

УТВЕРЖДАЮ :

директор ФГБНУ «Всероссийский  
научно-исследовательский  
и технологический институт  
биологической промышленности»,  
академик РАН и НААН Украины,  
профессор



А.Я. Самуйленко

26 ноября 2015г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации по диссертационной работе Бартова Михаила Сергеевича «Новые биотехнологические подходы к созданию остеоиндуктивных материалов на основе белка rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом в *Escherichia coli*», представленной к защите в диссертационном совете Д006.027.01 на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### Актуальность работы

Диссертационная работа Бартова Михаила Сергеевича «Новые биотехнологические подходы к созданию остеоиндуктивных материалов на основе белка rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом в *Escherichia coli*», посвящена получению и исследованию эффективности остеопластических материалов, содержащих белковый фактор роста костной ткани рекомбинантный человеческий BMP-2, а также поиску способа выделения димера вышеупомянутого белка для увеличения активности данных материалов. Образование кости является сложным генетически детерминированным процессом, в котором участвуют различные клеточные популяции и синтезируемые ими факторы роста и дифференциации клеток. Добавление подобных факторов, в частности rhBMP-2, в состав трансплантационных материалов ускоряет протекание регенерации костной

ткани в области дефекта за счет активации малодифференцированных и мультипотентных стволовых клеток. Этот подход современной терапии, используемый для направленной регенерации костной ткани, является наиболее перспективным с точки зрения достижения результата лечения, что подкрепляется многочисленными результатами клинических испытаний.

### **Научная новизна результатов исследования, выводов и рекомендаций**

Научная новизна исследований, проведенных автором диссертационной работы, заключается, прежде всего, в разработке способа, позволяющего увеличить выход димерной формы rhBMP-2 и, таким образом, повысить регенеративный потенциал трансплантационных материалов из коллагена при иммобилизации на них данного белка. В работе впервые для этих целей была сконструирована плазмидная рекомбинантная ДНК, обеспечивающая экспрессию в *E.coli* рецепторного белка BMPRIA-CBD, обладающего бифункциональной активностью. С одной стороны, он обладает способностью специфически взаимодействовать со своим лигандом rhBMP-2, с другой – связываться с целлюлозосодержащим носителем. Автором впервые был создан продуцент белка BMPRIA-CBD, на основе которого в дальнейшем был получен хроматографический носитель, позволяющий получать rhBMP-2 с высоким выходом. Также в работе впервые было проведено тестирование на животных материала из частиц деминерализованного костного матрикса совместно с обогащенной тромбоцитами плазмой крови, и показана возможность применения последней для ограничения распространения материала за пределы зоны имплантации.

### **Практическая значимость работы**

Значимость проведенной диссертантом работы состоит в разработке эффективного метода выделения rhBMP-2 с помощью его рецептора, иммобилизованного на хроматографическом носителе. Метод имеет перспективы использования при промышленном производстве рассматриваемых в работе трансплантационных материалов. Автор продемонстрировал на культуре клеток, что очищенный на новом сорбенте белок обладает более высокой удельной биологической активностью, чем препарат белка, выделенный по стандартной технологии и использованный им для адаптации и апробирования методик

тестирования регенеративного потенциала на начальном этапе работы. В связи с этим представляется перспективным внедрение данной разработки в схему производства материалов с rhBMP-2.

### **Рекомендации по использованию результатов работы**

Полученные результаты могут быть использованы в таких учреждениях, как Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина», Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также других учреждениях, работающих в сфере биотехнологии и/или ветеринарии и медицины.

### **Оценка содержания работы**

Текст диссертационной работы хорошо структурирован, изложен на 138 страницах машинописного текста и сопровождается 11 таблицами и 46 рисунками. Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», «Приложение А».

Во введении автором обосновывается актуальность избранной темы, ставятся цели и задачи для их достижения, описывается новизна проведенных исследований и их значение для науки и практики. Раздел завершается представлением данных об апробации результатов работы, и их публикации в виде статей, тезисов и патентов РФ, полный список которых предусмотрительно приведен в конце автореферата.

