

До разової спеціалізованої ради ДФ 35.051.130
Львівського національного університету
імені Івана Франка
м. Львів, вул. Університетська, 1

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Пороннік Оксани Олександрівни

*на дисертаційну роботу Тістечка Степана Івановича на тему
«АКТИНОМІЦЕТИ РИЗОСФЕРИ ЯЛІВЦЮ ВИСОКОГО JUNIPERUS EXCELSA
M.-ВІЕВ.: ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ТА БІОСИНТЕТИЧНІ
ВЛАСТИВОСТІ», представлену на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»*

Актуальність теми дисертаційного дослідження

Сьогодні, спостерігають стрімкий розвиток мультирезистентності у патогених мікроорганізмів (англ. Multidrug resistance (MDR)), що представляє серйозну загрозу для здоров'я людини. Найперспективнішим способом вирішення цієї проблеми є впровадження нових антимикробних препаратів. Це в свою чергу зумовлює підвищений інтерес до скринінгу нових природних біоактивних сполук. Людство давно визнало, що мікроорганізми є багатим джерелом сполук з широким спектром терапевтичної дії. Їхні еволюційно відібрані, надзвичайно різноманітні та складні хімічні структури мають більші шанси на біологічну активність, ніж сполуки, отримані шляхом комбінаторного біосинтезу. На сьогодні більше половини комерційних препаратів мають природне походження або розроблені на основі природних сполук.

Бактерії класу *Actinomycetia*, добре відомі своєю здатністю продукувати широкий спектр біоактивних сполук. Приблизно дві третини всіх відомих сьогодні антибіотиків продукують актиноміцети, переважно представники роду *Streptomyces*. Проте, виділення та впровадження нових сполук значно сповільнилося. Труднощі з впровадженням нових антибіотиків пояснюють значним повторним відкриттям раніше описаних сполук, особливо серед стрептоміцетів. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є дослідження нових і недостатньо вивчених середовищ існування мікроорганізмів.

Перспективною для скринінгу нових природних біоактивних сполук є вузька зона субтропиків середземноморського типу на чорноморському узбережжі Кримського півострова. Значна варіабельність мікрокліматичних умов, велике різноманіття рослинних угруповань із значною кількістю рідкісних і ендемічних рослин сприяло формуванню великого мікробного різноманіття. Однією з таких рослин є ялівець високий (*Juniperus excelsa* M-Bieb.), який, за даними Червоної книги України, віднесений до вразливих видів.

Попередні дослідження окремих штамів актиноміцетів, ізольованих із ризосфери рослин Кримського півострова, продемонстрували їхній потенціал, як продуцентів нових біологічно активних сполук. У цій роботі ми зосередилися на вивченні колекції актиноміцетів, виділених із ризосфери *J. excelsa*. Лікарські властивості цього виду, а також особливості мікрокліматичних умов, можуть формувати особливе угруповання актиноміцетів, філогенетична характеристика якого дозволить з великою вірогідністю виявити рідкісні роди.

Передбачалося, що всебічне дослідження біологічних властивостей ізолятів, головно спектру їхніх вторинних метаболітів, відкриє перспективи до виявлення продуцентів нових природних сполук. Отримані дані дозволять сформуванню уявлення про різноманіття та біосинтетичний потенціал актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова, а також сформуванню колекцію штамів актиноміцетів – продуцентів антибіотиків, перспективних для розвитку мікробних біотехнологій в Україні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційну роботу виконано на базі структурного підрозділу Колекція культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків (ККМПА), що функціонує при кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка, в межах держбюджетних тем Бг-203Н “Колекція культур мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка” (№ держреєстрації 0103U008453, договір №Н/309-2003 від 20.04.2015), Бг-41Нр “Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами” (№ державної реєстрації 0116U008070, 2016-2018 рр.), Бг-09Ф “Мутації стійкості актинобактерій до антибіотиків: джерело нових уявлень про механізми резистентності та біотехнологічних знарядь” (№ державної реєстрації 0120U102039, 2020-2022 рр.). Частина досліджень виконано під час наукового стажування на кафедрі фармацевтичної біотехнології Саарландського

університету (Німеччина, 2018, 2019-2021 рр.) за індивідуальними грантами FEMS (FEMS-GO-2017-001) та DAAD (№57440918).

