

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, директора по инновациям в биотехнологии Публичного Акционерного Общества «Институт стволовых клеток человека», Красильникова Игоря Викторовича на диссертационную работу Кузнецова Дениса Бахтиеровича на тему: «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертационного исследования

Одной из актуальных проблем в биотехнологической и биофармацевтической отрасли в настоящее время является поиск путей оптимизации «upstream process» для повышения эффективности производства. В соответствии с требованиями GMP «Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance» изготовление продукции и её качество обеспечивается за счёт разработки эффективных и действенных производственных процессов. Процессы должны быть основаны на механистическом понимании влияния факторов на характеристики продукта. В связи с этим применение современных физических, физико-химических и математических методов для установления основных звеньев механизма и получения предиктивных моделей, обеспечивающих надлежащее механистическое понимание влияния переменных на процесс, является первоочередной задачей. В связи с этим диссертационная работа Кузнецова Дениса Бахтиеровича «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов» является актуальной и оригинальной, имеет важное практическое значение для биотехнологической и биофармацевтической отраслей.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проведенного Кузнецовым Д.Б. диссертационного исследования разработан оригинальный метод повышения выхода биомассы с помощью микроволнового облучения, основанный на обработке культуры с однородной плотностью потока мощности на частоте $36,84\div 37,04$ ГГц в режиме непрерывной генерации, продолжительностью 25 ± 5 мин, концентрацией, при которой необходимо проводить облучение 1200 ± 240 млн кл/мл, температуре 37 ± 1 °С. Использование этого метода в процессах изготовления маточной и реакторной культуры в совокупности является перспективной технологией оптимизации *upstream process*.

Диссертантом впервые разработан эффективный метод восстановления индикаторных свойств цельноклеточного биосенсора на основе *E. coli* с *lux*-опероном после длительного хранения и продемонстрирована его работоспособность в способе определения антагонистической активности пробиотиков. Данный способ был разработан на основе изучения реакции люминесценции биосенсора при воздействии на него электромагнитным излучением различных параметров.

Впервые автором изучено влияние микроволновой интенсификации на продукцию рекомбинантных белков и установлено, что оптимальные параметры облучения не приводят к потере плазмиды и снижению их биосинтеза.

Впервые в исследовании диссертант с использованием методов математического планирования и оптимизации условий проведения эксперимента определил параметры продолжительности облучения и концентрации клеток, при которых культивирование штамма *E. coli* является наиболее эффективным для увеличения прироста биомассы и продукции целевого белка.

Важным результатом является то, что автором экспериментально были получены данные, которые после проведения математической обработки

позволили выявить прогнозирующие переменные, которые в будущем способны предсказывать биотехнологические эффекты с помощью компьютерного моделирования. Впервые представлено теоретическое обоснование механизмов влияния электромагнитного излучения на метаболическую активность, бактериальную люминесценцию и ростовые характеристики бактериальной культуры на основе изученных физико-химических процессов, протекающих при микроволновой обработке питательной среды и штаммов *E. coli*.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационной работы Кузнецова Д.Б. обусловлена большим объемом результатов экспериментальных исследований, использованием современных биологических физических и физико-химических методов испытаний, в том числе сканирующая атомно-силовая микроскопия, ядерная магнитно-резонансная релаксометрия, корректной статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту, в полной мере аргументированы. Выводы научно обоснованы, подтверждены результатами экспериментальных данных и соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационного исследования Кузнецова Д.Б. состоит в том, что разработанная научная концепция об основных звеньях механизма влияния микроволнового облучения на биологические эффекты при СВЧ-облучении с использованием теоретического аппарата физики и химии поверхности позволяет интерпретировать результаты СВЧ-обработки

на молекулярном уровне. Благодаря этому, повышается глубина понимания взаимодействия микроволнового излучения с живой материей через электрохимические процессы, а полученные знания могут быть в будущем консолидированы с вычислительными методами моделирования для исследований *in silico* и прогнозирования требуемого биотехнологического эффекта.

Предложенные научные гипотезы, в соответствии с которыми процессы изменения подвижности протонов на интерфейсах клеток, индуцированные СВЧ-излучением, приводят к сложным каскадным реакциям, оказывающим влияние на биологические параметры культуры бактерий, являются новаторскими.

Разработанный автором метод восстановления индикаторных свойств цельноклеточных биосенсоров может быть использован фармацевтическими предприятиями для оценки антагонистической активности пробиотических штаммов.

Разработанный метод повышения концентрации при культивировании *E. coli*, который позволяет увеличить прирост биомассы *E. coli* K12 TG1 до 64% и *E. coli* LEGM-18 до 81% и теоретические основы промышленной технологии, могут найти применение во многих биотехнологических производствах для повышения их эффективности.

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс в рамках курса «биотехнология» в ФГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 01.07.2022).

Результаты исследования и разработанный метод восстановления/усиления индикаторных свойств рекомбинантного штамма *E. coli* внедрен в работу АО «НПО Микроген» филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед».

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Полученные автором результаты представлены в открытой печати в достаточном объеме: 10 статей в рецензируемых изданиях, 4 статьи – в других изданиях, 4 тезиса – в материалах конференций.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Автор поставил цель и сформулировал задачи в рамках диссертационной работы. Автором проведен анализ зарубежной и отечественной литературы и нормативных требований для внедрения новых технологических процессов в биотехнологическое производство. Автор разработал дизайны экспериментов, непосредственно принимал участие на всех этапах экспериментальной работы, разработал методы повышения выхода биомассы и восстановления индикаторных свойств цельноклеточных биосенсоров, осуществил обобщение всех экспериментальных данных, провел статистическую обработку результатов, осуществил интерпретацию результатов исследования, сделал обоснованные выводы.

