

## 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 Андрея Андреевича является актуальным научным исследованием. Работа комплексная и состоит из двух частей: первая часть посвящена биосинтезу полимеров - альгината и поли-3-оксибутирата бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12 и исследованию их физико-химических свойств, вторая часть – это разработка биополимерной конструкции на основе ранее синтезированных полимеров и ее имплантации в толстый кишечник крысам линии Wistar с целью исследования кишечной микробиоты. Несмотря на множество ранее опубликованных исследований по кишечной микробиоте, в работе Дудун А.А. впервые продемонстрировано влияние непосредственно композитной конструкции на состав кишечной микробиоты, что позволяет проследить, какие именно отдельные таксономические бактериальные единицы могут проявлять себя как прогностические маркеры при различных воспалительных заболеваниях или регенеративных процессах. В первой части работы, посвященной синтезу альгинатов показана возможность оптимизации синтеза данных биополимеров с заданными физико-химическими свойствами, что позволяет использовать бактериальные альгинаты для многих биомедицинских задач.

Научная новизна работы состоит в изучении влияния различных факторов среды на конкурентный синтез двух биополимеров (альгината и поли-3-оксибутирата) бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12. Впервые разработаны биоинженерные конструкции на основе этих биополимеров, прослежена связь увеличения или, наоборот, угнетения отдельных таксономических бактериальных групп в кишечной микробиоте после серий хирургических вмешательств по имплантации этих конструкций в толстый кишечник крыс линии Wistar.

Практическая значимость работы состоит в определении условий ферментации *Azotobacter vinelandii* 12, при которых достигнута высокая эффективность избирательного

биосинтеза высокомолекулярного «капсулярного» альгината. В диссертационной работе на основе поли-3-оксибутирата и альгината разработаны различные варианты конструкций для имплантации в толстый кишечник крыс *in vivo* для анализа кишечной микробиоты. Изменение состава кишечной микробиоты после имплантации различных вариантов конструкций дает понимание о том, какие бактерии могут участвовать в роли «маркеров» для диагностики воспалительных эффектов толстого кишечника. Необходимо отметить, что автору удалось провести полноценный цикл исследования, начиная от синтеза биополимеров штаммом-продуцентом и заканчивая оценкой влияния биополимерных имплантов на основе синтезированных полимеров на микробиоту кишечника крыс.

Дудун Андреем Андреевичем получены результаты, имеющие фундаментальное и практическое значение для развития инвазивных методов лечения толстого кишечника, одним из которых является использование тканеинженерных материалов на основе биосовместимых биополимеров. Автору в ходе проведения экспериментов удалось установить, как именно различные варианты тканеинженерных конструкций влияют на состав кишечной микробиоты. Так, к примеру, имплантация конструкции поли-3-оксибутират-альгинат с применением антибиотика показала превалирование в кишечной микробиоте крыс бактерий класса Clostridia. В дальнейшем, эти данные будут полезны при разработке различных вариантов композитных заплат для толстого кишечника, а метагеномные данные по анализу бактериальных сообществ в микробиоте помогут в изучении регенерации толстого кишечника после оперативных вмешательств.

Результаты работы представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков, работающих в различных областях биотехнологии, биоинженерии, микробиологии.

Диссертационная работа Дудун А.А. включает в себя 7 разделов, изложена на 136 страницах, хорошо иллюстрирована 32 рисунками и содержит 3 информативные таблицы. Разделы диссертации включают: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. При оформлении работы автор придерживался традиционной схемы. Список литературы обширен и включает 310 источников, при этом достаточно хорошо освещены работы последнего десятилетия.

Во введении обосновывается актуальность проблемы, формулируются цели и задачи исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы, характеризуется личный вклад диссертанта, приводятся результаты апробации полученных данных. Задачи исследования сформулированы четко и обоснованно относительно поставленной цели. Обзор литературы базируется на анализе большого количества научной информации по тематике работы и в полной мере описывает современное состояние в области изучения синтеза и свойств бактериальных полимеров рода *Azotobacter sp.*, а именно альгинатов и полиоксиалканоатов. В дополнении к этому присутствуют отдельные главы обзора литературы, посвященные современным биоинженерным стратегиям по лечению различных заболеваний желудочно-кишечного тракта и 16S метагеномному анализу кишечной микробиоты, что немаловажно для дальнейшей постановки экспериментальной части работы и обсуждения результатов.

Диссертант убедительно доказывает необходимость проводимых исследований. В целом обзор литературы дает подробное представление о предмете исследования и демонстрирует хорошее знание современного состояния дел в области изучения биополимеров и исследования кишечной микробиоты, а также предоставляет возможность оценить новизну полученных данных.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны применяемые в работе методики: культивирование *Azotobacter vinelandii* 12, выделение и очистка синтезированных альгинатов и поли-3-оксибутирата, подробно описаны используемые методики физико-химического анализа альгинатов и гидрогелей на их основе, разработка различных конструкций для имплантации в толстый кишечник животным *in vivo*, анализ бактериальных сообществ после серии оперативных вмешательств по имплантации ранее разработанных конструкций. В работе использованы как традиционные методы микробиологии, биохимии, физической химии, так и современные методы тканевой инженерии, метагеномики и биоинформатики.

