

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*» по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).**

Актуальность темы исследования

Человек широко применяет различные полимеры для своих потребностей: в легкой промышленности для производства предметов повседневного обихода, мебельной гарнитуры, упаковки, в полиграфии, в строительстве, в автомобильной промышленности, в коммунальном хозяйстве, в пищевой промышленности. Трудно назвать ту современную отрасль индустрии, где не использовались бы полимеры. Активно применяются полимеры и для изготовления медицинских изделий и лекарственных препаратов. В подавляющем большинстве используются полимеры, полученные нефтехимическим синтезом. Это такие термопластики как полиэтилен, полипропилен, поливинилхлорид, полиамиды, полистирол, поликарбонаты, полиметилметакрилаты и другие. Однако для медицинского использования эти полимеры далеко не всегда удовлетворяют существующим и постоянно возрастающим жестким требованиям к материалам медицинского назначения. Во многом это связано с искусственной химической структурой этих полимеров, с которой может быть обусловлена их токсичность для живых тканей, неспособность к биоразложению в окружающей среде и в организме человека, иммуногенность, канцерогенность и другие. Поэтому возрастает потребность в использовании природных полимеров, не обладающих этими недостатками, благодаря тому, что сами являются компонентами живого.

Однако использование полимеров, выделенных из тканей животных и растений, например, коллагена или альгината, сталкивается с проблемой слабого контроля свойств этих полимеров. В связи с этим особую актуальность приобретает применение полимеров, получаемых биотехнологическим путем, например, с помощью бактериального биосинтеза с широкими возможностями регуляции и контроля их химической структуры и, как следствие, физико-химических и биологических свойств. Такие полимеры, а именно, поли-3-оксибутират (ПОБ) и его сополимеры, и являются предметом комплексного исследования диссертанта. Диссертационная работа А.П. Бонарцева посвящена раскрытию фундаментальных причин, которые делают эти полимеры оптимальными по своим свойствам для различных биомедицинских приложений. Однако для достижения этих целей необходимо проведение широко-междисциплинарного исследования, охватывающего самые разные естественно-научные направления: от физической химии до экспериментальной медицины. И диссертант взял на себя нелегкий труд (заяввший более 15 лет) построения обширной научно-методической базы, включающей как классические, так и разработанные автором оригинальные методики и подходы. Потенциал разработанной экспериментальной системы исследования ПОБ и его сополимеров был полностью раскрыт диссертантом в его работе и, более того, теперь она может быть использована для исследования самых разных биоматериалов и их биомедицинского применения.

Общая характеристика работы

Рецензируемая работа содержит обобщение многолетних (полученных более чем за 15 лет) результатов комплексных исследований ПОБ и его сополимеров и изделий на их основе, предлагаемых для биомедицинского применения в различных областях: для биофармацевтики,

клеточной биологии, тканевой инженерии, регенеративной медицины. Следует отметить большой объем заявленных задач и проведенных исследований, их разносторонность и целостность работы.

Диссертационная работа Бонарцева А.П. построена по традиционному плану и включает: Введение, в котором обосновывается актуальность исследования, приведены цель и задачи, описаны объекты и предмет исследования, теоретическая и практическая значимость работы, приведены основные положения, выносимые на защиту, отражены степень достоверности и апробации полученных результатов; Обзор литературы (глава 1), Материалы и методы исследования (глава 2), Результаты и их обсуждение (глава 3), состоящей из 10-ти разделов, Общее заключение, Выводы, Список литературы. Материалы диссертации изложены 543-х страницах (с использованием шрифта Times New Roman, 12-ый кегль, с полуторным интервалом), проиллюстрирована 195-ью рисунками, содержит 36 таблиц. Список литературы включает 791 источник цитирования, из которых 82 источника российские, а 709 – зарубежные.

В первой главе представлен Обзор литературы, состоящий из 11-ти разделов и занимающий 134 страницы. Проведен углубленный анализ научной литературы по современному состоянию исследований поли-3-оксиалканоатов, изучения их физико-химических свойств, биodeградации, биосовместимости и медицинского применения, а также дается более широкий взгляд на исследования и медицинского применения основных классов биоматериалов в России и мире. Обзор литературы оставляет хорошее впечатление детальностью и широтой освещенной в нем информации. Он полностью выполняет функцию введения читателя в проблематику настоящего исследования и обоснования необходимости расширения наших знаний о поли-3-оксиалканоатах, полимерах, о свойствах и природных функциях которых долгое время было мало что

известно. Материалы «Обзора литературы» отражены в 5-ти обзорных статьях Бонарцева А.П. в отечественных и зарубежных журналах.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» (объемом 46 страниц) описаны объекты исследования, экспериментальные методы и методы математической обработки полученных данных. Работа выполнена на высоком методическом уровне, впечатляет разнообразие используемых в исследовании методов: от физико-химических методов анализа термофизических свойств полимеров, например, классического метода дифференциальной сканирующей калориметрии до хирургических методов моделирования критического костного дефекта и гистологических методов, например, оригинального гистоморфометрического метода отдельного флуоресцентного окрашивания новообразующейся костной ткани.

