

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Зернова Антона Лаврентиевича "Микрочастицы из биосинтетических полиоксиалканоатов для пролонгированного высвобождения белков", представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность

Белковые соединения играют базовую роль в молекулярных процессах биологической жизни, в том числе, организма человека – в норме и патологии, его защитных и восстановительных реакциях. Индукторы, модуляторы и препараты антител, вакцин, интерферонов, цитокинов, рецепторов, ферментов и др. белковых систем закономерно и неуклонно внедряются в практику современной медицины для эффективной коррекции иммунитета, защиты от инфекционных и онкологических заболеваний, инженерии искусственных органов и тканей.

Однако разработка белковых терапевтических систем предъявляет повышенные требования к сохранности исходно активных третичных и четвертичных структур белковых макромолекул, склонных к денатурации и дезактивации, что делает такую задачу весьма нетривиальной. Поиск её решений нуждается в проектировании и исследовании достаточно сложных нано-/микрокомпозитов, а формирование самих композитов требует оптимальной связующей основы. Наиболее эффективными связующими являются полимеры. В данном случае они должны быть биосовместимыми и пригодными к формированию таких микрокомпозитных емкостей, где связуемые белки сохраняют способность высвобождаться в нативной функциональной форме, а конструкция депо-системы обеспечивает заданную регуляцию динамики этого процесса. На поиск именно таких непростых, но *весьма актуальных* решений как раз и нацелена представленная диссертационная работа, имея *практическую ориентацию* на развитие жизненно важных технологий инженерии искусственных тканей.

Общая характеристика работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка

литературы. Работа изложена на 158 страницах, содержит 6 таблиц, 59 рисунков, список литературы включает 277 ссылок.

Во Введении обоснована актуальность выбранной темы, отмечен круг нерешенных проблем, сформулированы цель и задачи собственного исследования, охарактеризованы научная новизна и практическая значимость работы, приведены сведения о её апробации и публикациях соискателя по теме диссертации.

В первой главе (часть 1) дан аналитический *обзор литературы* в области биогенного синтеза полиэфиров 3-гидроксикарбоновых кислот, исследования их структуры и свойств, применения в медицине. Основное внимание акцентировано на производных R-оксимасляной кислоты – поли(3-гидроксibuтиратах) (ПГБ), и «пэгилированных» блок-сополимерах (ПГБ-ПЭГ). Рассмотрены формы, методы и особенности создания на их основе систем пролонгированного выделения биоактивных веществ (БАВ), включая белковые. Проанализированы факторы минимизации денатурации белков, регуляции кинетики высвобождения БАВ, и возможности применения белоксодержащих микрокапсул в тканевой инженерии. Обзор дает полноценное представление об актуальном состоянии проблемы и адекватное обоснование цели и задач собственного исследования диссертанта.

Во второй части («Материалы и методы исследования») описаны методики синтеза ПГБ, ПГБ-ПЭГ, получения микрокапсул с включением модельных белков (БСА и лизоцима), композитов лизоцима с декстраном, ПГБ, гидроксиапатитом и последующего формирования композитных микрокапсул. Приведены методы исследования структуры, молекулярной массы, характеристик полимеров; состава, структуры и свойств композитов и микрокапсул, их деградации и кинетики высвобождения белка (с анализом целостности и активности лизоцима), а также оценки токсичности микрокапсул. Описанные методы не оставляют сомнений в достоверности полученных результатов.

В третьей части представлены результаты собственных экспериментальных исследований соискателя, их анализ и интерпретация.

В разделе 3.1 изложен первый этап работы – синтез базовых образцов ПГБ в качестве связующей основы для формирования целевых микрочастиц. С учетом существенной зависимости физико-химических характеристик ПГБ от степени полимеризации предстояло получить серию образцов в заданном интервале

молекулярных масс (**ММ**), с чем диссертант успешно справился, рационально избрав стратегию последовательной комбинации экспериментальных методов. Высоко- (826 кДа) и средне- (255 кДа) молекулярные образцы получены микробиологическим синтезом с использованием двух различных механизмов контроля роста цепи¹, а олигомер (25 кДа) – пошаговым кислотнo-гидролизным расщеплением цепи ПГБ средней ММ. Образцы охарактеризованы методами гельпроникающей хроматографии и ИК–спектроскопии.

