

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических
наук Бонарцева Антона Павловича
на тему: «Биоинженерия поли-3-оксибутирата, получаемого
биотехнологическим путем: контролируемый биосинтез его
сополимеров, свойства *in vitro* и применение на моделях заболеваний
***in vivo*», представленной**
по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Актуальность. Диссертационная работа Бонарцева А.П. представляет собой комплексное исследование биосовместимых и биоразлагаемых полимеров, поли-3-оксибутирата и его сополимеров, получаемых микробиологическим синтезом. Разработка и исследование биосовместимых и биоразлагаемых полимерных изделий является чрезвычайно актуальной задачей для современной биотехнологии и ее приложений в медицине. В России и мире в последние два десятилетия происходит активное развитие тканевой инженерии, в которой широко используются конструкции на основе биоразлагаемых полимеров. Активно ведутся исследования по разработке новых форм доставки лекарственных препаратов на основе нано- и микрочастиц. Кроме того, остаются недостаточно хорошо изучены многие фундаментальные вопросы, касающиеся использования биоразлагаемых полимеров, такие как взаимосвязь химической структуры полимеров с их эксплуатационными свойствами, механизм изменения свойств полимеров в процессе их биodeградации, влияние физико-химических свойств полимеров на взаимодействие с ними клеток и другие. Комплексных исследований биоразлагаемых полимеров, охватывающих столь широкий спектр разнообразных методов, в мире крайне мало, но именно такие исследования позволяют составить целостную картину о взаимосвязи химической

структуры полимеров с их физико-химическими и биологическими свойствами. Автор диссертационного труда поставил целью, по возможности, заполнить пробелы в наших знаниях об уникальных свойствах полимеров бактериального происхождения – поли-3-оксибутирата и его сополимеров, в том числе сополимеров с синтетическим полиэтиленгликолем, полученных по оригинальной технологии биотехнологического ПЭГилирования.

Общая оценка работы. Диссертация Бонарцева А.П. построена по традиционному плану, включает следующие главы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, состоящей из 10-ти разделов, Заключение, Выводы, Список литературы. Список литературы содержит из 791 источников цитирования, из которых 82 российских 709 зарубежных. Работа написана с использованием шрифта Times New Roman (12-ый кегль, полуторный интервал) на 543-х страницах, проиллюстрирована 195-ью рисунками, содержит 36 таблиц.

Основные результаты работы опубликованы в 61-ой публикации, в т.ч. в 51-ой научной статье в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus и RSCI) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М.В. Ломоносова (из них 6 – в журналах первого квартиля Q1); в 2-х статьях в Российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ; в 2-х обзорных главы в книгах. Разработанные автором методики и полученные в работе данные отражены также в 6-ти патентах РФ.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. В работе хорошо представлены защищаемые положения, научная новизна, практическая значимость. Исследование представляет собой комплексный подход, в котором объединены и логически систематизированы различные направления исследования поли-3-оксибутирата и его сополимеров: от

микробиологического биосинтеза полимера до исследования тканеинженерных конструкций из него на лабораторных крысах, в результате чего создается система многопланового экспериментального исследования биоразлагаемых полимеров.

Глава **«Обзор литературы»** состоит из 11-ти разделов и занимает 134 стр. Представлено описание современного состояния исследования и медицинского применения биоматериалов в России и мире. Рассмотрены данные по современному состоянию исследований биоразлагаемых и биосовместимых полимеров, получаемых биотехнологическим путем, поли-3-оксиалканоатов, в частности, поли-3-оксибутирата (ПОБ). Дается обзор основных проблем исследования полиоксиалканоатов: изучения физико-химических свойств полимеров, биodeградации, биосовместимости, культивирования клеток на различных конструкциях из этих полимеров, их применения для тканевой инженерии (в т.ч. для регенерации костной ткани), а также создания и исследования систем пролонгированного высвобождения лекарственных веществ различного терапевтического действия. Представленная в «Обзоре литературы» обширная информация полностью раскрывает актуальность и значимость поставленной проблемы исследования и дает представление на современном уровне о развитии основных научных направлений, отраженных в диссертации. Обзор содержит анализ имеющейся отечественной и зарубежной научной литературы, качественно проиллюстрирован рисунками и таблицами, в т.ч. выполненными А.П. Бонарцевым самостоятельно или полученными из собственных обзорных статей автора. Значительная часть материала «Обзора литературы» отражена в 5-ти ключевых обзорных статьях Бонарцева А.П.: «Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе» в журнале Биомедицинская химия, «Поли-3-оксибутират и микробиота человека» в журнале Прикладная биохимия и микробиология, «Лекарственные системы на основе поли-3-оксиалканоатов: их микро- и

наноструктура» в журнале Вестник РГМУ, «Применение полиоксиалканоатов в медицине и биологическая активность природного поли-3-оксибутирата» в журнале Acta Naturae и «Effect of poly (3-hydroxyalkanoates) as natural polymers on mesenchymal stem cells» (Влияние поли-3-оксиалканоатов как природных полимеров на мезенхимальные стволовые клетки) в журнале World Journal of Stem Cells (Международный журнал стволовых клеток).

