

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Пошихонцевой 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 бионанотехнология)

Актуальность темы

Такролимус относится к фармакологической группе иммунодепрессантов, подавляющих иммунный ответ. В связи с этим этот препарат востребован в хирургической практике для предотвращения отторжения трансплантата после пересадки, а также для лечения ряда заболеваний таких как атипичный дерматит (псориаз), аутоиммунные заболевания (красная волчанка, ревматоидный артрит), злокачественные опухоли и др. Широкое использование такролимуса определяется его высокой активностью и минимальными побочными эффектами. Такролимус является промышленно важным препаратом и входит в число 57 МНН стратегически значимых лекарственных соединений, определенных Минпромторгом и Минэкономразвития РФ, собственное производство которых должно быть обеспечено в РФ. Между тем в настоящее время потребности здравоохранения в препарате покрываются только за счет импортных поставок. В связи с этим тема диссертационной работы В.Ю. Пошихонцевой «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*», несомненно, является актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций базируется на тщательной проработке теоретических основ изучаемой проблемы и анализе собственных экспериментальных данных, включающем статистическую обработку. В работе представлены акт испытаний способа микробиологического синтеза такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, а также результаты успешного испытания разработанного микробиологического способа получения такролимуса при выращивании культуры в жидкой питательной среде как в колбах, так и в лабораторных ферментерах.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, значение полученных результатов для науки и практики

Диссертационная работа Пошихонцевой В.Ю. выполнена на хорошем методическом уровне с использованием современных методов, приборов и

биоинформационных программ. Эксперименты проводили в трех-пятикратной повторности, и их достоверность не вызывает сомнения. Результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке.

При выполнении диссертационной работы описаны и охарактеризованы два новых штамма стрептомицетов, продуцирующих такролимус – *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *S. tsukubensis* Т60, один из которых, ВКМ Ас-2618Д, показал наибольшую биосинтетическую активность. Подобраны условия культивирования продуцента, обеспечивающие максимальный выход продукта и сохранения его химической целостности.

- Диссертантом впервые обнаружен эффект стимуляции биосинтеза такролимуса клетками низших эукариотов (дрожжей и мицелиальных грибов).
- Новые данные получены также при изучении влияния различных крахмалов на биосинтез такролимуса, что особо важно с учетом низкой стандартизуемости крахмалов, используемых в биотехнологических производствах.
- Успешно решена проблема, связанная с частичной деградацией образующегося продукта в процессе культивирования стрептомицета, за счет применения на этапе ферментации полимерных сорбентов. Этот подход позволил упростить выделение такролимуса из культуральной среды и его последующую очистку.

Таким образом, на основании комплексного решения проблем на всех этапах исследования (улучшения свойств штамма, оптимизации условий роста, выявления благоприятных для максимальной продукции биосинтеза такролимуса условий, в сочетании с эффективным и оригинальным способом очистки) диссертанту удалось разработать, по сути, технологию полного цикла получения этого важного иммуносуппрессанта и получить кристаллический продукт высокой степени очистки по качественным показателям соответствующий требованиям современной фармакопеи.

Данные геномных исследований штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д могут быть применены для получения новых продуцентов, а предложенные в работе методы и подходы – в биосинтетических процессах производства других высоковостремленных поликетидов.

Выводы, сделанные Пошехонцевой В.Ю., полностью отражают полученные ею результаты и соответствуют целям и задачам диссертационной работы.

По материалам диссертации опубликовано 18 работ, из них 7 в журналах, рекомендованных ВАК РФ и входящих в реферативную базу РИНЦ, международные

реферативные базы WoS и Scopus, получен Патент РФ (№ 2722699). Результаты работы представлены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с действующими правилами ВАК РФ.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа Пошихонцевой Вероники Юрьевны изложена на 149 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы исследования и результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитированной литературы, который включает 274 источника, списка работ, опубликованных по теме и приложений. Диссертация содержит 18 таблиц, 43 рисунка, 2 приложения.

Материал диссертационной работы хорошо структурирован, изложен последовательно, логично, содержит информативные графики, диаграммы, иллюстрации и таблицы, написан хорошим языком, не содержит ошибок.

