

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Дмитренка Павла Сергеевича «Применение масс-спектрометрии в исследованиях биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. - биоорганическая химия.

Структурное разнообразие морских метаболитов привлекает пристальное внимание специалистов во многих странах мира. В самом деле, каждый год ученые выделяют около 1000 новых морских природных соединений, нередко с неожиданными структурами и высокой физиологической активностью. Недавно на основе метаболитов морского происхождения была создана серия противоопухолевых лекарств нового поколения: в результате эктейнасцидин-743 (трабектедин, йонделис), брентуксимаб ведотин (адцетрис), эрибулин (халавен) появились в аптеках мира. Активные субстанции этих лекарств были выделены из морских беспозвоночных. Долгий путь к каждому из этих и других лекарственных субстанций морского происхождения начинался с поиска биологического источника для выделения активного компонента из сложных смесей природных соединений, где они нередко присутствовали в небольших количествах, выделения и их структурного анализа. Масс-спектрометрия как один из наиболее чувствительных и информативных методов идентификации и молекулярного анализа, сыграла во всех этих случаях важную роль.

Рецензируемое, поистине энциклопедического масштаба исследование разнообразных природных соединений обобщило многолетнюю работу П.С. Дмитренка, направленную на применение современных методов масс-спектрометрии в процессе поиска и установления структур ряда биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных, выделенных в основном из иглокожих и губок. При выполнении диссертационного исследования соискатель применил различные варианты масс-спектрометрии и хромато-масс-спектрометрии к установлению химического строения более чем 300 новых морских природных соединений. Он изучил особенности и закономерности масс-спектрометрической фрагментации для большого числа индивидуальных соединений и структурных серий метаболитов морских беспозвоночных, а затем и метаболомные профили в некоторых из них.

В связи с вышеизложенным, диссертационное исследование П.С. Дмитренка «Применение масс-спектрометрии в исследованиях биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных» нельзя не признать важным и актуальным направлением биоорганической химии.

Диссертационная работа написана на 50 стр, экспериментальные данные представлены в 5 таблицах, на 26 рисунках. Структурно автореферат докторской диссертации состоит из вводного раздела «Общая характеристика работы», и основной части, включающей введение и четыре главы: 1) Масс-спектрометрическое изучение биологически активных метаболитов морских

беспозвоночных; 2) Исследование метаболомных профилей морских звезд и голотурий; 3) Исследование распределения метаболитов в различных органах животных; и 4) Метаболомный анализ воздействия различных факторов на содержание полярных стероидных метаболитов морской звезды *Patiria pectinifera*. Завершают автореферат выводы и список основных публикаций по теме диссертации. Общая характеристика работы включает обоснование актуальности проблемы, цели и задачи работы, формулировки основных положений, выносимых на защиту, обоснование научной новизны и практической ценности работы, данные о публикациях (из 93 научных статей по теме работы, 60 основных работ перечислены в списке, приведенном в конце автореферата). В этом разделе даны также сведения об апробации диссертации и личном вкладе автора, благодарности и некоторые используемые сокращения и обозначения. Этот раздел работы дает представление об актуальной и достаточно сложной проблеме, на решение которой были направлены усилия соискателя. Необходимо было показать и использовать возможности, которые представляют разные варианты масс-спектрометрии, для установления строения нескольких сотен новых, преимущественно полярных метаболитов морских беспозвоночных. С другой стороны, в рецензируемой работе описано применение метаболомного подхода, заключающегося в сочетанном применении высокоэффективных разделительных методов и тандемной масс-спектрометрии. Были установлены метаболические профили сложных фракций некоторых биологически активных низкомолекулярных соединений морских беспозвоночных. Каждая из таких фракций состоит из многих десятков, а иногда и сотен родственных друг другу метаболитов. С помощью метаболомного подхода все эти соединения, в большинстве своем ранее неизвестные гликозиды, были охарактеризованы ионами, соответствующими молекулярным массам, типам агликонов и основными характеристиками их углеводных цепей (число моносахаридов, наличие дезоксисахаров и др.).

