

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по кандидатской диссертации Пошихонцевой Вероники Юрьевны на тему: «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*», выполненной в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**Соответствие соискателя ученой степени требованиям, необходимым для допуска к защите.** Пошихонцева В.Ю. соответствует требованиям, изложенным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.: имеет высшее образование, подтвержденное дипломами Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского» по специальности «Биоинженерия и биоинформатика» с квалификацией «Специалист по биоинженерии» и Федерального государственного бюджетного учреждения науки высшего профессионального образования «Пушкинский государственный естественно-научный институт» с присуждением степени магистра биологии по направлению «Биология»; подготовила диссертацию в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук - обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», давшего положительное заключение по данной диссертации; сдала кандидатские экзамены по английскому языку и истории и философии науки, что подтверждено дипломом об окончании аспирантуры, и по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), о чем предоставлена справка.

**Соответствие диссертации специальности, по которой совету предоставлено право защиты.** Диссертация Пошихонцевой В.Ю. выполнена в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», под руководством доктора биологических наук Доновой Марины Викторовны, на современном научно-методическом уровне с использованием физико-химических, общих микробиологических, биохимических,

молекулярно-генетических методов, методов электронной и световой микроскопии и статистических методов исследования. Члены комиссии считают, что диссертация Пошехонцевой В.Ю. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., с изменениями, утвержденными постановлениями Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», а также паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в областях исследований по пунктам 3 – «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения», 4 – «Изучение и разработка процессов и аппаратов микробиологического синтеза, включая физико-химическую кинетику, гидродинамику, массо- и теплообмены в аппаратах для ферментации, сгущение биомассы, разделения клеточных суспензий, сушки, грануляции, экстракции, выделения, фракционирования, очистки, контроля и хранения конечных целевых продуктов. Разработка теории моделирования, оптимизации и масштабирования процессов и аппаратов микробиологического синтеза» и 7 – «Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, биотрансформации, биокатализа, иммуносорбции, биодеструкции, биоокисления и создание систем биокомпостирования различных отходов, очистки техногенных отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды».

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором. Выполнение требований к публикации основных научных результатов диссертации.** По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 7 научных статей – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, а также 1 Патент РФ, что является вполне достаточным для проведения ее защиты.

Автор самостоятельно провела информационный поиск, анализ литературных данных. Вместе с научным руководителем сформулировала цель и задачи работы, проанализировала и обобщила полученные результаты. Все лабораторные исследования, включавшие изучение физиолого-биохимических, хемотаксономических и генотипических характеристик штаммов стрептомицетов, продуцирующих такролимус, разработку и апробацию биотехнологии получения такролимуса с использованием данных штаммов на уровне колб и лабораторных биореакторов, а также статистический анализ и описание

полученных данных проведены автором самостоятельно. Автор непосредственно принимала участие в подготовке и написании научных публикаций по теме диссертации.

Присвоения авторства чужого научного труда (плагиата), результатом которого может быть нарушение авторско-правового и патентного законодательства, в данной диссертации не обнаружено.

Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: содержание, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список используемых сокращений, список цитируемой литературы, список работ, опубликованных по теме диссертации и приложения. Список литературы включает 274 источника, в том числе 9 отечественных и 265 зарубежных авторов.

**Актуальность** выбранной темы определяется тем, что разработка эффективных способов производства иммуносупрессорных агентов нового поколения является важным направлением биотехнологии, прикладной микробиологии и биомедицины. Такролимус (FK-506) является одним из наиболее востребованных в медицинской практике препаратов. Он подавляет иммунный ответ; используется в хирургии для предотвращения отторжения трансплантата, в терапии атипичных дерматитов, аутоиммунных заболеваний, перспективен для применения в терапии злокачественных опухолей и др. Биосинтез такролимуса осуществляют природными, мутантными и генетически модифицированными штаммами актинобактерий рода *Streptomyces*. При этом основными проблемами, препятствующими эффективному практическому получению такролимуса, главным образом, являются низкий уровень биосинтетической активности и ее недостаточная стабильность у ряда штаммов-продуцентов, их выраженная диссоциация и фенотипическая изменчивость, окислительная деградация такролимуса на конечных этапах биосинтеза, образование нежелательных близкородственных побочных продуктов (аскомицин, дигидротакролимус), обуславливающее низкую эффективность процедуры выделения и очистки конечного продукта. В связи с вышеперечисленным, актуальными проблемами являются поиск и изучение новых микробных продуцентов и разработка на их основе эффективных способов биосинтеза такролимуса.

**Цель работы** – исследование особенностей биосинтеза такролимуса штаммами *Streptomyces* spp. и разработка эффективного биотехнологического способа его получения.

**Научная новизна полученных результатов.** Охарактеризованы два новых такролимус-продуцирующих штамма стрептомицетов – *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и Т60. Показаны преимущества *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в качестве продуцента такролимуса. Расшифрован его полный геном и выявлено наличие кластера биосинтеза такролимуса с полным набором генов (26 генов). Изучена фенотипическая изменчивость данного штамма и определен колониально-морфологический вариант, обеспечивающий высокий уровень продукции такролимуса. Определены критерии селекции высокопродуктивных диссоциантов штамма и выявлены условия их поддержания в стабильно активном состоянии. Выявлены условия культивирования и биосинтеза,

способствующие образованию целевого поликетиды. Изучено влияние полимерных сорбентов различного типа и показаны преимущества бромированного стирол-дивинилбензольного сорбента, обеспечивающего повышение эффективности биосинтеза за счет снижения нежелательной деструкции такролимуса, а также упрощения процедуры его выделения из культуральной среды. Разработан способ получения такролимуса, основанный на оригинальных методах биотехнологии синтеза и очистки с получением кристаллического продукта высокой степени очистки, по качественным показателям соответствующего требованиям современной фармакопеи.

На основании анализа поступившей работы комиссия пришла к заключению о возможности защиты кандидатской диссертации Пошихонцевой Вероники Юрьевны на тему: «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» в диссертационном совете Д 350.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ.

Члены комиссии:

доктор тех. наук, с.н.с. Похиленко Виктор Данилович (председатель) \_\_\_\_\_  
(подпись)

доктор биол. наук Фирстова Виктория Валерьевна \_\_\_\_\_  
(подпись)

доктор биол. наук Шепелин Анатолий Прокопьевич \_\_\_\_\_  
(подпись)

Председатель диссертационного совета  
Д 350.002.01, академик РАН, д-р мед. наук, проф.

Дятлов И.А.

Ученый секретарь диссертационного  
совета Д 350.002.01, канд. биол. наук

Фурсова Н.К.