

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минобрнауки России)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ»
(ФГБНУ ВИЗР)

ИНН/КПП 7820003347/782001001

Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3

Тел.: (812) 470-43-84

Тел./факс: (812) 470-51-10

E-mail: info@vizr.spb.ru, www.vizrspb.ru

исх. К-11/215 от 29.10.2021

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ ВИЗР, к.б.н.

Филипп Борисович Ганнибал

29 октября 2021 г.



Отзыв ведущего учреждения

Федеральное государственное научное учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

на диссертацию Гирич Елены Валерьевны

«Низкомолекулярные вторичные метаболиты грибов Южно-Китайского моря»

на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности

1.4.9 – биоорганическая химия

Актуальность темы диссертационного исследования. Диссертационная работа Е.В. Гирич посвящена выделению и установлению строения вторичных метаболитов факультативных морских грибов, выделенных в чистую культуру из различных субстратов, собранных у вьетнамского побережья Южно-Китайского моря, а также определение биологической активности выделенных соединений. Морские грибы в последнее время оцениваются как весьма перспективные продуценты биологически активных соединений с новыми углеродными скелетами/уникальными хемотипами. Действительно, имеется немало примеров грибных соединений, их производных и аналогов, которые используются в медицине, однако, многие из них могут найти потенциальное применение и как прообразы химических пестицидов. Например, полусинтетическое производные алкалоида пирипинопена А, образуемого многими видами родов *Aspergillus* и *Penicillium*, зарегистрировано недавно как инсектицид Inscalis компанией BASF.

Анализ диссертационной работы. Работа изложена на 171 странице и состоит из введения, литературного обзора (Глава 2), обсуждения результатов (Глава 3), экспериментальной части (Глава 4), выводов и списка литературы, включающего 221 библиографический источник.

Введение отражает актуальность представленной работы – высокую вероятность выделения из культур морских грибов новых по структуре веществ с интересной биологической активностью.

Глава 2 Обзор литературы состоит из двух частей «Морские микроскопические грибы – продуценты уникальных вторичных метаболитов» (п. 2.1) и «Южно-Китайское море – перспективный район Мирового океана для поиска грибов-продуцентов биоактивных соединений» (пп. 2.2–2.8) и Заключение (п. 2.9). Глава представляет собой справочную информацию по разнообразию метаболитов (описаны продуценты, структура и активность более 430 веществ) морских микромицетов.

В главе 3 рассматриваются результаты работы. Раздел 3.1 «Скрининг» состоит из трех предложений, без иллюстраций. В разделе 3.2. проводится анализ спектральных данных новых природных соединений (17 веществ) и по стандартному алгоритму устанавливается их структура. При возможности установлена абсолютная конфигурация веществ. Следует отметить уникальность, сложность и комплексность новых веществ, и использование практически всего набора современных методов для установления их структуры. В ходе выполнения работы идентифицировано 44 известных соединения.

В последнем разделе главы 3 приведены данные по противоопухолевой и нейропротекторной активности изучаемых веществ.

В главе 4 описаны методы исследований. В работе виден достаточно четкий методический подход: культивирование на одной и той же полутвердой среде, экстракция грибных метаболитов этилацетатом, их переэкстракция, последовательная очистка веществ на силикагеле и сефадексе, при необходимости финальная очистка методом ВЭЖХ. Описаны методы биологической оценки веществ, методы статистического анализа полученных данных.

Выводы, в целом, соответствуют поставленным цели и задачам, отражают положения, выносимые на защиту.

Замечания и вопросы к диссертанту, возникшие в ходе анализа работы.

Введение. Необходимо кратко прояснить историю и степень изученности морских грибов в акватории Южно-Китайского моря.

Цель и задачи работы слишком общие, которые можно применить к любому подобному исследованию морских грибов данного региона. Необходимо было подчеркнуть уникальность проведенных исследований.

Глава 1 отсутствует.

Глава 2. Обзор литературы.

Раздел 2.1 называется «Морские микроскопические грибы – продуценты уникальных вторичных метаболитов», но фактически анализируется их интересная биологическая активность. Об уникальности химических структур морских грибов можно судить по разделу 2.2, но он почему-то назван «Южно-Китайское море – перспективный район Мирового океана для поиска грибов-продуцентов биоактивных соединений».