В главе **«Материалы и методы»** (объемом 46 страниц) подробно изложена информация об объектах исследования: поли-3-оксибутирате и его сополимерах, полученных биотехнологическим путем, и различных изделиях на их основе. Работа выполнена на высоком методическом уровне, включая классические и современные методы, относящиеся к различным научным дисциплинам: микробиологии, полимерной и физической химии, микроскопии, биохимии, клеточной биологии, тканевой инженерии, фармакологии, физиологии и экспериментальной медицине, математическому моделированию и анализу изображений, статистическому анализу данных. Большое разнообразие используемых методов является безусловно сильной стороной работы. Так, в рамках одной работы используются классические и разработанные диссертантом микробиологические методы биосинтеза полимеров с присущей им спецификой (проведением анализа урожая биомассы, выхода полимера, измерения его молекулярной массы) и методы исследования тканевой реакции на имплантацию конструкций из полученных полимеров с использованием хирургической модели костного дефекта на крысах и как классических методов гистологии, так и оригинального гистоморфометрического метода раздельного флуоресцентного окрашивания новообразующейся костной ткани.

Глава **«Результаты и обсуждение»** изложена на 261-ой странице и представлена в 10-ти разделах. **Первый раздел** посвящен разработке

технологии биосинтеза ПОБ и его сополимеров (с 3-оксивалератом, с 3-окси-4-метилвалератом, а также с синтетическими ди-, три- и полиэтиленгликолями) с заданной молекулярной массой и мономерным составом, в которой уникальная способность штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б утилизировать добавленные в культуральную среду карбоновые кислоты и даже чужеродные синтетические производные полиэтиленгликоля для синтеза сополимеров ПОБ и регуляции их молекулярной массы используется для разработки способа контролируемого биосинтеза поли-3-оксиалканоатов с заданной химической структурой. Автором проведен анализ влияния концентрации добавляемых в культуральную среду предшественников мономеров синтезируемых полимеров и времени их добавления на урожай биомассы, содержание полимера в клетках штамма-продуцента, молекулярную массу и мономерный состав синтезируемых полимеров. Автором подобраны наиболее оптимальные варианты синтеза полимеров с заданными характеристиками. Разработана также методика глубокой очистки полимеров для их последующего использования в экспериментах на клетках и животных. Получены 19 экспериментальных партий выделенных из биомассы и очищенных полимеров с различной химической структурой. Во **втором разделе** рассматривается микро- и ультраструктура стандартных макроскопических пленок и ультратонких пленок из всех полученных путем биосинтеза полимеров различной химической структуры. Описаны основные надмолекулярные структуры, свойственные частично кристаллическому ПОБ и его сополимерам: ламели и сферолиты, и показано, как изменяется ультраструктура полимера при его биотехнологической модификации с использованием полиэтиленгликоля. В **третьем разделе** проводится анализ взаимосвязи химической структуры полимеров из полученных ранее партий на их основные физико-химические свойства: кристалличность, механические свойства и гидрофильность. Выявлены закономерности этих зависимостей, например, линейное

снижение жесткости и гидрофильности поверхности сополимера поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом при повышении молярного содержания 3-оксивалерата, что имеет большую практическую важность при разработке медицинских изделий из этих полимеров. В **четвертом разделе** описано проведение комплексного исследования гидролитической и ферментативной деградации всех полученных ранее полимеров. Была показана зависимость кинетики изменения физико-химических свойств полимеров от их химической структуры. Проведена тщательная математическая обработка полученных данных с использованием известных из литературы математических моделей биodeградации полимеров. Для сополимеров поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом найдена граница фазового перехода структурно-физических свойств полимера, которая составила 5,7-5,9%, что является новым фундаментальным открытием свойств этих полимеров. Показано также как в процессе ферментативной деградации изменяется надмолекулярная структура полимера: фрагментируются и исчезают или, напротив, появляются кристаллические структуры полимеров - ламели, что согласуется с волнообразным изменением степени кристалличности полимеров. **Пятый раздел** посвящен анализу цитотоксичности и росту клеток на пленках из полученных ранее полимеров. Проведен отбор полимеров, обладающих наибольшей совместимостью с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) и фибробластами для дальнейших исследований, ПОВ и его сополимера с полиэтиленгликолем. Результаты этих исследований позволили перейти к следующим направлениям исследования полимеров - на клетках и лабораторных животных. Особый интерес также заслуживает исследование биоразложения пленок при росте на ней фибробластов, а затем роста этих клеток на уже подвергшихся биodeградации пленках из ПОВ и его композита с другим биоразлагаемым полимером, полилактидом, что было сделано впервые. В **шестом разделе** приведено описание изготовления нано- и микрочастиц, способных к

