

Проректор по научной работе
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный
университет имени Иммануила Канта»,
кандидат ф-м наук

2023 г.



ведущей организации на диссертационную работу Весниной Анны Дмитриевны на тему «Разработка биотехнологии пищевых ингредиентов из метаболитов hairy roots растений, обладающих антиатеросклеротическим потенциалом», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

По данным Всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности населения во всем мире. Сегодня известно, что первопричиной развития ряда ССЗ является атеросклероз – хроническое, воспалительное заболевание, связанное с нарушением метаболизма липидов, повреждением эндотелиального монослоя, миграцией и накоплением липопротеинов низкой плотности, миграцией воспалительных клеток и созданием очага воспаления. Известно, что образ жизни (питание, физическая активность, вредные привычки и т.д.) играет значимую роль в возникновении, патогенезе данного заболевания. Вклад вносят и генетические особенности, состояние микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), воздействие окружающей среды. Правильное (сбалансированное, оптимальное и персонализированное) питание является относительно простым и доступным профилактическим средством как для первичной, так и для вторичной профилактики ССЗ, в том числе атеросклероза, внедрение которого в клиническую практику позволит снизить инвалидизацию и смертность трудоспособного населения. Для полноценного профилактического воздействия на организм с помощью питания актуален прием индивидуально подобранных пробиотических, пребиотических, синбиотических препаратов.

Диссертационная работа Весниной Анны Дмитриевны направлена на разработку индивидуальных функциональных пищевых добавок антиатеросклеротической направленности, в состав которых входят метаболиты hairy roots шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi.), левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides* Pjin.), копеечника забытого (*Hedysarum neglectum* Ledeb) – байкалин, хлорогеновая кислота и кверцетин, соответственно; синбиотические добавки, стимулирующие работу представителей нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) потребителей, принявших участие в исследовании.

Новизна исследования и полученных результатов

Цель диссертационной работы заключается в разработке состава функциональных пищевых добавок персонализированного действия для профилактики атеросклероза с использованием метаболитов *hairy roots*.

Для реализации поставленной цели диссертантом рассмотрены вопросы, связанные с оценкой современного состояния персонализированного питания; с изучением отдельных факторов риска развития атеросклероза (генетические особенности – однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), состояние здоровья и микробиоты ЖКТ, вредные привычки) у жителей Кузбасса; процесса биотехнологического культивирования *in vitro* *hairy roots* и подбором гормонального состава питательных сред; процесса экстрагирования растительных метаболитов и получением экстрактов *hairy roots*, извлечением из них целевых биологически активных веществ (БАВ): из биомассы *hairy roots* шлемника байкальского – байкалина, из левзеи сафлоровидной – хлорогеновую кислоту, из копеечника забытого – кверцетина; с оценкой биоактивности выделенных БАВ; с анализом пробиотической активности ряда молочнокислых бактерий, формированием на их основе пробиотических композиций с антиатеросклеротическим потенциалом; с разработкой на основе синбиотиков и БАВ из экстрактов *hairy roots* смеси функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ); разработкой рекомендаций по применению функциональных пищевых добавок (ФПД) на основе ФПИ в группах людей с повышенным риском развития атеросклероза.

В рамках персонализации питания формировалась исследуемая группа потребителей-добровольцев, для которых учитывались следующие параметры: пол, возраст, национальность, концентрация С-реактивного белка, наличие хронических заболеваний, ожирения, вредной привычки – курения. Для итоговой группы добровольцев (106 мужчин возрастом $59,3 \pm 7,8$ лет) осуществлялся анализ SNP генов *CAT* (rs1001179), *MnSOD* (rs4880), *GPx1* (rs1050450), *ADRB3* (rs4994), *PPARG* (rs1801282), *FABP2* (rs1799883), устанавливались характерные представители (культивируемые *in vitro*) нормальной микробиоты ЖКТ, в зависимости от сочетаний вариантов генотипов добровольцы были разделены на 6 групп, для каждой из которых был рекомендован прием разработанных ФПИ.

