

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «САРАТОВСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ СЦ РАН)

ул. Рабочая, 24, г. Саратов, 410028

Тел./факс (845-2) 23-45-10, 27-14-36. E-mail: sncransar@san.ru, www.sncran.ru

№ 17800/-187 от 30.10.2023
на _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора ФИЦ СЦ РАН,
д.т.н., профессор
В.А. Кушников

«30» октября 2023 г.

Отзыв

ведущей организации на диссертационную работу Лучниковой Натальи Алексеевны «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*», представленной на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология

Актуальность темы диссертации. На фоне дефицита высокоэффективных лекарственных средств для лечения социально значимых заболеваний чрезвычайно актуален поиск новых соединений с выраженной фармакологической активностью. Для этих целей перспективно использование растительных пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда. Интерес исследователей к данной группе соединений обусловлен их широкой доступностью и разнообразным спектром проявляемой биологической активности. Однако химическая трансформация тритерпеноидов, молекулы которых характеризуются повышенной степенью гидрофобности, сопряжена с рядом существенных недостатков – реакции протекают при агрессивных значениях pH, высокой температуре, как правило, с использованием дорогостоящих катализаторов. Для получения новых производных с выраженной активностью и повышенной биодоступностью перспективно использование биокатализа, открывающего возможность получать целевые продукты окисления с высоким уровнем хемо- и стереоселективности в нормальных условиях среды. Описанные на настоящий момент процессы биологической трансформации тритерпеноидов пока имеют значительные ограничения: низкий уровень конверсии, низкая концентрация исходного соединения, патогенность использованных микробных трансформаторов. В связи с этим диссертационная работа Лучниковой Н.А., направленная на изучение возможности биотрансформации пентациклических тритерпеноидов на

примере олеаноловой и глицирретовой кислот с целью получения новых биологически активных соединений, несомненно, является своевременной и актуальной. В качестве потенциальных биотрансформаторов выбрана одна из наиболее разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов – актиномицеты рода *Rhodococcus* (класс *Actinomycetes*, порядок *Mycobacteriales*, семейство *Nocardiaceae*) обладающие высокой катаболической активностью в отношении широкого ряда сложных гидрофобных соединений.

Научная новизна, достоверность научных положений и выводов. Научная новизна диссертации не вызывает сомнений. Автором впервые показана способность актиномицетов рода *Rhodococcus* к окислительной биотрансформации пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда – олеаноловой и глицирретовой кислот. На основании обширного скрининга коллекционных штаммов актиномицетов отобраны штаммы с наибольшей каталитической активностью в отношении тритерпеноидов. Выявлены наиболее типичные адаптивные реакции родококков на присутствие тритерпеновых кислот. С использованием суспензий нерастущих клеток *R. rhodochrous* подобраны условия, обеспечивающие полную биоконверсию олеаноловой и глицирретовой кислот в высоких (1,0 г/л) концентрациях. Полученные метаболиты олеаноловой и глицирретовой кислот идентифицированы как 3-оксопроизводные. Документированы новые реакции C5 гидроксирования и C23 карбоксилирования молекулы олеаноловой кислоты с образованием ранее неопisanного полиоксигенированного метаболита – 3 β ,5 α ,22 α -тригидроксиолеан-12-ен-23,28-диовой (5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой) кислоты. Определена потенциальная противоопухолевая, антиоксидантная и противовоспалительная активность полученных метаболитов. Способом *in vitro* обнаружена антибактериальная активность 3-оксо-олеаноловой и 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислот. Подтверждено участие мембранно-связанных ферментных комплексов в процессе окислительной биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот. Составлен Каталог генов, ответственных за образование ферментов семейства CYP450, участвующих в процессе биоконверсии тритерпеноидов.

Достоверность научных положений и выводов работы не вызывает сомнений. Диссертационная работа представляет собой комплексное исследование, основанное на использовании классических микробиологических и современных аналитических (высокоточная респирометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ), микроскопических (атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, рентгеновская спектроскопия), молекулярно-генетических (секвенирование нового поколения, ПЦР в реальном времени) и биоинформатических методов. Достоверность результатов подтверждается не только комплексным характером диссертационной работы, но и числом экспериментов, проведенных на отдельных этапах исследования, а также соответствующей адекватной статистической обработкой фактических данных.

