

Отзыв официального оппонента,

доктора химических наук, профессора **Усова Анатолия Ивановича** на диссертацию **Иванчиной Натальи Владимировны** «Полярные стероиды морских звезд: структура, биологическая активность и биосинтез», представленную на соискание **ученой степени доктора химических наук** по специальности **1.4.9 – биоорганическая химия**.

Морские беспозвоночные представляют собой богатый источник органических соединений, которые не встречаются в наземных животных. Примером служат полярные стероиды, широко представленные в морских звездах, представителях класса Asteroidea типа иглокожих (Echinodermata). Эти уникальные метаболиты в течение многих лет изучаются в Тихоокеанском институте биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН, и работа Н.В. Иванчиной является весомым вкладом в это научное направление. Полярные стероиды морских звезд родственны широко известным и практически важным стероидным биорегуляторам наземных организмов, но отличаются от них рядом структурных особенностей. Их высокая полярность объясняется наличием большого количества гидроксильных групп и таких заместителей, как сульфаты, моносахаридные остатки или углеводные цепи. Обилие морских стероидов дает новые представления о структурном разнообразии этих соединений, а получаемая структурная информация важна для понимания путей их биосинтеза и для установления корреляций между их химическим строением и биологической активностью. Поскольку некоторые виды морских звезд доступны в больших количествах, отдельные представители полярных стероидов можно получать из природного сырья для последующего применения в качестве потенциальных компонентов новых медицинских препаратов. Учитывая эти соображения, диссертационную работу Н.В. Иванчиной, посвященную выделению полярных стероидов из 18 видов морских звезд, установлению химического строения, изучению биосинтеза и биологической активности выделенных соединений, следует признать весьма актуальной.

Диссертация занимает 394 страницы и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы, насчитывающего 404 названия. Во введении изложены представления автора об актуальности темы исследования, сформулированы цели и задачи, новизна полученных результатов, а также теоретическая и практическая значимость работы, и перечислены положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор посвящен изложению имеющихся данных по структурам и свойствам стероидов морских звезд. Описаны полигидроксистероиды, их гликозиды и

более сложные астеросапонины, имеющие уникальные агликоны и заместители в виде олигосахаридных цепей. Приведены также литературные данные о структурах других групп полярных стероидов морских звезд, таких как стероидные фосфаты, сульфаты и циклические гликозиды. Отдельные разделы обзора посвящены биологической активности полярных стероидов, а также их биосинтезу и возможным функциям в организме морских звезд. Литературный обзор имеет непосредственное отношение к теме диссертации, подтверждает необходимость более глубокого изучения этого класса морских метаболитов и позволяет высоко оценить весомость вклада автора работы в соответствующий раздел биоорганической химии.

В начале главы «Обсуждение результатов» помещен сравнительно небольшой параграф, содержащий описание общей стратегии выделения и структурного анализа полярных стероидов, которая была использована в работе. Далее на многих страницах подробно излагаются результаты установления строения стероидных метаболитов, выделенных из каждого из исследованных видов морских звезд. Дальнейшие разделы этой главы содержат описание исследования биологической активности полярных стероидов морских звезд и биосинтеза этих соединений. В главе «Экспериментальная часть» перечислены использованные приборы и материалы, даны сведения о морских звездах и приведены технические характеристики проведенных экспериментов. Диссертация заканчивается выводами, в которых автор с исчерпывающей полнотой формулирует все важнейшие достижения проведенной работы.

Диссертационная работа содержит колоссальный объем новых данных о структуре и свойствах морских полярных стероидов и заслуживает самой высокой оценки. Вот ее главные достоинства:

1. Широкий охват биологических объектов. В работе использованы морские звезды, обитающие не только в морях Дальнего Востока, но также в тропиках, Арктике и Антарктике. Были изучены как близкородственные виды, так и виды, далекие в таксономическом отношении.
2. Решена сложнейшая проблема разделения смесей близких по свойствам полярных стероидов. Индивидуальные метаболиты, необходимые для проведения структурного анализа и изучения биологических свойств, были выделены в препаративных количествах с помощью хроматографии на разнообразных колонках, а их чистота подтверждалась с помощью тонкослойной хроматографии.
3. В качестве наиболее эффективного метода установления строения полярных стероидов применена спектроскопия ядерного магнитного резонанса. Необходимо отметить, что для уверенной интерпретации спектров ЯМР необходимо, наряду с

собственными данными, учитывать колоссальный объем информации по спектрам родственных соединений, уже имеющийся в литературе. Подробная интерпретация сигналов в спектрах исследованных соединений приведена в многочисленных таблицах, содержащихся в диссертации, и эти данные являются важнейшим вкладом в структурный анализ полярных стероидов.