продолгованному высвобождению различных лекарств, прежде всего, противоопухолевых. На основании данных по кинетике высвобождения лекарств из микрочастиц и их математической обработки были разработаны противоопухолевые формы продолгованного высвобождения на основе нано- и микрочастиц из поли-3-оксибутирата и его сополимеров и композитов, и проведено исследование их противоопухолевой активности на опухолевых клетках *in vitro* и на моделях эпителиальных опухолей мышей *in vivo*. Диссертант впервые показал, что микрочастицы из поли-3-оксибутирата, загруженные паклитакселом, обладают повышенной продолгованной противоопухолевой эффективностью *in vivo* на моделях эпителиальных опухолей мышей по критерию локального торможения роста опухоли при сниженной острой токсичности в сравнении с традиционной противоопухолевой лекарственной формой (Таксолом). Проведенный диссертантом объем исследований позволяет создать новое перспективное противоопухолевое средство продолгованного действия.

Седьмой раздел посвящен получению и исследованию микрочастиц на основе поли-3-оксибутирата и его сополимера с полиэтиленгликолем с инкапсулированным терапевтическим белком, лизоцимом, для его продолгованного высвобождения. Было показано, что лизоцим высвобождался из полимерных микрочастиц в течение двух недель с сохранением стабильности и ферментативной активности, что позволяет проводить продолгованную антибактериальную терапию с использованием такого препарата, например, инфицированных ран или ожогов, а также поврежденных слизистых. В **восьмом разделе** исследуются плоские пористые матриксы на основе ПОБ и его биоПЭГилированного сополимера, способные к поддержанию роста фибробластов и МСК. Показано, что пористые матриксы на основе ПОБ вызывают спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути, а биоПЭГилирование этого полимера приводит к частичному подавлению этого эффекта. Исследование проводится с использованием иммунохимических методов анализа

экспрессии маркеров дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. **Девятый раздел** посвящен получению объемных пористых матриксов из композитов ПОБ с минеральным компонентом – гидроксиапатитом. Получена также тканеинженерная конструкция на основе этих объемных пористых матриксов, которые заполнили альгинатным гидрогелем, содержащим стволовые клетки. Впервые было продемонстрировано, что такая конструкция способствует почти полной регенерации критического костного дефекта у крыс *in vivo* за 1 месяц с использованием гистологических методов и оригинального метода дифференциального флуоресцентного окрашивания новообразующейся костной ткани. Наконец, в **десятом заключительном разделе**, приводится описание пористых микросфер из ПОБ как носителей для прикрепления и роста мезенхимальных стволовых клеток. Показана прекрасная интеграция микросфер с костной тканью и стимуляции ими восстановления костной ткани. Полученные данные имеют большую практическую значимость и могут быть использованы для разработки отечественных остеопластических материалов и других биоразлагаемых имплантируемых медицинских изделий.

Заключение. В главе «Заключение» (объемом 16 страниц) автором диссертации подведен итог выполненной работы, обсуждены основные результаты работы и дается оценка их фундаментального и прикладного значения. В «Заключении» в качестве итоговой иллюстрации приведена общая схема организации созданной системы экспериментальных исследований полимеров и таблица с описанием основных ее компонентов, что позволяет четко обосновать поставленную в работе цель и основные задачи исследования.

Выводы, сделанные в работе, соответствуют цели и задачам исследования. **Положения, выносимые на защиту,** подтверждены результатами диссертационного исследования.

Замечания. Принципиальных недостатков работа не имеет. Основные замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер.

Так, на рисунке 46 приводится график изменение параметров биосинтеза полимеров в зависимости от условий культивирования штамма-продуцента, довольно сложный для восприятия. Не вполне понятно, по какой шкале (справа или слева) следует смотреть ту или иную кривую из 4-х, представленных на графике.

Схему биосинтеза ПОБ и его сополимеров (рисунок 40) лучше было бы поместить не в начала главы, а в качестве иллюстрации обсуждения всех полученных результатов в конце этой главы.

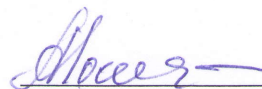
Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа Бонарцева А.П. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Актуальность темы, общий объем исследования, безусловная достоверность результатов и их новизна, обоснованность выводов и практическая значимость работы позволяют высоко оценить труд диссертанта. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненного автором комплексного междисциплинарного исследования разработаны теоретические положения, позволившие решить крупную научную проблему по созданию научно-методической базы для экспериментального исследования полимерных биоматериалов, что имеет также важное практическое значение. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бонарцев Антон Павлович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,

Ножевникова Алла Николаевна


« » 2022 г.

Контактные

Тел.: +7(916)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.03 – «Микробиология».

Адрес места работы: 117312, Москва, пр. 60-летия Октября, 7, корп. 2

Тел.: +7(499)135-21-39; e-mail: inmi@inmi.ru

Подпись главного научного сотрудника Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» Ножевниковой А.Н. удостоверяю:

