

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Пошихонцевой Вероники Юрьевны
«Биосинтез макроциклического поликететида такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*», представленную к защите на соискание учёной степени кандидата
биологических наук по специальности
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность избранной темы диссертации. Такролимус (FK-506) представляет собой макроциклический поликетид, образуемый представителями р. *Streptomyces*, среди которых максимальным уровнем продуктивности обладают штаммы вида *S. tsukubensis*. Наряду с другими известными макролидными антибиотиками и их производными он подавляет иммунный ответ *in vivo* и *in vitro* и служит действующим веществом лекарственных препаратов, применяемых в хирургии для предотвращения отторжения органов и тканей, в терапии кожных и аутоиммунных болезней. Клиническая значимость такролимуса как эффективного иммуносупрессорного агента обуславливает большой интерес к способам его синтеза, однако его биотехнологическое получение сталкивается с рядом препятствий, основными из которых являются низкий уровень и недостаточная стабильность биосинтетической активности у штаммов-продуцентов, их выраженная диссоциация, окислительная деградация целевого продукта на конечных этапах процесса и образование нежелательных побочных веществ.

В связи с этим, диссертационное исследование Пошихонцевой В.Ю., посвященное изучению новых микробных продуцентов и разработке на их основе эффективного способа биосинтеза такролимуса и путей его интенсификации, весьма актуально. Цель и задачи, поставленные в работе, соответствуют тенденциям развития современной биотехнологии, прикладной микробиологии и биомедицины.

Научная новизна. Идентифицированы два новых штамма, образующих такролимус – *Streptomyces tsukubensis* T60 и *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и показаны преимущества последнего в качестве продуцента. Расшифрован полный геном *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, в котором выявлен кластер биосинтеза такролимуса с полным набором генов. Установлен диссоциант штамма, обеспечивающий высокий уровень образования такролимуса, а также выявлены условия его поддержания в стабильно активном состоянии. Впервые обнаружен эффект стимуляции биосинтеза такролимуса клетками низших эукариотов (дрожжей и мицелиальных грибов). Впервые изучено влияние крахмалов различной структуры на продукцию такролимуса. Впервые показаны преимущества

бромированного стирол-дивинилбензольного сорбента в обеспечении повышения эффективности биосинтеза путем снижения нежелательной деструкции такролимуса, а также упрощения процедуры его выделения из ферментационной среды. Разработан оригинальный метод очистки такролимуса с получением кристаллического продукта, соответствующего требованиям современной фармакопеи. Новизна и оригинальность исследований подтверждена 1 патентом РФ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования генома штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д могут быть использованы для получения новых продуцентов с улучшенными биосинтетическими возможностями, а сам штамм и разработанная на его основе биотехнология могут использоваться для промышленного биосинтеза такролимуса по технологии полного цикла.

Предложенные автором методы и подходы могут быть применены при производстве других поликетидов (рапамицина, аскомицина и др.). Это относится к применению полимерных сорбентов стирол-дивинилбензольного ряда для предотвращения биodeградации и облегчения процедуры выделения целевых макролидов, а также к дизайну питательных сред, режимам ферментации, способам поддержания диссоциантов в стабильно активном состоянии и очистки целевых продуктов от близких структурных аналогов.

Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологических особенностей стрептомицетов, образующих макроциклические поликетиды и факторов, способствующих их максимальной продукции в ходе биосинтеза.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов обусловлена применением адекватных методов исследования и корректным статистическим анализом данных. Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на российских и международных конференциях. Материалы исследования представлены в 18 публикациях, из которых 7 статей в журналах, входящих в Перечень ВАК и реферативные базы РИНЦ, WoS и Scopus.

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, включает 18 таблиц и 43 рисунка. Библиография содержит 274 наименования.

Во **введении** обосновывается актуальность диссертационного исследования, характеризуется степень разработанности темы, формулируются цель и задачи работы, приводится новизна и значимость исследования для науки и практики, описывается степень достоверности и апробация полученных результатов.

В **обзоре литературы** (главы 1, 2) представлен анализ публикаций, посвященных особенностям и экологическому значению бактерий р. *Streptomyces*, а также микробному биосинтезу такролимуса и применению этого вещества в медицине.

В разделе «**Материалы и методы исследования**» (глава 3) подробно описываются среды и условия культивирования микроорганизмов, методы их идентификации, ход экспериментов по изучению влияния различных факторов на эффективность биосинтеза такролимуса. При выполнении работы соискателем использованы как классические методы микробиологии, так и современные биохимические, молекулярно-генетические, хемотаксономические и физические методы, а также применена статистическая обработка данных.

