



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МОРДОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. Н.П. ОГАРЁВА»
(ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва»)

ул. Большевицкая, д. 68, г. Саранск,
Республика Мордовия, Россия, 430005,
телефон (8342) 24-37-32, 24-48-88, факс (8342) 47-29-
13,

E-mail: dep-general@adm.mrsu.ru, <http://www.mrsu.ru>
ОКПО 02069964, ОГРН 1021300973275,
ИНН/КПП 1326043499/132601001

от 04.2021 № 01-02-22/1357
на № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО
«МГУ им. Н.П. Огарёва»
С.М. Вдовин

« _____ » _____ 2021г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ НАУЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» Министерства науки и высшего образования, г. Саранск, на диссертационную работу Пошехонцевой Вероники Юрьевны «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертационного исследования

Одним из важнейших направлений современной микробиологии, биотехнологии и биомедицины является разработка полного цикла производства фармацевтических субстанций, в том числе, иммуносупрессорных препаратов широкого спектра терапевтического действия. Среди препаратов данной фармакологической группы одним из

наиболее востребованных является такролимус – 23-членный макроциклический поликетид, широко применяемый в различных областях медицины (при трансплантации органов и тканей для профилактики и лечения отторжения трансплантатов); в дерматологии: при лечении атопических дерматитов, в том числе у детей; псориаза, гангренозной пиодермии и др.; аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, красная волчанка; и др.). Востребованность такролимуса в медицинской практике обусловлена не только его высокой терапевтической эффективностью, но и меньшими побочными воздействиями в сравнении с другими препаратами данной фармацевтической группы. Однако, имеется существенный дисбаланс между высокой клинической востребованностью такролимуса и относительно невысокой эффективностью известных методов его производства.

Особенно остро проблема стоит в России, не имеющей до настоящего времени собственного производства полного цикла фармацевтической субстанции такролимуса и его аналогов и вынужденной импортировать эти дорогостоящие препараты. Выявление и изучение микробных продуцентов такролимуса, разработка эффективных способов его получения, изучение закономерностей биосинтеза такролимуса и его регуляции, разработка эффективных способов выделения и очистки с получением субстанции фармакопейного качества – все это определяет высокую актуальность диссертационного исследования Вероники Юрьевны Пошихонцевой, посвященного изучению микробиологических и биотехнологических аспектов биосинтеза штаммами *Streptomyces tsukubaensis*.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования

В ходе исследования были охарактеризованы два новых штамма, продуцирующих такролимус, отобран наиболее активный продуцент – штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Расшифрован его полный геном, в

котором обнаружен кластер из 26 генов биосинтеза такролимуса. Результаты важны для получения новых продуцентов с улучшенными биосинтетическими возможностями. Диссертантом впервые изучена фенотипическая изменчивость штамма и определены критерии селекции его высокопродуктивных диссоциантов. Получены приоритетные научные данные о стимуляции биосинтеза такролимуса у стрептомицетов клетками низших эукариотов, таких как дрожжи и мицелиальные грибы, и показана зависимость их эффекта от состава клеточных стенок эукариотов. Установлено, что максимальная продукция такролимуса наблюдается на крахмалсодержащих средах и впервые изучено влияние высоко- и низкомолекулярных крахмалов различной структуры на биосинтез такролимуса в условиях культивирования с подпиткой. Особый интерес представляют исследования, посвященные выявлению нежелательной деструкции такролимуса культурой продуцента и разработке способов ее устранения. При этом впервые показана эффективность применения бромированного стирол-дивинилбензолового сорбента на этапе биосинтеза. С применением оригинального метода очистки получен кристаллический продукт высокой степени очистки, по качественным показателям соответствующий требованиям современной фармакопеи.

