

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
**ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М.СЕЧЕНОВА**

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной деятельности
ГБОУ ВПО Первый Московский
государственный медицинский университет
имени И.М.Сеченова Минздрава России,
д.м.н., профессор



Николенко В.Н.

«3» апреля 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертационную работу Головина Михаила Анатольевича «Разработка пробиотической композиции с высокой способностью к редукции холестерина», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

1. Актуальность темы диссертации

Разработка и производство новых видов продукции, способствующей поддержанию и улучшению состояния здоровья населения, относится к одним из основополагающих социальных и экономических задач. Сердечно-сосудистые заболевания остаются одной из основных причин смертности и инвалидности людей различных возрастных групп. Наиболее значимыми факторами являются неправильное питание, малоподвижный образ жизни и другие, приводящие к повышению артериального давления и уровня холестерина в крови, что провоцирует сердечно-сосудистые заболевания, включая атеросклероз, у населения. Важнейшая роль в профилактике и коррекции обмена веществ, в частности липидного обмена, предупреждения прогрессирования атеросклеротических повреждений сосудов принадлежит применению продукции на основе пробиотических микроорганизмов. Многолетние клинические наблюдения за лечебной и профилактической эффективностью применения пробиотических микроорганизмов показали, что они не обладают побочными эффектами при их длительном применении.

В этой связи актуальность рассматриваемой диссертационной работы, в которой М.А. Головин предлагает использовать природный биологический потенциал пробиотических микроорганизмов, участвующих в поддержании нормального состава микробиоты желудочно-кишечного тракта и метаболизме ряда важнейших веществ, в том числе холестерина, в организме человека, является очевидной.

2. Научная новизна исследований и степень обоснованности полученных результатов

Головиным М.А. теоретически и экспериментально обоснован состав композиции на основе специально отобранных штаммов пробиотических культур с высокой холестеринметаболизирующей способностью.

Диссертантом выделен, идентифицирован новый штамм бифидобактерий *B. bifidum* GG-72, а результаты изучения комплекса технологических и пробиотических свойств позволили его рекомендовать для введения в состав пробиотической композиции и депонировать во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИгенетика» под номером ВКПМ Ас-1884.

Показано, что штаммы пробиотических бактерий *B. bifidum* GG-72, *L. rhamnosus* LC-52GV; *L. acidophilus* АСТ-44, *L. fermentum* LFM-2, *L. plantarum* ГВИ-1 проявляют антагонистическую активность в отношении представителей патогенных тест-культур, адгезивную и холестерин понижающую способности, а также симбиотически сочетаются между собой.

Определены рациональные параметры биотехнологии изученных штаммов пробиотиков: установлено, что способность к снижению концентрации холестерина зависит от продолжительности культивирования и в максимальной степени проявляется в конце фазы логарифмического роста, а также состава питательной среды.

Выявлены зависимости изменения показателей качества и безопасности в условиях хранения и обоснован срок годности созданной пробиотической композиции, способной снижать уровень холестерина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Обоснованы методологические подходы использования разработанной пробиотической композиции в технологии молочно-сокового напитка профилактической направленности.

Результаты работы получены на поверенном оборудовании, с использованием стандартных методов исследований, достоверность результатов исследований подтверждена 3-5 кратной повторностью экспериментов и обработкой данных с применением методов математической статистики.

3. Практическое значение работы

На основании результатов проведенных исследований разработаны: состав и условия биотехнологии пробиотической композиции с высокой способностью к снижению концентрации холестерина; технологическая инструкция на получение биомассы пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина.

В промышленных условиях проведена проверка биотехнологии изученных штаммов и пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, что подтверждено положительным актом выработки.

Результаты исследований внедрены в учебный процесс: использованы в дисциплинах «Стартовые культуры в технологии продуктов питания» – для студентов направления 260200.68 «Продукты питания животного происхождения» и «Технология молока и молочных продуктов» – для студентов специальности 260303.65.

4. Структура диссертации

Диссертация состоит из разделов: введения, аналитического обзора литературы, организации экспериментов с описанием методов исследований, экспериментальной части, включающей результаты исследований и их обсуждение, основных заключений по работе, библиографического списка литературы, списка сокращений и условных обозначений и приложений. Общий объем диссертации 144 страниц. Материалы диссертации представлены в 41 рисунке и 27 таблицах. Список цитируемой в работе литературы содержит 213 источников, 126 из которых на иностранных языках.

Во введении дано обоснование исследования пробиотических препаратов и функциональных продуктов на их основе. Автор указывает, что эти исследования целесообразно проводить для поиска новых продуцентов пробиотиков, снижающих концентрацию холестерина в организме человека и животных. В этой части работы четко изложены цель и задачи исследований, и их формулировка полностью соответствует содержанию выполненных исследований.

