

ОТЗЫВ официального оппонента

о диссертации Генералова Евгения Александровича «Биохимические основы биомедицинского применения полисахаридов из клубненосных растений» на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Взаимодействие полисахаридов с иммунной системой известно давно и привлекает пристальное внимание уже более сотни лет. Например, адьювантные свойства полисахаридов были известны еще в середине прошлого века. Однако лишь в последние 50 лет были обнаружены рецепторы и биохимические механизмы, приводящие к передаче сигнала от рецепторов полисахаридов на активируемые гены. Было обнаружено, что полисахариды могут вызывать не только активацию клеток иммунной системы, но и влиять на пролиферацию других клеток, причем, в зависимости от условий, как стимулируя, так и подавляя деление. Таким образом, учитывая огромный неослабевающий интерес к использованию полисахаридов в качестве лекарств или целебных пищевых добавок в различных областях медицины, можно сказать, что тема рецензируемой работы является в высшей степени актуальной.

В работе впервые выделены и охарактеризованы два полисахарида из клубней картофеля и топинамбура. Показано, что они имеют природу гетеро- β -гликанов и содержат анионные группы. При этом полисахарид из топинамбура, называемый в работе HTLP (*Helianthus tuberosum* L. Polysaccharide), не имеет белковой части, содержит 1 $\rightarrow$ 4 и 1 $\rightarrow$ 3 гликозидные связи, состоит из ряда моносахаридов с преобладанием глюкозы и характеризуется молекулярной массой 1-2 МДа. В отличие от HTLP, гликан картофеля (*Solanum tuberosum* L. Polysaccharide- STP) имеет белковую часть, мигрирует в условиях ДСН-электрофореза как белок с молекулярной массой 70 кДа, содержит 1 $\rightarrow$ 4 гликозидные связи, состоит из ряда моносахаридов с преобладанием галактозы. Многогранные исследования биологических

свойств полученных полисахаридов показало их способность взаимодействовать с иммунной системой млекопитающих и человека. В работе продемонстрирована возможность использования HTLP для лечения онкологических заболеваний, включая метастазирующую форму карциносаркомы Уокера, а STP – может применяться для лечения язвы желудка при системном введении. Оба препарата действуют через активацию клеток иммунной системы. Таким образом новизна рецензируемой работы не вызывает никаких сомнений.

Работа Генералова Е.А. построена традиционным образом. Первая глава диссертационной работы представляет собой обзор литературы. Эта часть работы написана чрезвычайно широко и претендует на исчерпывающую классификацию рецепторов. Причем вопросы структуры углеводов затрагиваются относительно вскользь, а их биологические эффекты и типы рецепторов на полисахариды (лектинов) рассматриваются очень подробно. В работе приведена классификация рецепторов, их биологическая роль, специфичность и пути передачи сигнала. Данная информация используется автором для интерпретации собственных результатов, касающихся возможных рецепторов, на которые оказывают влияние изучаемые в работе полисахариды HTLP и STP.

Вторая глава диссертации дает представление о методах, использованных в работе. Следует отметить чрезвычайно широкий круг использованных экспериментальных подходов и физических методов. Так, для определения структуры полисахаридов используется жидкостная ВЭЖХ и газожидкостная хроматография, для изучения белковой части STP – аминокислотный анализ. Для очистки полисахаридов используется традиционная последовательность операций, включающая анионообменную хроматографию, гельпроникающую хроматографию и ВЭЖХ. Таким образом, от основной массы крахмала авторы отделяются уже на первой стадии, отбирая только полианионные макромолекулы.

Полученные препараты охарактеризованы УФ- и ИК-спектрами, спектрами комбинационного рассеяния, усиленного на поверхностных плазмонах. Все эти методы убедительно доказали полисахаридную природу HTLP и STP, причем в спектре STP были заметны колебания, отвечающие пептидным группам белковой компоненты полисахарида. Спектры кругового дихроизма продемонстрировали складчатую конформацию STP и смесь спиралеподобной и складчатой конформаций для HTLP. Анализ размеров лиофилизированных макромолекул HTLP и STP показал глобулярные структуры размера около 200 и 50 нм, соответственно. Такие большие размеры с трудом могут быть отнесены к единичным макромолекулам и, по всей видимости, являются результатом агрегации.

В работе также был использован полный комплекс методов клеточной иммунологии: метод Эрне определения количества антителообразующих клеток в селезенке, несколько моделей оценки противовирусной, противоопухолевой и противоязвенной активностей, а также метод оценки влияния препарата на метастазирование карциномы Уокера. В работе также был использован метод оценки активности НК-лимфоцитов, стимулированных HTLP. Кроме того, были использованы методы оценки противолучевой активности по отношению к рентгеновскому облучению и пучкам протонов. Наконец, был использован комплекс подходов оценки биобезопасности, включающий как токсические тесты, так и тесты на анафилактогенность, аллергенность, эмбриотоксичность, мутагенность и тератогенность. Подробнейшее описание перечисленных методов позволяет воспроизвести данные подходы в любой квалифицированной лаборатории.