Практическая значимость исследования

Практическая значимость работы заключается в том, что штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и разработанная на его основе биотехнология могут быть использованы в качестве основы при промышленном производстве востребованной в медицине фармацевтической субстанции такролимуса по технологии полного цикла. Разработанные в данном диссертационном исследовании методы и подходы могут быть применены также в биосинтетических процессах производства других высоковостребованных поликетидов, таких как аскомицин, зотаролимус, рапамицин. Особо стоит отметить примененную

диссертантом стратегию выделения образующегося такролимуса *in situ* путем его сорбции на полимерных носителях на этапе биосинтеза, существенно упрощающую последующую очистку с получением продукта фармацевтического качества.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов диссертации определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментов и подтверждается проведенной статистической обработкой полученных данных. В процессе выполнения диссертационной работы использован широкий арсенал микробиологических, биотехнологических, молекулярно-генетических, химических и аналитических методов.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Пошихонцевой В.Ю. изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц, иллюстрирована 43 рисунками. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения и основной части, включающей обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы. Список литературы содержит 274 источника, из них 9 – отечественных и 265 – зарубежных.

Во «**Введении**» обоснованы актуальность и значимость проблемы, степень ее изученности, сформулированы цели и задачи исследования, освещена научная новизна и практическая значимость работы. Представлена информация об опубликованных по теме диссертации работах автора (18 печатных работ, из них 7 – в журналах, входящих в перечень, рекомендованный ВАК, а также индексируемых в международных базах WoS и Scopus, 11 тезисов научных конференций, 1 Патент РФ).

«**Обзор литературы**» состоит из двух глав. В первой главе суммированы известные литературные данные о физиолого-

биохимических особенностях бактерий рода *Streptomyces*, и их применению в биотехнологии. Во второй главе анализируются известные литературные данные о биосинтезе такролимуса стрептомицетами. Глубоко анализируются пути биосинтеза такролимуса и его регуляции, связи биосинтеза такролимуса с первичным метаболизмом, известных методов получения такролимуса и способах, направленных на увеличение его продукции, освещены проблемы и сложности, связанные с селективным получением такролимуса.

Цели и задачи исследования логичны и обоснованы.

Экспериментальная часть состоит из двух глав – «Материалы и методы» и «Результаты и их обсуждение».

В главе «Материалы и методы» диссертантом подробно описаны методы исследования, использованные в работе, включая классические микробиологические методы, современные молекулярно-генетические, биотехнологические и аналитические методы.

Глава «Результаты и их обсуждение» включает несколько разделов. Первый раздел посвящен таксономическому описанию трех штаммов стрептомицетов, продуцирующих такролимус – *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, *Streptomyces* sp. Т60 и *Streptomyces tacrolimicus* ATCC 55098. Диссертантом оценены культурально-морфологические свойства трех продуцирующих такролимус штаммов, их физиолого-морфологические особенности, проведен филогенетический анализ. На основании полученных результатов штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 отнесены к виду *S. tsukubensis*. Проведено полногеномное секвенирование штамма Ас-2618Д, геном депонирован в GenBank. В геноме выявлен кластер из 26 генов, относящихся к биосинтезу такролимуса. Принадлежность штамма к виду *S. tsukubensis* убедительно подтверждена результатами ДНК-ДНК-гибридизации *in silico*.

Во втором разделе представлены результаты оценки способности указанных штаммов к биосинтезу такролимуса, показаны преимущества штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д как наиболее активного продуцента.

В третьем и четвертом разделах исследована фенотипическая изменчивость штамма, его диссоциация с образованием колониально различающихся вариантов. Несомненным достижением автора явилось обнаружение наиболее активного диссоцианта, определение условий его сохранения в стабильно активном состоянии.

Пятый раздел посвящен оптимизации условий биосинтеза такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Вероникой Юрьевой проведен большой объем работы, позволивший выявить оптимальные для роста и биосинтеза такролимуса условия, включая составы питательных сред, температурный режим, аэрацию, уровень pH, продолжительность этапов роста и биосинтеза.

Оценено влияние различных источников углерода, включая моно- и дисахара, декстрины и крахмалы различного происхождения и показано увеличение выхода такролимуса на крахмалсодержащих средах. Диссертантом успешно преодолены трудности, связанные с низкой стандартизуемостью картофельных крахмалов, изучено влияние структуры крахмалов на биосинтез такролимуса, предложены варианты, обеспечивающие высокий выход такролимуса при использовании низко- и высокомолекулярных крахмалов.