В обзоре литературы подробно освещаются вопросы, касающиеся значения пробиотиков в профилактике и нормализации микрофлоры кишечника. Особое внимание автор диссертационной работы М. А. Головин уделяет оценке важности микрофлоры в снижении холестерина в организме. Автор тщательно проанализировал работы отечественных и зарубежных авторов, посвященных исследованию механизмов влияния пробиотиков на уровень содержания холестерина, антиканцерогенной и антиоксидантной активности, способности продуцировать антимикробные соединения пептидной природы. Подводя итог по анализу исследований отечественных и зарубежных авторов, М.А. Головин

формулирует необходимость проведения научных работ по созданию ассоциированных пробиотиков с высокой способностью к снижению холестерина.

В главе 2 автор приводит описание объектов и используемых методов для исследования. Для выполнения поставленных задач автор использовал методы современные (молекулярно-генетический анализ генома выделенных культур для идентификации, метод совместного культивирования; адгезионной активности с использованием лабораторной линии эпителиальных клеток CaCo-2; концентрации холестерина – метод Златкиса-Зака;), классические (метод перпендикулярных штрихов; непатогенности – на лабораторных белых мышах и др.). Следует также отметить, что автор проводил наработку препаратов в полупромышленных условиях на базе ООО «Дом соусов» в соответствии с внутренними стандартными процедурами. Все использованные методы позволили автору диссертационной работы решать поставленные задачи. Это показывает высокий уровень проведенных исследований и достоверность полученных результатов. Все эксперименты проведены с достаточным числом повторностей, проведена оценка воспроизводимости результатов исследований.

Глава 3 посвящена выделению и изучению новых штаммов *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72,. Кроме новых штаммов автор М.А. Головин в работе использовал коллекционные штаммы пробиотиков с целью оценки их антагонистической активности, адгезионной способности и способности к снижению концентрации холестерина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Большое внимание автор уделяет исследованию функционально-технологических свойств штаммов пробиотиков, так как определение этих показателей косвенно характеризует выживаемость клеток в желудочно-кишечном тракте. Исследования этих свойств автор проводит в сравнении с коллекционным штаммом *B. adolescentis* BGV-11 и показывает и высокую устойчивость новых штаммов к действию неблагоприятных факторов, возникающих в желудочно-кишечном тракте организма человека.

Наиболее важный признак новых штаммов *B. bifidum* GG-71 и *B. bifidum* GG-72 – антагонистическую активность – автор доказывает, используя тест-культуры *E. coli* O157:H7 и *S. aureus* 209-P. В результате проведения этих исследований автор отбирает штамм *B. bifidum* GG-72 как активный в отношении условно-патогенных микроорганизмов и наиболее технологичный, который был депонирован в ВКПМ.

В главе 4 представлены результаты изучения способности пробиотических штаммов микроорганизмов к снижению концентрации холестерина, которые являются наиболее важными в связи с поставленной целью исследований в диссертационной работе.

Используя различные методы экспериментальных исследований по оценке способности штаммов к снижению концентрации холестерина (в том числе рост на

различных по составу питательных средах, содержащих холестерин, стадии роста продуцента) автор показал, что различия в интенсивности снижения концентрации холестерина зависят от возраста культуры и связаны с различиями в интенсивности метаболизма и адсорбирующей способности клеточных стенок. С этим заключением автора вполне можно согласиться.

На основании исследований, представленных в главе 4, автор предлагает использовать две композиции штаммов для создания ассоциированных пробиотиков: «a1» и «b1», которые были использованы в дальнейших исследованиях. Для формирования пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина, автором была исследована сочетаемость выбранных штаммов пробиотических бактерий. На основании экспериментальных данных по сочетаемости культур в период роста, а также способности к снижению концентрации холестерина у композиций «a1» и «b1» автором было установлено, что большую перспективность для разработки пробиотика имеет композиция «b1», содержащая штамм *B. bifidum* GG-72 и штаммы *L. rhamnosus* LC-52GV, *L. plantarum* ГВИ-1, *L. fermentum* LFM-2, *L. acidophilus* АСТ-44.

Материалы результатов исследований композиции «b1» представлены в главе 5. Автором изучены жизнеспособность, антагонистическая активность штаммов пробиотиков, а также способность к снижению концентрации холестерина в питательной среде при различных значениях температуры в период хранения композиции «b1». В результате исследований автор устанавливает срок годности пробиотической композиции, снижающей концентрацию холестерина: при температуре плюс 4 ± 2 °C – 3 месяца, тогда как при температуре минус 18 ± 2 °C – 6 месяцев.