Обоснованность научных результатов доказана достаточно репрезентативной группой исследованных объектов. Научные положения и выводы работы основаны на изучении большого числа фундаментальных и прикладных работ отечественных и зарубежных авторов. Полученные результаты систематизированы и сопоставлены с

известными опубликованными данными других исследователей. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и согласуются с основными результатами проведенного исследования.

Анализ структуры и содержания диссертации, ее завершенность. Диссертация Лучниковой Н.А. носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, пяти глав собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 210 источников, в том числе 9 отечественных и 201 зарубежных авторов. Работа изложена на 176 страницах, содержит 18 таблиц и 58 рисунков.

Во «Введении» соискатель обосновывает актуальность изучаемой проблемы, излагает план собственного исследования, включающий цель и задачи исследования, научные положения, обозначает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, апробацию результатов и связь с научными программами, отмечает исследования, проведенные совместно с коллегами из других учреждений.

Глава «Обзор литературы», состоящая из пяти разделов, содержит основную информацию о распространении пентациклических тритерпеноидов, их биосинтезе и биологической активности, а также процессах биотрансформации тритерпеноидов с использованием грибов и бактерий. Кроме того, автор дает описание генетических, морфологических и физиологических особенностей актиномицетов, указывающих на перспективность использования данной группы бактерий в процессах биотрансформации сложных органических соединений, в том числе пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда. Следует отметить цитирование в тексте значительного количества современных литературных источников и новейших данных, датированных 2015–2022 гг., что подчеркивает исключительную актуальность и повышенную концентрацию внимания мирового научного сообщества на исследовании возможности получения фармакологически значимых соединений на основе растительных терпеноидов. Поскольку большая часть литературных источников представлена зарубежными публикациями, несомненна важность проведенных Лучниковой Н.А. исследований для российской науки.

Глава «Материалы и методы» написана достаточно подробно. Автором приведена детальная информация по использованным в работе бактериальным штаммам (свойства, место, источник выделения), реагентам, методикам и статистической обработке данных. Описание методик сопровождается ссылками на первоисточники, указана использованная материально-техническая база.

Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в последующих пяти главах. В третьей главе представлены данные по определению коллекционных штаммов, способных использовать олеаноловую и глицирретовую кислоты в качестве единственного источника углерода, а также изучению особенностей роста и проявления трансформирующей активности родококков в отношении высоких (1,0 г/л) концентраций тритерпеноидов.

В четвертой главе представлены данные по изучению влияния олеаноловой и глицирретовой кислот на морфометрические и интегральные физико-химические особенности родококков. Механизмы адаптации бактерий выражены комплексными перестройками: от изменения морфометрических показателей и рельефа клеток до

образования клеточных агрегатов и синтеза и аккумуляции резервных энергетических веществ.

В пятой главе представлены результаты подбора оптимальных условий конверсии тритерпеноидов. С целью оптимизации процесса биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот использованы приемы адсорбционной иммобилизации бактериальных клеток и использования суспензий нерастущих клеток. По результатам проведенных исследований, использование суспензий нерастущих клеток обеспечивает полную биоконверсию тритерпеноидов в течение 1–3 сут.

Шестая глава посвящена идентификации метаболитов и определению их биологической активности. Основные полученные метаболиты представляют собой 3-оксопроизводные исходных кислот. Особенно стоит отметить, что биотрансформация олеаноловой кислоты сопровождается образованием нового соединения – 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты. Выявленные метаболиты характеризуются антибактериальной активностью, по данным *in silico* – менее токсичны по сравнению с исходными кислотами и перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых, антиоксидантных и противовоспалительных агентов. Кроме того, *in vitro* обнаружена антибактериальная активность 3-оксо-олеаноловой и 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислот.