В третьей главе диссертационной работы рассматриваются результаты исследования как структуры, так и биологической активности исследуемых полисахаридов. Автору удалось показать, что оба полисахарида существенно подавляют воспаление, вызванное подкожной инъекцией каррагинана, однако их действие на отек, вызванный инъекцией формалина или скипидара в воздушный карман (на модели карманной гранулёмы), сильно отличалось. На

основании этих результатов автору удалось установить, что HTLP обладает неспецифической противовоспалительной активностью, а STP отличается более избирательным действием и практически не влияет на воспаление, вызванное формалином. Молекулярные причины, определяющие противовоспалительное действие полисахаридов топинамбура и картофеля пока не исследованы, однако можно сказать, что работа Е.А. Генералова показывает важность изучения этих эффектов и может привести к разработке нового поколения противовоспалительных препаратов.

Препарат из картофеля STP, проявлявший выраженную адьювантную активность в тесте Ерне, был также исследован в качестве противовирусного препарата на модели сирийских хомяков, зараженных вирусом SARS-CoV-2. STP продемонстрировал существенную противовирусную активность, выражающуюся в снижении токсического эффекта вируса, снижения уровня провоспалительных цитокинов IL-1 β и γ -IFN и повышения противовоспалительного IL-4. Снижалось вызываемое вирусом снижение веса зараженных животных. При этом прямого влияния на репродукцию вируса в культуре клеток не наблюдалось, то есть основные эффекты были вызваны иммунным ответом, усиленным STP.

Сходный эффект оказывает STP и на развитие язвы желудка. В этом случае также благотворное воздействие на заживление язвы оказывает понижение уровня провоспалительных цитокинов IL-1 β и γ -IFN и повышения концентрации противовоспалительного IL-4. Помимо этого эффекта, на модели Селле язвы желудка была продемонстрирована способность STP подавлять окислительный стресс.

Многообещающие результаты были получены в работе при исследовании влияния HTLP на развитие опухолей карциномы Льюиса и карциносаркомы Уокера. Оказалось, что HTLP в значительной степени снижал скорость роста опухолей и уменьшал скорость их метастазирования. Изучение механизма этого эффекта показало, что наибольший вклад в этот эффект вносит

активация цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и повышение продукции IL-4.

В целом работа Генералова Е.А производит чрезвычайно приятное впечатление, хотя и не свободна от некоторых недостатков.

- 1) Хотя выделенные в работе соединения STP и HTLP, скорее всего, являются, индивидуальными соединениями, в работе приведены доказательства лишь для STP, для которого продемонстрированы данные диск-электрофореза с единственной полосой, отвечающей молекулярной массе около 70 кДа. Насчет HTLP утверждается, что анализ препарата методом гельпроникающей хроматографии давал единственный унимодальный пик, не приведенный в работе. Для доказательства индивидуальности данного пика можно было бы воспользоваться приемом, применяемым в области синтетических полимеров: рассчитать моменты распределения для хроматограммы очищенного препарата. Если среднечисловая и средневесовая молекулярные массы оказались бы близки, можно было бы однозначно утверждать, что HTLP является индивидуальным соединением.
- 2) При прочтении работы возникает вопрос, что натолкнуло автора на исследования иммуномодулирующей активности выделенных полисахаридов? Я не нашел данных, обладают ли какими-то иммуномодулирующими свойствами нефракционированные водные экстракты коркового слоя клубней картофеля или топинамбура. Например, известно, что спиртовой экстракт листьев топинамбура содержит органорастворимое низкомолекулярное иммуномодулирующее вещество – гелиангин. Что натолкнуло автора на необходимость фракционирования водного экстракта клубней, использованная в работе? С чем связан выбор именно коркового слоя клубней с и без ростков картофеля и топинамбура? Что натолкнуло автора на исследование именно клубней?
- 3) Что натолкнуло автора на использованную в работе методику очистки? В работе отсутствует обзор методов очистки углеводных эффекторов

иммунной системы. Хотелось бы узнать, какое место занимает методика очистки полисахаридов, использованная в работе, в ряду опубликованных методик выделения других полисахаридных эффекторов иммунной системы?

4) Несмотря на полноту и актуальность обзора литературы, на мой взгляд, он недостаточно подробен с точки зрения механизмов влияния полисахаридов на различные биохимические системы. Вследствие этого обзор читается тяжело и мало помогает в интерпретации результатов автора. На мой взгляд, автору следовало бы большее внимание уделить сравнению методик выделения и очистки различных полисахаридных иммуномодуляторов/адъювантов.

5) Работа не свободна от некоторых стилистических неточностей, что неудивительно, учитывая ее большой объем.

Тем не менее, отмеченные недостатки носят скорее характер рекомендаций и не умаляют значимость диссертационного исследования Генералова Евгения Александровича. Диссертация Е.А. Генералова является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема установления биохимических механизмов биологической активности и физико-химических характеристик полисахаридных комплексов, полученных из клубненосных растений, с целью их биомедицинского применения. Вклад проведенных исследований и разработок в отечественный биомедицинский комплекс, подтвержденный промышленным выпуском биологически активных добавок и лекарственного средства, обеспечивает значительное развитие страны.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в

Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Генералов Евгений Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич



27.10.2025.

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-31-27, e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, дом 1, стр. 3

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений

Подпись сотрудника химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Н.С. Мелик-Нубарова удостоверяю: _____

Дата 27.10.2025