Основные результаты исследований индивидуальных природных соединений приведены в первой, самой большой главе диссертационной работы «Масс-спектрометрическое изучение биологически активных метаболитов морских беспозвоночных». В этой главе даются обобщенные сведения о масс-спектрометрическом анализе многочисленных индивидуальных метаболитов, выделенных из голотурий и морских звезд (тип Echinodermata), а также губок (тип Porifera).

В ранних работах, которые почти не обсуждаются в автореферате П.С. Дмитренко применял масс-спектроскопию (МС) с ионизацией бомбардировкой быстрыми ионами (ББИ МС), а его основные публикации включают анализ масс-спектров, полученных с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС) и матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ МС). Им были изучены масс-спектры с регистрацией как положительных, так и отрицательных ионов, а позднее МС высокого разрешения и тандемная МС. Были получены и проанализированы масс-спектры характерных для морских звезд стероидных гликозидов различных структурных групп и полигидроксированных стероидов, изучены масс-спектры тритерпеновых гликозидов голотурий, а из метаболитов губок – различных алкалоидов, полярных липидов, стероидных и тритерпеновых гликозидов и других групп морских природных

соединений.

Ограниченный объем отзыва не позволяет прокомментировать не только все работы соискателя с индивидуальными соединениями, но и особенности МС всех изученных структурных групп метаболитов. Поэтому ограничимся некоторыми примерами.

Более 20 полигидроксистероидов из морских звезд и их сульфатов были изучены МС в большинстве случаев с регистрацией отрицательных ионов. Эти стероидные метаболиты давали масс-спектры, позволяющие определить брутто-формулы изученных соединений, а использование МС/МС экспериментов позволило наблюдать фрагментацию с последовательными потерями молекул воды и характерными отрывами фрагментов боковой цепи, что сыграло большую роль в определении строения этих метаболитов. В ИЭР масс-спектрах сульфатированных стероидов наблюдали характеристичные пики при m/z 97 $[\text{HSO}_4]^-$ и 80 $[\text{SO}_3]^-$, указывающие на присутствие сульфатной группы, а в ББИ масс-спектрах - пики, указывающие на её потерю.

Анализ масс-спектров 46 новых гликозидов полигидроксистероидов из 9 видов морских звезд был особенно успешным в тех случаях, когда изучали сульфатированные гликозиды и применяли тандемную МС. Например, локализация заряда на конце боковой цепи в сульфатной группе афеластерозидов Е из *Aphelasterias japonica* облегчила структурный анализ и позволила по фрагментным ионам полностью последовательно «прочитать» структуру боковой цепи и однозначно определить локализацию и химическую природу моносахаридного остатка. Масс-спектры стероидных биозидов и триозидов позволили определить положение углеводных остатков в стероидном ядре, а в случае триозидов и их последовательность в одной из цепей.

Были получены и изучены масс-спектры более 30 астеросапонинов, включая 20 новых, выделенных из 7 видов морских звезд. Как известно, астеросапонины - это сульфатированные стероидные олигогликозиды с пятью или шестью моносахаридными остатками в углеводных цепях. Их изучение с помощью масс-спектрометрии дало обширную информацию о структурах углеводных цепей и стероидных агликонов этих довольно сложных соединений, а в сочетании с ЯМР данными позволило полностью установить строение каждого из них. Изучение фрагментации некоторых астеросапонинов при диссоциации, индуцированной столкновением, выявило характерные интенсивные фрагментные ионы, образующиеся при потере нейтрального фрагмента боковой цепи с массой 100 а.е. Это позволило надежно обнаруживать такую боковую цепь в астеросапонидах при последующих метаболомных исследованиях.

Методами МАЛДИ, ББИ и ИЭР МС соискателем были получены и изучены масс-спектры более 200 тритерпеновых олигогликозидов из 13 видов голотурий, включая 153

