

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Дудун  
Андрея Андреевича на тему: «Биосинтез бактериального альгината и влияние  
конструкций на его основе на состав кишечной микробиоты *in vivo*»

по специальности 1.5.6. Биотехнология

### Актуальность темы исследования.

Использование эндопротезов и подложек на основе биополимерных конструкций получило широкое применение в области тканевой инженерии и является перспективным направлением исследований. Основные требования к ним - способность к биосовместимости и биодegradации. Одними из таких биополимеров являются поли-3-оксибутират (ПОБ), относящийся к семейству полиоксиалканоатов (ПОА), и неразветвленный экзополисахарид альгинат, которые можно получать с помощью бактерий рода *Azotobacter*, конкретно *Azotobacter vinelandii*. Бактериальные полиоксибутираты и альгинат с разными характеристиками могут быть использованы для изготовления скаффолдов для регенерации тканей и органов, в частности, для биополимерных конструкций для регенерации стенки толстого кишечника. Различные заболевания толстого кишечника, такие как множественный сепсис, болезнь Крона или рак толстой кишки требуют современных подходов инвазивного лечения.

Одной из важных особенностей толстого кишечника от большинства других органов является наличие в нем разнообразной, активной микробиоты, которая как «отдельный орган» играет большую роль в регуляции здоровья человека. Поэтому необходимо знать какие изменения будут происходить в ее составе при использовании биополимерных конструкций на основе ПОБ и альгината в качестве «заплаты», как эти изменения могут повлиять на скорость заживления или воспалительные процессы кишечного эпителия.

Целью диссертационной работы Андрея Андреевича Дудуна стало изучение синтеза *Azotobacter vinelandii* 12 альгинатов и ПОБ, их физико-химическая характеристика и получение конструкции с использованием этих биополимеров для имплантации в толстый кишечник крыс, оценка её влияния на состав бактерий в кишечнике.

**Научная новизна работы.** Установление условий для синтеза штаммом *Azotobacter vinelandii* 12 конкретного полимера, поли-3-оксибутирата и альгината, и их комбинаций, выявлено, что капсульный альгинат с большей молекулярной массой предпочтительнее свободного, находящегося в культуральной жидкости альгината. Показаны различия физико-химических свойств полученных полимеров в процессе их синтеза в полном факторном эксперименте (ПФЭ). В работе были продемонстрированы влияния имплантированных биополимерных конструкций на основе бактериальных альгината и ПОБ на состав кишечной микробиоты крыс линии Wistar.

**Практическая значимость.** Ранее не было показано возможности контролируемого синтеза альгината и ПОБ, что позволяет в будущем оптимизировать процесс биотехнологического синтеза ПОБ и альгината для различных задач в области биотехнологий и медицины. Данные по составу кишечной микробиоты после имплантации разработанной биополимерной «заплатки» показывают, что изменения в ней могут быть очень большие, что необходимо учитывать и определять бактериальные «маркеры» воспалительных эффектов и регенеративных процессов в толстом кишечнике после операции.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, содержащий ссылки на 310 источников. Работа иллюстрирована 32 рисунками, содержит 3 таблицы.

**В обзоре литературы** проведен анализ бактериальных полимеров – альгинатов и ПОБ, их синтез, биодegradация и применение в биомедицине. Достаточно полно описаны различные тканеинженерные конструкции для регенерации кишечного эпителия. Особое внимание уделено роли кишечной микробиоты в жизни человека и ее исследованию методами секвенирования. Обзор написан обстоятельно.

**Материалы и методы** описаны подробно. В работе был использован полнофакторный эксперимент (ПФЭ) по трем факторам (сахароза, фосфаты и азрация) для выбора условий культивирования штамма с целью получения наиболее высокого уровня выхода нужного полимера. Полученные полимеры были охарактеризованы методами ИК



спектроскопии, вискозиметрии, реометрии, термогравиметрическим анализом. Проведена оценка цитотоксичности и его влияние роста клеток бактериальных альгинатов методами определения жизнеспособных клеток. были разработаны Разработаны ПОБ-альгинат конструкции в виде кишечной заплаты с целью проведения серии операций на крысах *in vivo* - сферы из альгинатного гидрогеля с включением в него пробиотических бактерий *Lactobacillus* sp. и *Bifidobacterium* sp.. Для изучения микробиота фекалий крыс применен метод 16S метагеномного секвенирования. Полученные данные статистически подсчитаны и визуализированы при помощи современных подходах биоинформатики.