В главе 2 номер раздела 2.2 повторяется дважды.

Кажется сомнительным причисление пеницилларов А-Е (соединения **337-341**) к классу монотерпеноидов ввиду строения их углеродного скелета, а также, потому что в литературе данные вещества не именуется авторами как таковые.

Глава 3.

3.1. Скрининг

Существуют несколько подходов к скринингу БАВ: 1) использование новых или неизученных видов организмов, 2) по целевой биологической активности и 3) по анализу метаболитного профиля. В последнем случае, как правило, используется ВЭЖХ/УФ-МС. В связи с этим требуется пояснение какому принципу были отобраны 4 штамма для дальнейшей работы. Этот вопрос представляется важным, так как по результатам проведенного скрининга сформулирован вывод №1, но никак не проиллюстрирован.

Разделы 3.2.-3.5 являются ключевыми в диссертации и выполнены на высоком уровне, однако, несколько вопросов к диссертанту все же имеется.

Диссертант не привел метаболитные профили (ТСХ и/или ВЭЖХ-хроматограммы) экстрактов отобранных штаммов. Это стоило сделать хотя бы в Приложении. Без этого сложно судить о полноте изучения их состава.

В диссертации не приведены иллюстрации ключевых спектров новых веществ. Можно было бы сослаться на опубликованные диссертантом работы, где в сопровождающих материалах они имеются; привести их в Приложении к диссертации либо в электронном виде на сервере.

Интересна информация о выделенных диссертантом мелатонин-подобных соединениях на с. 79, однако обсуждение результатов минимально. То же самое можно сказать и новых циклотрипептидных производных, содержащих фрагмент коричной кислоты.

Возможные конформации цитриперазина D изучены *in silico*. Какие метод и компьютерная программа были использованы?

Структуры биоактивных соединений морских грибов сложны, поэтому маловероятно, что многие из этих веществ можно потенциально получить с помощью химического синтеза. Поэтому крайне важно указывать выходы перспективных соединений в культурах грибов-продуцентов, а также сравнивать таковые с другими продуцентами, если они синтезируются другими микроорганизмами.

Раздел 3.6. Биологическая активность выделенных соединений.

В тексте диссертации приведено обсуждение результатов идентификации выделенных соединений, что дает представление о степени уникальности обсуждаемых структур, о родственных соединениях, о других известных природных источниках этих соединений. Однако биологическая активность выделенных соединений обсуждается скупо. Это немного снижает общее впечатление от работы, так как не позволяет оценить, насколько выявленная биологическая активность типична/нетипична для данных структур и насколько ценны полученные данные.

Цитотоксическая активность N-метилпретриходермамида В и нейропротекторная активность (+)- и (-)- криптоэхинулинов В и астеррихинона В4 вынесена в выводы 7 и 8, но важность этих данных не подчеркнута в обсуждении.

Определена взаимосвязь между структурой и цитотоксической активностью различных производных сесквитерпеноидов (стр. 119, вещества **456-459**), однако основная часть этих результатов описана в форме констатации фактов.

Глава 4.

В главе 4 приведены методики проведения ТСХ, но не указано какие из них использованы для скрининга, а какие для контроля гомогенности хроматографических фракций?

Чем обусловлен выбор биотестов для разных соединений (влияние цитриперазинов А-D на апоптоз клеток 22Rv1, PC-3 и LNCaP; соединений **441-445** на токсичность в отношении мышинных спленоцитов и гемолитическую активность, и т.д.)?

Есть какие-то литературные прецеденты использования этих типов активности для структурно родственных веществ?

Выводы

Вывод 1 не обоснован, т.к. в работе не представлены экспериментальные данные и не указаны критерии, по которым проведен отбор штаммов.

Выводы 7 и 8. Из протестированных метаболитов отмечено три вещества, вызывающих апоптоз клеток рака предстательной железы и проявляющие нейропротекторную активность на моделях болезни Паркинсона. Из них только у метилпретриходермамида В (**101**) выход 0.8%, у (+) и (-) криптоэхинулинов В (**466**) 0.02% и астеррихинона В4 (**483**) он не превышает 0.1%. Насколько они перспективны для углубленных исследований с учетом данных по их выходам?