Раздел «**Результаты и обсуждение**» (глава 4) посвящен результатам собственных исследований автора и их обсуждению. В нем приводится описание штаммов стрептомицетов и на основании изучения фенотипических, биохимических, генотипических, хемотаксономических признаков и филогенетического анализа делается вывод об их принадлежности к виду *Streptomyces tsukubensis*. Дана оценка способности штаммов к биосинтезу такролимуса и исследовано влияние условий получения и хранения посевной культуры отобранного для дальнейшей работы штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на продукцию макролида. Основное место в разделе уделено оптимизации условий биосинтеза такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, а именно: изучено влияние температуры, рН среды, аэрации, различных по своей структуре источников углерода и азота, микроэлементов и аминокислот, присутствия низших грибов; исследованы способы предотвращения деградации такролимуса продуцентом с помощью полимерных сорбентов. Разработан способ получения такролимуса фармакопейной чистоты путем ферментации в оптимизированном режиме на оптимизированной среде с последующим выделением целевого продукта и несколькими стадиями его очистки.

В целом, результаты исследования свидетельствуют о большом объеме проделанной работы и отражают решение важной научно-практической задачи.

Заключение, выводы сформулированы четко, сомнений в их достоверности и правильности не возникает.

Диссертация и ее автореферат написаны хорошим литературным языком, последний адекватно отражает содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по работе нет. Оценивая в целом диссертацию Пошихонцевой В.Ю. положительно, как научное профессиональное исследование, демонстрирующее разностороннюю подготовку автора, хотелось бы сделать ряд замечаний по оформлению диссертации и задать несколько вопросов:

1. В названии работы штамм обозначен как *Streptomyces tsukubaensis*, в то время как далее по тексту используется видовое название *Streptomyces tsukubensis*. На рисунке 11 неточно указано видовое название штамма NRRL 18488(T) (*Streptomyces tsukubensis* вместо *Streptomyces tsukubaensis*).

2. Ссылки на литературные источники в тексте оформлены по-разному, иногда они перечисляются в алфавитном порядке (например, на стр. 14, 16, 22), иногда – в хронологическом (например, на стр. 23, 24), и в некоторых случаях – бессистемно (например, стр. 36, 74).

3. В таблице 8 температура криогенного хранения указана как 20 и 70°C вместо -20 и -70°C.

4. На рисунках 19, 33 и 37 показан выход биомассы такролимуса в присутствии дополнительных компонентов, в т.ч. в контроле. Однако ни в подрисуночных подписях, ни в сопровождающем рисунке тексте нет пояснений, что является контролем. Вероятно, это среда без внесения дополнительных компонентов.

5. В главе «Материалы и методы» (стр. 45) сказано, что было изучено влияние аминокислот L-метионина и L-лизина на биосинтез такролимуса. В дальнейшем обсуждается участие только L-лизина в процессе биосинтеза (стр. 96). Проводилось ли исследование влияния L-метионина и если оно проводилось, то в чем заключается это влияние?

6. При изучении влияния условий хранения, чем был обоснован выбор температуры криогенного хранения в -20 и -70°C, а концентрации глицерина как криопротектора в 5, 20 и 50%? (п. 4.4). Почему изучение срока хранения криогенной культуры было ограничено 180 сутками (6 мес.), хотя далее по тексту в числе преимуществ криогенной культуры указано, что ее активность сохраняется, по крайней мере, в течение 1 года?

7. Почему ни в тексте, ни на рисунке 37 нет конкретных данных по увеличению продукции такролимуса с помощью сорбента SP-207, а ведь именно он, а не сорбенты XAD, которым уделено основное внимание, был отобран для дальнейшей работы?

Возникшие вопросы и замечания носят уточняющий характер и не снижают общей оценки научной и практической ценности рецензируемой работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертационная работа Пошихонцевой Вероники Юрьевны «Биосинтез макроциклического поликетид такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне с использованием современных методов исследований, в которой представлено

решение важной научно-практической задачи разработки высокоэффективного биотехнологического способа получения клинически значимого макролида такролимуса.

По актуальности избранной темы, научной новизне полученных результатов, практической значимости, объему выполненной исследований и уровню внедрения полученных результатов, данная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., в редакции постановлений 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. И № 1168 от 01.10.2018 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Пошихонцева Вероника Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент, доктор
биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории биотехнологий
Уфимского Института биологии –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра
Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН)
Адрес: 450098, г. Уфа, проспект Октября, 69, лит. Е
Телефон/факс: (347) 235-62-47
E-mail: ib@anrb.ru



15 апреля 2021 г.

Подпись Коршуновой Т.Ю. заверяю

секретарь руководящего



Урабахтине А.А.