

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
Акулиной Елизаветы Александровны на тему: «Получение и исследование  
свойств бактериального альгината для использования в тканевой инженерии»  
по специальности 1.5.6. Биотехнология

Альгинаты (АЛГ) находят широкое применение в медицине и косметологии. Традиционным сырьем для получения АЛГ являются бурые морские водоросли. Существует обширная промышленная база, ориентированная на получение и переработку водорослевого АЛГ. В то же время, перспективным продуцентом АЛГ являются почвенные бактерии рода *Azotobacter*. В технологическом отношении применение биополимеров, полученных бактериальным синтезом, для указанных выше целей является важным направлением в современной биомедицине, особенно учитывая возрастающую неблагоприятную экологическую нагрузку на береговую зону мирового океана, являющуюся местом добычи бурых водорослей.

Альгинаты, водорастворимые экзополисахариды, гелевые композиции на основе которых могут быть использованы для формирования микрочастиц для контролируемого высвобождения лекарственных препаратов, для инкапсулирования живых клетки, таких как фибробласты и мезенхимальные стволовые клетки человека, обеспечивая им трехмерное окружение для дальнейшего формирования тканей. Полиоксиканоаты (ПОА), гидрофобные полиэфиры карбоновых кислот, благодаря свойствам биосовместимости и биodeградации, могут играть роль поддерживающей жесткой основы матрикса для роста клеток. Бактериальный синтез позволяет контролировать характеристики синтезируемых полимеров, влияющих на такие физико-химические свойства, как молекулярная масса и мономерный состав, что важно для их дальнейшего использования. При этом бактерии рода *Azotobacter* способны к синтезу одновременно обоих типов

биополимеров – альгинатов и полиоксиалканоатов/полиоксибутиратов (ПОА)/(ПОБ).

**Актуальность исследования.** Разработка технологических подходов к синтезу биополимеров с заданными свойствами открывает возможность конструкции макромолекулярных структур с необходимыми характеристиками под конкретные цели и задачи, что является актуальным направлением исследований в области фармакологии и биомедицины. Диссертация Акулиной Е.А. посвящена изучению возможности осуществления бактериями рода *Azotobacter* синтеза АЛГ с заданными характеристиками путем изменения условий культивирования, разработке методов выделения и очистки полимера, оценке биосовместимости бактериального АЛГ и использованию АЛГ в качестве компонента гибридной конструкции для регенерации костной ткани.

**Научная новизна работы.** Соискателем впервые разработан комплекс биотехнологических подходов для синтеза бактериальных АЛГ с заданными свойствами: исследовано влияние условий культивирования на их характеристики, получены АЛГ с различной молекулярной массой и мономерным составом; Показано отсутствие цитотоксичности и хорошая биосовместимость бактериальных АЛГ с тканями животных, что демонстрирует возможность их применения в составе биоинженерных конструкций для тканевой инженерии. Впервые на основе альгинатов и поли-3-оксибутирата разработана трехмерная гибридная матрица, способная к поддержанию роста стволовых клеток, обеспечивающих регенерацию костной ткани *in vivo*.

**Практическая значимость.** Результаты представленной к защите работы показывают возможность эффективной замены бурых водорослей - традиционного сырья для получения АЛГ, применяемых в различных областях биомедицины, фармакологии и биотехнологии, продуктом микробиологического синтеза - бактериальным АЛГ, обеспечивающим подбор материалов с характеристиками, необходимыми для решения конкретных задач, что невозможно при использовании водорослевого АЛГ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из традиционных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий ссылки на 150 источников, из них 128 на иностранном языке. Работа иллюстрирована 26 рисунками, содержит 13 таблиц.

В **обзоре литературы** проведен анализ текущего уровня исследований технологии синтеза и возможностей применения бактериальных полимеров – альгинатов и полиоксиалканоатов. Достаточно полно описаны влияния условий культивирования на свойства полимеров, различные методы выделения и очистки АЛГ. Подробно описано многообразие форм применения гидрогелей на основе АЛГ в биомедицине, фармакологии, пищевой промышленности. Особое внимание уделено разнообразию возможных конструкций для тканевой инженерии на основе полимеров, дан анализ их недостатков и преимуществ. В целом обзор литературы демонстрирует хорошую осведомленность автора и объективность оценки состояния проблемы получения и применения биополимеров на основе АЛГ. В качестве замечания можно отметить использование нетрадиционного термина: *кристалличное (полукристалличное) состояние/структура*, без пояснения его отличия от *кристаллический*. Этот термин встречается в тексте и в дальнейшем. Это замечание, впрочем, не снижает качества представленного в работе обзора литературы.

