

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Киселева Константина Вадимовича
«Регуляция биосинтеза и значение стильбенов в клетках растений»
по специальности 1.5.6. Биотехнология
на соискание ученой степени доктора биологических наук

Разнообразие природных соединений, обнаруженных в растениях, открывает широкие перспективы их использования не только в пищевой промышленности, но и в фармацевтике или при производстве косметики. Стильбены — это фенольные соединения, которые синтезируются в качестве вторичных метаболитов шикиматным путем в растениях. Стильбены имеют большой терапевтический потенциал в качестве антиоксидантных, противомикробных, противовоспалительных, противоопухолевых и кардиопротекторных средств. В настоящее время источниками стильбенов являются культуральные и дикорастущие растения, культуры клеток растений иногда для получения необходимых стильбенов используется химический синтез. Однако в известных растениях-продуцентах содержание стильбенов невелико, скорость роста растений также невелика, поэтому получать стильбены таким способом не всегда выгодно. Использование клеточных культур растений также сопряжено с рядом сложностей, связанных как с дороговизной организации процесса культивирования, так и с недостатком информации о сигнальных путях и транскрипционных факторах, регулирующих активность биосинтеза стильбенов растений. Учитывая эти соображения диссертационную работу Константина Вадимовича следует признать весьма актуальной.

Диссертационная работа направлена на получение новых фундаментальных знаний о молекулярно-генетических механизмах и сигнальных путях, регулирующих биосинтез стильбенов, разработку

методов получения культур клеток растений, обладающих активным ростом и высоким уровнем содержания резвератрола и других стильбенов.

Представленная диссертация изложена на 206 страницах, содержит 33 рисунка, 20 таблиц и следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Список литературы включает 354 источника.

Диссертация имеет традиционную структуру. Во введении обоснована актуальность работы, определена цель работы, поставлены задачи, которые предстояло решить, показана научная новизна работы и ее практическая значимость. Обзор литературы состоит из нескольких разделов, он обобщает данные литературы о распространении стильбенов, их биологической активности, регуляции биосинтеза резвератрола и других стильбенов.

Обзор литературы написан достаточно подробно и доходчиво описывает состояние исследований по теме диссертации.

Глава 2 - «Материалы и методы» - описывает использованные в работе методы. Глава 3 - «Результаты и обсуждение», где излагаются основные результаты работы, которые обсуждаются с привлечением литературных данных. Далее следуют разделы «Заключение», «Выводы», завершается диссертация разделом «Список литературы».

Сделанные выводы базируются на достаточном экспериментальном материале, подтверждаются данными наблюдений и не вызывают сомнений. Содержание автореферата соответствует основному тексту диссертации. Данные исследований были опубликованы в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК.

Константином Вадимовичем была проделана колоссальная работа по исследованию уровня экспрессии группы генов, участвующих в

метаболизме стильбенов, а также генов, регулирующих активность целевых генов. Изучено влияние некоторых эффекторов на содержание стильбенов. Проведены эксперименты не только с культурами клеток, но и с целыми растениями. Показано, что стильбены оказывают влияние на экспрессию важных регуляторных и защитных генов у растений.

В целом работа производит благоприятное впечатление, однако, как и все диссертации содержит отдельные недостатки.

Рисунок 2 обзора литературы содержит неточности. Реакция образования пиносильвина катализируется отдельным ферментом – пиносильвинсинтазой КФ 2.3.1.146, а не стильбенсинтазой КФ 2.3.1.95.

В первом положении, выносимом на защиту указано, что кора хвойных деревьев (ель, сосна) является наиболее богатым доступным источником стильбенов. В таблице 6 приводятся данные по экстракции стильбенов различными растворителями, однако, разные растворители и разная их концентрация была использована только для экстрагирования стильбенов из коры, из хвои и древесины экстракцию проводили только этанолом одной концентрации. В таблице 7 приводятся данные по оптимизации температуры экстрагирования, но здесь почему-то используется только метанол, и экстракция стильбенов проводится только из коры. Для процесса экстракции критически важными параметрами также являются не только степень измельчения материала, но способ экстракции – мацерация, перколяция и т.д., скорость перемешивания. В тексте диссертации эти параметры не указаны. Таким образом, необходимо дополнительное пояснение на основании каких именно данных автор сделал вывод о том, что кора хвойных содержит наибольшее количество стильбенов. Также необходимо разъяснить методику определения общего содержания стильбенов в образцах, т.к. в разделе «Материалы и методы» не содержится необходимой информации. Кроме этого, необходимо подробно указать

условия хроматографического разделения: название и размер колонки, температуру колонки, используемые растворители и т.д. Для количественного определения содержания стильбенов следует привести калибровочные кривые каждого из них.