В экспериментальной третьей главе диссертационной работы (объемом 261 страница) представлена доказательная база правомочности сделанных автором выводов и аргументирована новизна полученных результатов. Глава состоит из 10-ти разделов, посвященных различным аспектам исследования поли-3-оксибутирата и его сополимеров: 1) Биосинтез поли-3-оксибутирата и его сополимеров; 2) Исследование микро- и ультраструктуры; 3) Исследование физико-химических свойств; 4) Исследование биodeградации; 5) Биосовместимость *in vitro*; 6) Системы пролонгированного высвобождения низкомолекулярных веществ; 7) Микрочастицы для пролонгированного высвобождения белков; 8) Остеогенные свойства 2D-матриков; 9) Остеогенные свойства 3D-матриков; и 10) Остеогенные свойства 3D-матриков из пористых микросфер. Результаты экспериментальной работы хорошо иллюстрированы, приведен большой объем числовых данных с их статистической обработкой.

В «Заключении» (на 16-ти страницах) диссертант подводит итоги работы и дает оценку их фундаментального и прикладного значения,

иллюстрируя эту главу общей схемой и таблицей о разработанной им в ходе этого комплексного исследования системе экспериментальных исследований полимеров, что делает его разностороннюю и обширную работу логически завершенной и осмысленной.

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

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность

Содержание экспериментальной части диссертации характеризует проведенное А.П. Бонарцевым исследование как хороший образец творческой научной работы с выраженным междисциплинарным и биоинженерным уклоном, выполненным с привлечением широкого спектра классических и современных экспериментальных методов, относящихся к отдаленным друг от друга научным дисциплинам: химии высокомолекулярных соединений, микроскопии, физической химии, микробиологии, биохимии, клеточной биологии, фармакологии, (пато)физиологии, гистологии и экспериментальной медицины, а также методов математического моделирования, обработки изображений и статистической обработки полученных числовых данных. Это обеспечило получение впечатляющего объема экспериментальных данных, а их анализ позволил сделать выводы и обеспечить достоверность результатов. Детализация описания результатов и используемых в работе методов, а также математическая обработка результатов доказывает, что преимущественная часть обсуждаемых в работе результатов – это личный вклад автора в работу. Обоснованность и достоверность результатов диссертационного исследования обеспечены репрезентативностью выборок и адекватным применением статистических методов обработки данных.

Научная новизна полученных данных.

Научную новизну, теоретическое и практическое значение результатов, необходимых для квалификации рецензируемой работы как докторской можно отразить в следующих формулировках:

- Разработан экспериментальный биотехнологический подход для контролируемого биосинтеза ПОБ и его сополимеров с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б, который позволяет синтезировать полимеры с заданной молекулярной массой и заданной химической структурой.

- С использованием разработанного метода помимо поли-3-оксибутирата и его сополимера с 3-оксивалератом были также синтезированы новые сополимеры поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем (ПОБ-ПЭГ), поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом и полиэтиленгликолем (ПОБВ-ПЭГ) и поли-3-оксибутирата с 4-метилвалериановой кислотой (ПОБ4МВ).

- Установлены закономерности взаимосвязи надмолекулярной структуры ПОБ и его сополимеров, различных его физико-химических свойств (степени кристалличности, механической жесткости и гидрофильности поверхности) и кинетики изменения этих свойств в процессе гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*. Найдена граница фазового перехода (при содержании 3-оксивалерата у ПОБВ в 5,7-5,9%) структурно-физических свойств полимера, при пересечении которой меняется закономерность кинетики изменения физико-химических свойств сополимера в процессе его биodeградации.

- Получены микрочастицы на основе ПОБ и его сополимеров, загруженные низкомолекулярными лекарственными веществами и белком

лизоцимом, исследована кинетика и механизм их пролонгированного высвобождения, что позволяет ее прогнозировать с высокой точностью.