Автором выполнена подготовка статей к публикации, написание глав диссертационной работы. Кузнецов Денис Бахтиерович лично участвовал в апробации результатов исследования.

Оценка содержания, завершённости и оформления диссертации

Структура диссертационной работы Кузнецова Д.Б. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы, включающего 201 источник.

Материалы диссертационной работы изложены на 117 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 13 таблицами и 35 рисунками.

В разделе «Введение» автор представляет актуальность темы, формулирует цель и задачи работы, а также научную новизну. В ходе исследования использован комплекс современных биологических, биотехнологических, физических и физико-химических методов испытаний, в том числе абсорбционная спектроскопия, рефрактометрия, сканирующая атомно-силовая микроскопия и ядерная магнитно-резонансная релаксометрия. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, и обоснована достоверность полученных результатов. Диссертант лично принимал активное участие на всех этапах экспериментального исследования, систематизировал полученные данные.

В первой главе «Обзор литературы» автором проанализирована номенклатура различных продуктов, в т.ч. лекарственных средств, которые получают при культивировании штаммов *E. coli* и имеют высокое клиническое значение в терапии ряда заболеваний. Также приводится информация о цельноклеточных биосенсорах и современном состоянии развития технологий электромагнитного облучения культур микроорганизмов, в том числе известные способы и устройства, обнаруженные эффекты и возможные механизмы, лежащие в их основе.

Раздел «Результаты собственных исследований» включает две главы.

Во второй главе автор описывает методы облучения и устройства для их осуществления, эффекты обработки микроволновым излучением питательной среды, его влияние на ростовые характеристики различных производственных штаммов *Lactobacillus*, данные сканирующей атомно-силовой микроскопии, биолюминесцентного тестирования, приведен метод восстановления индикаторных свойств цельноклеточного биосенсора.

В третьей главе представлена разработка технологии интенсификации роста культуры *E. coli*. Приведены данные по исследованию параметров накопления биомассы штаммов *E. coli* и продукции ею рекомбинантных

белков, данные ядерной магнитно-резонансной релаксометрии, результаты полного факторного эксперимента, построена карта уровня прироста биомассы в зависимости от переменных и построены профили для предсказанных значений переменных. Приведено описание технологии получения биомассы, включающей совокупность методов пассирования штамма, получение маточной культуры и технологию получения реакторной культуры, в которые интегрируется метод СВЧ-облучения, приведена блок-схема концепта биореактора и технологическая схема.

В разделе «Заключение» автор анализирует полученные данные, сопоставляя с известными данными, подчеркивая актуальность и практическую значимость разработки технологии микроволновой интенсификации роста бактериальных культур.

Выводы диссертационной работы достоверны, убедительны, соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат диссертационного исследования Кузнецова Д.Б. отражает содержание, результаты и выводы работы в полном объеме, соответствуют тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, объектам исследования, основным положениям и выводам, сформулированным автором, диссертация полностью соответствует специальности 1.5.6. – биотехнология.

Необходимо отметить, что диссертационная работа Д.Б. Кузнецова выполнена на высоком методическом уровне с применением современных биологических, физических, физико-химических и математических методов. Следует отметить логическую последовательность изложения результатов. Единственное замечание при чтении диссертации заключается в оформлении

рисунка 29. Диссертант привел подписи вертикальных осей рядом с кривыми, которые к ним принадлежат, что с одной стороны упрощает восприятие, но с другой стороны является нестандартным в подписании шкал. Это единственное замечание по оформлению работы, которое никак не снижает научной и практической ценности работы.

Замечания и пожелания:

В диссертационной работе приводится оценка влияния на продукцию рекомбинантных белков с помощью биолюминесцентного тестирования. Однако автор раскрывает почему выбран данный метод, однако возможно следовало использовать стандартные методы по идентификации и его количественного определения.

Однако следует отметить, что указанные выше замечания не принципиальны и не снижают высокого уровня диссертационной работы Д.Б. Кузнецова, которая является самостоятельным законченным научным исследованием, результаты которого имеют практическую значимость.

Заключение

Диссертационная работа Кузнецова Денис Бахтиеровича на тему «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология, выполненная под руководством доктора медицинских наук Миронова Андрея Юрьевича, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы, имеющей важное значение для повышения эффективности биотехнологических предприятий.

Диссертационная работа Кузнецова Дениса Бахтиеровича по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации «842 от 24 сентября

2013 года (с редакции Постановлений Правительства Российской Федерации (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016, № 748 от 02 августа 2016, № 650 от 29 мая 2017, № 1024 от 28 августа 2017, № 1168 от 01 октября 2018, № 426 от 20 марта 2021, № 1539 от 11 сентября 2021, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26 мая 2020), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Кузнецов Денис Бахтиерович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6. – биотехнология.

Официальный оппонент:

Директор по инновациям в биотехнологии
Публичного Акционерного Общества
«Институт стволовых клеток человека»
(119333, г. Москва, ул. Губкина, дом 3, стр. 2,
Телефон: +7 (495) 646-80-76 (доб. 185), e-mail: kiv06@mail.ru)

доктор биологических наук

22.12.2022.



Игорь Игорь Викторович Красильников

Подпись И.В. Красильникова заверяю:

Директор по науке
Публичного Акционерного Общества
«Институт стволовых клеток человека»
(119333, г. Москва, ул. Губкина, дом 3, стр. 2,
Телефон: +7 (495) 646-80-76 (доб. 185), e-mail: frolova@nextgene.ru)

кандидат медицинских наук



М.Е. Мария Евгеньевна Фролова