

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Горностай Татьяны Геннадьевны «Химический состав, способ получения и фармакогностическая характеристика мицелия *Inonotus rheades* (Hymenochaetaceae)», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в диссертационный совет Д 999.140.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по специальности: 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

**Актуальность темы** диссертационной работы Горностай Т.Г. определяется высоким потенциалом базидиальных грибов в качестве источника различных биологически активных веществ. Род *Inonotus* отличается многочисленностью видов, значительная часть которых до сих пор малоизучена. Таким образом, исследование химического состава одного из представителей данного рода *I. rheades* – трутовика лисьего является актуальным. Углубленное изучение факторов, влияющих на накопление целевых веществ данного вида, также не проводилось. Получение таких знаний необходимо как для фундаментальной науки, так и для возможного применения в биотехнологии с целью получения качественного сырья для последующего использования в фармацевтической отрасли.

**Научная новизна.** Диссертантом впервые раскрыт химический состав мицелия *Inonotus rheades*. Для вида выявлено присутствие стеролов (инотодиол, ланостерол, эргостерол пероксид), лупановых тритерпеноидов (лупеол, бетулин, бетулиновая кислота, бетулон, бетулоновый альдегид, бетулоновая кислота, бетулиновый альдегид), полисахаридов, жирных кислот, а также стирилпиронов (феллинины А1 и А2, 1,1-дистирилпирилэтан, *транс-/цис*-биснорянгонины, 3-биснорянгонил-14'-гиспидин, 3,14'-бисгиспидинил, *транс-/цис*-гиспидины, гифоломины А и В), в том числе нового бис(стирилпирона) – реадина, представляющего собой 3,3'-этилиден-бис-[4-гидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2Н-пиран-2-он].

Установлена закономерность в накоплении стирилпиронов, водорастворимых полисахаридов, жирных кислот и терпеноидов в зависимости от использованного типа субстрата и светового режима при культивировании мицелия *I. rheades*. Впервые доказана биотрансформация бетулина в бетулиновую кислоту в мицелии *I. rheades*.

**Практическая значимость работы.** Показана возможность получения чистой мицелиальной массы *I. rheades* на твердом древесном субстрате разных пород. Определена световая и субстратная зависимость синтеза компонентного состава мицелиальной массы мицелия *I. rheades*. Предложен способ получения мицелия трутовика лисьего сухого. Определены показатели качества нового лекарственного сырья «Трутовик лисий мицелий сухой» и разработаны методы его стандартизации. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре химии и пищевой технологии

им. проф. В.В. Тутурина ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет».

**Структура и оформление диссертации.** Диссертация изложена на 208 печатных страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, трех глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, состоящего из 279 источников, в том числе 241 – на иностранном языке, и включает 18 рисунков, 32 таблицы и 7 приложений.

Во введении автором аргументирована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель, задачи исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая ценность работы.

В первой главе в достаточной мере отражены современные представления о базидиомицетах рода *Inonotus*. Отдельный раздел главы посвящен эколого-морфологической характеристике грибов, с данными о распространении и субстратной специфичности. Во втором разделе обобщены данные о химическом составе терпеновых, фенольных соединений и полисахаридов представителей рода *Inonotus*. В третьем разделе автор рассматривает влияние субстратного и светового фактора на морфологию, физиологию и биохимический состав базидиальных грибов. В последнем разделе представлены данные о биологической активности экстрактивных веществ из различных видов рода *Inonotus*.