Раздел 3.2 представляет наиболее существенную часть диссертации, связанную с непосредственным конструированием различных экспериментальных форм микрокапсулированных систем высвобождения белков и исследованием их характеристик. Результаты представлены в последовательности пошагового усложнения систем, восходящего к совершенствованию их целевой функциональности.

В подразделе 3.2.1. описано получение микрокапсул первично апробированного модельного белка – бычьего сывороточного альбумина (**БСА**), с оболочкой формируемой ПГБ (826 кДа). Исследованы размеры и морфология микрочастиц, установлено наличие двух основных типов связывания БСА (захват внутрь капсулы и сорбция на её поверхности). Показано, что такая неоднородность ведет к выраженной двухэтапной кинетике высвобождения белка. Сначала наблюдается «взрывной» эффект быстрого сброса поверхностно адсорбированной части, а затем, постепенное (диффузионное) выделение БСА из полости микрокапсулы с биодеструкцией и самой полиэфирной оболочки, при этом часть БСА остается нерастворимой в составе БСА-ПГБ агломератов.

Подраздел 3.2.2 посвящен депо-системам с высокоактивным белком (ферментом лизоцимом) функциональность которого чрезвычайно чувствительна к нарушениям (денатурации) его нативной структуры, что требует разработки специальных подходов к конструированию микрокапсул. Диссертантом предложен и успешно апробирован путь к решению этой проблемы посредством предварительного формирования композитов белка с гидрофильной основой, и лишь последующего инкапсулирования. Экспериментальный поиск с пошаговым анализом промежуточных результатов привел к выбору нано-гидроксипатита, как

¹ в культуральной среде *Azotobacter chroococcum* 7Б с ингибированием биосинтеза полипропиленгликолем, или более активно – ацетатом натрия

оптимально биосовместимой и не агрессивной к белковой структуре основы композитной сердцевины. А улучшенные целевые характеристики микрокапсул с такой сердцевиной, как было установлено, обеспечивала оболочка, формируемая не гомополимерами ПГБ (различной тестированной ММ), а блочно-амфифильными структурами «пэгилированного» производного (ПГБ-ПЭГ). Диссертант пришел к такому выводу на основании подробного экспериментального исследования характеристик микрокапсул, кинетики высвобождения фермента, анализа целостности его структуры и ферментативной активности на выходе. Наконец, экспериментальный прототип микрокапсул, потенциально перспективных для тканевой инженерии был успешно испытан на отсутствие цитотоксичности *in vitro*. Суммируя вышеизложенное, следует признать, что представленная работа является актуальным, оригинальным и плодотворным научным исследованием, выполненным на высоком квалификационном уровне, с четкой ориентацией научно-биотехнологических результатов на практические задачи медицины.

Новизна исследований Зернова А.Л. заключается в разработке ряда оригинальных методик инкапсулирования белков в микрочастицы на основе биогенных полиэфиров 3-оксибутановой кислоты, и впервые – их блок-сополимеров с полиэтиленгликолем. Предложен новый подход к решению проблемы пролонгированного дозирования из твердо-композитных микрокапсул белков без потери их активности. Получены и впервые охарактеризованы оригинальные депо-формы белковых субстанций, перспективные для инженерии искусственных тканей, и потенциалом более широкого практического применения.

Представленные в диссертации результаты, научные положения выводы и обобщения являются достоверными и обоснованными. Они подтверждаются большим объемом экспериментального материала, полученного с использованием комплекса современных микробиологических, физических и физико-химических методов.

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы для научных разработок в области биотехнологии, химии и медицины в Московском Онкологическом центре, Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Нижегородской государственной медицинской академии, Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Институте фундаментальной

биологии и биотехнологии при Сибирском федеральном университете и иных научных и производственных центрах биотехнологического, медицинского и смежного профиля.