новых соединений. Было установлено, что они имеют молекулярные массы в диапазоне 1000 - 1600 а.е., могут содержать от одной до четырех сульфатных групп, присоединенных к углеводным цепям, и разные тритерпеновые агликоны, часто имеющие 18(20)-лактонные фрагменты. В режиме регистрации положительных ионов они детектируются $[M_{Na}+Na]^+$ ионными пиками. Моно- и дисульфатированные гликозиды обнаруживаются в режиме регистрации отрицательных ионов в виде ионных пиков $[M_{Na}-Na]^-$ и $[M_{2Na}-2Na]^{2-}$ соответственно, тогда как несульфатированные соединения выявляются в виде пиков иона $[M-H]^-$. Трисульфатированные соединения в условиях МС образуют ионы $[M_{3Na}-Na]^-$, $[M_{3Na}-2Na]^{2-}$ и $[M_{3Na}-3Na]^{3-}$. В tandemных масс-спектрах образование фрагментных ионов связано с разрывом гликозидных связей между углеводным фрагментом и агликоном между моносахаридными остатками. Полный анализ всех вариантов масс-спектров дает важную информацию, которая вместе с ЯМР данными позволила полностью установить их строение, включая конфигурации всех асимметрических центров.

Были получены и проанализированы масс-спектры более 100 вторичных метаболитов морских губок, включая 70 ранее неизвестных. Кроме участия МС в установлении строения большой серии стероидных и тритерпеновых гликозидов, были изучены и другие структурные группы метаболитов губок. Так, необычными природными соединениями губок, изученными с помощью масс-спектроскопии, были димерные биполярные липиды, с концевыми участками, подобными фрагментам некоторых редких сфинголипидов. Алкалоидолипиды, океанолины А и В из губки *Oceanapia* sp., на одном из концов молекул, которых имеется изохинолиновый фрагмент, а другой содержит характерные для сфинголипидов амино- и гидроксильную группы, были изучены с помощью МС в сочетании с химической деградацией - озонолизом. ИЭР МС высокого разрешения была использована не только для установления брутто-формулы этих соединений, но также для анализа продуктов их озонолиза, что стало ключевым моментом в определении положения функциональной группы в середине углеводородной цепи и установлении их полного строения.

Ключевую роль сыграла масс-спектрометрия и при установлении строения новых гликолипидов — мелонозидов из дальневосточной морской губки *Melononchora kobjakovae*. И в этом случае для решения структурных задач пришлось прибегнуть к использованию сочетанного применения озонолиза и масс-спектрометрического анализа полученных производных. Анализ был выполнен ИЭР МС/МС высокого разрешения в режимах регистрации отрицательных и положительных ионов.

Многочисленные новые гуанидиновые алкалоиды из губки *Monanchora pulchra* П.С. Дмитренко и соавторы анализировали с помощью МАЛДИ и ИЭР МС высокого

разрешения в режиме регистрации положительных ионов. Интересной особенностью их спектров была форма пиков метастабильных ионов при m/z 773, 745, 759, 745 и 759, которая почти не отличалась от пиков от нормальных ионов, хотя обычно пики метастабильных ионов являются уширенными. Наличие пиков метастабильных ионов, в этих соединениях подтверждали МАЛДИ МС/МС спектрами родительских ионов $[M+H]^+$, в которых наблюдались фрагментные пики $[M+H-101]^+$ при m/z 758, 730, 744, 730 и 744, соответственно, вместо пиков метастабильных ионов. Это показывает, что нужно быть осторожными при интерпретации МАЛДИ спектров для этой группы природных соединений.

Интересным примером применения масс-спектрометрии высокого разрешения является изучение новых стероидов из губок *Topsentia* sp. и *Halichondria vansoesti*. Все они имеют трисульфатированное стероидное ядро и отличаются строением боковых цепей. Большинство выделенных стероидов имеют в составе атомы галогенов, поэтому для подтверждения брутто-формул значения интенсивностей изотопных пиков кластера молекулярных ионов сравнивались с расчетными значениями, что позволило отличить друг от друга молекулы хлор-, йод- и бромтопсентиастерин сульфатов.

Первое алюминийсодержащее соединение морских беспозвоночных, алюмогуитаррин А из губки *Guitarra imbriata*, было также изучено (+)ИЭР масс-спектрометрией высокого разрешения. Его молекулярная формула была установлена как $C_{24}H_{15}AlN_6O_6$ исходя из значения пика иона $[M+H]^+$ с m/z 511.0945 (рассчит. для $[C_{24}H_{16}AlN_6O_6]^+$ 511.0941) и пика иона с m/z 533.0761 $[M+Na]^+$ (рассчит. для $[C_{24}H_{15}AlN_6O_6Na]^+$ 533.0761).

