новизну темы диссертационной работы. В разделе «Обсуждение результатов» автор последовательно излагает проведенные исследования: исследование восстановительной способности экстрактов клеточных культур растений, изучение влияния некоторых условий реакции восстановления серебра и золота на выход наночастиц, их форму, размер и дзета-потенциал. Полученные результаты наглядно представлены в таблицах и отображены на рисунках. В разделах «Материалы и методы» описаны экспериментальные подробности проведенных работ. В разделе «Выводы» автор суммирует главные результаты, полученные в ходе работы.

В целом, можно заключить, что проведенное исследование выполнено на высоком уровне с использованием современных биотехнологических, химических, биохимических и физико-химических методов. Полученные результаты существенно расширяют представление о способах получения металлических наночастиц с использованием экстрактов культур клеток растений, а полученные наночастицы являются перспективной основой для создания терапевтических агентов. Представленные выводы конкретны, аргументированы и отражают полученные экспериментальные данные.

Замечания и вопросы:

1. На рис. 5 показана восстановительная способность экстрактов клеток культур различных растений. Автор не указывает каким образом были приготовлены экстракты, проводился ли расчет восстанавливающей способности на сухой вес или для расчетов был использован сырой вес? Известно, что при измерении оптической плотности растворов линейная зависимость сохраняется не на всем участке чувствительности

спектрофотометра. Приведенные на рисунке 5 данные свидетельствуют, что максимальные значения измеренной оптической плотности приближаются к предельным значениям. Следовало бы привести экспериментальные доказательства, что все полученные значения оптической плотности были измерены на линейных участках.

2. Авторы указывают, что применяемые методы получения наночастиц часто не отвечают требованиям эффективности, рентабельности и безопасности. Однако, например, использование глюкозы в качестве восстанавливающего агента, является вполне безопасным, эффективным и менее затратным, чем применение культур клеток растений. Хотелось бы получить дополнительные пояснения авторов почему они не использовали в качестве положительного контроля глюкозу или аналогичные безопасные и дешевые вещества, обычно применяемые в качестве восстановителей.

3. В разделе 3.2 Авторами приведены результаты экспериментов по определению оптимальных условий реакции восстановления (электромагнитное излучение разной частоты). Известно, что температура оказывает существенное влияние на ход химических реакций, однако, авторами не было изучено влияние этого параметра на ход реакции. Кроме того, в разделе «Материалы и методы» отсутствует раздел, описывающий эту часть экспериментов из чего невозможно заключить при какой температуре эти эксперименты проводились и контролировался ли этот параметр.

4. Автор указывает, что кипячение экстракта увеличивало его восстанавливающую способность, однако не приводит объяснение этому эффекту. Хотелось бы узнать соображения автора на этот счет.

5. В разделе 3.4. автор описывает восстанавливающую способность отдельных компонентов каллусной культуры воробейника. На рисунке 16 приведено относительное содержание различных компонентов. Суммарное их содержание составило всего 1,75%. Что из себя представляет 98,25% веществ остается неизвестным. В разделе «Материалы и методы» указано,

что для определения содержания каждого из компонентов проводили выделение суммарных фракций веществ из экстракта. В процессе выделения неизбежны потери целевых веществ. Например, автор использовала осаждение полисахаридов 70% этанолом. Однако, полисахариды с молекулярной массой 3-5 кДа не осаждаются этой концентрацией этанола. Проводилась ли оценка сколько таких полисахаридов содержится в экстракте и какой вклад они вносят в образование наночастиц. Очевидно, в экстрактах растительных клеток в большом количестве содержатся низкомолекулярные сахара, которые, несомненно, обладают большим восстановительным потенциалом. Хотелось бы, чтобы автор объяснил, почему не проводилась оценка содержания низкомолекулярных сахаров, тем более что метод для определения их содержания такой же, как и для определения содержания полисахаридов.

6. Автор указывает, что индивидуальные полисахариды воробейника не изучены, поэтому в качестве модельных полисахаридов были выбраны полисахариды водорослей. Полисахариды высших растений хорошо изучены. Основную массу полисахаридов растений составляют целлюлоза и полисахариды пектиновой природы, крахмал. Выбранные же автором полисахариды водорослей - фукоиданы, ламинараны и альгиновые кислоты, в наземных растениях не обнаружены. Необходимо, чтобы автор дал дополнительное пояснение, чем был обусловлен такой выбор.

7. При изучении восстанавливающей способности полисахаридов водорослей не учитывалась их молекулярная масса. Таким образом, в приготовленных растворах содержалось разное количество молекул, следовательно сравнивать полученные данные не вполне корректно. Авторам следовало указать молярные концентрации веществ, а не процентные.