Во введении автор описывает существующую научную проблему, актуализирует тему исследования, обосновывает цель и основные направления ее реализации, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» разделен на две главы. Первая глава посвящена биологии бактерий рода *Streptomyces*, их экологическому значению и биотехнологическому применению. Во второй главе описывается современное состояние исследований в области биосинтеза такролимуса: применение в медицине, данные об известных продуцентах такролимуса, пути биосинтеза и его регуляция, выход такролимуса и побочные продукты биосинтеза.

В главе «Материалы и методы» диссертантом подробно представлены методы исследования (всего около 30 различных методов), использованные в работе: современные микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические, физико-химические и биотехнологические.

В главе «Результаты и их обсуждение» первый раздел посвящен таксономическому изучению штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 и их способности к продукции такролимуса в сравнении с типовым штаммом-продуцентом *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T. По хемотаксономическим и молекулярно-генетическим исследованиям штаммы ВКМ Ас-2618Д и Т60 идентичны *S. tsukubensis* NRRL 18488^T. У более активного штамма ВКМ Ас-2618Д расшифрован полный геном и обнаружен кластер из 26 генов биосинтеза такролимуса.

Кроме того, из четырех диссоциантов, образующихся при росте культуры *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на твердых средах отобран наиболее активный по способности продуцировать такролимус вариант, подобраны условия способствующие минимизации фенотипической диссоциации и поддержанию данного морфологического типа в стабильно-активном состоянии.

Последующие разделы «Результатов и их обсуждения» посвящены подбору условий, благоприятных для роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и биосинтеза такролимуса: оптимизации температурного режима, режима аэрации, pH, состава питательных сред. Особо стоит отметить результаты, полученные при изучении влияния высоко- и низкомолекулярных крахмалов различной структуры, а также – эффекта стимуляции биосинтеза такролимуса в присутствии в среде клеток дрожжей и некоторых грибов. Подобные исследования ранее не проводились.

Несомненной удачей работы является эффективное решение проблемы частичной деградации такролимуса в процессе культивирования продуцента – использование в качестве сорбента полимерных смол, которые не только сохраняют химическую целостность макролида, но облегчают последующую его экстракцию из культуральной среды.

В последних разделах главы представлен материал по эффективности применения разработанного способа микробиологического синтеза такролимуса в лабораторных биореакторах и разработке метода выделения и очистки субстанции такролимуса до фармакопейной чистоты 99,8% с выходом целевого продукта более 50%.

Завершается диссертационное исследование «Заключением» и «Выводами».

Диссертация Пошихонцевой В.Ю. производит очень хорошее впечатление. Прodelана большая, тщательно спланированная, кропотливая и трудоемкая работа, получены интересные и важные в биотехнологическом плане результаты.

Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней»

По актуальности, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверности и новизне диссертационная работа и автореферат Пошихонцевой В.Ю. «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Цели и задачи диссертационной работы, определенные Пошихонцевой В.Ю., решены методически корректно и научно обоснованы. Диссертация имеет важное

научное и практическое значение. Сделан весомый вклад в область разработки новых эффективных способов получения высококачественного препарата такролимуса.

Автореферат изложен на 24 страницах и полностью соответствует содержанию самой диссертации. Выводы в автореферате и диссертации идентичны.

Замечания.

1. При описании культуральных свойств исследуемых стрептомицетов не указан характер роста культуры в жидкой среде, в виде пеллет или мицелиальной сети, что может отражаться на продуктивности штаммов.
2. Добавление в жидкую среду гранул сорбента и инактивированных клеток дрожжей может способствовать росту культуры стрептомицета в виде биопленок и, соответственно, повышать продуктивность такролимуса. Проводились ли исследования в этой связи?

Заключение

Диссертационная работа Пошихонцевой В.Ю. «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*» является законченной научно-квалификационной работой, которая по актуальности темы, адекватности использованных методов, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов соответствует требованиям ВАК РФ 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 диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Пошихонцева Вероника Юрьевна заслуживает присвоения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Потехина Наталья Викторовна
д.б.н. вед.н.с. кафедры микробиологии
биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1,
стр. 12, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Биологический факультет.

Тел.: 8(495) 939 56 01, 8 963 921 26 07

e-mail: potekhina56@mail.ru

Воронцов Р.В. д.б.н. Потехина Н.В.
д.б.н. биол. ф-та МГУ, академик
М.В. Карпачев



17