В следующей части работы автор переходит к описанию экспериментов по изучению влияния предшественников фенольных соединений и УФ-С на биосинтез стильбенов в годовалой хвое ели *P. jezoensis*. Хотелось бы видеть более подробное объяснение, почему был выбран этот эксперимент, почему УФ-С, а не А или В?, почему именно годовалая хвоя? Ведь в предыдущем эксперименте было показано, что наибольшее содержание стильбенов наблюдается в коре.

В таблице 9 приводится содержание стильбенов в хвое, но не указываются условия экстракции.

Автор указывает, что с помощью ПЦР РВ были проанализированы уровни транскрипции четырех генов *STS P. jezoensis*: *PjSTS1a*, *PjSTS1b*, *PjSTS2* и *PjSTS3* почему именно эти четыре гена были выбраны? Все ли они дают функциональные продукты? Далее автор делает вывод что увеличение содержания стильбенов в хвое ели *P. jezoensis* после добавления предшественников и обработки УФ-С происходило за счет увеличения уровня транскрипции генов биосинтеза стильбенов. Хотелось бы понять, есть ли корреляция между увеличением уровня транскрипции генов и увеличением активности соответствующих ферментов?

Далее автор почему-то возвращается к описанию содержания стильбенов в частях другого растения – сосны корейской. Здесь, вероятно, экстракцию проводили только этанолом и почему-то только из коры, шишек и плодов. Почему не анализировали хвою и древесину, как в предыдущих экспериментах? Почему использовали только один растворитель?

Семейство генов *STS* в виноградной лозе состоит из 48 генов *STS*, где, по меньшей мере, 32 гена являются потенциально функциональными, как было выявлено в результате общегеномного анализа виноградной лозы (Vannozzi et al. 2012; Parage et al. 2012). Автор выбрал 10 из них. Хотелось бы получить комментарий, почему именно эти 10. Анализ экспрессии ограничивается лишь описанием рисунка 11. Автор не делает попыток объяснить, почему экспрессия одних генов увеличивается значительно, а других не изменяется так драматически.

На странице 96 диссертации автор указывает, что увеличение содержания стильбенов в хвое ели *P. jezoensis* после добавления предшественников и обработки УФ-С происходило за счет увеличения уровня транскрипции генов биосинтеза стильбенов. А на странице 103 пишет, «...показано, что ель *P. jezoensis* отличается постоянным высоким содержанием стильбенов и высокой экспрессией генов *STS*. В то же время виноград *V. amurensis*, произрастающий в схожих климатических условиях, обладает индуцибельным биосинтезом стильбенов и экспрессией генов *STS*». На мой взгляд, здесь есть некоторое противоречие. Ведь увеличение содержания стильбенов и увеличение уровня транскрипции генов биосинтеза стильбенов в хвое ели *P. jezoensis* также происходит в ответ на добавление предшественников и обработку УФ-С, т.е. является индуцибельным.

Я заметил, что автор концентрируется на общем содержании стильбенов, вместе с тем, в фармацевтике применяются, в основном, высокоочищенные вещества, поэтому, информация о том, в каких условиях можно получить наиболее гомогенные вещества является более ценной, даже если выход целевого вещества невысок.

Высказанные замечания не влияют на общую высокую оценку проделанной работы и полученных результатов.

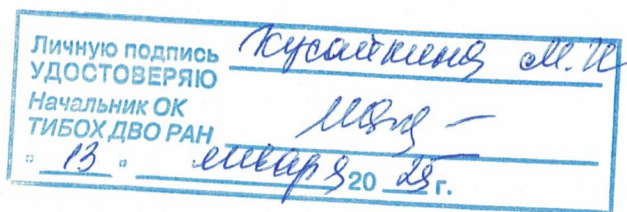
Таким образом, диссертация Киселева Константина Вадимовича, соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Доктор биологических наук
(03.01.04 - биохимия), доцент,
ведущий научный сотрудник
лаборатории химии ферментов,
заместитель директора по научной работе
Кусайкин Михаил Игоревич
Эл. почта оппонента: mik@riboc.dvo.ru
Тел. (423)231-14-30



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук.
690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159
Эл. почта: office@riboc.dvo.ru

13 января 2025 г.



Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Киселева Константина Вадимовича «Регуляция биосинтеза и значение стильбенов в клетках растений», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

1. Фамилия Имя Отчество оппонента: Кусайкин Михаил Игоревич.
2. Ученая степень и отрасль науки: доктор биологических наук.
3. Специальность по докторской диссертации: 1.5.4. – Биохимия (биологические науки).
4. Ученое звание: доцент.
5. Место основной работы оппонента: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук.
6. Занимаемая должность: заместитель директора по научной работе.
7. Почтовый индекс, адрес: 690012, г. Владивосток, ул. Калинина, д.177, кв.57.
8. Телефон: +7 (423) 231-23-60.
9. Адрес электронной почты: mik@piboc.dvo.ru.
10. Список основных публикаций по теме рассматриваемой диссертационной работы в рецензируемых научных журналах за последние 5 лет:
 1. Kurochkina L., Pozdyshev D., Kusaykin M., Barinova K., Ermakova S., Semenyuk P. Sulfated polysaccharides accelerate gliadin digestion and reduce its toxicity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2024. Т. 695. С. 149439.
 2. Silchenko A.S., Taran I.V., Usoltseva R.V., Zvyagintsev N.V., Zueva A.O., Rubtsov N.K., Lembikova D.E., Nedashkovskaya O.I., Kusaykin M.I., Isaeva M.P., Ermakova S.P. The discovery of the fucoidan-active endo-1 \rightarrow 4- α -l-fucanase of the gh168 family, which produces fucoidan derivatives with regular sulfation and anticoagulant activity // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Т. 25. № 1. С. 218.
 3. Sintsova O., Popkova D., Kalinovskii A., Rasin A., Borozdina N., Shaykhutdinova E., Klimovich A., Menshov A., Kim N., Anastyuk S., Kusaykin M., Dyachenko I., Gladkikh I., Leychenko E. Control of postprandial hyperglycemia by oral administration of the seaanemone mucus-derived α -amylase inhibitor (magnificamide) // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023. Т. 168. С. 115743.
 4. Thinh Ph.D., Rasin A.B., Silchenko A.S., Trung Vo.T., Kusaykin M.I., Hang C.T.T., Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Ermakova S.P. Pectins from the sea grass *Enhalus acoroides* (L.f.) royle: structure, biological activity and ability to form nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Т. 242. № Part 3. С. 124714.
 5. Usoltseva R.V., Zueva A.O., Malyarenko O.S., Anastyuk S.D., Moiseenko O.P., Isakov V.V., Kusaykin M.I., Jia A., Ermakova S.P. structure and metabolically oriented efficacy of fucoidan from brown alga *Sargassum muticum* in the model of colony formation of melanoma and breast cancer cells // *Marine Drugs*. 2023. Т. 21. № 9. С. 486.
 6. Zueva A.O., Silchenko A.S., Rasin A.B., Malyarenko O.S., Kusaykin M.I., Kalinovskiy A.I., Ermakova S.P. Production of high- and low-molecular weight fucoidan fragments with defined sulfation patterns and heightened in vitro anticancer activity against tnbc cells using novel endo-fucanases of the gh107 family // *Carbohydrate Polymers*. 2023. Т. 318. С. 121128.
 7. Belik A.A., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Ermakova S.P. Two gh16 endo-1,3- β -d-glucanases from formosa agariphila and f. algae bacteria have complete different modes of laminarin digestion // *Molecular Biotechnology*. 2022. Т. 64. № 4. С. 434-446.
 8. Liu X., Liu X., Kusaykin M.I., Zhang M., Bai X., Cui T., Shi Y., Liu C., Jia A. Structural characterization of a p-selectin and egfr dual-targeting fucoidan from *sargassum fusiforme* // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. Т. 199. С. 86-95.