Общая оценка диссертационной работы

Представленная работа имеет фундаментальный характер, поскольку в основном посвящена структурному разнообразию вторичных метаболитов факультативных морских грибов, заселяющих вьетнамское побережье Южно-Китайского моря. Выбор темы обусловлен хорошо подтвержденным фактом - способностью морских грибов синтезировать вторичные метаболиты с разнообразной биологической активностью, не встречающейся у наземных представителей, что имеет потенциальное практическое значение для данного исследования.

Соискателем подготовлен исчерпывающий литературный обзор, посвященный новым вторичным метаболитам, выделенным из грибов-микровицетов Южно-Китайского моря за период с 2015 по 2019 года.

Еленой Валерьевной выполнен огромный объем работы по выделению и характеристике структуры вторичных метаболитов морских грибов Южно-Китайского моря. В литературном обзоре проведен тщательный поиск и анализ информации об уже известных соединениях микровицетов, встречающихся в этой области Мирового океана, что несомненно помогло Елене Валерьевне при идентификации соединений, выделенных в рамках диссертации. Для установления структур выделенных соединений использованы разнообразные методики – ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгено-структурный анализ, установление абсолютной конфигурации при помощи метода Мошера и спектров кругового дихроизма и т.д.

Результаты работы изложены подробно и детально и в полной мере дают возможность оценить квалификацию диссертанта. Соискателю удалось успешно выделить и с использованием современных спектральных методов доказать структуру 61 индивидуального соединения различной химической природы (алкалоиды, терпеноиды, поликетиды, трипептиды), среди которых 17 ранее неописанных метаболитов. Для двух выделенных веществ предложен путь биосинтеза.

Не ограничиваясь только доказательством строения выделенных соединений, диссертант исследовал их биологическую активность, что позволило обнаружить метаболит с высокой цитотоксической активностью, а также 3 соединения, обладающих нейропротекторной активностью.

Умение интерпретировать данные, полученные вышеперечисленными методами, характеризует диссертанта как квалифицированного специалиста в области идентификации природных соединений.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, с высоким импакт-фактором, что подчеркивает достоверность установления новых структур, представленных в работе. Материалы работы были также широко апробированы на различных конференциях.

В автореферате Гирич Е.В. сохранены все структурные элементы диссертации. Разделы, содержащие сведения о положениях, выносимых на защиту, новизне, заключении, в котором содержатся выводы работы, и главы автореферата Е.В. Гирич соответствуют таковым в диссертации.

Значимость полученных автором диссертации результатов. Несмотря на определенные недостатки, диссертационная работа демонстрирует, что Елена Валерьевна Гирич – высококвалифицированный специалист в области идентификации природных соединений. По степени актуальности темы, уровню полученных научных результатов, степени их новизны, теоретической и практической значимости, а также по форме и содержанию, диссертация Гирич Елены Валерьевны «Низкомолекулярные вторичные метаболиты грибов Южно-Китайского моря» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи (исследование вторичных метаболитов факультативных морских грибов, собранных у вьетнамского побережья Южно-Китайского моря), имеющей значение для изучения структурного разнообразия природных соединений и разработки новых лекарственных препаратов на их основе. Полученные ею результаты подчеркнули важность изучения биологического разнообразия морских грибов. Таким образом, диссертация Е.В. Гирич отвечает всем

требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Гирич Елена Валерьевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР (№ 10), протокол № 2 от 28.10.2021 г.

Отзыв составили:

Зав. лаб. фитотоксикологии и биотехнологии, кандидат биологических наук, Берестецкий Александр Олегович, aberestetskiy@vizr.spb.ru, +7 (812) 476-68-38

кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Фролова Галина Михайловна, fgm41@mail.ru, +7 (812) 476-68-38

кандидат биологических наук, научный сотрудник, Далинова Анна Александровна, adalinova@vizr.spb.ru, +7 (812) 476-68-38

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений"

Адрес: Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

Индекс: 196608

e-mail: info@vizr.spb.ru

Телефон: +7 (812) 470-51-10

Факс: +7 (812) 470-51-10

Сайт института: <http://vizrspb.ru/>

Подписи к.б.н. Берестецкого А.О., к.х.н. Фроловой Г.М. и

к.б.н. Далиновой А.А. удостоверяю,

Ученый секретарь ФГБНУ ВИЗР, д.б.н., Гусева О.Г.