При оценке различных источников азота Вероникой Юрьевой выявлены преимущества использования кукурузного экстракта перед остальными комплексными источниками органического азота. Интересной находкой явилось обнаружение позитивного эффекта применения инактивированной дрожжевой биомассы в качестве компонента питательной среды при биосинтезе такролимуса. Вероника Юрьевна обнаружила, что не только пекарские дрожжи, но и другие низшие

эукариоты могут стимулировать биосинтез такролимуса, и при этом их эффект связан с составом клеточных стенок эукариотов.

Диссертантом успешно решена также проблема, связанная с деградацией такролимуса культурой продуцента. С целью ее устранения Вероника Юрьевна использовала прием, основанный на сорбции образующегося такролимуса на полимерных сорбентах. Этот подход позволил не только устранить деструкцию целевого продукта, но и облегчить его последующее выделение из культуральной жидкости.

В последнем разделе главы представлен материал по масштабированию процесса до уровня лабораторных биореакторов, разработке способов выделения и очистки с получением такролимуса фармакопейного качества. В результате проведенных исследований отработан режим ферментации, подобраны наиболее эффективные полимерные сорбенты на различных этапах очистки, разработана эффективная оригинальная технология очистки с получением такролимуса фармакопейного качества, позволяющая отделить целевой продукт от нежелательных побочных поликетидов сходной структуры.

Завершается диссертационное исследование «Заключением» и «Выводами».

Материал диссертации изложен подробно, последовательно и логично, хорошо структурирован. Выводы согласуются с поставленными задачами, обоснованы и логически следуют из полученных результатов.

Принципиальных замечаний по оформлению работы и ее содержания нет.

В качестве пожелания можно отметить целесообразность более глубокого исследования фенотипически наиболее отличных диссоциантов штамма-продуцента, возможно, с применением полногеномного секвенирования, что внесет вклад в понимание причин наблюдаемой диссоциации стрептомицетных продуцентов и различий их целевой активности.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, отражает суть проведенного исследования и включает в себя основные положения диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в качестве теоретической базы для получения новых штаммов-продуцентов такролимуса, обладающих улучшенными биосинтетическими свойствами, а также при разработке способов микробиологического получения других востребованных в медицинской практике поликетидов.

В практической перспективе штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и разработанная с его использованием биотехнология могут послужить основой для промышленного получения фармацевтической субстанции такролимуса по технологии полного цикла, в настоящее время отсутствующей в РФ.

Заключение

Диссертация Пошехонцевой Вероники Юрьевны «Биосинтез макроциклического поликетидов такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология) является самостоятельным, завершенным научным исследованием, выполненным на высоком научном уровне. В ходе работы получен активный штамм-продуцент такролимуса, на его основе разработан прототип технологии полного цикла для производства высоковольтребованной фармацевтической субстанции такролимуса.

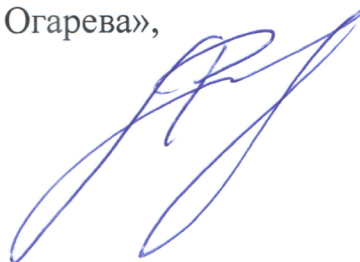
По своей актуальности, научной новизне и теоретико-практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, опубликованными в Постановлениях

Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Пошихонцева Вероника Юрьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии, протокол заседания №15 от «02» апреля 2021 г.

Декан Факультета биотехнологии и биологии,
Заведующий Кафедрой биотехнологии, биоинженерии
и биохимии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева»,
д.б.н., профессор
Виктор Васильевич

Ревин



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» Министерства науки и высшего образования,

Адрес: 430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевицкая, д. 68

Тел.: +7 (8342) 24-37-32

E-mail: dep-general@adm.mrsu.ru; dep-mail@adm.mrsu.ru

Web-сайт: <https://www.mrsu.ru>

