

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук
Самойленко Владимира Александровича на диссертацию
Бартова Михаила Сергеевича «Новые биотехнологические подходы к
созданию остеоиндуктивных материалов на основе белка rhBMP-2,
полученного микробиологическим синтезом в *Escherichia coli*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Бартова Михаила Сергеевича посвящена оценке эффективности применения трансплантационных материалов, содержащих в своем составе рекомбинантный человеческий белок BMP-2, а также разработке биотехнологических подходов для обогащения препарата rhBMP-2 его биологически активной димерной формой.

Актуальность избранной темы вытекает из несомненной социальной значимости проблематики лечения переломов, особенно у людей в пожилом возрасте. Применение аутотрансплантатов во время проведения операции не всегда возможно, а порой и опасно, в связи с чем использование трансплантационных материалов иного происхождения становится не только оправданным, но и перспективным. Достижения современной биотехнологии позволяют добиться ускорения процесса регенерации костей с помощью использования различных тканевых факторов роста, от эффективности которых зависит время реабилитации пациента.

Очень перспективным направлением является создание костных морфогенетических белков. В данной работе автором в качестве такого фактора роста рассматривается белок BMP-2, обладающий среди прочих наибольшей эффективностью в отношении стимулирования остеогенеза. Новизна работы заключается в том, что автором предлагается оригинальный подход, который позволяет увеличить биологическую активность трансплантационного материала, содержащего rhBMP-2, за счет повышения содержания в препарате белка молекулярной димерной формы, определяющей его остеоиндуктивные свойства. В настоящее время для повышения уровня продукции целевого белка, его стабилизации и реализации быстрой и эффективной его очистки, является технология аффинных доменов: с помощью микробиологического синтеза в клетках бактерий возможно получать химерные белки, содержащие аффинные домены и биологически активные пептиды.

Суть подхода заключается в использовании клеточного рецептора данного белка для выделения только димерной формы из смеси олигомеров, получаемых в процессе биосинтеза в микробиологической системе *Escherichia coli*. Для реализации предложенного подхода была сконструирована плазида, обеспечивающая экспрессию химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, который содержит функциональный домен рецептора к rhBMP-2 и целлюлозосвязывающий домен, позволяющий использовать его для очистки с помощью метода аффинной хроматографии

на целлюлозосодержащем сорбенте, что и было успешно продемонстрировано. Автором также был получен штамм-продуцент белка BMPRIA-CBD и оптимизированы по нескольким параметрам условия его экспрессии, что позволило получить белок с хорошим выходом.

Следующим этапом исследований являлась оптимизация условий глубинного культивирования бактериальных клеток, содержащих гены химерных белков. Был подобран состав питательных сред и физико-химические условия выращивания в колбах и лабораторном ферментере. В результате проведенных экспериментов удалось повысить уровень продукции химерных белков в 1,5 раза по сравнению с начальным.

Кроме того, следует отметить, что была проведена большая работа по исследованию на лабораторных животных биологической активности материала с иммобилизованным рекомбинантным человеческим BMP-2, синтезированным ранее в лаборатории, где автор проводил положенные в основу диссертационной работы исследования. Диссертация обладает большой практической значимостью для разработки материалов с увеличенными остеоиндуктивными свойствами для применения в медицине и ветеринарии, что могло бы способствовать импортозамещению продукции данной категории. Кроме того, апробированный подход для получения белков высокой степени чистоты с помощью их мембранных рецепторов имеет и общетеоретическую научную ценность для разработки методов выделения других белков.

Относительно содержания диссертационной работы следует отметить, что она оформлена в соответствии с ГОСТом, устанавливающим структуру и правила оформления диссертаций. Работа содержит титульный лист, оглавление, введение, основную часть, состоящую из глав «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение» и «Выводы». В конце диссертации автором приведены список сокращений, список литературы, насчитывающий 199 литературных источников, и одно приложение с обширным иллюстративным материалом, на который автор ссылается по ходу текста. Работа изложена на 138 страницах, содержит 46 рисунков и 11 таблиц.

Во введении к диссертационной работе автор раскрывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи работы, указывает на научную новизну и практическую значимость, приводит информацию о структуре диссертации и ее апробации на научно-практических конференциях и публикации в научных изданиях.

