

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)**

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук**

– обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный
центр биологических исследований Российской академии наук»
(ИБФМ РАН)

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Института биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г.К.
Скрябина РАН, ФГБУН Федеральный
исследовательский центр «Пушкинский
научный центр биологических исследований
РАН»

д.б.н., проф.

Вайнштейн М.Б.

23 августа 2021 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**на диссертацию Лещенко Елены Владиславовны «Строение и биологическая
активность вторичных метаболитов грибов, выделенных из морских растений и
грунтов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия**

Диссертационная работа Е.В. Лещенко посвящена выделению и установлению
структуры новых вторичных метаболитов грибов, выделенных из морских растений и
грунтов Японского, Охотского и Южно-Китайского морей, и исследованию их
биологической активности. Проблема поиска и разработки новых лекарственных
средств, проявляющих фармакологически важную биологическую активность, в том
числе, в области онкотерапии, несомненно, является актуальной задачей. Природные
соединения, полученные из микроорганизмов, обладают богатым антиканцерогенным
и химиотерапевтическим потенциалом. Новые противоопухолевые соединения,

полученные из грибов, могут быть эффективными для профилактики и лечения новообразований. Микроскопические грибы, выделенные из малоизученных местообитаний, хорошо известны как источники новых биологически активных соединений. По этой причине, вторичные метаболиты из морских грибов относятся к объектам пристального внимания со стороны исследователей, занимающихся поиском новых эффективных лекарственных препаратов. Поэтому выделение и установление химической структуры новых природных низкомолекулярных метаболитов, потенциальных биологически активных соединений, не теряет своей актуальности.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 162 страницах, содержит 23 таблицы и 42 рисунка. Список литературы содержит 178 наименований.

Первая глава посвящена введению, где автор обосновывает актуальность работы, которая не вызывает никаких сомнений, формулирует цель и связанные с ней задачи исследования, а также формулирует научную новизну и практическую значимость

Вторая глава “Литературный обзор” посвящена анализу зарубежной и отечественной литературы по теме диссертации, где приведен подробный анализ структуры и биологической активности метаболитов микроскопических грибов, ассоциированных с морскими травами и водорослями, а также наиболее интересных метаболитов грибов, выделенных из грунтов и мангровых растений. Анализируемые природные соединения были разделены на классы в соответствии с химической классификацией: терпеноиды, стероиды, поликетиды, меротерпеноиды, алкалоиды, пептиды, макролиды, жирные кислоты. Данная глава написана на основе доступного материала, опубликованного в период с 2010 по 2020 г.г.

В третьей главе “Обсуждение результатов” представлены данные проведенных исследований, которые позволяют оценить надежность и обоснованность сделанных на их основе выводов. Первый раздел посвящен скринингу. Автором было проанализировано 243 изолята грибов, выделенных из образцов грунта, а также из морских и мангровых растений дальневосточных морей России и Южно-Китайского моря. Анализ вторичных метаболитов в этилацетатных экстрактах грибов был проведен с помощью ТСХ и определения антимикробной активности в отношении грам-положительных и грам-отрицательных бактерий. В результате автором было отобрано 8 штаммов грибов, относящихся к родам *Penicillium* (5 шт.), *Talaromyces* (1

шт.), *Aspergillus* (1шт.) и *Trichoderma* (1 шт.). Следующие разделы посвящены установлению строения вторичных метаболитов каждого отдельного штамма грибов. У всех штаммов грибов рода *Penicillium* были обнаружены новые вторичные метаболиты.

У штамма *P. thomii* КММ 4674 автором было обнаружено 13 новых вторичных метаболитов, относящихся к поликетидам декалинового типа, которые были названы как паллидопениллин А и зостеропениллины А-Л. Штамм *P. thomii* КММ 4679 синтезировал одно новое соединение зостеропениллин М. Выделенные соединения являются первыми декалиновыми поликетидами с 1-гидрокси-3-оксопропильным заместителем при С-4, деметилированными по С-4. Паллидопениллин А и зостеропениллин А автором были получены в виде монокристаллов. Их молекулярная структура была исследована с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА). Абсолютные конфигурации стереоцентров зостеропениллинов А-Д установлены на основании анализа экспериментальных и расчетных спектров электронного кругового дихроизма (ЭКД). Для этого был выполнен конформационный анализ и рассчитаны КД спектры для возможных конформаций этих соединений. Предложена схема биосинтеза зостеропениллинов А-Л и паллидопениллина А.

У штамма *P. thomii* КММ 4667 автором было обнаружено пять новых сесквитерпенов эудесманового типа, которые были названы как томимарины А-Д. Абсолютные конфигурации в соединениях установлены с помощью сравнения экспериментальных и теоретических спектров ЭКД, рассчитанных на основе нестационарной теории функционала плотности. Штамм также синтезировал 5 известных соединений, среди которых сескитерпены гваянового типа и пренильный индольный алкалоид.

Из штамма *P. claviforme* КММ 4665 автором был выделен новый 3-(2'-гидроксибутил)-7-гидроксифталид. Структура была подтверждена с помощью РСА монокристалла. У штамма были также обнаружены известные соединения 3-бутил-7-гидроксифталид, изопатулин, *m*-гидроксибензиловый спирт и циклопенин.

