

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

Диссертационная работа Дудун А.А. посвящена синтезу и исследованию физико-химических свойств бактериальных биоразлагаемых полимеров, созданию композитных конструкций на основе синтезированных полимеров для имплантации их в толстый кишечник крыс *in vivo* и изучению влияния имплантированных конструкций на состав кишечной микробиоты.

1. Актуальность темы диссертации.

В настоящее время в развитых странах мира биотехнологии активно внедряются и в медицинскую сферу. Использование направленного синтеза для получения целевых продуктов с помощью объектов микробного происхождения для нужд медицины и, в частности, тканевой инженерии, позволяет создавать материалы с необходимыми, а также совершенно новыми свойствами для целей трансплантации органов и тканей, регенеративной медицины, создания лекарственных средств для лечения заболеваний различной этиологии. Существующие требования к применяемым в медицинской биоинженерии материалам, побуждают исследователей постоянно искать новые полимеры, удовлетворяющие конкретным условиям их применения в медицинской практике. Материалы на основе бактериальных полимеров, такие как альгинаты, полиоксиалканоаты, полилактиды и др., и их композиты обладают биосовместимостью, низкой токсичностью и необходимыми для данного конкретного случая заданными физико-механическими характеристиками. В работе автор в качестве объектов исследования использует биоразлагаемые и биосовместимые полимеры поли-3-оксибутират и альгинат. За счет варьирования условий культивирования бактериального штамма *Azotobacter vinelandii* 12 синтезированы данные биополимеры с различными физико-химическими свойствами. Благодаря биосовместимости, биodeградации и вариации механических свойств бактериальные поли-3-оксибутират, альгинат и их

композиты могут быть применимы в качестве скаффолдов для заживления тканей и органов, что имеет большой потенциал для их биомедицинского применения.

Одной из самых частых проблем с которой сталкивается медицина – это различные заболевания толстого кишечника, часто требующие оперативного вмешательства. Роль кишечной микробиоты в процессе регенерации или воспалительных процессов остается неясной, при этом кишечная микробиота, как отдельный орган, играет большую роль в здоровье человека. В работе Дудун А.А. на основе синтезированных полимеров поли-3-оксибутирата и альгината разработаны тканеинженерные конструкции – кишечные заплаты, что может рассматриваться в качестве нового инвазивного подхода лечения толстого кишечника. Общепринято, что влияние импланта при эндопротезировании оценивают, используя гистологические и иммунохимические методы. Но для кишечника необходимо учитывать его тесное взаимодействие с микробиотой. Ответом на имплантацию медицинского изделия, как правило, является существенное изменение состава микробиоты, то есть состав микробиоты может быть ассоциирован с определенным воспалительным или регенеративным процессом.

2. Новизна результатов диссертационной работы

В работе впервые изучено влияние различных факторов на конкурентный синтез двух биополимеров бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12, а именно: гидрофобного поли-3-оксибутирата и гидрофильного альгината.

Продемонстрировано различие физико-химических свойств полученных полимеров в процессе их биосинтеза.

В работе впервые показано влияние имплантированных биополимерных конструкций на основе альгината и поли-3-оксибутирата на состав кишечной микробиоты крыс линии Wistar.

Впервые прослежена связь увеличения или, наоборот, угнетения отдельных таксономических бактериальных групп после серий хирургических вмешательств по имплантации биополимерных конструкций в толстый кишечник крыс линии Wistar.

3. Практическая значимость диссертационной работы.

Практическая значимость работы состоит в возможности избирательного биосинтеза биополимеров: гидрофобного поли-3-оксибутирата и гидрофильного альгината определенного состава полимерной цепи и заданных физико-химических характеристик.

Путем варьирования условий культивирования *Azotobacter vinelandii* 12 достигнута высокая эффективность биосинтеза свободных и капсулярных альгинатов. Определены условия избирательного биосинтеза только капсулярного альгината при полном подавлении биосинтеза свободного альгината и поли-3-оксибутирата. Продемонстрировано влияние биополимерных конструкций на основе поли-3-оксибутирата и альгинатов на состав кишечной микробиоты. В работе автором рассматривается возможная роль и функции отдельных таксономических бактериальных групп микробиоты в заживлении поврежденной кишечной ткани.