Признавая в целом высокий научный и квалификационный уровень выполненной работы, следует, тем не менее, отметить ряд замечаний.

Замечания.

1. **В обзоре литературы** и в целом по тексту диссертации (автореферата) просматривается излишняя увлеченность автора преимущественно англоязычными источниками информации и терминологией, без должного учета информационных ресурсов и смысловых эквивалентов русского языка. Например, употребление сочетания «**бёрст**-эффект» (как созвучной имитации термина “burst effect“, стр. 88,89,91,112,114,129) не обосновано, поскольку русский язык вполне ясно отражает тот же смысл словосочетанием «взрывной эффект» (быстрого выделения). Аналогично, «**сурфактант**» (стр. 36, 37, 64, 95) в русском языке отсутствует, а по-русски означает **поверхностно активное вещество** (со стандартной аббревиатурой «**ПАВ**»), в конкретных ситуациях обозначая «**эмульгатор**». В ряду смысловых неточностей отметим не совсем корректное отнесение исследуемых микрокапсул к системам «**доставки**» (*delivery*), так как по существу выполненных исследований экспериментально подтверждены лишь функции управляемого **выделения** (*release*) белков.
2. Автор диссертации подчеркивает существенную **роль молекулярных размеров** – **молекулярной массы** (ММ) в регуляции целевых свойств синтезируемых и используемых полимеров, оперируя значения ММ (826, 255 и 25 кДа) образцов ПГБ. Однако совершенно неясным остается существенный вопрос: а каков уровень однородности образцов по ММ, то есть, какова полидисперсность (индекс полидисперсности, равный соотношению средневесовой и среднечисловой ММ). Определялась ли она, поскольку, судя по упоминанию в экспериментальной части (стр. 60) гельпроникающей хроматографии, такая инструментальная возможность имела. Заметим, что сам термин «полидисперсность», упомянутый на стр. 60, используется также на стр. 16 литературного обзора, но и там его значение остается загадкой. Цитата: «Молекулярная масса синтезируемого полимера колеблется от 10 до 3000 кДа с индексом полидисперсности около». а около чего не указано. С другой стороны, аналогично значимый показатель *распределения по размерам* не полимерных молекул, а микрокапсул, в диссертации продемонстрирован, например, рис. 25 (стр. 85), 36 (стр. 97)

3. Приведенное на стр. 81 количественное соотношение интенсивностей полос поглощения при 3240 см^{-1} в ИК-спектрах образцов ПГБ разной молекулярной массы 250 и 25 кДа, равное $0,87:1,25 = 0,7$, при расчетном молярном соотношении окси-групп $25 : 250 = 0,1$, представляется неубедительным подтверждением заданной степени гидролитического расщепления ПГБ 250 до уровня ПГБ 25, по крайней мере, без тщательного анализа полимер-ассоциированных примесей молекул воды.
4. *В подразделах части 3 (Результаты и их обсуждение)* рассмотрение самих результатов часто предваряется излишне развернутыми преамбулами микро обзоров литературы (стр. 75-76, 78, 83). Это несколько перегружает восприятие собственных достижений аспиранта. Более рациональным представляется четкое разделение обще-информационных сведений (в обзор литературы с последующими ссылками на него), и литературных данных, существенных для сопоставления с собственными результатами в «Результатах и их обсуждении».
5. Итоговый результат совершенствования конструкций белок-выделяющих микрокапсул характеризуется убедительными преимуществами по критериям биосовместимости, нетоксичности, стабильности, пролонгированного дозирования белка без нарушений его активности. Однако по параметру «**степень загрузки**» возникают сомнения: не слишком ли низка полезная емкость (менее 1%) полученных микрокапсул, и каковы перспективы повышения данного показателя?
6. Утверждение, что сохранение ферментативной активности лизоцима свидетельствует о целостности его нативной формы (третичной структуры), строго говоря, не совсем корректно, так как есть примеры, когда такая активность сохраняется и при некоторых модификациях архитектуры макромолекул. Если нет дополнительных данных, то лучше ограничиться констатацией стабильности именно функциональной активности, что само по себе весьма ценно в данном случае.
7. Текст диссертации и автореферата не свободен от досадных опечаток, неудачных формулировок и неточностей, например:
 - ✓ стр. 18. «Это кетоновые тела, которые продуцируются в митохондриях, которые затем распределяются по организму» - трудно допустить, что именно митохондрии распределяются по организму;
 - ✓ стр. 58, 59, 79, 105 «**кислый**» гидролиз – оригинально, но не верно, верно «**кислотный**»;

