

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Дмитренко 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

Морские организмы – это одно из биологических сообществ, преобладающих на Земле, а их метаболиты, низкомолекулярные и высокомолекулярные, представляют огромные возможности для их изучения, понимания их биологической роли и применения. Мне, как морскому биохимику, посвятившему всю жизнь изучению липидных метаболитов морских организмов, прежде всего, хотелось оценить вклад данной диссертации, посвященной применению масс-спектрометрии, в изучение морских природных соединений в расширение наших представлений о биологическом значении таких метаболитов.

Актуальность изучения морских природных соединений не вызывает сомнений. Ведь в морской среде обитают представители всех известных на земле таксонов, а некоторые из них целиком являются морскими. Следствием этого является огромное структурное разнообразие морских метаболитов, которое привлекает внимание ученых во многих странах мира. По данным международного научного журнала Natural Product Reports, в журнале ежегодно публикуется одна обзорная статья о выделенных новых низкомолекулярных морских природных соединений, около 30 тысяч которых были выделены и изучены из морских микроорганизмов, растений и животных, но не были ранее найдены в наземных организмах. Среди них оказались вещества, ставшие основой лекарств (например, ω -3-жирные кислоты и их оксилипиновые производные, тритерпеновые гликозиды и ганглиозиды из голотурий, кардиоактивные хиноидные соединения, в том числе эхинохром, а из морских ежей - многочисленные природные соединения с высокой противоопухолевой активностью, противовирусные агенты и другие). Низкомолекулярные метаболиты (например, липиды мембран) играют критически важную адаптационную роль в самом существовании морских организмов, а другие из метаболитов важны для защиты от хищников (например, разнообразные гликозиды, антибиотики и др.).

Рецензируемое, масс-спектрометрическое исследование природных соединений из морских организмов, выполненное П.С. Дмитренко и представленное им в виде научного доклада диссертации на соискание ученой степени «доктор химических наук» по специальности 1.4.9 - биоорганическая химия, обобщило многолетнюю работу, направленную на применение масс-спектрометрии в поиске и установлении строения вторичных метаболитов морских беспозвоночных (в основном из иглокожих и губок).

Кстати, это одни из самых интересных типов морских беспозвоночных, аккумулирующих в себе признаки, как животных, так и растений. У иглокожих, появление признаков животных и растений, это результат взаимодействия на уровне генома, произошедший в докембрии, после гибели одноклеточных симбиотических водорослей и сохранения части их генома. Об этом я писал еще в 80-е годы. У губок, это результат сосуществования клеток хозяина и одноклеточных симбиотических водорослей на уровне цитоплазмы, сохранившееся до наших дней.

В целом, исследование П.С. Дмитренка «Применение масс-спектрометрии в исследованиях биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных» следует признать важным дополнением к достижениям морской биоорганической химии и изучению метаболитов.

Диссертация в виде научного доклада состоит из введения «Общая характеристика работы», и основной части с главами: 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 *P. pectinifera*.

В общей характеристике работы даются обоснование актуальности проблемы, цель и задачи работы, формулировки положений, выносимых на защиту, сведения о научной новизне и практической ценности работы, данные о публикациях. В конце основной части диссертации приведены выводы и список 60 основных публикаций по теме диссертации, хотя соискатель опубликовал по этой теме 93 научные статьи. Во введении сообщается также об апробации диссертации и личном вкладе автора, даются некоторые используемые сокращения и обозначения.

Целью настоящей работы было установление новых биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных с помощью современных методов масс-спектрометрии и поиск новых перспективных для медицины биологически активных соединений, установление особенностей их биосинтеза и биологических функций.

В результате проведенной работы было установлено строение трехсот новых морских природных соединений и изучены их метаболические профили. С помощью метаболомного подхода были изучены: полигидроксилированные стероиды, родственные им гликозиды, астеросапонины и циклические гликозиды морских звезд; тритерпеновые гликозиды голотурий; стероидные и тритерпеновые гликозиды, сульфатированные стероиды, биполярные липиды и гуанидиновые алкалоиды морских губок и предложена структура для ряда новых соединений.