4. В необходимых случаях спектральные данные о строении веществ подтверждены результатами химических анализов.
5. Особенно важно подчеркнуть внимание автора к решению стереохимических проблем структурного анализа. В работе с помощью различных подходов были определены конфигурации асимметрических атомов углерода в полизамещенных стероидах и абсолютные конфигурации моносахаридов в гликозидах и астеросапонинах.
6. В итоге автором были выделены 196 индивидуальных представителей полярных стероидов, из которых 90 оказались не известными прежде метаболитами, содержащими новые структурные элементы в стероидной части молекул или же новые углеводные заместители. Остальные представители были уже описаны ранее, но чтобы убедиться в этом, их строение тоже пришлось устанавливать!
7. Исходя из структур большого набора полярных стероидных соединений, были высказаны предположения о последовательных превращениях этих метаболитов в процессе их биосинтеза. При экспериментальном изучении биосинтеза было впервые установлено, что получаемые с пищей холестерин или его сульфат служат в организме звезды биогенетическими предшественниками полярных стероидов. Тем самым показано, что разнообразие состава этих метаболитов у разных звезд может быть связано с различными типами их питания.
8. Для ряда полярных стероидов были проведены исследования биологической активности. Наиболее интересными с практической точки зрения представляются найденные противоопухолевые, иммуномодулирующие и нейритогенные и нейропротекторные свойства, зависящие, как и следовало ожидать, от структурных особенностей этих соединений. Изучение биологической активности полярных стероидов, несомненно, следует продолжать, поскольку в этом классе соединений с большой вероятностью можно найти соединения, перспективные для практического использования.
9. Необходимо особенно подчеркнуть превосходные литературные качества диссертации. Работа написана прекрасным литературным языком и читается с

неослабевающим интересом. Текст практически свободен от опечаток и неудачных выражений.

10. Материалы диссертационной работы опубликованы в представительных отечественных и высокорейтинговых международных журналах, неоднократно докладывались на престижных научных конференциях и получили высокую оценку научной общественности. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

К работе можно сделать несколько замечаний.

1. На стр. 8, где сформулированы цель и задачи работы, отдельно упоминаются гликозиды полигидроксистероидов и астеросапонины, однако в работе не сформулированы четкие критерии, позволяющие отнести вещество к астеросапонинам. В задачах 5 и 6 число объектов сокращено до трех, но нет пояснения, почему для углубленного изучения выбраны именно эти три вида. Важно было подчеркнуть, что, в отличие от арктических, тропических и антарктических видов, доступных эпизодически, эти местные звезды доступны практически в течение всего года.
2. Хотелось бы видеть более подробное описание особенностей сырья. Если морские звезды собраны в экспедиционных условиях и немедленно запускаются в обработку, какими критериями нужно пользоваться для отнесения разных особей к одному виду и как определяют этот вид? Напротив, если предполагается заготовка сырья для последующей обработки в лаборатории, то как нужно фиксировать и хранить материал? Какие изменения в составе стероидных метаболитов могут происходить при хранении? Насколько зависит состав этих метаболитов от района и от сезона заготовки для данного вида?
3. В работе в подавляющем числе случаев для экстракции веществ использовались целые звезды, однако морские звезды имеют сложное анатомическое строение, причем сравнительно нетрудно получить отдельно гонады, гепатопанкреас и стенки тела. Сравнение состава этих трех фракций сырья могло бы пролить свет на вопросы о том, какие именно стероидные метаболиты важны для процессов гаметогенеза и эмбриогенеза, какие - для процессов усвоения пищи, а какие выполняют защитные функции.
4. Для установления строения использовались наиболее мощные современные варианты спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии, однако совершенно ясно, что применение этих методов к смесям веществ неэффективно, так что необходимо выделять индивидуальные соединения. Казалось бы, что для этой цели в первую

очередь нужно было использовать ионообменную хроматографию, которая позволила бы сразу отделить нейтральные метаболиты от сульфатированных, а сульфатированные разделить на фракции в соответствии с количеством сульфатных групп. Однако такая хроматография не применялась, это случайность или же существуют какие-то особенные свойства стероидных метаболитов, препятствующие их разделению этим методом?