Антиатеросклеротический потенциал данных БАВ оценивался *in vivo* с использованием модельных организмов *Caenorhabditis elegans*: анализировалось влияние БАВ на выживаемость, стрессоустойчивость, экспрессию *SOD-3*; *in vitro* – антиоксидантная активность. Для получения синбиотических добавок изучалась способность ряда молочнокислых бактерий стимулировать рост представителей нормальной микробиоты ЖКТ потребителей, подавлять жизнедеятельность ряда условно-патогенных штаммов, проявлять устойчивость к действию ряда антибиотиков, неблагоприятным условиям ЖКТ, антиоксидантная активность и способность снижать уровень холестерина *in vitro*.

К научным положениям, полученным диссертантом при реализации работы, относятся:

- качественный и количественный состав ПС для культивирования *hairy roots*;
- использование байкалина, кверцетина и хлорогеновой кислоты в составе ФПД профилактической направленности;
- перечень пробиотических штаммов, консорциумов, синбиотиков на их основе проявляющих ААЗ потенциал *in vitro*;
- биотехнология получения индивидуальных ФПИ, проявляющих ААЗ потенциал.

Значимость диссертационного исследования

В работе рассмотрены перспективы изготовления индивидуальных функциональных пищевых добавок (ФПД) профилактической направленности, в частности, через учет анамнеза, биохимических показателей крови, генетических особенностей (SNP генов), состояния микробиоты ЖКТ потребителя. Представлено обоснование использования байкалина, хлорогеновой кислоты, кверцетина в составе функциональных пищевых добавок на основе синбиотиков профилактической направленности.

Подобран качественный и количественный гормональный состав питательных сред для выращивания hairy roots шлемника байкальского, левзеи сафлоровидной, копеечника забытого, позволяющий повысить индекс роста культур в среднем на 5,2 единицы. Представлен анализ антиатеросклеротического потенциала байкалина, кверцетина и хлорогеновой кислоты *in vitro* и *in vivo* на *Caenorhabditis elegans*; пробиотического потенциала молочнокислых бактерий, консорциумов, синбиотиков и ФПИ на их основе и их способности снижать уровень холестерина.

Разработано 15 смесей ФПИ, проявляющих антиоксидантную активность, способность снижать уровень холестерина *in vitro*, подавлять жизнедеятельность условно-патогенных тест-штаммов, проявляющих устойчивость к действию ряда антибиотиков; 27 ФПД, реализуемые в капсульном или таблетированном виде, в виде порошка, гранул, разбавляемых водой. ФПД апробированы на АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» и на ООО НПО «Здоровое питание» (г. Кемерово).

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы и приложений, то есть включает все разделы, необходимые для данной работы. Объем основного текста 124 страницы, содержащий 63 таблицы, 46 рисунков, 6 формул. Список использованной литературы включает 309 источников, в том числе – 248 иностранных. В приложениях к диссертационной работе представлены материалы, подтверждающие практическую значимость результатов исследований (нормативная документация, акты промышленной проверки), интерес со стороны предпринимательства – диплом победителя конкурса «Студенческий стартап» (от Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере»).

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат изложен на 19 страницах. По содержанию и объему автореферат соответствует установленным требованиям, отражает основные положения диссертационной работы.

Личный вклад диссертанта

Личный вклад Весниной Анны Дмитриевны заключается в выполнении теоретических исследований, постановке цели и задач работы, подборе материалов и методов, в формировании, организации плана экспериментов и его выполнении, анализе, оформлении результатов исследований в виде публикаций, научных докладов на конференциях.