К досадным недочетам следует отнести и большое количество опечаток и неудачных выражений.

Автореферат и опубликованные статьи полностью отражают

содержание диссертации. По теме диссертации автором опубликованы 4 статьи в высокорейтинговых рецензируемых журналах, включенных в Перечень ВАК РФ, а также несколько материалов конференций.

Заключение

Диссертационная работа «Использование клеточных культур растений для получения биологически активных наночастиц металлов» является законченным научным трудом, решающим ряд задач биотехнологии, важных для изучения и получения наноматериалов биологическим способом. Работа полностью соответствует требованиям, установленным пунктами 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции), а ее автор Югай Юлия Анатольевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 — Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:
доктор биологических наук по специальности
03.01.04 – Биохимия, доцент,
ведущий научный сотрудник
лаборатории химии ферментов
ФГБУН Тихоокеанский институт
биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

1. 02. 2022

Адрес: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159
Телефон: (423)23 10705
e-mail: mik@piboc.dvo.ru

«Подпись сотрудника удостоверяю»
Ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН
кандидат биологических наук
В.В. Куриленко

Кусайкин Михаил Игоревич



Сведения об оппоненте

по диссертационной работе **Югай Юлии Анатольевны**
на тему **«Использование клеточных культур растений для получения биологически активных наночастиц металлов»**,
представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности
1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Фамилия Имя Отчество оппонента	Кусайкин Михаил Игоревич
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	1.5.4 – Биохимия, старый шифр – 03.01.04
Ученая степень и отрасль науки	Доктор биологических наук, Биохимия и молекулярная биология
Ученое звание	доцент
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук
Занимаемая должность	Ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов
Почтовый индекс, адрес	690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159
Телефон	(423)231-14-30
Адрес электронной почты	mik@piboc.dvo.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>1. Rasin A.B., Shevchenko N.M., Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Likhatskaya G.N., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. // Relationship between the structure of a highly regular fucoidan from <i>Fucus evanescens</i> and its ability to form nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules. 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.180</p> <p>2. Usoltseva R.V., Belik A.A., Ermakova S.P. // Laminarans and 1,3-beta-D-glucanases. International Journal of Biological Macromolecules. 2020. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.034</p> <p>3. Rasin A.B., Silchenko A.S., Ermakova S.P. // Enzymatic transformation and anti-tumor activity of <i>Sargassum horneri</i> fucoidan. Carbohydrate Polymers.</p>

2020. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2020.116635
4. Belik A., Silchenko A., Ermakova S. // Two new alginate lyases of PL7 and PL6 families from polysaccharide degrading bacterium *Formosa algae* KMM 3553(T): structure, properties, and products Analysis. *Marine Drugs*. 2020.
DOI: 10.3390/MD18020130
5. Silchenko A.S., Rasin A.B., Ermakova S.P. // Fucoidan sulfatases from marine bacterium *Wenyuingzhuangia fucanilytica* CZ1127(T). *Biomolecules*. 2018. DOI: 10.3390/BIOM8040098
6. Silchenko A.S., Rasin A.B., Ermakova S.P. // Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. *Carbohydrate Polymers*. 2018. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2018.03.094
7. Belik A.A., Silchenko A.S., Ermakova S.P. // Alginate lyases: substrates, structure, properties, and prospects of application. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018.
DOI: 10.1134/S1068162018040040
8. Rasin A., Silchenko A., Kalinovskiy A. // Application of enzyme treatment and NMR spectroscopy for the research of *Sargassum horneri* fucoidan. *FEBS Open Bio*. 2018.
9. Silchenko A.S., Rasin A.B., Ermakova S.P. // Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*. *Carbohydrate Polymers*. 2017.
DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2017.08.043
10. Usol'tseva R.V., Zhao P., Kusaikin M.I., Jia A., Yuan W., Zhang M., Ermakova S.P. // Structural characteristics and antitumor activity of fucoidans from the brown alga *Sargassum muticum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2017.
DOI: 10.1007/S10600-017-1956-9
11. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Zvyagintseva T.N. // Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae*. *Glycobiology*. 2017.
DOI: 10.1093/GLYCOB/CWW138
12. Kusaykin M.I., Belik A.A., Zvyagintseva T. N. // A new recombinant endo-1,3-beta-D-glucanase from the marine bacterium *Formosa algae* KMM 3553:

	enzyme characteristics and transglycosylation products analysis. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017. DOI: 10.1007/S11274-017-2213-X 13. Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zvyagintseva T.N. // Fucoidanases. Glycobiology. 2016. DOI: 10.1093/GLYCOB/CWV072
--	--

Заместитель директора,
д.б.н., доцент



М.И. Кусайкин

«3» 12 2021 г.