В седьмой главе представлены данные по определению ферментных систем, участвующих в процессах биотрансформации тритерпеноидов, и кодирующих их генов. Полученные результаты представляют особый научный интерес, поскольку в научной литературе наблюдается явный недостаток информации о микробных ферментах, ответственных за конверсию тритерпеноидов. В результате молекулярно-генетических и биоинформатических исследований проведен подробный анализ генома штаммов-биотрансформаторов, определена локализация целевых ферментных систем и составлен Каталог генов, кодирующих ферменты семейства CYP450.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций. Результаты диссертационной работы способствуют расширению и детализации первоначального представления о биокаталитическом потенциале родококков и их возможном использовании для трансформации пентациклических тритерпеноидов с целью получения биологически активных соединений. Полученные экспериментальные данные могут послужить основой для разработки высокоэффективных биотехнологических способов биосинтеза новых фармакологически значимых соединений.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научной печати. Основные результаты диссертационного исследования отражены в виде 10 публикаций, в том числе в изданиях, входящих в утвержденный ВАК РФ перечень рецензируемых научных изданий (Микробиология), и в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Web of Science и Scopus (Molecules, Catalysts, Pharmaceuticals). Подана заявка на получение патента на изобретение РФ «Способ получения 5 α ,22 α -дигидроксигипсогеновой кислоты с использованием клеток *Rhodococcus rhodochrous*».

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы. Диссертационная работа Лучниковой Н.А. носит логически последовательный и завершённый характер, написана хорошим литературным языком. Представленный материал хорошо структурирован в виде таблиц, графиков и рисунков, что позволяет ориентироваться в массиве полученных экспериментальных данных. Исчерпывающий обзор литературы, включающий новейшие литературные сведения, и проведенный критический анализ современных исследований по теме диссертации указывает на высокую степень проработанности соискателем текущего состояния данной проблемы. Сочетанное использование современных методов исследований, большой объем проведенных экспериментов, результаты статистической обработки полученных данных подтверждают достоверность и обоснованность представленных научных сведений.

Полученные Н.А. Лучниковой новые данные о процессах биотрансформации олеаноловой и глицирретовой кислот перспективны для широкого использования в технологиях получения новых эффективных лекарственных средств.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. **При прочтении диссертации возник вопрос.** По мнению диссертанта, не усложнит ли биотехнологический процесс получения целевых биоактивных производных выявленная способность бактериальных трансформаторов к выраженной агрегации клеток в присутствии тритерпеноидов?

Заключение. Диссертация Лучниковой Н.А. «Трансформация пентациклических тритерпеноидов олеананового ряда с использованием актиномицетов рода *Rhodococcus*» является завершённой научно-квалификационной работой и соответствует п. 5 «Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов» Паспорта научной специальности 1.5.11. Микробиология. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений, научно-практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9–14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (с изменениями и дополнениями в редакции № 1539 от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Лучникова Н.А. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология.

Отзыв подготовила
доктор биологических наук, профессор
ведущий научный сотрудник

лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН


_____ Турковская Ольга Викторовна

Диссертационная работа и автореферат обсуждены, отзыв заслушан и одобрен на заседании лаборатории экологической биотехнологии с привлечением сотрудников

лабораторий микробиологии и иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (протокол № 6 от 23 октября 2023 г.).

Подпись Турковской Ольги Викторовны заверяю

Ученый секретарь ФИЦ СЦ РАН к.б.н.



О.Г. Селиванова

Адрес ведущей организации:

Российская Федерация, 410028, Саратовская обл., г. Саратов, ул. Рабочая, 24.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СЦ РАН).

Тел.: +7 (8452) 27-14-36, +7 (8452) 23-45-10. Факс: +7 (845-2)274510.

E-mail: sncransar@san.ru sncransar@yandex.ru. Официальный сайт: <http://СНЦРАН.рф>.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН).

Российская Федерация, 410049, Саратовская обл., г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13.

Тел.: +7 (8452) 97-04-44, +7 (8452) 97-04-03. E-mail: mail@ibppm.ru.

Официальный сайт: <http://ibppm.ru>.