Публикации

Содержание диссертационной работы достаточно полно отражено в научных публикациях: по теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из которых 7 – материалы конференций различного уровня; 6 – статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых ВАК Минобрнауки РФ, 7 – статьи в рецензируемых изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science. Основные положения и результаты исследований диссертационной работы были предметом докладов и обсуждений на мероприятиях различного уровня: Международная научная и научно-практическая конференция «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2019–2022); «Образование, наука, инновации: вклад молодых исследователей» (Кемерово, 2020, 2022); «Современные достижения биотехнологии. Техника, технологии и упаковка для реализации инновационных проектов на предприятиях пищевой и биотехнологической промышленности» (Ставрополь-Пятигорск, 2020); «Современные пищевые тенденции глазами молодых ученых: перспективы, инновации и прогрессивные технологии» (Санкт-Петербург, 2021); «Молодые ученые в аграрной науке» (Луганск, 2022); Международный молодежный конкурс научных проектов «Стираем границы» (Москва, 2021); Всероссийская конференция молодых ученых, посвященная году науки и технологий в Российской Федерации (Казань, 2021); форум «Наука будущего–наука молодых» (Новосибирск, 2022); AIP Conference Proceedings (Калининград, 2022).

Замечания и вопросы по диссертационной работе

По результатам анализа работы выявлены следующие вопросы, замечания, пожелания:

1. По тексту диссертационной работы автор использует разное время повествования для описания дизайна эксперимента. При описании хода научно-исследовательской работы и объяснения эмпирических данных рекомендуется применять единый стиль и время повествования. Также в тексте диссертационной работы встречаются орфографические ошибки. Термины «фенолы флавоноидного типа» и «фенол нефлавоноидного типа» (страница 29 диссертационной работы) рекомендуется заменить на «флавоноиды» и «оксикоричная кислота» соответственно.

В разделе диссертации 2.4 «Материалы и методы исследования» в качестве единиц измерения автор использует величины, принятые системой СИ. Однако данный подход соблюдается не во всем описании используемых методов. Так, например, в заголовке таблицы 2.4.1 состав среды приводится на 1 дм³, а на странице 53 состав среды дается на 1 л. Необходимо унифицированное использование единиц измерения по всей работе.

На рисунке 3.3.1 не подписана ось. На рисунках 3.4.4-3.4.7, 3.4.11-3.4.12, 4.2.1, 4.3.1-4.3.3 представлены эмпирические результаты без статистической обработки.

2. Из представленного материала в главе 1 «Литературный обзор» и главе 3 «Результаты исследования и их обсуждения» не удалось выявить, почему автор в качестве объекта исследования выбрал шлемник байкальский, левзея сафлоровидная и копеечник забытый.

3. В главе 2 «Организация эксперимента, материалы и методы исследования» отсутствует пояснение, какому руководству автор следовали (STROBE или CONSORT) при выборе критериев включения/исключения участников эксперимента.

4. В разделе диссертации 2.4 «Материалы и методы исследования» указано, что для оценки трансгенного статуса полученных бородачатых корней (hairy roots) проводился ПЦР-

анализ, направленный на выявление в геномной ДНК растений присутствия гена *rolB* *Agrobacterium rhizogenes*. В качестве отрицательного контроля для ПЦР-анализа использовали растительный материал проростков исследуемых растений. Однако в работе не сказано об использовании положительного контроля для ПЦР-анализа, что является существенно важным моментом при проведении ПЦР-анализа. Также автор не приводит информацию об использовании ПЦР-анализа на выявление генов *virD* и *virC* для исключения контаминации бактериями *A. rhizogenes* полученных культур hairy roots.

5. Из обсуждения эмпирических данных, представленных на странице 113 диссертационной работы, не следует заключения и остается не ясным вопрос, с чем связано повышение антиоксидантной активности пробиотических консорциумов при добавлении пребиотиков.