В первой главе основной части диссертации в виде научного доклада «*Масс-спектрометрическое изучение биологически активных метаболитов морских*

беспозвоночных» дано описание применения различных вариантов масс-спектрометрии для установления строения трехсот индивидуальных соединений, изученных соискателем. Соискатель при работе с индивидуальными соединениями, выделенными из экстрактов морских организмов, применял большой набор масс-спектроскопических методик и при этом всегда выбирал такой вариант, который позволял решить возникшие структурные проблемы. Больше всего работ было выполнено с применением масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией. Но были и структуры, к установлению строения которых привлекалась масс-спектрометрия с матричной десорбцией/ионизацией, или с электронной ионизацией. Образующиеся ионы сортировались по отношению массы к заряду с помощью электромагнитных анализаторов, времяпролетных анализаторов или квадрупольных анализаторов. Многие спектры записывались в режимах tandemной масс-спектрометрии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Материал диссертации был обобщен и представлен в виде примеров масс-спектрометрического изучения некоторых представителей тех многочисленных структурных групп метаболитов, с которыми работал соискатель. Из-за большого объема материала, прокомментируем только несколько наиболее интересных примеров.

Например, с участием диссертанта были описаны структуры октаола и нонаола из стероидов морских звезд с рекордно большим числом гидроксильных групп (восемь и девять, соответственно).

В ранних работах, которые мало обсуждаются в диссертации, П.С. Дмитренко применял масс-спектрометрию (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 была применена МС с регистрацией как положительных, так и отрицательных ионов, а позднее масс-спектрометрия высокого разрешения и tandemная масс-спектрометрия. Были получены и проанализированы масс-спектры характерных для морских звезд стероидных гликозидов различных структурных групп и полигидроксилированных 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.

Более 20 полигидроксистероидов из морских звезд и их сульфатов были изучены в большинстве случаев с регистрацией отрицательных ионов. Такие метаболиты давали масс-спектры, которые позволяли определить брутто-формулы изученных соединений, а использование МС/МС экспериментов (tandemная масс-спектрометрия) - наблюдать фрагментацию с последовательными потерями молекул воды и характерными отрывами фрагментов боковой цепи, что сыграло большую роль в определении строения этих метаболитов.

В масс-спектрах сульфатированных полигидроксистероидов их морских звезд ионизацией электрораспылением наблюдали характеристичные пики при m/z 97 $[\text{HSO}_4]^-$ и 80 $[\text{SO}_3]^-$.

По моему мнению, особый интерес представляет изучение пяти т.н. циклических гликозидов из тропической морской звезды *Echinaster luzonicus*. Хорошо известны стероидные гликозиды из морских беспозвоночных (они не только в морских звездах, но и в губках и мягких кораллах). Но редкая группа метаболитов из *E. luzonicus* и родственных видов морских звезд характеризуется гликозидами с углеводной цепью, которая присоединена к агликону двумя связями таким образом, что образуется 17-членный макроцикл, подобный макроциклу синтетических ионофоров. В условиях масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением ионы $[\text{M}-\text{Na}]^-$ в этих соединениях теряют часть моносахаридных остатков в виде $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (60 Да), $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (90 Да) и $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ (134 Да), а характерный ионный пик при m/z 157 $[\text{GlcA}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ объясняется отрывом остатка глюкуроновой кислоты. *Интересно изучал ли кто-нибудь, не могут ли эти вещества связывать катионы металлов подобно ионофорам?*

Соискателем были получены и изучены различные масс-спектры 153 новых тритерпеновых олигогликозидов из 13 видов голотурий. С помощью масс-спектрометрии было установлено, что они имеют молекулярные массы до 1600 а.е., углеводные цепи с двумя – шестью моносахаридными остатками, а их тритерпеновые агликоны часто имеют 18(20)-лактонные фрагменты (это так называемые голостановые гликозиды). В тандемных масс-спектрах они образуют фрагментные ионы с последовательными отрывами моносахаридных остатков, что позволяет определить строение их углеводных цепей. При регистрации катионов в их спектрах присутствуют $[\text{M}_{\text{Na}}+\text{Na}]^+$ ионные пики. Моно- и дисульфатированные гликозиды детектируются в режиме регистрации отрицательных ионов в виде $[\text{M}_{\text{Na}}-\text{Na}]^-$ и $[\text{M}_{2\text{Na}}-2\text{Na}]^{2-}$ ионных пиков, а несульфатированные соединения в спектрах с регистрацией анионов имеют пики ионов $[\text{M}-\text{H}]^-$. Трисульфатированные соединения в масс-спектрах имеют пики ионов $[\text{M}_{3\text{Na}}-\text{Na}]^-$, $[\text{M}_{3\text{Na}}-2\text{Na}]^{2-}$ и $[\text{M}_{3\text{Na}}-3\text{Na}]^{3-}$. Применение масс-спектрометрии вместе с ЯМР позволило установить химическое строение всех этих метаболитов.

