

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

Диссертационная работа Бонарцева А. П. посвящена системному развитию экспериментально-теоретических основ и фундаментально обоснованных методологических решений в области управляемого биосинтеза поли-3-оксибутиратов (ПОБ) и сополимеров (ПОБ/С), производных надмолекулярных систем и композитов с детальным исследованием их структуры и свойств на пути создания актуально-востребованных биотехнологических продуктов медико-биологического назначения (включая, в частности, терапевтические системы доставки – выделения лекарств и биоинженерные системы регенерации тканей) последовательно тестируемых от уровней *in vitro* до экспериментальных моделей терапии заболеваний *in vivo*.

Актуальность решения научно-технологических проблем в этой сфере связана с непрерывно возрастающим интересом научных, производственных (и потребительских) секторов развития современного общества к изысканиям новых технологически доступных материалов, сочетающих в себе, с одной стороны, физиологическую безопасность контактов и взаимодействий с организмом человека, а с другой – широкий потенциал высокоэффективного (и экономически целесообразного) биоинженерного решения конкретных жизненно острых задач защиты, восстановления и поддержания здоровья. Представленные автором результаты в сопоставлении с известными аналогами и прототипами дают все основания оценки ПОБ/С как конкурентно перспективных базовых материалов для соответствующих разработок. Их актуальность усиливается критически острой необходимостью **импортозамещения** и даже лидерства оригинальных **отечественных** материалов и разработок.

Научная новизна и оригинальность

Несмотря на то, что ПОБ, как биогенный полимер бактериальных клеток, имеет весьма древнюю историю естественно-природного существования и эволюции, лишь в современных исследованиях механизмов и закономерностей его биосинтеза и свойств, автору диссертации впервые удалось:

- предсказать и разработать оригинальные биотехнологические системы **искусственно-контролируемого** бактериального синтеза не только гомо-ПОБ, но и его со- и тер- полимерных модификаций с этиленгликолем, 3-оксивалератом, 4-метилвалериановой кислотой... заданных молекулярных масс (**ММ**) и мономерного состава, обладающих расширенным диапазоном ранее неисследованных структурообразующих и функциональных свойств;
- предложить, разработать и применить системную методологию выявления, исследования и анализа этих свойств, включая ранее неизученные аспекты взаимосвязи структурно-специфических, физико-химических и биомедицинских характеристик данного класса соединений, а также производных изделий и препаратов, на различных уровнях экспериментального моделирования (суб-/над-молекулярном, клеточном и тканевом) с применением адекватных алгоритмов математического описания и анализа;
- создать и протестировать широкий ряд новых биоинженерных изделий и препаратов – лекарственных депо-систем и систем регенерации тканей (включая 3D-печатные композиты со стволовыми клетками), установив существенные параметры и разработав методологии их оптимизации на заданную – практически значимую (целевую) эффективность. Высокий уровень новизны (оригинальности) представленных идей, подходов и результатов подтвержден 6 патентами РФ авторского приоритета.

Значимость для теории и практики – ценность диссертационной работы Бонарцева А. П. для фундаментальной и прикладной науки заключается в том, что, фокусируясь на конкретных биотехнологических объектах ПОБ/С и производных, работа выходит за рамки частного узкопрофильного исследования, становясь центром кристаллизации и **интеграции** мощного

междисциплинарного научного направления, объединяющего фундаментально-теоретические и методические заделы смежных областей знаний и технологий в их взаимном развитии в целях создания биоинженерных продуктов, востребованных для **широкого практического применения**. Выполненная на стыке биотехнологии, биохимии, химии и физики полимеров, материаловедения, нанотехнологии, математического и био-натурного (клетки – ткани – организм) моделирования, ... диссертационное исследование Бонарцева А. П. дает на выходе широкий диапазон уникальных ПОБ/С-материалов, препаратов и изделий (микрочастицы, пленки, пористые матриксы, композиты...) с высоким потенциалом практического внедрения в современную медицинскую практику высокоэффективной лекарственной терапии онко- и иных заболеваний, хирургии, восстановления костно-тканевых повреждений, и др.

Материалы диссертационной работы в научно-фундаментальном и прикладном аспектах **представляют интерес и могут быть использованы** в научно-исследовательских, конструкторских и производственно-технологических центрах медико-биотехнологического, а также смежного профиля (ветеринарии, науки о полимерах, материаловедения и др.).