4. Содержание диссертации.

Диссертация построена традиционно и состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы.

В литературном обзоре приведены подробные сведения о бактериальном альгинате, а именно: о его биосинтезе, биодegradации, механических и физико-химических свойствах. Отдельное внимание уделено использованию альгинатов в медицине и фармацевтике. В обзоре также рассмотрены полиоксикалкоанаты, второй класс биополимеров, синтезируемых бактериями рода *Azotobacter*. Использование их в качестве жестких основ для поддержания роста клеток в разработках трехмерных матриц дает возможность создания композитных конструкций на основе нескольких полимеров для тканевой инженерии. Вторая часть литературного обзора посвящена новым стратегиям лечения толстого кишечника и исследованию кишечной микробиоты толстого кишечника в норме и в патологиях. Подробно описаны методики анализа кишечной микробиоты.

В главе, посвященной материалам и методам, описана постановка полного факторного эксперимента культивирования бактерии *Azotobacter vinelandii* 12, разработка методов выделения и очистки альгината и поли-3-оксибутирата, охарактеризованы физико-химические свойства полученных полимеров. Большая часть работы посвящена получению на основе поли-3-оксибутирата и альгината различных вариантов конструкций для имплантации в толстый кишечник крыс *in vivo* и дальнейшему анализу кишечной микробиоты методом 16S метагеномного анализа.

Глава, посвященная результатам и обсуждению, состоит из 2 частей. В первой части приводятся результаты синтеза альгинатов и поли-3-оксибутирата бактерией *Azotobacter*

vinelandii 12 в полном факторном эксперименте и их физико-химические свойства. Показано, что низкие концентрации углерода, высокие концентрации фосфатов и высокая аэрация в среде, способствует синтезу высокомолекулярного капсулярного альгината, при этом полностью подавляется синтез свободного альгината и поли-3-оксибутирата. Исследование физико-химических свойств полимеров выявило, что альгинаты различаются по молекулярной массе, уровню ацетилирования и M/G составу полимерной цепи. Во второй части главы приведены результаты 16S метагеномного анализа кишечной микробиоты после серии операций по имплантации различных вариантов композитных конструкций в толстый кишечник крысам линии Wistar. Влияние различных вариантов конструкций на кишечную микробиоту *in vivo* выражалось в изменении качественного и количественного состава бактериальных сообществ в сравнении с контрольной группой.

Диссертация охватывает полный спектр исследования бактериального альгината – от биосинтеза и до исследования его применения *in vivo*. Полученные данные позволяют автору сделать вывод о возможности использования бактериального альгината в тканевой инженерии кишечника, а также о влиянии конструкций на основе альгината и поли-3-оксибутирата на состав кишечной микробиоты *in vivo*.

Выводы по диссертационной работе вполне конкретны и точно отражают существо выполненной работы и полученные в ней результаты. Список литературы содержит 310 наименований использованных источников. Автореферат и опубликованные работы отвечают существу диссертации, ее объективному содержанию и сделанным выводам. По теме диссертации автором опубликовано 9 печатных работ, 6 из них индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

В качестве замечаний следует отметить следующее:

1. В работе не приведены данные по динамике биodeградации использованных биполимерных конструкций.
2. Почему в качестве объекта исследований был выбран штамм *Azotobacter vinelandii* 12?
3. Почему для оценки цитотоксичности альгинатов использовались мезенхимальные стволовые клетки и почему продолжительность эксперимента на клетках была 1 и три дня, не мало ли?

4. Что было главным для оценки выхода продукта при бактериальном синтезе – количество полимера, молекулярная масса полимера, соотношение М/Г в молекулярной цепи, уровень ацетилирования?

Все выше перечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы. Диссертация Дудун А.А. 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.

Таким образом, соискатель Дудун Андрей Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, заместитель директора по научной и научно-образовательной работе, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Попов Анатолий Анатольевич


« » 2022 г.

Контактные данные:

Тел.: 8 (495) 939-79-33, e-mail: popov@sky.chph.ras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

002.00.06 – «Высокомолекулярные соединения»

Адрес места работы: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Подпись Попова А.А. удостоверяю

Ученый секретарь ИБХФ РАН