Во второй главе приведены микробиологические, биохимические, химические, фармакогностические методы исследования объекта. Полученные данные обработаны с применением адекватных методов математической статистики, что позволяет сделать заключение о достоверности результатов, полученных автором.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований по химическому составу мицелия *I. rheades*. Определен химический состав трех фракций мицелия *I. rheades*: гексановой, этилацетатной и водной. Доказано, что гексановая фракция содержит: 3 стерола (инотодиол, ланостерол, эргостерол пероксид) и 7 лупановых тритерпеноида (лупеол, бетулин, бетулиновая кислота, бетулон, бетулоновый альдегид, бетулоновая кислота, бетулиновый альдегид). Из этилацетатной фракции выделено и идентифицировано 6 стирилпиронов (*транс*-/*цис*-гиспидин, *транс*-/*цис*-биснорянгонин, феллинин A1/A2) и 5 бис(стирилпиронов) (1,1-дистирилпирилэтан, 3,14'-бисгиспидинил, гифоломин В, 3-биснорянгонил-14'-гиспидин), а также определена структура нового бис(стирилпирона) - 3,3'-этилиденбис[4-гидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2Н-пиран-2-он], названного реадинин.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена оценке влияния светового и субстратного фактора на химический состав мицелия *I. rheades*. Соискатель выявил изменения в содержании разных групп соединений при использовании субстратного фактора. Показано, что мицелий *I. rheades*

способен концентрировать тритерпеновые соединения, источником которых является древесина, используемая в качестве субстрата. Также обнаружены изменения в концентрации насыщенных и ненасыщенных жирных кислот мицелия *I. rheades* на разных субстратах, основные изменения пришлись на долю олеиновой, линолевой и бегеновой кислот. Субстратный фактор оказал существенное влияние на количественный выход и состав стирилпиронов и бис(стирилпиронов) мицелия *I. rheades* при использовании древесины *B. pendula*, мицелий содержал значительно большее количество соединений, чем выращенный на *P. tremula*. Для водорастворимых полисахаридов автором выявлено преобладание галактанов в мицелии, полученном на *P. tremula*, в то время как мицелий на *B. pendula* накапливает больше глюкозана и маннана. В мицелии, выращенном на *B. pendula*, содержание фукозы и ксилозы больше, чем в мицелии на *P. tremula*, содержание арабинозы и рамнозы, напротив, выше при использовании *P. tremula* в качестве субстрата.

Соискатель убедительно продемонстрировал регуляцию компонентного состава мицелия *I. rheades* световым режимом. Для лупановых тритерпеноидов в мицелии *I. rheades* выявлено максимальное накопление лупеола при красном свете, бетулиновой кислоты – в области желтого света, бетулина – под действием синей части спектра. Показано, что повышение мощности светового потока синего света от 24,1 до 48,3–96,8 мкмоль/м<sup>2</sup>\*с способствует повышению концентрации тритерпеноидов в мицелии от 2,80 до 6,15–6,19 мг/г, в том числе бетулина от 1,57 до 4,85–4,87 мг/г. Соискателю удалось установить биотрансформацию бетулина в бетулиновую кислоту под действием светового фактора. Изменения жирнокислотного профиля мицелия *I. rheades* от светового режима касаются, в первую очередь, содержания основных компонентов. Максимальное накопление стирилпиронов наблюдалось при использовании синей части спектра и постепенно снижалось в красной части спектра. Соискателем выявлен оптимальный световой режим, обеспечивающий максимальную продукцию стирилпиронов в мицелии *I. rheades*. Исследования полисахаридов в мицелии *I. rheades* выявили, что синтез доминирующих моносахаридов ВРПС зависит от светового режима. В мицелии, выращенном в темноте, преобладают галактаны, в то время как мицелий на свету, вне зависимости от длины волны используемого светового режима, содержит меньшее количество галактанов. При культивировании мицелия на свету содержание глюкозана почти в 2 раза выше.

Исследование изменений химического состава под действием светового и субстратного фактора позволили предложить новую технологию получения мицелия трутовика лисьего на древесине *B. pendula* с использованием обработки светом 465-470 нм и интенсивностью светового потока 48,3 мкмоль/м<sup>2</sup>\*с для увеличения содержания действующего вещества – гиспидина.