Приведенные выше замечания носят частный и дискуссионный характер, не затрагивая существа представленной работы, её актуальности, новизны, объективности и значимости, а также квалификационной зрелости диссертанта.

Заключение

Диссертация Зернова А.Л. является законченной научно-квалификационной работой. Автором получены результаты, имеющие существенное значение для развития науки и технологии микросистем локально-продолжительного дозирования белковых препаратов, перспективных для применения в инженерии искусственных тканей. Основные результаты работы опубликованы в 3 статьях в квалификационных журналах из перечня ВАК, 4 статьях зарубежных рецензируемых журналов, 4 статьях в сборниках трудов и 4 тезисах докладов конференций. Автореферат полно передает полученные результаты.

Диссертационная работа Зернова А.Л. соответствует паспорту специальности 03.01.06 и в полной мере отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства РФ от 29.09.2013 № 842 (в редакции от 02.08.2016), предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Зернов Антон Лаврентиевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 ☐ Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Главный научный сотрудник лаборатории
химии полиэлектролитов и медико-биологических полимеров
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Ордена Трудового Красного Знамени Института
Нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева
Российской академии наук,
доктор химических наук
serbin@ips.ac.ru
телефон 495 647 59 27 доб. 331
119991, Москва, Ленинский проспект 29

А. В. Сербин

Подпись р.ж.и. Сербина А. В. заверяю
ученый секретарь ИИХС РАН
кандидат химических наук



И. С. Калашникова

Сведение об официальном оппоненте

по диссертации Зернова Антона Лаврентиевича «Микрочастицы из биосинтетических полиоксикалкоанатов для пролонгированного высвобождения белков», предоставленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Фамилия, имя, отчество	Сербин Александр Владимирович
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень (с указанием отрасли науки и научных специальностей и шифра, по которым защищена диссертация)	Доктор химических наук, Специальность: 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения
Основное место работы	
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента на момент представления им отзыва	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
Адрес организации	119991, Москва, Ленинский проспект, 29
Телефон	495 647 59 27 доб. 331
Адрес электронной почты	serbin@ips.ac.ru
Должность	Главный научный сотрудник лаборатории химии полиэлектролитов и медико-биологических полимеров

Список публикаций:

Сербин А.В., Веселовский А.В., Цветков В.Б. Исследование *in vitro* и *in silico* интерферогенных аналогов нуклеиновых кислот, искусственно программируемых на блокаду начальных этапов ВИЧ-инфицирования клеток // Биотехнология – 2012. – № 1. – С. 72-89; Serbin A.V., Veselovsky A.V., Tsvetkov V.B. In vitro and in silico investigation of interferonogenic analogues of nucleic acids, artificially programmed to block the initial stages of HIV infection of cells // Applied Biochemistry and Microbiology – 2012. - N 9. – P. 723-739.

Tsvetkov V.B., Serbin A.V. A Novel View of Modelling Interactions between Synthetic and Biological Polymers via Docking // Journal of Computer-Aided Molecular Design – 2012 – 26(12):1369-1388

Tsvetkov V. B., Veselovsky A.V. and Serbin A.V. Molecular dynamics of synthetic polymers interference with viral biopolymer targets pretested via docking // in Book: Worldwide Research Efforts in the Fighting Against Microbial Pathogen. From Basic Research to Technological

Developments - Ed. by A. Méndez-Vilas, – Brown Walker Press – Boca Raton, Florida – USA, ISBN-10:1-61233-636-1; ISBN-13: 978-1-61233-636-7, 2013, p. 199-203