Новизна наукових досліджень та їхня значущість для науки

Вперше проведено комплексний аналіз філогенетичного різноманіття та біосинтетичного потенціалу актиноміцетів ризосфери *J. excelsa* на території Кримського півострова. Встановлено таксономічне положення 372 ізолятів актиноміцетів, які представлені 11 родами (*Actinoplanes*, *Actinorectispora*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* та *Streptomyces*). Визначено їхню здатність продукувати антимікробні сполуки проти спектру тест-культур. Досліджено їхні фітостимулювальні властивості. Вперше використано мікробний біосенсор *S. lividans* ТК24 рМО16 для скринінгу продуцентів тіопептидних антибіотиків серед природних ізолятів актиноміцетів. В результаті чого вперше на території Кримського півострова виділено продуцентів тіопептидних антибіотиків берніаміцинів – *Streptomyces* sp. Je 1-79 та Je 1-613. Ідентифіковано, очищено та встановлено хімічну структуру двох нових нафтохінонвмісних антибіотиків фурахіноцинів К та L, які продукує штам *Streptomyces* sp. Je 1-369. В структурі фурахіноцину L виявлено дуже рідкісний, серед природних сполук фрагмент ацетилгідразону. Виявлено перший, і поки єдиний, фурахіноцин із антимікробною активністю. Запропоновано ймовірний шлях біосинтезу нових фурахіноцинів К та L.

Практичне значення отриманих результатів

Отримані результати демонструють потенціал природних ізолятів актиноміцетів ризосфери *J. excelsa*, як продуцентів широкого спектру біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків. У дослідженій колекції природних ізолятів актиноміцетів виявлено продуцентів промислово важливих антибіотиків антиміцинів та спіраміцинів, а також стамбоміцинів, десерторміцину А, берніаміцинів та лідикаміцинів, що підтверджено двома патентами України на винахід. Ідентифіковані в роботі нові антибіотики фурахіноцини, мають практичне та фундаментальне значення. Крім антибіотичної активності у структурі фурахіноцину L міститься рідкісний фрагмент ацетилгідразону, поки не відомо які гени беруть участь у його формуванні. Таким чином, продуцент цих антибіотиків може стати платформою для з'ясування принципів формування гідразоновмісних природних сполук. Створена в ході роботи колекція продуцентів антибіотиків

може бути платформою для формування повного циклу виробництва антибіотиків в Україні, що сприятиме зміцненню безпеки у сфері охорони здоров'я. Нуклеотидні послідовності окремих генів та цілих геномів актиноміцетів, отриманих в цій роботі, зареєстровані в міжнародних базах даних (зокрема, GenBank) та є доступними для досліджень науковими групами всього світу.

Обсяг і структура дисертації

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 204 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 39 рисунками та 7 таблицями. Список літератури включає 265 найменувань.

Повнота викладу результатів дисертаційної роботи та наукових положень в наукових публікаціях за темою дисертації

За матеріалами дисертації опубліковано 8 статей: 4 статті у міжнародних виданнях, які входять до баз даних Scopus та Web of Science, (2 статті кuartиль Q1, 1 стаття кuartиль Q2, 1 стаття Q3), 1 стаття, що входить до бази даних Scopus, фахове видання України, категорія А, і 3 статті в фахових виданнях України, категорії Б. Також отримано 2 патенти України на винахід, видано 9 матеріалів і тез доповідей на закордонних, міжнародних і вітчизняних наукових конференціях, форумах та симпозіумах.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності

У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертанта. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

Пропозиції та зауваження до дисертаційної роботи

Принципових недоліків у дисертаційній роботі Тістечка Степана Івановича не виявлено. Однак, є окремі уточнюючі питання:

1. Чим обумовлений вибір саме кримського регіону для пошуку нових мікроорганізмів порівняно з іншими регіонами?
2. Чи планує пошукач в подальшому вивчати штами ризосферних мікроорганізмів з екстремальних умов існування?

3. Чи можливе створення комплексних препаратів для захисту рослин з кількох нових штамів мікроорганізмів, відкритих пошукачем?
4. Чи визначали цитотоксичність виявлених нових речовин (фурахіноцинів К та L) на нормальних клітинах, наприклад, культурах нормальних клітин тварин чи людини?
5. Щодо біотехнологічного вирощування штамів мікроорганізмів, які синтезують нові речовини: чи є складнощі у створенні масштабного вирощування цих штамів в Україні?

Загальна оцінка роботи і висновок

В цілому, за зазначеною актуальністю, обсягом наведеного експериментального матеріалу, його новизною, науковим і практичним значенням, рівнем застосованих методологічних підходів дисертаційна робота «Актиноміцети ризосфери ялівцю високого *Juniperus excelsa* M.-Wieb.: генетичне різноманіття та біосинтетичні властивості» відповідає встановленим вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року № 40, які пред'являються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор, Тістечок Степан Іванович, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

*Кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України*

Оксана ПОРОННІК