В пятой главе соискателем с помощью микроскопического метода определены диагностические признаки сырья трутовика лисьего, разработаны методы качественного определения полифенольных соединений

и гиспидина для стандартизации сухого мицелия трутовика лисьего, проведен товароведческий анализ, определены показатели качества сырья трутовика лисьего, включённые в проект ФСП. Соискателем в итоговом заключении обобщены результаты исследований, на основании которых автор формулирует 4 вывода, отвечающих цели работы и задачам, а также согласующихся с положениями, выносимыми на защиту.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, рекомендаций и выводов.**

Изложение материала в диссертации и автореферате совпадает и отражает результаты исследований, полученные автором. Результаты исследований базируются на достаточном фактическом материале. Эксперименты выполнены с использованием комплекса современных микробиологических, биохимических, химических, фармакогностических и статистических методов исследований, что позволяет сделать заключение о достоверности полученных автором результатов. Заключение и выводы логично вытекают из результатов работы и в достаточной степени аргументированы.

Апробация настоящей работы осуществлена в виде докладов на научных конференциях различного уровня, в которых отражены основные положения диссертационной работы, по материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 9 – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

При общей положительной оценке диссертационной работы Горноста́й Т.Г. имеются следующие замечания и пожелания:

1. Глава материалы и методы составляет 15 стр. (с 55 по 70 стр.), из них 7 страниц, начиная с 62 по 69 страницы – это методики определения различных видов активности (антимикробная и фунгистатическая, иммуномодулирующая, антирадикальная и т.д.) и всего 8 страниц по фармакогностическим и физико-химическим методам. В свою очередь результаты определения различных видов биологической активности вынесены в приложения. Корректнее было вынести указанные методики так же в приложения.
2. Известно, что в спиртовых растворах клетки растений деформируются. Почему в качестве включающей и проявляющей жидкости при проведении микроскопического анализа трутовика лисьего выбран 70% этиловый спирт?
3. Что подразумевается под органической и минеральной примесью для сырья трутовика лисьего, который был выращен в стерильной камере? Ведь согласно общепринятым определениям «органическая примесь» - это части других неядовитых растений, не являющихся сырьем, а «минеральная примесь» - это камни, песок, кусочки земли.
4. В диссертации на странице 58 для определения показателей доброкачественности сырья указана Государственная Фармакопея СССР 1990г. XI изд., которая утратила силу, в 2018 году вышла

Государственная Фармакопея XIV издания, корректнее было дать ссылку на нее.

5. С чем связан выбор приобретения *I. rheades* штамма 0186 в коллекции чистых культур? Каков ареал распространения данного вида и произрастает ли он в нашем регионе?

Указанные замечания и пожелания не умаляют теоретической и практической значимости данной диссертационной работы.

**Заключение.** Диссертационная работа Горноста́й Т.Г. «Химический состав, способ получения и фармакогностическая характеристика мицелия *Inonotus rheades* (Hymenochaetales)» является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой и содержит решение важной задачи в области фармацевтической химии и фармакогнозии по поиску новых природных источников биологически активных веществ.

Считаю, что по актуальности темы, объему выполненных исследований, научно-методическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертация Горноста́й Татьяны Геннадьевны «Химический состав, способ получения и фармакогностическая характеристика мицелия *Inonotus rheades* (Hymenochaetales)» соответствует требованиям ВАК Министерства науки и высшего образования РФ (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Доцент кафедры фармации медицинского института  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Бурятский государственный  
университет имени Доржи Банзарова»

Министерства науки и высшего образования РФ

кандидат фармацевтических наук, доцент *Рандалова* Рандалова Туяна Эрдэмовна

«19» *калол* 2019г.

Шифр специальности: 14.04.02 фармацевтическая химия, фармакогнозия.

670000, Республика Бурятия

г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а

тел.: 8 (3012) 297-170

e-mail: soktoevate@gmail.com

http://www.bsu.ru



Общий отдел  
Правильность подписи *Рандаловой Т.Э.* заверяю  
*Зинев* *Вараномыше Р.С.*  
"19" "11" 2019г.