Serbin A.V., Karaseva E.N., Alikhanova O.L., Tsvetkov V.B. Drug resistance preventive antivirals based on nano-responsible poly-ligands // in Book: Worldwide Research Efforts in the Fighting Against Microbial Pathogen. From Basic Research to Technological Developments - Ed. by A. Méndez-Vilas, – Brown Walker Press – Boca Raton, Florida – USA, ISBN-10:1-61233-636-1; ISBN-13: 978-1-61233-636-7, 2013, p.139-144

Tsvetkov V. B., Serbin A. V. Molecular Dynamics Modeling the Synthetic and Biological Polymers Interactions Pre-Studied via Docking. Anchors Modified Polyanions Interference with the HIV-1 Fusion Mediator // Journal of Computer-Aided Molecular Design – 2014 – 28(6):647-673

Официальный оппонент



Сербин Александр Владимирович

Подпись руки Сербина А. В. заверяю
ученый секретарь ИНХС РАН
кандидат химических наук



И. С. Калашникова



ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Зернова Антона Лаврентиевича «Микрочастицы из биосинтетических полиоксиалканоатов для пролонгированного высвобождения белков», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Зернова А.Л. посвящена созданию систем пролонгированной доставки белков на основе полимерных микрочастиц из полиоксиалканоатов.

Разработка и исследование систем пролонгированного высвобождения является очень важной задачей современной биотехнологии. Ведь при использовании таких систем доставки с одной стороны устраняются недостатки прямого введения действующего вещества, такие как низкая стабильность и неэффективный его расход, а с другой стороны осуществляется длительное поддержание требуемых концентраций биологически активных веществ. В данной работе в качестве такой системы исследуются микрочастицы из биоразлагаемого и биосовместимого полимера – поли(3-гидроксибутирата), а также его сополимера с поли(этилен гликолем), загруженные лизоцимом. При этом инкапсулированный белок сохраняет свою нативную форму в течение длительного времени, что особенно важно в связи с низкой устойчивостью белковых макромолекул к физико-химическим и иным воздействиям. Исследуемые микрочастицы являются эффективной моделью доставки белка, и открывают широкие перспективы для их использования в фармакологии, тканевой инженерии, направленной дифференцировке стволовых клеток и так далее.

Таким образом, тема диссертационной работы Зернова А.Л. является актуальной, и обеспечивает основу для дальнейших исследований систем пролонгированной доставки белков, например ростовых и дифференцировочных факторов в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Диссертация Зернова А.Л. построена по классической схеме, и включает в себя следующие основные разделы: введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Материал диссертации изложен на 158 страницах и содержит 59 рисунков. Список

литературы содержит ссылки, как на классические статьи, так и на современные работы. В целом, оформление диссертации соответствует требованиям, установленным Министерством образования Российской Федерации. Обнаруженные в диссертации немногочисленные опечатки не снижают положительного впечатления от работы.

Раздел «Обзор литературы» состоит из 2х частей (всего 49 страниц текста). Первая часть посвящена описанию биосинтеза, физико-химических свойств биodeградируемых и биосовместимых полимеров – полиоксисалканоатов, в частности основного их представителя поли(3-гидроксibuтирата) (ПГБ), а также его блок-сополимера с поли(этилен гликолем) (ПГБ-ПЭГ). Во второй части обзора представлен подробный анализ существующих систем пролонгированной доставки белков, в частности, описано их получение, применение в тканевой инженерии, а также механизмы высвобождения молекул из таких полимерных систем.

На основании представленного в обзоре анализа существующих данных диссертантом обоснована перспективность использования полимерных микрочастиц на основе ПГБ-ПЭГ для пролонгированной доставки белков при решении различных задач биоинженерии и, в первую очередь, при биоинженерии костной ткани. В обзоре также обоснован выбор модельного белка (лизоцим) и показано, что микрочастицы на основе ПГБ-ПЭГ являются уникальными системами доставки, при разработке которых необходим длительный подбор условий, зависящих как от физико-химических и механических свойств используемого полимера, так и технологических аспектов процесса создания полимерных микрочастиц.

