

ОТЗЫВ

официального оппонента Патрушева Льва Ивановича 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 и бионанотехнологии).

Неутешительная статистика случаев травматизма, сопровождаемого повреждениями костной ткани, делает чрезвычайно актуальным и в нашей стране, и за рубежом поиск новых эффективных материалов и методов, которые могли бы быть использованы для лечения таких пациентов. В этом отношении особенно перспективными представляются материалы для замещения травмированной костной ткани, полученные с использованием недорогого вторичного сырья биогенного происхождения и эндогенных индукторов остеогенеза. Разработке именно таких новых материалов посвящена диссертационная работа М.С. Бартова, высокая актуальность и своевременность которой не вызывает сомнений.

Диссертация, изложенная на 138 страницах компьютерного текста, хорошо оформлена, содержит 46 рисунков и 11 таблиц. Список цитированных

литературных источников представлен 199 ссылками, из которых 23 на русском языке.

Во введении автор обсуждает актуальность проблемы, четко формулирует цели и задачи исследования, описывает научную новизну полученных результатов и возможности практического их применения в современной биотехнологии и медицине. Лаконичный обзор литературы, как и вся диссертация, написанный хорошим литературным языком, является логичным введением в экспериментальную часть рецензируемой работы. В разделе «Материалы и методы» М.С. Бартов подробно описывает многочисленные компьютерные, гистологические, хирургические, микробиологические и биохимические методики, связанные с получением и очисткой рекомбинантных белков, а также экспериментальные модели, использованные для определения их биологической активности. Этот раздел характеризует автора как зрелого исследователя, владеющего современными методами цитологии, биохимии и молекулярной биологии.

Основной раздел работы «Результаты и их обсуждение» состоит из двух больших частей. В первой части описаны достижения М.С. Бартова в разработке остеоиндуктивных материалов на коллагеновом носителе, полученном на основе деминерализованного костного матрикса (ДКМ), с иммобилизованным на нем рекомбинантным костным морфогенетическим белком-2 человека (rhBMP-2). Специально разработанные методы фрагментации ДКМ с последующим эффективным фракционированием позволили автору получать коллагеновый матрикс в виде микрочастиц любого заданного размера, а также в виде блоков различной формы, пригодных для восстановления костной ткани в широком диапазоне утраченных объемов. Полученные фракции ДКМ были использованы для иммобилизации на нем имеющегося в распоряжении автора rhBMP-2, который, являясь эффективным индуктором остеогенеза *in vivo*, как предполагалось, мог способствовать в составе ДКМ регенерации травмированной костной ткани. Предположение автора блестяще подтвердилось при испытаниях модифицированного таким

образом ДКМ на нескольких моделях: 1) в индукции эктопического остеогенеза при внутримышечной имплантации ДКМ в виде микрочастиц; 2) в комбинации с пористыми титановыми имплантатами, а также 3) в исправлении критических краниальных дефектов в составе пористой губчатой мембраны. Следует особо подчеркнуть, что для оценки биологической активности ДКМ с иммобилизованным rhBMP-2 М.С. Бартов отработал и эффективно использовал тонкие количественные методы в сочетании с эффективной статистической обработкой получаемых результатов, что приводит к высокой достоверности сделанных выводов.

Во второй, заключительной части работы диссертант решает задачу повышения эффективности биологического действия rhBMP-2 в составе коллагенового матрикса ДКМ. Дело в том, что биологически активной является димерная форма hBMP-2, и лишь она продуктивно взаимодействует со своим рецептором BMPRIA на поверхности клеток. В то же время доступный автору очищенный препарат rhBMP-2 кроме димеров содержал мономеры и олигомеры белка, что могло снижать его удельную биологическую активность. Для решения этой проблемы М.С. Бартов разрабатывает оригинальный метод очистки rhBMP-2 из телец включения рекомбинантных клеток *E.coli*, основанный на аффинной хроматографии с использованием иммобилизованного рецептора, с которым взаимодействуют только биологически-активные димеры hBMP-2. Автор получает генно-инженерные конструкции, экспрессирующие в составе плазмидного вектора рецептор BMPRIA, слитый через пептидный линкер с доменом, связывающим целлюлозу (CBD), а следовательно, химерный рекомбинантный рецептор может быть иммобилизован на носителе, содержащем целлюлозу и использован для аффинной хроматографии. В соответствии с выбранной стратегией, М.С. Бартову удалось очистить димер hBMP-2 до электрофоретически гомогенного состояния и продемонстрировать его высокую биологическую активность.

В связи с данным разделом работы хотелось бы сделать несколько замечаний. Во-первых, не проведено сравнение удельной биологической активности полученного препарата с таковой исходного рекомбинантного белка, использованного в первой части диссертации. Поэтому сделать вывод о целесообразности проведения дополнительной очистки исходного белка rhBMP-2 не представляется возможным. Во-вторых, в диссертации отсутствуют конкретные данные о первичной структуре олигонуклеотидов, использованных для синтеза рекомбинантного гена, а также последовательность его сборки, что делает невозможным воспроизведение данной части работы. В-третьих, схема полученного экспрессирующего вектора сделана недостаточно подробно: на ней не обозначены функциональные модули химерного гена, непонятно каким образом можно индуцировать ген с помощью IPTG если он находится под контролем раннего промотора бактериофага T5 и т.п.

Сделанные замечания не умаляют общего очень хорошего впечатления, которая производит данная диссертационная работа. Автору удалось концептуально разработать и эффективно решить важную биотехнологическую проблему создания новых материалов биогенного происхождения для замещения утраченной в результате травм костной ткани. Полученные оригинальные результаты могут найти широкое применение в современной медицине и ветеринарии. Автореферат и публикации автора достаточно полно отражают содержание диссертации, а сделанные в ней основные выводы хорошо аргументированы и не вызывают сомнений.

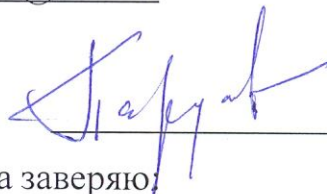
С учетом всего вышесказанного считаю, что диссертационная работа Бартова Михаила Сергеевича «Новые биотехнологические подходы к созданию остеоиндуктивных материалов на основе белка rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом в *Escherichia coli*», полностью соответствует критериям пп. 9-14 «Положения 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, М.С. Бартов, безусловно заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе и бионанотехнологии).

3 декабря 2015 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»
Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва,
ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10
Тел. (495) 335-01-00; e-mail: office@ibch.ru

д.б.н., профессор



Л.И. Патрушев.

Личную подпись Л.И. Патрушева заверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН,

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