**Результаты и обсуждение.** В работе Дудун А.А. показано влияние условий культивирования в ПФЭ на синтез и характеристики полимеров, полученные полимеры охарактеризованы по химической структуре и молекулярным параметрам, подтверждено отсутствие цитотоксического эффекта бактериального альгината на мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Дана оценка  $\alpha$ -разнообразия и  $\beta$ -разнообразия, качественного и количественного состава микробиоты фекалий крыс, и её реакция на имплантацию в кишечник разработанных конструкций на основе ПОБ и альгината.

**Заключение.** В главе «Заключение» автором диссертации подведен итог выполненной работы, обсуждены основные результаты работы и дается оценка их фундаментального и прикладного значения.

**Выводы,** сделанные в работе, соответствуют цели и задачам исследования.

**Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики.**

Определены условия избирательного синтеза штаммом *Azotobacter vinelandii* только капсулярного альгината (с большей молекулярной массой, чем у свободного альгината, и не проявившего цитотоксичности) без накопления свободного альгината и ПОБ. В условиях пониженных концентраций сахарозы, повышенной концентрации фосфатов и высокого уровня аэрации избирательно достигнут синтез только капсулярного альгината при полном подавлении синтеза свободного альгината. Несомненным достоинством является подробная характеристика бактериальных ПОБ и альгината. Показано, что ММ капсулярных альгинатов значительно выше ММ свободных альгинатов. ММ капсулярных альгинатов варьирует в зависимости от условий культивирования (от 212 кДа до 574 кДа). Обнаружена корреляция молекулярной массы альгинатов с их водопоглотительными и вязкоупругими свойствами.



Разработано несколько вариантов подложки для имплантации дефекта кишечника на основе пластины ПОБ с микросферами, содержащими чистый альгинат, альгинат со сферами лактобактерий, альгинат со сферами бифидобактерий и альгинат со сферами лактобифидобактерий. Исследование состава микробиоты молекулярно-генетическими методами после хирургического вмешательства по имплантации гибридных конструкций на основе альгината и ПОБ показало, что изменение при этом бактериального населения толстого кишечника значимы.

**Публикации.** Основные идеи и положения работы были изложены в 24 научных работах: из них 6 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

Дудун А.А. провел большую работу, применил разнообразный комплекс современных методов и получил важные результаты в научном и практическом отношении, однако, необходимо отметить отдельные **недостатки работы и вопросы:**

1. В работе практически нет количественных данных по накоплению ПОБ, свободных и капсульных альгинатов, соотношению этих полимеров при разных условиях и какие из них выбраны для получения ПОБ для подложки ПОБ и альгината для сфер.
2. Почему опыт с крысами проходил столь непродолжительно -7 суток и можно ли утверждать, что регенерация ткани кишечника после операции с подложкой из биополимеров (ПОБ и альгината) прошла успешно.
3. Не ясно какие именно бактерии автор рассматривает в качестве маркеров воспалительного и регенеративного процессов после имплантации биополимерной «заплатки» на основе альгината и ПОБ в кишечник крыс, хотя это утверждает. Каковы критерии выявления бактериальных маркеров регенерации и воспалительного процесса, кроме литературных данных о полезности пробиотических бактерий, что некоторые из выявленных бактерий являются известными обитателями кишечника животных, такие как представители *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibaculum*, *Allobaculum*, *Blautia* и ряда других.
4. В ряде случаев изложение результатов и их обсуждение недостаточно четкое.


Указанные замечания, тем не менее, не снижают ценность диссертационной работы и не влияют на главные результаты работы. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. 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, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Считаю, что соискатель Дудун Андрей Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
заведующий кафедрой микологии и альгологии  
биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»

КУРАКОВ Александр Васильевич

  
подпись  
В.12.2022  
Дата подписания

Контактные данные:

тел.: +7-(495)-939-39-70, e-mail: kurakov57@mail.ru  
Специальности, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:  
03.02.03 – Микробиология (биологические науки),  
03.02.13 – Почвоведение

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»,  
биологический факультет

Тел.: +7-(495)-939-15-18; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова» А.В. Куракова удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»



Е.В. Петрова

дата