Достоверность результатов и **степень обоснованности** научных положений, выводов и рекомендаций. Достоверность надежно обеспечена применением на всех этапах работы широчайшего спектра современных методов и инструментария получения экспериментальных данных, их воспроизводимостью и статистическим анализом доверительных интервалов. Обоснованность вытекающих из этих данных научных положений, выводов и рекомендаций, подкреплена грамотностью, логичностью и теоретической фундаментальностью интерпретации собственных результатов в сопоставлении с известными аналогами, адекватным применением методов математического моделирования, анализа и экспериментальной верификации, включая натурное моделирование на биосистемах различного уровня (биохимический, клеточный, тканевый, организмов опытных животных). Экспертное признание достоверности и обоснованности подтверждается фактом приема материалов выводов и

рекомендаций диссертанта к публикации в высокорейтинговых профессионально рецензируемых профильных журналах и книжных изданиях.

Публикация основных результатов. Материал диссертации представлен в 61 публикации, включая 51 научную статью в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных для защиты на диссертационном совете МГУ им. М.В. Ломоносова (из них 6 – в журналах Q1), в 2-х статьях в Российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ; в 2-х обзорных главах книжных изданий и отражены в 6-ти патентах РФ.

Оценка содержания диссертации

Диссертация Бонарцева А. П. построена классически, включая все необходимые для квалификационной экспертизы части: введение, три основные главы – **обзор литературы** (глава 1), **материалы и методы** исследования (глава 2), **результаты и их обсуждение** (глава 3, 10 разделов), общее заключение, выводы и список литературы. Материал изложен ясно, логично и в полном объеме на 543 страницах, содержит 195 рисунков, 36 таблиц и список литературы – 791 источник цитирования.

Во введении автором обоснована актуальность выбранного тематического направления, сформулированы цель и задачи работы, охарактеризованы её научная новизна, теоретическая и практическая значимость, соотношение с мировым уровнем, основы методологии, личный вклад автора на всех этапах работы, степень достоверности, апробация на научных форумах, публикации в профильных изданиях и патентная защита; описаны объём, структура и логика работы. Сформулированы положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы (Глава 1) представлен анализ научных публикаций о современном состоянии исследований и разработок в области биоматериалов и роли био-технологии/инженерии в их развитии. Внимание акцентировано на биогенных полиоксиканоатах (ПОА), их молекулярной структуре, физико-химических свойствах, деградации, природной функции запасания резервного питания бактерий и биосовместимости. Обсуждены известные

подходы к созданию ПОА-матрикс для биоинженерии, в т.ч., костных тканей, потенциал стволовых клеток мезенхимы костно-тканевой дифференциации, а также примеры применения ПОА для разработки лекарственных систем. Обзор литературы выстроен последовательно и логично, написан ясным языком и дает полноценное понимание как тематической проблематики в целом, так и её частных аспектов, существенных для целеполагания и планирования собственных исследований диссертанта.

В Главе 2 «Материалы и методы исследования» детально описаны экспериментальные условия контролируемого биосинтеза ПОБ/С, их выделения из биомассы и очистки, методы регуляции и определения химического состава и ММ полимеров; методы изготовления и исследования свойств изделий из ПОБ/С: пленок, матрикс, микро- и нано-частиц; изучения их морфологических, физико-химических и целевых свойств инструментальными методами микроскопии, порометрии, анализа размеров микро- и нано- частиц, кристалличности, механической прочности и упругости, гидрофильности, водопоглощения, адсорбции и кинетики высвобождения ЛВ и белков из микрочастиц. Описаны экспериментальные процедуры многоуровневого био-натурного (*in vitro / in vivo*) моделирования и изучения биodeградации, токсичности, биосовместимости, остеогенной активности ПОБ/С- и композитных изделий, а также терапевтической (противоопухолевой) эффективности ЛС-наполненных микросфер, охарактеризованы использованные клеточные культуры, подопытные животные, моделируемые на них заболевания, методы мониторинга патологий и лечебных эффектов. Раскрыты методы математической обработки и статистического анализа экспериментальных данных. Совокупность использованных методов свидетельствует о высоком экспериментальном уровне исследований и достоверности полученных результатов.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение» состоит из 10 разделов, три из которых посвящены биосинтезу ПОБ/С, исследованию их молекулярной и надмолекулярной структуры, физико-химических свойств, а два следующих раздела – результатам изучения (*in vitro*) биodeградации и биосовместимости.