Части диссертационной работы, посвященные описанию результатов экспериментальной части работы и их обсуждению являются детальными и отвечают на все поставленные задачи. На первом этапе работы, была исследована способность бактерии *Azotobacter vinelandii* 12 синтезировать два типа полимеров: поли-3-оксибутират и альгинат при различных условиях культивирования. Важным результатом данной части диссертации

является установленный автором факт, что при пониженных концентрациях сахарозы, повышенной концентрации фосфатов и высокого уровня аэрации избирательно достигнут синтез только высокомолекулярного капсулярного альгината при полном подавлении синтеза свободного альгината. Результаты сравнительного анализа физико-химических свойств полученных биополимеров в вариантах полного факторного эксперимента показал различия альгинатов по молекулярной массе, степени ацетилирования и соотношения M/G мономерного состава цепи.

Вторая часть описания результатов посвящена разработке конструкций на основе синтезированных поли-3-оксибутирата и альгината и их имплантации в толстый кишечник крысам линии Wistar для дальнейшей оценки бактериальных сообществ в кишечной микробиоте. Данный эксперимент в полной мере демонстрирует существенный потенциал применения подобных кишечных заплат в тканевой инженерии, поскольку использование данных конструкций не демонстрировало негативного влияния на состав кишечной микробиоты за исключением конструкции поли-3-оксибутират-альгинат с инкапсулированными бактериями рода *Lactobacillus sp.* Это подтверждается анализом  $\alpha$ -разнообразия, демонстрирующим сложность биологической системы внутри бактериального сообщества. Показано, что все варианты конструкций (за исключением биополимерной конструкции с включением Лактобактерий) показывали сопоставимый уровень  $\alpha$ -разнообразия при сравнении с контрольной группой. 16S данные, оцененные по  $\beta$ -разнообразию, показали, что оперируемые крысы в вариантах с имплантируемой конструкцией и инкапсуляцией пробиотиков и в варианте применения антимикробного препарата вносили больший вклад в структуру кишечного бактериального сообщества, чем факт самой операции или эндопротезирования биополимерной конструкции без включения каких-либо дополнительных веществ. Основываясь на результатах метагеномного анализа, можно заключить, что разработанные биополимерные конструкции кардинально изменяли структуру бактериального сообщества кишечной микробиоты, позволяя проследить резкий рост или полное исчезновение отдельных бактериальных таксономических единиц.

В ходе прочтения работы и автореферата возникли отдельные замечания и вопросы:

1. В начале второй главы «Результаты и обсуждение» автор приводит данные о том, что доминирующим филумом по количеству операционных таксономических

единиц (ОТЕ) являются *Firmicutes*, но одновременно с этим не приводит данные по количественному соотношению двух самых многочисленных филумов кишечной микробиоты, а именно соотношению *Firmicutes* к *Bacteroidota*, хотя данный критерий является одним из самых показательных при анализе кишечной микробиоты.

2. На странице 94 автор называет бактерии рода *Faecalibaculum sp.* пробиотическими и отмечает их рост у крыс с контрольными операциями и в экспериментальной группе крыс с конструкцией поли-3-оксибутират-альгинат. Однако утверждение, что бактерии рода *Faecalibaculum sp.* являются пробиотическими спорно. Скорее правильно говорить, что бактерии рода *Faecalibaculum sp.* являются потенциально новыми кандидатами в пробиотики.
3. В диссертации есть оценка цитотоксичности синтезированных альгинатов, получены важные результаты, однако в выводах они не отражены.
4. В выводах не уточнена, какая именно корреляция (вероятно положительная?) обнаружена между молекулярной массой полученных альгинатов и их вязкоупругими свойствами.

Все вышеперечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы.

Диссертация Дудун А.А. прошла широкую апробацию на российских и международных конференциях. Результаты и выводы работы в полном объеме представлены в печатных работах, включающих в себя 9 статей, 6 из которых опубликованы в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах WoS, SCOPUS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова

В целом, можно заключить, что представленная работа имеет большое значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биотехнологии, является добротным законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне. 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:

кандидат биологических наук, начальник лаборатории геномики прокариот, ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»», Курчатовский геномный центр

Тощакوف Степан Владимирович

Контактные данные:

Тел.: 8(9 9, e-mail: ste il.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.26 – «Молекулярная генетика».

Адрес места работы: 123098, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1



2022 г.  
- 4/1/2

Начальник лаборатории «Геномная фабрика»  
«Курчатовского геномного центра»  
НИЦ «Курчатовский институт»



С.В. Тощакوف

Подпись С.В. Тощакова удостоверяю  
Главный ученый секретарь  
НИЦ «Курчатовский институт»



М.М. Борисов