Обзор написан хорошим языком, характеризуется широким охватом материала, и включает исчерпывающие данные как по физико-химическим и биологическим свойствам поли(3-гидроксibuтиратов), так и по проблеме пролонгированного высвобождения биоактивных белков в современной регенеративной медицине и тканевой инженерии, причём наибольшее внимание уделено самым последним публикациям, характеризующим современное состояние этих направлений биотехнологической науки. На мой взгляд, при некоторой доработке, обзор заслуживает опубликования в отечественной научной периодике.

Раздел «Материалы и методы» дает исчерпывающее представление об использованных в работе методах. Автор демонстрирует владение широким спектром самых современных методологий: методами биосинтеза полимеров с использованием

бактериальных штаммов-продуцентов; методами оценки основных характеристик получаемых полимеров с использованием ЯМР и ИК спектроскопии; методами работы с белками, включая их выделение, очистку, анализ и контроль динамики их высвобождения из полимерных структур (спектрофотометрия); а также методами модификации полимеров и получения на их основе микрокапсул (прежде всего, методом «водная фаза/масляная фаза/водная фаза»). Особо стоит отметить высокое качество данных, полученных с использованием микроскопии (сканирующая электронная и конфокальная) и широкого ряда методов анализа структуры и активности белков на разных этапах их инкапсулирования и высвобождения. Клеточные работы, как с бактериальными штаммами, так и с мезенхимальными стволовыми клетками, составляют значительную часть диссертации, что значительно повышает методологический уровень исследований, и характеризует автора как опытного клеточного биолога. В целом, раздел «Материалы и методы» написан весьма обстоятельно, и содержит необходимую информацию для детального воспроизведения экспериментов.

Раздел «*Результаты и обсуждение*», содержащий описание экспериментальной части работы, выполненной автором, можно условно разделить на 3 части.

Первая часть посвящена получению микрокапсул из поли(3-гидроксibuтирата) (ПГБ), загруженных модельным белком БСА. Для этого в начале был разработан способ получения ПГБ различной молекулярной массы. С помощью культивации штамма-сверхпродуцента *Azotobacter chroococcum* 7В в различных условиях были синтезированы два гомополимера с молекулярной массой (ММ), необходимой для разработки систем пролонгированного высвобождения белков. Для контроля ММ была разработана методика, основанная на добавлении агентов, ингибирующих рост биомассы *Azotobacter chroococcum* 7В, и, в конечном счете, снижающих ММ ПГБ – ацетата натрия и ППГ. В результате, методом контролируемого биосинтеза получены полимеры, обладающие увеличенной гидрофильностью: низкомолекулярный поли(3-гидроксibuтират) и его сополимер с поли(этилен гликолем).

Далее, были получены микрокапсулы из ПГБ 800 кДа, загруженные модельным белком БСА. Таким образом, на первом этапе работы была разработана оригинальная методика инкапсулирования модельного белка в частицы из биоразлагаемого полимера. Однако низкий процент вхождения белка в капсулы ограничивал

возможность создания на их основе новой пролонгированной формы терапевтического белка. В связи с этим, методика создания микрочастиц, загруженных белком, была кардинально изменена, что позволило достичь существенных успехов – увеличения эффективности инкапсулирования и увеличения доли белка, высвобождающегося пролонгировано.

Во второй части работы описан процесс разработки методики инкапсулирования белка в сплошные полимерные микрочастицы с целью устранения недостатков системы пролонгированного высвобождения белков, основанной на микрокапсулах, а именно низкой степени загруженности, а также высокого уровня начального взрывного высвобождения – бёрст-эффекта. При этом модельный белок был заменен на лизоцим, который, будучи положительно заряженным белком малого размера, в большей степени подходил для моделирования создания систем пролонгированного высвобождения ростовых факторов и цитокинов.