Раздел «Обзор литературы» (с.12-39), занимающий по объему четверть основной части диссертации, широко охватывает сведения о костных морфогенетических белках, методах получения BMP-2 и способах увеличения его биологической активности. Раздел заключается подразделом, посвященным остеопластическим материалам, в котором автором всесторонне рассматриваются связанные с ними аспекты.

Экспериментальная часть (с.40-52) состоит из двух довольно подробно изложенных подразделов – «Материалы и реактивы» и «Основные

методики». Для достижения поставленных задач автором было использовано большое количество разнообразных методов, начиная от классических микробиологических и биотехнологических, и заканчивая сложными инструментальными методами, такими как гистология и микрокомпьютерная томография, что ярко характеризует масштабность выполненной работы.

Раздел «Результаты и обсуждение» (с.53-98) достаточно хорошо структурирован и включает в себя подразделы, соответствующие задачам, поставленным для достижения целей работы. Исходя из целей можно выделить 2 логические части. В первой из них (подразделы 3.1-3.2) автор описывает получение остеоиндуктивных материалов в различных видах исполнения и проводит исследование их биологической активности на 3 различных экспериментальных моделях *in vivo*, сопровождая представляемые данные обширным иллюстративным и графическим материалом. Приведенные результаты достоверно подтверждают остеоиндуктивные свойства разработанных материалов из коллагенового матрикса в виде костной крошки, а также высокую эффективность применения губчатых пористых мембран с иммобилизированным на них белком rhBMP-2.

Вторая часть посвящена разработке нового биотехнологического подхода к выделению димерной формы rhBMP-2 и проверке ее биологической активности (подразделы 3.3-3.6).

Автор успешно сконструировал штамм-продуцент химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, представляющего собой рецептор фактора роста и регенерации костной ткани BMP-2 в комплексе с целлюлозосвязывающим доменом. Была проведена оптимизация процесса глубинного культивирования по основным физико-химическим факторам, определяющим рост продуцента и индукцию целевого белка. Следует отметить комплексный подход к оптимизации процесса биосинтеза и выбор наиболее значимых параметров для регуляции процесса. В результате удалось повысить выход целевого продукта в 1,5 раза.

Созданная конструкция позволила получить значительно обогащенный димерной формой белок rhBMP-2 с помощью аффинной хроматографии. Полученный результат является еще одним примером успешной реализации методологии аффинных доменов, развиваемой в лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Завершает диссертацию раздел «Выводы» о проведенной работе. Обоснованность выводов рецензируемой работы не вызывает сомнений, они основаны на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования. Новизна представленных результатов не вызывает сомнений, результаты представляют большой научный и практический интерес и могут быть использованы при создании технологии промышленного производства новых остеопластических материалов.

По диссертационной работе и автореферату имеются некоторые замечания, которые в целом не влияют на положительную оценку работы:

1. В разделе «Обзор литературы» описание многообразия остеопластических материалов представляется несколько избыточным.

2. В разделе «Реагенты и ветеринарные препараты» (с.41) не для всех групп реактивов указаны производители.

3. Скорость вращения центрифуги (с.58) следует указывать в единицах RPM вместо об./мин.

4. На некоторых рисунках (например, с.61, с.66) указаны планки погрешности без указания достоверности.

5. В разделе «Оптимизация экспрессии BMPRIA-CBD в штамме-продуcente и условий его культивирования в ферментере» при описании влияния объема среды в колбе на накопление биомассы (с.88) не приведены значения pH, которые также могли оказать влияние на выход биомассы.

Содержание автореферата отражает содержание диссертации. Результаты работы апробированы на 7 всероссийских и международных научных конференциях, опубликовано 4 научных статьи, в том числе 3 в рекомендованных ВАК журналах, а также получено 3 патента.

Диссертационная работа Бартова Михаила Сергеевича «Новые биотехнологические подходы к созданию остеоиндуктивных материалов на основе белка rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом в *Escherichia coli*» соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а её автор Бартов Михаил Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий центром экспериментальной биотехнологии ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

Владимир Александрович Самойленко

Адрес: 142290, Московская область, г.Пушино, пр-т Науки, д.5,
тел./факс: 8 (495)956-33-70

02 декабря 2015 года