Переход в исследованиях П.С. Дмитренко от анализа спектров индивидуальных соединений к анализу метаболомов был достаточно логичным и продуктивным. Метаболомика – современная область исследований, основанная на изучении состава сумм метаболитов различных организмов, органов, тканей с широким применением МС. Во второй главе автореферата диссертации «Исследование метаболомных профилей морских звезд и голотурий» были обсуждены результаты изучения качественного и количественного состава сложных смесей метаболитов иглокожих и губок (т.н. метаболомное профилирование). До применения метаболомного подхода из изученных беспозвоночных удалось идентифицировать далеко не все соответствующие метаболиты. Стероидный метаболом дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica* был изучен методом ВЭЖХ-ИЭР МС/МС. В результате анализа методом в этом животном были идентифицированы 68 компонентов: 33 астеросапонина, 28 сульфатированных гликозидов полигидроксистероидов и 7 сульфатированных стероидных полиолов. При

изучении метаболома применялись не только масс-спектрометрические данные, но и установленные соискателем и его учениками закономерности, связывающие времена удерживания при ВЭЖХ с наличием тех или иных структурных фрагментов в идентифицированных стероидах. Часть обнаруженных метаболитов идентифицировали сравнением их времен удерживания и масс-спектров с таковыми для стандартных соединений, выделенных ранее из этой морской звезды.

Для изучения метаболомного профиля полярных стероидов дальневосточной морской звезды *Lethasterias fusca* была применена нанопоточная жидкостная хроматография в комбинации с тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (наноВЭЖХ-ИЭР МС/МС). С помощью этого более чувствительного метода удалось обнаружить и охарактеризовать масс-спектрометрическими данными и особенностями хроматографического поведения 106 астеросапонинов, 6 нативных агликонов астеросапонинов, 81 полигидроксистероидный гликозид и 14 полигидроксилированных стероидов (всего 207 стероидных метаболитов). Полученные данные показали, что метаболомные профили изученных морских звезд существенно различаются соотношениями сульфатированных и несulfатированных стероидов и производных холестанового, эргостанового и стигмастанового рядов.

Завершают эту главу автореферата результаты масс-спектрометрического изучения метаболома тритерпеновых гликозидов голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Из этого хорошо изученного беспозвоночного ранее были выделены около 30 индивидуальных гликозидов. Метаболомное изучение позволило однозначно детектировать 54 соединения, в том числе 26 сульфатированных, 18 несulfатированных и 10 дисульфатированных гликозидов. Структуры обнаруженных гликозидов были охарактеризованы (–)ИЭР МС/МС, а в и спектрах имелись серии фрагментных ионов, возникающих при разрыве как гликозидных связей, так и С-С связей в боковых цепях агликонов. Отрыв нейтрального фрагмента массой 60 Да ($C_2H_4O_2$) указывал на наличие ацетоксигруппы в агликоне, а потеря молекулой массы 104 Да ($C_2H_4O_2 + CO_2$) была характерна для гликозидов, содержащих ацетоксигруппу и 18(20)-лактонный цикл. Полученные данные о новых метаболитах, образующихся при биосинтезе этих сложных метаболитов, позволили высказать гипотезу об этапах построения углеводных цепей в этих гликозидах.

Большие возможности масс-спектрометрических исследований были продемонстрированы и в главе 3 автореферата «Исследование распределения метаболитов в различных органах животных». Эта работа позволила получить новую информацию о биологических функциях метаболитов иглокожих. Так, были изучены метаболомные профили различных компонентов тела морской звезды *Lethasterias fusca*, а именно: стенок

тела, гонад, желудка, пилорических выростов и целомической жидкости. Получение соответствующих фракций метаболитов контролировали с помощью ИЭР МС и ВЭЖХ-ИЭР МС на каждом этапе их выделения, а затем полученные фракции анализировали с помощью наноВЭЖХ-ИЭР МС. Установлено, что в стенках тела и особенно в желудке из полярных стероидов присутствуют в основном астеросапонины. С учетом уязвимости желудка для атак хищных рыб из-за его выворачивания наружу при питании (т.н. внешнее питание), можно предполагать, что астеросапонины выполняют защитную функцию от хищников в морских звездах. С другой стороны, основными метаболитами в пилорических выростах, которые можно считать отдаленными аналогами печени и поджелудочной железы позвоночных, были моно- и биозиды полигидроксистероидов, что хорошо согласуется с ранее предполагаемой пищеварительной ролью таких метаболитов. Вместе с тем некоторые группы стероидных метаболитов выполняют, по-видимому, иные функции и накапливаются в гонадах. Таким образом, метаболомные исследования позволяют оценивать биологические функции метаболитов морских беспозвоночных.