Также лизоцим обладает ферментативной активностью, что позволило оценить изменения уровня его стабильности в процессе высвобождения. Для создания новых частиц, загруженных лизоцимом, использовались ПГБ 25 кДа и ПГБ-ПЭГ в качестве носителей с усовершенствованными физико-химическими свойствами. Исследование кинетики высвобождения лизоцима из микрочастиц, основанных на модифицированных полимерах, показало, что снижение гидрофобности материала носителя резко изменяет вид кинетического профиля высвобождения.

На этом этапе работы также был получен ответ на ключевой вопрос - насколько сохраняется нативная структура белка в процессе его высвобождения из полимерных микрочастиц? Для этого, стабильность высвободившегося лизоцима была исследована на трех уровнях: целостности полипептидной цепи, вторичной и третичной структуры белка. Целостность полипептидной цепи высвободившегося белка была оценена с помощью электрофореза по Лэммли. Исследование стабильности на уровне вторичной структуры белка проводилось при помощи метода кругового дихроизма. Наконец, ферментативная активность белка, напрямую связанная с его третичной структурой и общей стабильностью, оценивалась на основе анализа способности лизоцима к разложению клеточной стенки бактерий *Micrococcus luteus*.

В завершающей части работ, автором была исследована цитотоксическая реакция мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из костного мозга

крысы, на полученные в работе микрочастицы. Эти исследования не выявили цитотоксичности по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам, что говорит об их высокой биосовместимости получаемых микрочастиц и о соответствии разработанных методик поставленным задачам.

Таким образом, в ходе выполнения данной работы автором был разработан ряд оригинальных методик инкапсулирования модельного белка лизоцима в полимерные микрочастицы на основе поли(3-гидроксибутирата) и его сополимеров с использованием гидроксиапатита, как носителя. Впервые для инкапсулирования белков был использован биосинтетический блок-сополимер поли(3-гидроксибутират)-со-поли(этилен гликоль) (ПГБ-ПЭГ). При этом, было показано, что микрочастицы на его основе обладают лучшими параметрами инкапсулирования модельного белка лизоцима по сравнению с микрочастицами из гомополимера ПГБ. Также впервые показано, что применение сополимера ПГБ-ПЭГ обеспечивает более высокую стабильность высвобождаемого белка в сравнении с ПГБ на протяжении двух недель высвобождения *in vitro*. Высвобождение лизоцима из полимерного матрикса полученных микрочастиц осуществляется по двум механизмам: деградации микрочастиц и диффузии белка. Так же для частиц на основе ПГБ-ПЭГ, загруженных модельным белком лизоцимом, на мезенхимальных стволовых клетках крысы была показана высокая степень биосовместимости *in vitro*.

В целом, работа выполнена на самом высоком биотехнологическом уровне. Вместе с тем, как и к любой другой работе, к представленному на защиту исследованию есть некоторые замечания. Практически все они являются незначительными и, таким образом, не влияют ни на значимость экспериментов, ни на выводы работы. В частности:

1. Не доказано, что на рис 1 мы видим внутри капсулы именно белок: снимки SEM дают этому лишь косвенное подтверждение. Сравнение внутренней и внешней поверхностей капсул содержащих белок с микрофотографиями ненагруженных капсул позволило бы доказать это прямо.

2. При обсуждении кинетики высвобождения белка из частиц низкомолекулярного, высокомолекулярного ПОБ и сополимера следовало бы привести данные по степени кристалличности этих полимеров и сополимера.

3. Вызывает удивление весьма быстрая биodeградация капсул из

высокомолекулярного (826 кДа) ПОБ. Объяснение этого эффекта в тексте диссертации отсутствует.

4. Оценка характера взаимодействия микрочастиц с клеточной мембраной (электронная микроскопия) очень украсила бы работу. К сожалению, такая оценка не проводилась.

5. Не на всех микрофотографиях отмечен масштаб (например, рис. 1, 7б, 11 б,в).

