

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию **Попова Романа Сергеевича «Изучение гликозидов и родственных соединений из морских звезд и голотурий методами масс-спектрометрии»**, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Морские беспозвоночные, в частности, морские звезды и голотурии, являются источником разнообразных гликозидов и родственных им высокополярных соединений. Многие вещества этой группы вторичных метаболитов имеют уникальную химическую структуру и обладают физиологической активностью, проявляя противоопухолевые, противовирусные, противовоспалительные, анальгетические, гемолитические, иммуномодулирующие и другие свойства. Гликозиды морских звезд имеют стероидные агликоны, гликозиды голотурий являются тритерпеновыми производными; при этом структура многих «морских» гликозидов заметно отличается от аналогичных метаболитов наземного происхождения. Одним из важнейших методов определения структуры индивидуальных гликозидов и общего профиля этих соединений в природных объектах является хромато-масс-спектрометрия.

Актуальность темы диссертации обусловлена необходимостью совершенствования масс-спектрометрической техники в изучении гликозидов морских беспозвоночных для развития метаболомного подхода, включающего в себя полный анализ низкомолекулярных вторичных метаболитов современными методами масс-спектрометрии (МС) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Эти методы позволяют провести скрининг метаболома и определить влияние патологических процессов, стресса и изменений условий среды обитания на метаболом морского организма.

Поэтому постановка **цели настоящей работы**, как использование современных методов масс-спектрометрии для установления структурных особенностей ряда новых и ранее известных стероидных гликозидов морских звезд и тритерпеновых гликозидов голотурий, а также применение полученных данных для метаболомных исследований морских звезд, является правомерной и позволила внести фундаментальный вклад в современную биоорганическую химию.

Наиболее существенные научные результаты, отвечающие критериям новизны.

Из морской звезды *Aphelasterias japonica* выделен новый стероидный гликозид с 26-О-сульфатированной холестановой боковой цепью, афеластерозид Е, и установлена его полная структура. При помощи масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением

(ИЭР) определены особенности строения 18-ти новых стероидных соединений из нескольких видов морских звезд и тритерпеновых гликозидов из голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Показана возможность использования методов tandemной масс-спектрометрии для идентификации стереоизомеров некоторых полигидроксистероидных соединений морских звезд. В морских звездах *A. japonica* и *Patiria pectinifera* при помощи сочетания масс-спектрометрических методов исследован состав полярных стероидных соединений и предложена схема биосинтеза этих веществ. Определено влияние питания, травматического стресса и различных факторов окружающей среды на стероидный метаболит морской звезды *P. pectinifera*. При помощи методов ВЭЖХ-ИЭР МС и ВЭЖХ-ИЭР МС/МС была доказана передача тритерпеновых гликозидов по пищевой цепи от голотурии *E. fraudatrix* к морской звезде *P. pectinifera*, что указывает на возможность использования этих гликозидов в качестве новых маркеров при определении пищевых связей морских звезд.

Результаты, полученные Р.С. Поповым, имеют не только большую теоретическую значимость и расширяют фундаментальные знания о структурно-функциональных свойствах вторичных метаболитов морских беспозвоночных, но и интересны с **практической** точки зрения. Предложенные подходы масс-спектрометрического анализа могут эффективно использоваться для исследования метаболита морских звезд и голотурий, сравнения различных видов и популяций этих иглокожих, определения биологической роли и путей биосинтеза гликозидов. Эти результаты необходимы для выделения, изучения структуры и физиологической активности индивидуальных компонентов при создании новых фармакологических субстанций.

Диссертация написана по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, результатов и обсуждения, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Результаты работы полностью отражены в выводах. Соискателем выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, получена основная часть результатов, написаны статьи и сделаны доклады на конференциях. В положениях, выносимых на защиту, указаны только те результаты, в получении которых роль автора была определяющей. Работа изложена на 183 страницах, содержит 7 таблиц, 54 рисунка и 8 приложений. Список литературы включает 210 цитируемых работ.

Во Введении обоснована необходимость проведенных исследований, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, а также дана информация о публикациях и личном вкладе исследователя.

Литературный обзор отражает современное состояние проблемы, решаемой автором диссертации. В обзоре обобщены структурные особенности гликозидов и родственных соединений из морских звезд и голотурий, детально рассмотрены современные масс-спектрометрические методы, которые применяются для анализа гликозидов и родственных соединений из этих животных. Обобщена информация о фрагментации исследуемых соединений при масс-спектрометрическом анализе, представлены характерные примеры и указаны основные проблемы современной метаболомики морских организмов. Представленная литературная информация однозначно указывает на важность и необходимость настоящего исследования.