6. В разделе 3.3 диссертационной работы соискатель представляет результаты получения экстрактов из биомассы hairy roots лекарственных растений только с применением в качестве экстрагента водно-этилового спирта. Хотелось бы, чтобы автор пояснил, почему в своих исследованиях он не использовал в качестве экстрагентов метанол или этилацетат. Применение этих экстрагентов мог позволить получить экстракт с более богатым качественным и количественным составом БАВ. Также из представленных данных таблицы 3.3.1 не ясно, каким образом автор получал экстракт шлемника байкальского в присутствии водно-этанольного раствора при использовании низкой температуры (23,0 °C), когда температура кипения 70 %-ного этилового спирта составляет 80,2°C. Автору следует пояснить, почему процесс экстракции не превышает 1,5 часов при таких низких температурах экстракции. Известно, что при использовании низких температур экстракции продолжительность процесса должна быть выше.

В тексте диссертационной работе отсутствуют сведения о мощности ультразвука, которую использовали для получения экстрактов из сухой биомассы hairy roots.

В разделе 3.3 диссертационной работы для сравнения эффективности экстракции при различных параметрах желательно привести данные по выходу экстракта в % или г от массы навески растительного материала.

7. С какой целью автор в 4 главе определял устойчивость к антибиотикам и антибиотическую активность? Как эти факторы влияют на профилактику атеросклероза?

Таблицы 3.3.10-3.3.12: Не совсем корректным является включение в эти таблицы экидизона – вещества, не относящегося к классу полифенолов, а представляющего собой стероид и относящегося к классу терпеноидов по пути биосинтеза и химическому строению.

8. При визуализации и описании схемы получения индивидуально подобранных функциональных пищевых ингредиентов, функциональных пищевых добавок профилактической направленности (глава 4 диссертационной работы) автор указал неполные технологические параметры процессов. Так не указана температура, продолжительность и влажность процесса инкубации проростков растений с агробактериями; продолжительность и условия процесса культивирования (освещение, скорость перемешивания); размер пор и тип фильтра, используемого для процесса фильтрации; продолжительность процесса сушки hairy roots. Также отсутствуют параметры проведения экстракции и очистки БАВ. Эти же замечания касаются процесса получения биомассы пробиотиков.

9. В разделе 4.4. описана принципиальная схема получения и рекомендации по применению разработанных функциональных пищевых добавок, проводилась ли

экономическая оценка указанной технологии? Является ли она конкурентной в сравнении с традиционными источниками биологически активных веществ?

Указанные замечания не уменьшают научной и практической значимости работы, не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Весниной Анны Дмитриевны.

Заключение

Диссертационная работа Весниной Анны Дмитриевны, выполненная в рамках государственного задания FZSR-2023-0002 и FZSR-2020-0006, оформлена и соответствует требованиям ВАК, соответствует п. 1, 3, 9, 10, 13, 16, 21, 25 паспорта научной специальности ВАК РФ 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологических веществ. Диссертационная работа соответствует пп. 9–14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (с изменениями на 1 октября 2018 года), предъявляемым Высшей аттестационной комиссией при Министерстве наук и высшего образования Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Веснина Анна Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.3.5. Биотехнология продуктов питания и биологических веществ.

Отзыв подготовлен кандидатом биологических наук, и.о. директором высшей школы живых систем образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта, секретарем ученого совета образовательно-научного кластера Федуреавым Павлом Владимировичем.

Отзыв обсужден на заседании ученого совета образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта, протокол №04 от 16.05.2023 г. Присутствовало на заседании 25 человек, в обсуждении приняли участие 5 человек. Результаты голосования: «за» - 25 человек (единогласно), «против» - нет, «воздержалось» - нет.

Кандидат биологических наук
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,
и.о. директора высшей школы живых систем,
секретарь ученого совета образовательно-научного кластера «Институт
медицины и наук о жизни (МЕДБИО)»
236041, г. Калининград, ул. Университетская, д.2,
e-mail: pavel.feduraev@gmail.com
Телефон (4012) 59-55-95 доб. 5005

Федуреав Павел Владимирович