Перечисленные недостатки не влияют на высокий методологический уровень данной работы и её несомненную практическую и информативную значимость как с точки зрения техники инкапсулирования белков в полимерные микрочастицы, так и с точки зрения практического применения результатов работы в биоинженерии. На мой взгляд, представленная работа является прекрасным примером классического биотехнологического исследования, последовательно и обстоятельно раскрывающего тонкие механизмы взаимодействия биоактивных белковых структур и полимерных носителей.

Текст диссертации и опубликованные автором статьи дают основания заключить, что диссертационная работа Зернова А.Л. актуальна по своим задачам и содержанию, и является логически завершенным исследованием, выполненным на самом современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые, непосредственно диссертантом, и опубликованы в рецензируемых отечественных (три) и зарубежных (четыре) научных журналах, входящих в перечень журналов и изданий, утвержденных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов сомнений не вызывает.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Все вышеизложенное позволяет мне заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Зернова Антона Лаврентиевича *«Микрочастицы из биосинтетических полиоксиканоатов для пролонгированного высвобождения белков»* соответствует требованиям «Положения о

присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук,
начальник лаборатории тканевой инженерии
НИЦ «Курчатовский институт»

А.А. Пантелеев

Адрес: 123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.
Телефон: +7 (499) 196 71-81
E-mail: a.a.pantel@gmail.com

Подпись к.б.н. Пантелеева Андрея Александровича
заверяю:

Главный Учёный секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»

С.Ю. Стремоухов



Сведения об официальном оппоненте

по диссертации Зернова Антона Лаврентиевича «Микрочастицы из биосинтетических полиоксикалкоанатов для пролонгированного высвобождения белков», предоставленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе и бионанотехнологии).

Фамилия, имя, отчество	Пантелеев Андрей Александрович
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень (с указанием отрасли науки и научных специальностей и шифра, по которым защищена диссертация)	Кандидат биологических наук, Специальность: 14.00.20 (Токсикология)
Основное место работы	
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента на момент представления им отзыва	Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт"; Курчатовский комплекс НБИКС технологий;
Сокращённое наименование	НИЦ «Курчатовский институт»
Адрес организации	123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.
Телефон	+7 (499) 196 71-81
Адрес электронной почты	a.a.pantel@gmail.com
Должность	Начальник лаборатории тканевой инженерии

Список публикаций:

1. Сытина Е.В., Тенчури́н Т.Х., Рудяк С.Г., Сапрыкин В.П., Романова О.А., Орехов А.С., Васильев А.Л., Алексеев А.А., Чвалун С.Н., Пальцев М.А., Пантелеев А.А. Сравнительная оценка биосовместимых полимерных матриц, полученных путем электроформования и их использование для создания объемных дермальных эквивалентов. Молекулярная медицина. – 2014. – №. 6. – С. 38-47.

2. Романова О.А., Григорьев Т.Е., Гончаров М.Е., Рудяк С.Г., Соловьёва Е.В., Крашенинников С.В., Сапрыкин В.П., Сытина Е.В., Чвалун С.Н., Пальцев М.А., Пантелеев А.А. Хитозан как модифицирующий компонент искусственного матрикса в тканевой инженерии кожи человека //клеточные технологии в биологии и медицине. – 2015. – №. 2. – С. 103-113.

3. O. A. Romanova, T. E. Grigor'ev, M. E. Goncharov, S. G. Rudyak, E. V. Solov'yova, S. T. Krashennnikov, V. P. Saprykin, E. V. Sytina, S. N. Chvalun, M. A. Pal'tsev, A. A. Panteleev. Chitosan as a modifying component of artificial scaffold for human skin tissue engineering. Bulletin of experimental biology and medicine. – 2015. – Т. 159. – №. 4. – С.

557-566.

4. Пантелеев А.А., Сытина Е.В., Чабан Е.А., Пальцев М.А. Использование амниотической оболочки плода человека в биоинженерии кожных покровов. *Молекулярная Медицина*, том 14, №5, стр 49-54, 2016.

Официальный оппонент

А.А. Пантелеев

Подпись заверяю

Главный учёный секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»

С.Ю. Стремоухов



«04» апреля 2017 г.