Были получены и проанализированы масс-спектры более 100 вторичных метаболитов морских губок, включая 70 ранее неизвестных. В целом ряде случаев масс-спектрометрия изучаемых метаболитов морских беспозвоночных не давала достаточной структурной информации. В этих случаях этот метод применяли после химических трансформаций таких метаболитов с отщеплением части их молекул.

Например, при установлении строения новых гликолипидов – мелонозидов из дальневосточной морской губки *Melonon chorakobjakovae* – пришлось прибегнуть к использованию озонлиза и масс-спектроскопического анализа полученных производных.

Интересное применение масс-спектропии высокого разрешения было продемонстрировано при изучении новых стероидов из губок *Topsentia* sp. и *Halichondria vansomaei*. Большинство выделенных стероидов являются галогенированными соединениями. Для подтверждения их брутто-формул наблюдаемые значения интенсивностей изотопных пиков кластера молекулярных ионов сравнивались с расчетными значениями, что позволило установить строение хлор-, йод- и бромтопсентиастерин сульфатов.

По моему мнению, раздел работы, в котором анализируются метаболемы разных видов иглокожих и губок является не менее интересным, чем часть, в которой изучалось строение отдельных метаболитов.

Во второй главе работы «Исследование метаболомных профилей морских звезд и голотурий» даны результаты так называемого метаболомного профилирования, то есть качественного и количественного анализа состава сложных смесей метаболитов.

Например, для изучения метаболомного профиля полярных стероидов дальневосточной морской звезды *Lethasterias fusca* была применена нанопоточная жидкостная хроматография в комбинации с tandemной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (наноВЭЖХ-ИЭР МС/МС), и, в результате, соискатель обнаружил в этом объекте 106 астеросапонинов, 6 нативных агликоновастеросапонинов, 81 полигидроксистероидный гликозид и 14 стероидных полиолов (всего 207 стероидных метаболитов).

В главе 3 диссертации «Исследование распределения метаболитов в различных органах животных» методами метаболомики, то есть комбинацией современных разделительных методов с масс-спектроскопическими исследованиями, были изучены метаболомные профили стенок тела, гонад, желудка, пилорических выростов и целомической жидкости морской звезды *Lethasterias fusca*. Полученные фракции анализировали с помощью наноВЭЖХ-ИЭР МС. Установлено, что в стенках тела из полярных стероидов преобладают астеросапонины. Эти данные подтверждают гипотезу, что астеросапонины выполняют защитную функцию от хищников в морских звездах. В то же время, основными метаболитами в пилорических выростах, которые являются частью пищеварительной системы этих беспозвоночных, были моно- и биозиды полигидроксистероидов. Вероятно, эти метаболиты, подобно желчным кислотам и спиртам высших животных, эмульгируют пищевые компоненты хищных морских звезд и облегчают их всасывание и переваривание. Однако это предположение не было проверено экспериментально, что предстоит еще сделать. Еще более интересны отмеченные автором колебания в содержании отдельных стероидных метаболитов в гонадах. Почти 50 лет назад японские и американские биохимики сообщали о т.н. «овариан-сапонилах» морских звезд. Однако дальнейшего развития эти работы не получили. Данные, полученные соискателем,

предполагают, что можно продолжить это исследование метаболомными методами и детально показать, как изменяется состав полярных стероидов в половых продуктах морских звезд и какие соединения регулируют синхронное созревание мужских и женских половых продуктов, чтобы обеспечить успех внешнего оплодотворения. В целом работы соискателя внесли существенный вклад в понимание биологических функций метаболитов морских звезд.