5. Несколько не очень удачных выражений связаны с особенностями углеводной номенклатуры. Метоксилированные стероиды – это может быть, но метоксилированная ксилоза – это на самом деле метилированная ксилоза. «Двухцепочечные» гликозиды по большей части вообще лишены углеводных цепочек и содержат единичные моносахаридные остатки, присоединенные к разным положениям стероидных агликонов. «Конфигурация гликозидной связи» – очень многие так говорят и пишут, но нужно отдавать себе отчет, что конфигурация – это характеристика не связи, а хирального центра, в данном случае речь идет о конфигурации гликозидного углеродного атома. Большие КССВ для Н-1, вообще говоря, соответствуют не β -конфигурации гликозидов, а транс-диаксиальному расположению Н-1 и Н-2, другими словами, доказывают противоположные конфигурации при С-1 и С-2, в то время как греческие буквы α или β обозначают совпадение (или несовпадение) конфигураций при С-1 и С-5 в гексозах (или С-1 и С-4 в пентозах). По счастью, большинство моносахаридов в составе веществ, описанных в работе, относятся к D-ряду и имеют D-конфигурацию при С-2, поэтому большие КССВ действительно подтверждают β -конфигурацию соответствующих гликозидов.
6. В работе пришлось решать много стереохимических проблем, в частности, определять абсолютные конфигурации моносахаридов. К сожалению, для этой цели был выбран не самый удобный метод – ГЖХ гликозидов, получаемых при взаимодействии моносахаридов с оптически активным вторичным октанолом по реакции Фишера. Этот спирт с трудом вступает в реакцию гликозилирования, так что вместо него предпочтительно использовать оптически активный вторичный бутанол. Однако главным недостатком реакции Фишера является возможное образование четырех гликозидов из каждого моносахарида. Этот подход, дающий достаточно надежные результаты для индивидуальных моносахаридов, трудно применять к смесям из-за значительного числа пиков на хроматограммах и перекрытия пиков, отвечающих производным разных моносахаридов. Рисунок 7, приведенный на стр. 82 диссертации, подтверждает, что смесь трех моносахаридов

дает двенадцать пиков на хроматограмме, но не поясняет, каким образом используются подобные картины для определения абсолютных конфигураций. Дополнительную сложность представляет такое определение для урановых кислот, которые при октаноллизе должны превращаться в октиловые эфиры гликозидов. Определение абсолютной конфигурации сахаров часто считают необязательной процедурой, исходя из того, что глюкоза, хиновоза, ксилоза в природных углеводах практически всегда относятся к D-ряду, и нет необходимости еще и еще раз подтверждать эту принадлежность. Однако в морских объектах очень часто встречаются как D-, так и L-галактоза, а фукоза, один из главных компонентов биогликанов иглокожих (голотурий и морских ежей), обычно имеет L-конфигурацию. Обнаружение D-фукозы в стероидных гликозидах морских звезд следовало бы подтвердить выделением и определением оптического вращения этого моносахарида.

7. На стр. 160 сказано, что альфа-гликозиды – это редкие природные соединения. Подобное утверждение содержится и в автореферате, однако с ним трудно согласиться. Вспомним, например, что одно из самых широко распространенных органических соединений, с которым каждый из нас сталкивается буквально каждый день (это сахароза), является альфа-гликозидом.
8. Структуры так называемых циклических гликозидов настолько необычны, что заслуживают более подробного обсуждения. В литературном обзоре (стр. 47) нужно было подчеркнуть, что химическая связь O-6 гексозного остатка и C-6 агликона в лузоникиозиде **A 183**, формально напоминающая простой эфир, резко отличается по устойчивости от обычных простых эфиров, которые, как хорошо известно, не расщепляются в условиях гидролиза гликозидов. Однако в **183** эта связь легко расщепляется при очень мягком воздействии, что приводит к образованию нециклической олигосахаридной цепи и группировке сопряженного диена в агликоне. Этот процесс в обсуждении результатов ошибочно назван гидролизом (стр. 221), хотя это не гидролиз, а элиминирование, и вода как реагент в процессе не участвует. Дальнейшая обработка модифицированного нециклического гликозида позволяет получить в свободном состоянии все три моносахарида. В найденных автором циклических гликозидах только лузоникиозид **E (326)** действительно содержит группировку простого эфира, так что при гидролизе этого вещества должны освободиться не три, а только два моносахарида. Интересно было бы проверить это обстоятельство экспериментально. Что касается путей биосинтеза циклических гликозидов, то