- Впервые проведено многоуровневое исследование влияния биотехнологического ПЭГилирования поли-3-оксибутирата на наноструктуру, физико-химические и биологические свойства полимера. Показано, что биотехнологическая сополимеризация ПОБ с ПЭГ (при содержании мономеров этиленгликоля всего 0,33 мол.%) приводит к появлению монослойных ламелей в качестве кристаллических структур в надмолекулярной структуре полимера; значительному повышению гидрофильности и снижению степени кристалличности полимера, к изменению кинетики ранней стадии биodeградации биополимера *in vitro*; возрастанию вклада диффузии белка по закону Фика в его высвобождение при использовании микрочастиц на основе ПОБ-ПЭГ, загруженных лизоцимом; частичному подавлению способности поли-3-оксибутирата вызывать спонтанную дифференцировку МСК по остеогенному пути при использовании пористых матриксов на основе полимеров.

- Получена новая пролонгированная лекарственная форма противоопухолевого алкалоида паклитаксела на основе микрочастиц из ПОБ и показано, что она обладает сниженной острой токсичностью и более высокой противоопухолевой эффективностью по сравнению с препаратом Таксол в традиционной лекарственной форме на мышинных моделях *in vivo* внутрибрюшинно трансплантированных опухолей.

- Разработаны пористые матриксы и микросферы на основе ПОБ и его биоПЭГилированного сополимера и на моделях некритического и критического костных дефектов *in vivo* были выявлены их остеиндуктивные свойства - способность стимулировать образование новой костной ткани в области дефекта, заполненного полимерным материалом.

- Разработана тканеинженерная конструкция на основе пористых матриксов из композита ПОБ с гидроксиапатитом и альгинатом натрия, в

которую были помещены мезенхимальные стволовые клетки, и продемонстрирована ее остеоиндуктивная активность, которая обеспечила >90% восстановление критического костного дефекта за 1 месяц.

- По итогам проведенных исследований создана фундаментальная научно-методическая база для экспериментального исследования поли-3-оксибутирата и его сополимеров, позволяющая комплексно исследовать взаимосвязь физико-химических и биомедицинских свойств этих биополимеров на различном уровне: атомно-молекулярном, надмолекулярном, клеточном и тканевом.

Замечания

Замечаний принципиального характера к работе нет. Тем не менее, должен отметить несколько небольших замечаний рекомендательного характера. Так, рисунок 91 перегружен графиками одинакового вида, кроме того, некоторые данные на них дублируются, например, кинетические кривые изменения массы полимерных пленок из образцов ПОБ-105, ПОБ-364 и ПОБ-1095 приведены сразу на 3-х графиках рисунка – Б, Г и Д, а кинетическая кривая для образца ПОБ-1095 присутствует на всех 5-ти графиках. Аналогичное дублирование данных имеется на рисунке 98 с данными по математическому анализу экспериментальных данных падения молекулярной массы полимеров. На рисунке 122 автор приводит математическую обработку экспериментальных данных по кинетике высвобождения лекарственных веществ различной химической природы из микросфер на основе поли-3-оксибутирата по модели Хигучи. Однако, для кинетики высвобождения паклитаксела из микросфер на основе различных композитов и сополимеров поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем он эту модель не использует. Для обозначения полимеров полилактидов в каких-то местах работы используется термин полимолочная кислота и

соответствующее сокращение ПМК, а в каких-то - полилактиды и сокращение ПЛА.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Диссертация А.П. Бонарцева является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне, в которой по результатам комплексного исследования разработана научно-методическая база для экспериментального исследования полимерных биоматериалов, что имеет важное практическое значение. О большом объеме и высоком научном уровне исследований, проведенных А.П. Бонарцевым, свидетельствует тот факт, что по результатам работы автором опубликовано 61 публикация, в т.ч. в 51 научная статья 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); две статьи в российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ и две обзорные главы в книгах. Разработанные автором методики и полученные в работе данные отражены также в 6-ти патентах РФ.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Полученные экспериментальные результаты целесообразно использовать в курсах биотехнологии в высших учебных учреждениях.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к докторским диссертациям. 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

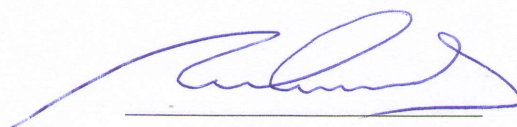
диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

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

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики полимеров и кристаллов отделения физики твердого тела физического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Яминский Игорь Владимирович



«25» мая 2022 г.

Контактные данные:

Тел.: +7(495)939-10-09, e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

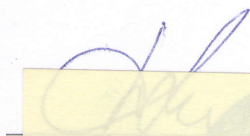
02.00.06. – «Высокомолекулярные соединения (физико-математические науки)».

Адрес места работы: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 2

Тел.: +7(495)939-31-60; e-mail: info@physics.msu.ru

Подпись профессора физического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Яминского И.В. удостоверяю:

Декан физического факультета
Московского государственного
университета имени М.В.Ломоносова,
д.ф.-м.н., профессор



И.Сысоев