Вторая часть главы 3 посвящена собственно реализации наукоёмкой инженерии ПОБ/С-производных композитных конструкций – препаратов и изделий целевого назначения по двум ключевым направлениям: (1) депо-системы пролонгированного высвобождения лекарств и ферментов и (2) более сложные гибридно-композитные системы восстановления костных тканей, в т.ч., с участием стволовых клеток. По направлению (1) рассмотрены результаты по созданию, изучению и апробации *in vitro* микросферических, микро- и нано-размерных систем высвобождения лекарственных соединений (ЛВ) различной химической природы и назначения: дексаметазон, хлорамбуцил, дипиридамол, индометацин и флурбипрофен, левофлоксацин, рифампицин, этопозид и детально изученный канцеростатик паклитаксел (ПТЛ). Разработаны принципы и различные методы получения таких систем, установлены факторы, механизмы и закономерности регуляции их морфологии, размерности, порогов ЛВ-загруженности и кинетики высвобождения ЛВ, для которой предложены и верифицированы адекватные модели математического описания и практические методы оптимизации. В частности, на примере оптимизированных ПТЛ-загруженных ПОБ/С-микрочастиц показаны экспериментально подтвержденные *in vitro/ vivo* возможности существенного (на порядки) снижения побочной токсичности ПТЛ без потерь целевой противоопухолевой эффективности с кратным увеличением продолжительности жизни животных с различными формами онкогенеза. Кроме того, в ряду ПОБ/С+ЛВ депо-систем разработаны и апробированы аналогичные формы, загруженные бактерицидным ферментом лизоцимом, а также симвастатином – индуктором дифференцировки стволовых клеток (МСК) на профильную функцию роста костной ткани.

Последние три раздела посвящены разработкам систем восстановления костных тканей на основе ПОБ/С-производных 2D и 3D пористых матриксов и микросфер оптимизируемых на биосовместимость и стимуляцию прорастания в порах остеогенных МСК, формирующих костную ткань. Определены условия и механизмы регуляции костно-регенерационных процессов с учетом факторов варьирования ММ, состава (включая ПЭГилирование), физико-

химических характеристик ПОБ/С, анизотропной морфологии пор и оптимальных диапазонов их размеров, композитных добавок гидроксиапатита и др. Показана высокая костно-восстановительная эффективность этих систем на экспериментальных моделях *in vitro / vivo* некритических (бедренной кости) и критических (теменной кости черепа) костных дефектов крысы. По данным гистологического и других методов мониторинга (включая компьютерную томографию *in vivo*) регенерация протекала достаточно полно и успешно без каких-либо выраженных воспалительных и иных побочных эффектов, а полимерное вещество матрикса подвергалось постепенной биodeградации.

Итоговая оценка представленных результатов суммирована автором в завершающих разделах «Общее заключение» и «Выводы».

В целом, научный уровень, практическая результативность и завершенность представленной диссертационной работы безусловно и полностью соответствует критериям высококлассного научного исследования, достойного для присуждения её автору ученой степени доктора наук.

Тем не менее, в любой научной работе нет пределов, но всегда есть новые перспективы движения к совершенству, в связи с чем, на правах оппонента, хотелось бы отметить ряд замечаний и пожеланий.

Замечания:

1. Поскольку **полимерные материалы** – центральный объект исследования, то особое значение имеет их фундаментальная характеристика – степень полимеризации, оцениваемая по молекулярной массе (ММ). В работе неоднократно подчеркивается критическая роль ММ, в регуляции всех практически значимых свойств и оптимизации условий переработки. Однако, в работе приводятся в основном средние значения ММ без уточнения ММ-неоднородности – полидисперсности (ММР) образцов, которая может значительно варьироваться в зависимости от условий биосинтеза и в процессах биodeградации, ферментативной и химической деполимеризации. При этом для оценки относительных (в т.ч. разнонаправленных) вкладов разных ММ-фракций в те или иные эффекты крайне важно уточнение ММР, а в идеале

желательно выборочное фракционирование ПОБ/С на узкодисперсные субфракции для сравнительного изучения их характеристик. Особенно интересен этот вопрос относительно пьезоэлектрически спрей-формируемых микросфер из наиболее низкомолекулярных полимеров. Хотелось бы уточнить: в какой степени этот аспект учитывался в диссертационной работе и наблюдались ли корреляции между ММ-полидисперсностью и надмолекулярной дисперсностью по размерам формируемых микросфер и пор?