В завершающей главе диссертации «*Метаболомный анализ воздействия различных факторов на содержание полярных стероидных метаболитов морской звезды *P. pectinifera**» показано, что повреждение животных, а также прием ими пищи вызывают изменения в стероидном метаболоме. Причем в этих условиях содержание астеросапонинов снижалось, а содержание большинства полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов росло. Не следует ли из этого, что при повреждениях, вызванных атаками хищника, стероидные гликозиды выделяются в морскую воду, а в стенках тела их поэтому становится меньше? При кормлении животных концентрации гликозидов полигидроксистероидов и двух сульфатированных полигидроксистероидов увеличились по сравнению с контрольной группой. Это, по-видимому, согласуется с их участием в пищеварении. Таким образом, полученные данные позволяют подтвердить высказанные ранее гипотезы о биологических функциях некоторых изученных метаболитов, но требуются дополнительные эксперименты и анализы, чтобы уточнить, какие именно вещества выполняют ту или иную биологическую роль.

Сделанные предположения не снижают общего положительного впечатления от выполненной работы и не вызывают сомнений в достоверности и значимости полученных П.С. Дмитренко результатов и обоснованности его выводов.

Цели и задачи настоящего фундаментального исследования по поиску и установлению структуры 300 новых вторичных метаболитов морских беспозвоночных, перспективных для медицины биологически активных соединений и их дальнейшего практического использования успешно выполнены автором данного исследования Дмитренко Павлом Сергеевичем и могут быть использованы в медицине для разработки новых лекарственных препаратов.

В целом работа написана хорошим научным языком, с четким, последовательным, доказательным изложением материала, чувствуется, что он весь прошел тщательный рецензионный отбор при публикациях в высокорейтинговых журналах первого и второго квартала. Каких-то существенных замечаний по представленной диссертационной работе у оппонента нет. Есть только одно небольшое уточняющее замечание по первому выводу. Правильнее было бы написать: «1. Выполнено масс-спектрометрическое изучение более 300 новых вторичных метаболитов, выделенных из представителей типа морские Иглокожие (класс звезды, голотурии) и типа Губки, принадлежащих к различным классам, включая полярные

стероиды морских звезд, тритерпеновые гликозиды голотурий, стероиды, гликозиды, алкалоиды, необычные липиды из морских губок ...».

При отсутствии замечаний по работе у оппонента остались некоторые пожелания и вопросы. В качестве пожелания очень интересно было бы получить информацию об изменениях состава липидов (липидома) изучаемых автором видов морских животных, в первую очередь ганглиозидов иглокожих и олигоцереброзидов губок, в том числе, в ответ на стрессовые воздействия и сравнить их с изменениями в профилях полярных стероидных метаболитов. Это была бы важная информация, как для практической медицины, так и для уточнения и понимания биологических функций этих метаболитов.

Автор указывает также на то, что в ходе метаболомных исследований были найдены астеросапонины с редкими моносахаридными остатками. Были ли структуры этих моносахаридных остатков подтверждены другими методами, например, ЯМР? Выделялись ли такие астеросапонины в индивидуальном виде?

Относительно использованных масс-спектрометрических методов. Почему автор не использовал современный метод, который все чаще начинают использовать в метаболомных исследованиях, - масс-спектрометрию ионной подвижности, в котором ионы исследуемых соединений дрейфуют и разделяются в слабом электрическом поле в потоке газа. Полагаю, применение этого метода позволило бы расширить список метаболитов.

Очень большой объем выполненных экспериментов, сотни природных соединений, в установление строения которых был внесен существенный вклад, умение делать заключения и выводы показывают, что исследование Дмитренко Павла Сергеевича является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном уровне. Диссертация и публикации в полной мере отражают содержание диссертации; все вынесенные на защиту положения обоснованы и подтверждены приведенными результатами исследований.

Результаты работы могут быть использованы в организациях РАН и ВУЗах, осуществляющих структурные исследования в области биоорганической химии с помощью современных физико-химических методов. Выводы соответствуют поставленной цели и решаемым задачам, подкреплены обсуждением выполненных масс-спектрометрических экспериментов.

Диссертация Дмитренко Павла Сергеевича «Применение масс-спектрометрии в исследованиях биологически активных вторичных метаболитов морских беспозвоночных» по своей актуальности, новизне, объему, научной и практической значимости результатов полностью 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, а ее автор, Дмитренко

ПавелСергеевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 - биоорганическая химия.

Костецкий Эдуард Яковлевич, доктор биологический наук по специальности 03.01.04 — биохимия, профессор, заслуженный работник высшего образования РФ, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии Института Мирового океана (Школы) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Адрес: 690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10.

E-mail: kostetskiy.yeya@dvfu.ru

Тел. 8 (924) 120-58-28

Костецкий Эдуард Яковлевич