Обзор литературы достаточно объёмен и рассматривает аспекты, связанные как с семейством костных морфогенетических белков, начиная от их общей характеристики и заканчивая способами оптимизации экспрессии и очистки полученного микробиологическим синтезом BMP-2, так и с трансплантационными биоматериалами. Широта представленных данных свидетельствует о всестороннем изучении диссертантом проблематики работы.

Экспериментальная часть посвящена использованным в работе материалам и оборудованию, а также основным методам исследования, привлеченным автором. Раздел описан довольно подробно и позволяет заключить, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современной приборной базы.

Подразделы главы «Результаты и обсуждение» соответствуют задачам, выделенным в начале работы. В подразделах 3.1-3.2 обсуждаются результаты получения и последующего тестирования биологической активности остеоиндуктивных материалов, содержащих rhBMP-2. Представленные экспериментальные данные убедительно демонстрируют высокий остеоиндуктивный потенциал разработанных материалов, доказанный на различных животных моделях. В подразделах 3.3-3.6 автором описывается процесс получения нового штамма-продуцента для экспрессии рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, состоящего из рецептора BMPRIA, слитого с целлюлозосвязывающим доменом. Оптимизация условий культивирования штамма позволила с хорошим выходом получить белок, который был в дальнейшем использован для разработки нового хроматографического носителя и выделения димерной формы rhBMP-2. Сформулированные выводы диссертационной работы обоснованы и базируются на представленных и обсужденных экспериментальных данных.

В список сокращений вошла расшифровка общепринятых аббревиатур. Список литературы включает 199 литературных источников, 23 из которых русскоязычные. В конце диссертационной работы автор приводит одно приложение, содержащее большую часть иллюстративного материала и способствующее облегчению знакомства читателя с основным текстом рукописи, не перегруженным таким образом рисунками.

## Замечания и предложения

Рецензируемая диссертация не лишена некоторых недостатков. Местами в тексте встречаются стилистические ошибки, такие как лексические повторы (подраздел 3.3, с.80) и избыточное употребление причастных оборотов в одном предложении (пункт 3.2.2, с.63). По содержанию работы имеются следующие замечания:

1. В разделе литературного обзора, описывающем механизм действия BMP-2, приведена общая для белков семейства BMP схема сигнального пути, иллюстрированная рисунком 5 (с.16). Между тем, более логично было бы представить схему сигнального пути BMP-2, указав в ней место рецептора BMPRIA, на который делается акцент в диссертационной работе.
2. При описании методики приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы крови желательно указать конечный диапазон концентраций тромбоцитов в плазме и ссылку на оригинальный источник.
3. В структуре диссертационной работы отсутствует раздел «Заключение», рекомендованный ГОСТом, устанавливающим правила оформления диссертаций и авторефератов.
4. Проводилось ли исследование биологической активности выделенного рекомбинантного белка BMP-2 на животных или только в культуре клеток?

Указанные замечания носят дискуссионный характер и не снижают научной и практической ценности полученных результатов и общей высокой оценки работы.

## Заключение

Содержание диссертационной работы полностью раскрыто в автореферате и соответствует областям исследования, указанным в паспорте специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии). По материалам работы опубликованы 4 статьи, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ; принято 3 патента. По нашему заключению, 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).

Отзыв на диссертационную работу Бартова Михаила Сергеевича рассмотрен и одобрен на заседании отдела молекулярной биологии и вирусологии ФГБНУ ВНИТИБП. Протокол № 5 от 26 ноября 2015 года.

ведущий научный сотрудник отдела  
молекулярной биологии и вирусологии  
ФГБНУ ВНИТИБП, д.б.н.,  
профессор



Светлана Владимировна Кузнецова

#### **Данные об организации**

Название: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ФГБНУ ВНИТИБП).

Почтовый индекс и адрес: 141142, Московская область, Щелковский район, пос. Биокомбината, д. 17.

Телефон: +7(496) 563-24-19.

Электронный адрес: [vnitibp@mail.ru](mailto:vnitibp@mail.ru).