2. Не во всех таблицах и на рисунках отражены доверительные интервалы приводимых значений, хотя в работе в целом вопросам воспроизводимости и статистической обработки данных уделено достаточно серьезное внимание.
3. В тексте диссертации и автореферата встречаются отдельные неточности, опечатки и неудачно сформулированные фразы. В частности, имеются расхождения порядка нумерации разделов 1.1. и 1.2. в «Оглавлении» (стр. 2-7) и последующем тексте диссертации; «Диссертационная работа состоит из 7 глав (стр. 21); в нумерации рисунков (за рис. 55. на стр. 225 следует новый рисунок, но с тем же номером, номера 126 и 127 на стр. 346, дублируются на стр. 347, но для других рисунков). Встречаются неудачные словосочетания: «...изменению кинетики изменения» ММ ... лучше было бы: «...варьированию ... изменения» или «...изменению кинетики снижения» ММ ...; «сложно сконструированных конструкций» (стр. 428) лучше было бы: «сложно организованных конструкций»... и т.д.
4. На взгляд оппонента, часть материала, развернутого на **543** страницах, особенно главы 3 «**Результаты ...**», можно было бы выразить в более лаконичной предметно-акцентированной форме без излишней детализации. В частности, насыщение ее подразделов избыточно развернутыми микро-обзорами литературы, можно было бы частично переадресовать в главу 1, а излишне подробное описание технических деталей некоторых экспериментов – вынести в Приложения к диссертации (после списка литературы). Это способствовало бы более рельефному и четко сфокусированному восприятию существа, безусловно **впечатляющих достижений автора**.

5. Наконец, анализ итогов работы, позволяет несколько усомниться в исчерпывающей полноте авторской оценки диссертантом практической значимости полученных результатов – в узкоспециализированных рамках преимущественно медицинского применения. Учитывая факты достаточно развернутых доклинических испытаний на животных (*in vivo*), практическую ценность работы правомерно распространить также и на смежные области: ветеринарии, животноводства и, более того – биоинженерии в пользу агропромышленного комплекса в целом. Разработанные методологии инженерии ПОБ/С-систем пролонгированного высвобождения биологически активных веществ, не менее привлекательны для создания конструкционно и функционально аналогичных экологически дружелюбных депо-форм контролируемой дозировки регуляторов роста животных и растений, фито-защитных препаратов, ...; а также биосовместимых компонентов защитных оболочек и упаковочных материалов для семян, продуктов и т.д. В совокупности такие практические перспективы будут иметь существенное значение для национального (в т.ч. экономического) суверенитета России.

Указанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы, а скорее подтверждают ценность её дальнейшего развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Диссертационное исследование Бонарцева Антона Павловича на тему «Биоинженерия поли-3-оксибутирата, получаемого биотехнологическим путём: контролируемый биосинтез его сополимеров, свойства *in vitro* и применение на моделях заболеваний *in vivo*» является завершённым исследованием, полностью отвечающим критериям актуальности, новизны, научно-фундаментальной и практической значимости, которое можно квалифицировать как научное достижение в области биотехнологии управляемого бактериального синтеза и исследования полиоксибутиратов, их сополимеров и разработки на этой основе новых лекарственных форм пролонгированного действия, а также имплантируемых систем тканевой инженерии, имеющих высокую практическую ценность для внедрения в современную биомедицину.

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, автор диссертационной работы Бонарцев Антон Павлович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор химических наук, доцент,
главный научный сотрудник лаборатории химии полиэлектролитов и медико-биологических полимеров отдела синтеза, модификации и переработки полимеров и полимерных композитов ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН),

Сербин Александр Владимирович

Контактные данные:

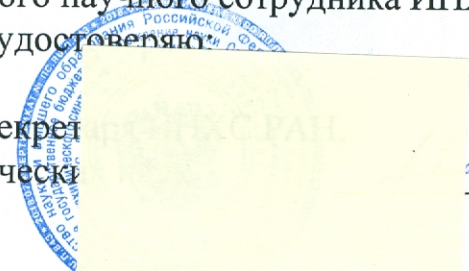
Тел.: +7-495-647-59-27 доб. 331, e-mail: serbin@ips.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.06. – «Высокомолекулярные соединения (химические науки)».

Адрес места работы: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 29

Тел.: (495) 954-22-92; e-mail: director@ips.ac.ru

Подпись главного научного сотрудника ИНХС РАН

Сербина А. В. 

И. о. ученого секретаря
кандидат химических наук

 Калашникова И.С.