Глава «Обсуждение результатов» содержит обширный экспериментальный материал, который хорошо иллюстрирован структурными формулами, масс-спектрами, схемами фрагментации и хроматограммами, а также наглядными результатами статистической обработки биологических экспериментов. Соискателем выполнена большая и кропотливая работа, в которой гармонично сливаются химическая и биологическая часть. Автор демонстрирует прекрасное владение широким спектром современных подходов в области масс-спектрометрического анализа, которые использованы в комплексе с другими спектральными методами. На первой стадии исследования основное внимание уделено установлению химической структуры и закономерностей фрагментации индивидуальных соединений. При этом сделан ряд фундаментальных обобщений в трактовке масс-спектров гликозидов и родственных соединений. В частности, предложена схема биосинтеза полигидроксистероидных соединений и показано, что метод tandemной масс-спектрометрии может с успехом применяться в «нетрадиционной» для этого метода области – для идентификации стереоизомеров. Эти результаты вместе с полученными ранее структурными данными позволили перейти от исследования индивидуальных веществ на качественно новый уровень – к анализу полного профиля гликозидов и количественному определению метаболома этих соединений в изученных беспозвоночных. Не останавливаясь на достигнутом, автор наглядно демонстрирует, как изменяется стероидный метаболом морской звезды в зависимости от условий жизни этих животных. Мощная статистическая обработка результатов биологических экспериментов не оставляет сомнений в достоверности выводов и возможности применения предложенного масс-спектрометрического подхода. Прямое доказательство пищевого происхождения тритерпеновых гликозидов голотурии в стероидном метаболоме морской звезды прекрасно дополняет и придаёт логическую завершенность большой работе, выполненной автором.

В Экспериментальной части дано представление об объектах исследования, методических приемах и условиях проведения экспериментов. В работе использован

практически весь спектр классических и новейших методов исследования низкомолекулярных метаболитов, включая поляризационную спектрометрию, колоночную хроматографию низкого давления, тонкослойную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, ^1H - и ^{13}C -ЯМР, масс-спектрометрию низкого и высокого разрешения с различными способами ионизации, такими как электронный удар, электрораспыление, фотоионизация при атмосферном давлении, МАЛДИ, а также метод изотопного обмена активных протонов. Широко применена tandemная масс-спектрометрия. Для установления достоверных отличий при биологических экспериментах использовано несколько независимых статистических методов.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и полностью подтверждаются проведенными исследованиями.

Содержание диссертации достаточно полно отражено в 13-ти печатных работах, среди которых 10 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Результаты работы были апробированы на 3-х международных и российских научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Несмотря на несомненную научную значимость и ясный стиль изложения диссертационной работы, возникли следующие замечания и вопросы:

1. На титульном листе не указана принадлежность ФАНО России.
2. В «Оглавлении» неправильно указана нумерация разделов (2.3.4 и т.д.).
3. Неудачное название раздела 3 («Обсуждение результатов»), создаётся впечатление, что сами результаты представлены отдельно. Типичное название для этого раздела «результаты и обсуждение», также допускается два отдельных раздела: «результаты» и «обсуждение».
4. стр. 7. Список сокращений следует помещать перед появлением этих сокращений в тексте.
5. стр. 15. Название рода животного пишется курсивом.
6. В «Литературном обзоре» не выделены сведения о масс-спектрометрии высокого разрешения изучаемых соединений.
7. стр. 41. Почему питание – абиотический фактор?
8. стр. 52. Неудачная формулировка «Исследования полярных стероидных соединений из некоторых морских звезд и тритерпеновых гликозидов голотурий». Вероятно, «...из некоторых голотурий»?
9. стр. 58 и далее. Для данных масс-спектрометрии высокого разрешения, кроме экспериментального значения, в тексте следует указать расчетное значение молекулярной массы, как это сделано, например, в разделе 3.4.

10. стр. 57. Некоторые гликозиды из морской звезды *Acanthaster planci*: новые соединения или впервые найдены в новом источнике? Приводятся только данные масс-спектрометрии, но на структурных формулах указана стереохимия.
11. В обсуждении результатов упоминается ряд новых гликозидов из морских звёзд. В части диссертации, касающейся новизны исследования, сделан упор только на одно новое соединение.
12. стр. 74. Найденные закономерности фрагментации ионов полигидроксистероидов в зависимости от ориентации гидроксильной группы при C-15 предполагают определённую ориентацию остальных заместителей, одинаковую для соединений 38-42. Будут ли найденные закономерности по C-15 справедливы для других соединений с другой ориентацией заместителей при C-3, C-4, C-5 и т.д.?
13. стр. 138. Отсутствуют количественные данные о содержании кислорода в морской воде для эксперимента по влиянию недостатка кислорода на содержание гликозидов в морской звезде.

Заключение. Диссертационная работа Р.С. Попова «Изучение гликозидов и родственных соединений из морских звезд и голотурий методами масс-спектрометрии», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10, является законченной научно-исследовательской работой, отражающей результаты собственных исследований автора, и имеет важное научное и практическое значение. По совокупности признаков работа Попова Р.С. соответствует всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

08 сентября 2016 г.

Заместитель директора по научной работе,
доктор биологических наук



А.Б. Имбс

ФАНО России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии»
Дальневосточного отделения Российской академии наук
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17
Тел.: +7(423)2317339, e-mail: andrey_imbs@hotmail.com



подпись 
Заверяю: начальник ОДО
Буренина В.Л.