**Раздел «Материалы и методы»** содержит подробное описание многочисленных и разнообразных методов, использованных Е.А. Акулиной в представленном к защите исследовании. Автором продемонстрировано хорошее владение методами культивирования бактерий, позволившее обеспечить вариативность характеристик продуцируемых полимеров; были разработаны методы выделения и очистки АЛГ, полученные полимеры были охарактеризованы методами ИК спектроскопии, вискозиметрии, реометрии, термогравиметрическим анализом, методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Изучение биосовместимости полимеров было проведено *in vitro* на культуре мезенхимальных

стволовых клеток крыс (МСК). Цитотоксичность бактериальных АЛГ и полиоксибутирата и их способность к поддержанию роста МСК определяли по жизнеспособности клеток в культуре. Отдельно необходимо отметить выполненную автором разработку гибридной трехмерной конструкции на основе полиоксибутирата и АЛГ, свойства и характеристики которой были исследованы на модели поддержания роста костной ткани в условиях критического дефекта в теменной части черепа крыс

**Результаты и обсуждение.** В работе Акулиной Е.А. показано влияние условий культивирования на синтез и характеристики полимеров, разработаны новые подходы для выделения высокоочищенного свободного и капсулярного АЛГ. Полученные полимеры охарактеризованы по химической структуре и молекулярным параметрам; в частности, автором было показано хорошее совпадение ИК-спектров водорослевого и бактериального АЛГ, единственным выявленным отличием которых было присущее бактериальным АЛГ ацетилирование, по-видимому, и обеспечивающее им большую вариативность структур при образовании биогелей. В результате впервые проведенного исследования биосовместимости бактериальных АЛГ с тканями животных, было показано отсутствие цитотоксического эффекта бактериального АЛГ и его способность к поддержанию пролиферации стволовых мезенхимальных клеток в объеме трехмерной биополимерной матрицы. Показано, что разработанная конструкция на основе полиоксибутирата и альгината обладает потенциалом для поддержания регенерации костной ткани на модели *in vitro*.

Достоверность полученных данных обоснована достаточной для статистической обработки повторностью выполненных экспериментов. Для представления результатов была проведена корректная статистическая обработка. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего ( $M \pm SD$ ) при уровне значимости  $p < 0,05$ . Таблицы и диаграммы объективно отражают полученные результаты, подробно проанализированы в тексте.

**Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики.** Е.А. Акулиной разработана многофакторная научно обоснованная

технологическая база для получения биополимеров с заданными свойствами. Несомненным достоинством диссертационной работы Акулиной Е.А. является очевидное практическое значение полученных результатов, обеспечивающих возможность контролировать характеристики АЛГ при его бактериальном синтезе. Такой подход позволит осуществлять тонкую настройку свойств синтезируемых полимеров и открывает широкий спектр возможного использования АЛГ в различных областях – в косметологии, фармацевтике и тканевой инженерии.

**Публикации.** По результатам проведенного исследования опубликованы 13 печатных работ: из них 10 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова

#### **Замечания по диссертационной работе.**

В целом, диссертационная работа Акулиной Е.А. производит хорошее впечатление, однако, необходимо отметить отдельные недостатки работы и поставить перед автором некоторые вопросы.

Помимо незначительных опечаток, автор допускает использование в тексте неканонических терминов. Так, применительно к бактериям используется традиционный термин «культивирование», однако, когда речь заходит о культуре мезенхимальных клеток, появляется новый термин «культивация» - хотя обычно в этом случае также используют термин «культивирование». При изложении данных, относящихся к культивированию мезенхимальных клеток, в тексте и в подписях к рисункам автор пользуется термином «рост клеток» вместо «пролиферация», имея в виду увеличение численности клеток в выбранных условиях культивирования. Однако, говорить о «росте клеток» можно только применительно к данным, представленным на рисунках 19, 21, 24 и 25, в остальных случаях речь идет об изменении числа выживших клеток. При этом на рисунках 19 и 20 не подписаны оси значений, что затрудняет оценку представленных данных.

Есть вопросы к изложению данных термогравиметрического анализа (ТГА), представленных на рисунках 14-16. В подписях к рисункам и в тексте не дается

определение представленных величин TG/% и DTG/%. Как можно понять из текста, TG/% характеризует общую потерю массы, тогда как смысл параметра DTG/% в тексте не раскрывается и не комментируется.

Неудачно сформулирована подпись под рисунком 26, иллюстрирующим существенно важные для проведенного исследования результаты. Понять локацию фрагментов рисунка без внимательного разбора соответствующего текста затруднительно. Помочь читателю могли бы стрелки на микрофотографиях гистологических препаратов, указывающие локализацию имплантов на основе трехмерных матриц на костном фрагменте. С сожалением приходится отметить, что автором не проведен анализ данных мультиканальных гистопантомограмм гистологических срезов теменных костей крыс с отдельным флуоресцентным окрашиванием, приведенных на обсуждаемом рисунке.

Наконец, соискателем не обсуждаются возможные перспективы дальнейшей модификации АЛГ с целью улучшения его биосовместимости и способности поддерживать пролиферацию стволовых клеток.

Указанные замечания, впрочем, не снижают значимость диссертационной работы Е.А.Акулиной и не ставят под сомнение полученные результаты и сделанные на их основании выводы. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Работа подготовлена и представлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Считаю, что соискатель Акулина Елизавета Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Аннотация полностью отражает содержание диссертации, в текст включены основные значимые рисунки и таблицы, что позволяет читателю получить объективное представление о выполненном исследовании.

Официальный оппонент:

д.б.н. по специальности 03.01.04 «Биохимия» (03-00-04), 03.00.16 «Экология», ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной и трансляционной нейробиологии отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии»

20.05.2022



Стволинский Сергей Лейбович

Адрес места работы:

125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д.80, ФГБНУ НЦН

Тел.: 8(495)490-2408 (центральный аппарат)

e-mail: [stvolinsky@neurology.ru](mailto:stvolinsky@neurology.ru)

Подпись вед.н.сотр. Стволинского С.Л. удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «Научный центр неврологии»

к.м.н.

Сергеев Д.В.