Штамм *P. oxalicum* КММ 4683 синтезировал новый сесквитерпен кадинанового типа - 7-гидрокси-8-дегидроксиганодерманол А. У остальных трех изученных грибов было обнаружено 14 известных соединений, среди которых следует отметить нафто-γ-пироны, синтезируемые у *A. foetidus* КММ 4694. Автором была изучена противоопухолевая активность этих соединений.

Последний раздел главы посвящен изучению биологической активности выделенных соединений. Автором было показано, что зостеропениллины В, Н и J индуцировали умеренное снижение выработки оксида азота (NO) в макрофагах, обработанных липополисахаридом (ЛПС), в нецитотоксических концентрациях (10.0 мкМ). Зостеропениллин М был цитотоксичен в отношении клеток рака простаты 22Rv1 с ИК₅₀ 46.8 мкМ и снижал продукцию активных форм кислорода в этих клетках. Установлено, что зостеропениллины А-С, G, Н, J, К действовали на экспрессию белка p62, связанного с аутофагией в лекарственно-устойчивых клеток рака простаты РС3. Автором было высказано предположение, что зостеропениллины могут сенсibilизировать клетки рака простаты человека при использовании лекарственных препаратов с цитотоксической активностью. Было показано, что томимарины А, В, D, Е в концентрации 10 мкМ вызывает снижение уровня оксида азота (NO) в мышинных перитонеальных макрофагах, обработанных ЛПС по сравнению с контролем. Установлено, что нафто-γ-пироны ингибируют формирование колоний клеток рака простаты человека 22 Rv1. Фонсецинон А проявлял цитотоксическое действие в отношении клеток 22 Rv1 с ИК₅₀ 13.1 мкМ.

В четвертой главе “Экспериментальная часть” основательно рассмотрены объекты исследования и их условия выращивания. Подробно описана процедура выделения и очистки вторичных метаболитов, а также приведены основные характеристики выделенных соединений. Установление структуры проводилось с помощью современных физико-химических методов: масс-спектрометрии высокого разрешения, одно и двумерной спектроскопии ЯМР, спектроскопии КД, рентгеноструктурного анализа. Приведены методы исследования биологической активности и статистическая обработка данных.

Выводы соответствуют поставленным задачам исследования и проведенному анализу экспериментальных данных.

Хотя работа написана хорошим и ясным языком имеется несколько замечаний к оформлению диссертации. В тексте диссертации латинское название родов грибов, после первого упоминания следовало бы сократить далее по тексту до одной заглавной буквы с точкой. В экспериментальной части, так как состав среды и условия выращивания изолятов были одинаковы, то эту информацию лучше было бы объединить для всех штаммов, а не подробно расписывать для каждого штамма. Место выделения изолятов указать в виде таблицы в экспериментальной части и не повторять это далее по тексту. Кроме того, не указана ссылка или базисный набор

функций, использованные для расчета методом функционала плотности. Хотя для установления абсолютной конфигурации в ряде случаев был использован надежный метод с применением эфиров Мошера, стоит рекомендовать для этой цели более активно применять метод РСА с аномальным рассеянием рентгеновских лучей. В ряде случаев встречаются неудачные выражения: «...в спектре, снятом ... » (стр. 11, Автореферат), «...энергетически минимизированная модель...» (стр. 10, Автореферат). Также имеется несколько замечаний по представлению результатов по биологической активности соединений. Насколько нам известно, линия 22RV1 не является признанной моделью для лекарственной устойчивости рака простаты. Эти клетки экспрессируют андрогенный рецептор и являются андроген зависимыми. Хотя есть данные, что эта линия содержит субпопуляцию клеток со множественной лекарственной устойчивостью CD117⁺/ABCG2⁺ (Liu, T., Xu, F., Du, X. *et al.* Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem* **340**, 265–273 (2010); <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0426-5>). Автор выделял и работал именно с этой популяцией? В этом контексте гораздо более интересно влияние метаболитов на клетки PC3 которые являются андроген-независимыми и обладают гораздо большей устойчивостью, чем 22Rv1 к противоопухолевым препаратам. Следовало бы сделать вывод или комментарий, почему уровень оксида азота и активных форм кислорода так важен. Планируется ли дальнейшее изучение зостеропениллинов в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами? Отметим, что все эти замечания не носят принципиального характера и не снижают очевидных достоинств этого исследования.

Диссертационная работа Е.В. Лещенко представляет собой законченное исследование, имеющее теоретическую и практическую значимость. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ в рецензируемых российских и международных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России. Материалы работы представлены на международных конференциях. Текст автореферата и опубликованные работы полностью отражают основные положения и выводы представленной диссертации.

Диссертация по содержанию соответствует специальности “Биоорганическая химия”. Рецензируемая диссертационная работа «Строение и биологическая активность вторичных метаболитов грибов, выделенных из морских растений и грунтов» является законченным научным-квалификационным исследованием, по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне,

безусловно отвечает требованиям п. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней (постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, в редакции от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Лещенко Елена Владиславовна, достойна присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Доктор биологических наук, в.н.с.

и. о. зав. лабораторией вторичных метаболитов,

Козловский Анатолий Григорьевич

Кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник

Антипова Татьяна Валентиновна

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки, «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

142290, Московская область, г. Пущино, пр-кт Науки, 5

Тел.: +7(4967)733962, adm@ibpm.ru

Подписи д.б.н. Козловского А.Г. и к.б.н. Антиповой Т.В.

удостоверяю,

ученый секретарь, д.б.н.



Решетилова Татьяна Анатольевна