вполне вероятно, что циклы образуются либо за счет присоединения углеводного гидроксила НО-6 к диеновому предшественнику (по реакции, обратной расщеплению **183**), либо за счет присоединения этого гидроксила к карбонилу при С-6 агликона (который имеется, например, в **327**) с последующим восстановлением полукетала, тогда как предварительное восстановление карбонила, предположенное на стр. 231, должно скорее препятствовать циклизации.

9. В работе выделено и идентифицировано много представителей полигидроксистероидов, их сульфатов и гликозидов, но так называемый метаболомный подход продемонстрировал, что в действительности число этих соединений еще гораздо больше. Дополнительными компонентами этих метаболитов могут быть моносахариды, содержащие кето-группу или атом азота. Интересно, чем объясняется такое многообразие, казалось бы, времени эволюции иглокожих должно было хватить для того, чтобы отобрать из этого множества вещества, действительно необходимые для жизнедеятельности.
10. В работе предполагается, что сульфатирование – это заключительная стадия биосинтеза, прекращающая дальнейшие трансформации метаболитов. По-видимому, это не так, поскольку сульфат холестерина был успешно использован в качестве исходного соединения при изучении биосинтеза полигидроксистероидов. Скорее всего, сульфатирование необходимо для облегчения транспорта метаболитов из органов, где происходит их биосинтез, в ткани, где они должны выполнять свои функции.
11. Латинские названия морских звезд, после первого упоминания, используются в диссертации в сокращенном виде (родовое название сокращается до первой буквы). Было бы неплохо дополнить список сокращений, имеющийся на стр. 16-17, дополнительным списком, содержащим расшифровку сокращенных названий всех видов звезд, которые можно встретить в работе.

Сделанные замечания несколько не влияют на общую высокую оценку работы. Автором выполнено детальное исследование полярных стероидов морских звезд, причем в качестве источников этих сложнейших метаболитов использованы 18 видов морских звезд, выловленных в разных районах Мирового океана: в Арктике, Антарктике, тропических морях и морях Дальнего Востока. Разработаны способы разделения сложнейших смесей близкородственных соединений и подходы к установлению их химического строения, базирующиеся главным образом на данных спектроскопии ядерного магнитного резонанса и высокоэффективной масс-спектрометрии. Установлены структуры 90 новых соединений, многие из них содержат структурные элементы, которые

не встречались ранее в этих объектах. Получены интересные данные о зависимости состава полярных стероидов от таксономического положения морских звезд. Экспериментальное исследование биосинтеза и метаболомный подход к анализу смесей полярных стероидов позволил предложить схемы образования и химических трансформаций полярных стероидов. Новые данные о происхождении и структурном разнообразии полярных стероидов являются фундаментальным вкладом в биохимию морских звезд. Практически значимыми результатами работы представляются сведения о биологической активности полярных стероидов и ее зависимости от строения агликонов и углеводной части молекул. В целом можно заключить, что Н.В. Иванчина является прекрасно подготовленным и широко эрудированным разносторонним исследователем, уникальным специалистом в области морской биоорганической химии.

Диссертационная работа **Иванчиной Натальи Владимировны** по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне полученных результатов безусловно удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842 (с учетом всех редакций), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор **Иванчина Наталья Владимировна** заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности **1.4.9 – биоорганическая химия.**

Усов Анатолий Иванович



Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН

Почтовый адрес: Москва 119991, Ленинский проспект, 47, ИОХ РАН

Телефон: (499)137-67-91

Адрес электронной почты: usov@ioc.ac.ru

Наименование организации (полное/сокращенное): ФГБУН Институт органической химии имени Н.Д.Зелинского РАН (ИОХ РАН)

20 сентября 2024 г.

Подпись профессора Усова Анатолия Ивановича заверяю

Ученый секретарь ИОХ РАН,

к.х.н. Коршевец Ирина Константиновна