Этот вывод подтвердило и метаболомное изучение различных органов и частей тела голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Повышенное содержание голостановых (т.е. содержащих 18(20)-лактон в агликоне) гликозидов в стенках кожно-мышечного остова этих животных экспериментально подтверждает давно уже высказанную гипотезу о защитной функции таких веществ в голотуриях.

В завершающей главе автореферата «Метаболомный анализ воздействия различных факторов на содержание полярных стероидных метаболитов морской звезды *P. pectinifera*» с использованием ВЭЖХ-ИЭР МС показано, что наибольшие изменения в гликозидном метаболоме вызывают повреждения животных, повышение температуры морской воды и кормление. Под действием этих факторов содержание астеросапонинов снижалось, а содержание большинства полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов увеличивалось. Так, при кормлении животных концентрации пяти гликозидов полигидроксистероидов и двух сульфатированных полигидроксистероидов увеличились по сравнению с контрольной группой. Полученные данные указывают на то, что различные группы полярных стероидов играют разные биологические роли в адаптации морских беспозвоночных как к стрессовым воздействиям, так и к обилию пищи.

Диссертация написана хорошим литературным языком, а текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно. Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности 1.4.9. - биоорганическая химия.

Автореферат соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание учёной степени доктора химических наук и даёт полное представление о структуре, объеме и содержании диссертации. Материалы, полученные при выполнении данной диссертационной работы приведены в списке литературы и, отдельно, в автореферате, изложены в 60 статьях, большинство из которых опубликованы в престижных высокорейтинговых научных международных изданиях. Работа прошла серьёзную апробацию, её результаты неоднократно докладывались на различных престижных конференциях и конгрессах. Количество и качество публикаций отражает наивысочайший уровень проведенных исследований.

Определённым недостатком настоящей работы является преимущественное использование масс-спектрометрии для анализа метаболомов и установления структуры новых природных соединений. Вероятно, диссертант располагает также данными ЯМР и других физико-химических методов, но это не нашло заметного отражения в автореферате. Помимо этого, в автореферате содержатся небольшие небрежности и отдельные опечатки.

Высказанные замечания и выявленные недостатки не снижают общего положительного впечатления от автореферата не вызывают сомнений в достоверности полученных П.С. Дмитренко результатов и обоснованности его выводов.

Большое количество публикаций в высококласных научных журналах, гигантский объем выполненных экспериментов, умение делать выводы и обобщения, которые адекватны полученным данным, показывают, что работа Дмитренко Павла Сергеевича является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном уровне. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации; выводы обоснованы, подтверждены приведенными результатами исследования.

Результаты работы могут быть использованы в организациях, осуществляющих исследования в области биоорганической и органической химии. Ряд из них имеет практическую значимость для специалистов в области масс-спектрометрии и хроматографии.

В целом, эта работа по новизне, научной и практической значимости, объему и полученным результатам соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, так как в работе содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для развития биоорганической химии, а её автор, Дмитренко Павел Сергеевич, заслуживает

присуждения учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Оппонент, доктор химических наук (02.00.10),
Руководитель научного направления «Постгеномная биология» Федерального
исследовательского центра «Казанский научный центр» Российской Академии наук,
заведующий отделом Казанского института биохимии и биофизики –
обособленного структурного подразделения Федерального исследовательского центра
«Казанский научный центр» Российской Академии наук

академик РАН

Александр Николаевич Гречкин

«10» января 2023 г.

Контактные данные

Почтовый адрес: 420111, г. Казань, а/я 261, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН

Тел. +7 843 292 75 35

E-mail: grechkin@kibb.knc.ru

Подпись Третькина А.И. завершено.
Главный инженер секретарь Ресурсы КазНИ ВАС
К.Х.Н.

Этот документ сд.