Важным исследованием автора является оценка способности композиции «b1» к снижению концентрации холестерина в условиях *in vivo* на линии белых мышей. Автором показано, что при вскармливании мышей с добавлением композиции «b1» снизились средняя концентрация общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, липопротеинов высокой плотности и триглицеридов.

Для продолжения научных исследований автором наработаны опытные партии препарата ассоциированного пробиотика и разработан способ его практического применения в технологии обогащенного пастеризованного молочно-сокового напитка.

5. Оценка соответствия работы требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям

Обсудив диссертацию М.А. Головина, выполненную на тему «Разработка пробиотической композиции с высокой способностью к редукции холестерина»,

представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) можно заключить, что диссертация является квалификационной законченной самостоятельно выполненной научно-исследовательской работой, в которой проведены комплексные исследования, имеющие научную новизну, практическую и социальную значимости.

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В главе 3, в таблицах 3.3 и 3.4 приводятся значения зон ингибирования роста тест-микроорганизмов *E.coli* и *S.aureus* супернатантом культуральной жидкости бифидобактерий, но не приводятся единицы измерения. Вероятно, размер зон ингибирования роста в мм? Можно ли утверждать, что зона 0,5 мм является показателем антагонистической активности бифидобактерий?

2. Можно ли утверждать, что наличие близких по размеру зон свидетельствует об идентичности продуцируемых соединений?

3. В таблице 4.8 название не совсем отражает её содержание: так в названии указано: «Принципиальная схема биотехнологического процесса (для каждого штамма отдельно)». Следовало бы пояснить, что культивирование проводили только монокультур.

4. На наш взгляд, таблицу 5.5. следовало бы назвать не «Комплексный анализ микробиоты кишечника...», а «Показатели кислотообразования кишечной микрофлоры у лабораторных животных при введении пробиотической композиции».

Следует отметить, что сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают значение результатов, полученных М.А. Головиным.

Автореферат отражает содержание, основные результаты исследований, приведенных в диссертации. Выводы сформулированы четко и логично. Результаты работы обсуждались на научно-практических и научных конференциях международного уровня. Основные результаты исследований опубликованы в печати, в том числе в научных изданиях журналов, рекомендованных перечнем ВАК РФ.

Полученные результаты проверены в промышленных условиях и внедрены в учебный процесс. Все это позволяет считать, что диссертация М.А. Головина «Разработка пробиотической композиции с высокой способностью к редукции холестерина», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) является самостоятельной завершенной научно-исследовательской работой, выполненной на актуальную тему, в которой решается важная задача – разработка пробиотической композиции на основе природных штаммов бифидобактерий и лактобактерий, проявляющей способность к адгезии и снижению уровня холестерина, антагонистическую активность в отношении

патогенных тест-культур, для получения продукции профилактической направленности.

Диссертационная работа Головина Михаила Анатольевича по научной новизне, методическому уровню и практической значимости полностью отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» к кандидатским диссертациям, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Головин Михаил Анатольевич достоин присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

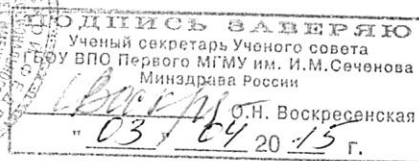
Диссертация и отзыв рассмотрены и одобрены на заседании кафедры биотехнологии (протокол № 6 от 2 апреля 2015 г.).

Заведующий кафедрой биотехнологии
Государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор биологических наук,
профессор



Луценко Сергей Викторович

119991, г. Москва, ул. Большая Пироговская, дом 2, стр.4
Телефон: (495) 609-14-00 (доб. 32-08)
E-mail: n_feldman@mail.ru



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертационной работе Головина Михаила Анатольевича «Разработка пробиотической композиции с высокой способностью к редукции холестерина», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в диссертационный совет Д 501.001.21 при биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова (119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1) в аттестационное дело

Полное название ведущей организации	Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
Сокращенное название	ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации составившего отзыв ведущей организации	Ректор Глыбочко Петр Витальевич, Член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание сотрудника, утвердившего отзыв ведущей организации	Николенко Владимир Николаевич доктор медицинских наук Специальность – 14.03.01 Анатомия человека Профессор Проректор по научной деятельности государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Луценко Сергей Викторович, профессор Доктор биологических наук Профессор
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1. Громовых, Т.И. Культивирование мицелия штаммов <i>Laetiporus sulphureus</i> для получения кормовой добавки для птиц / Т.И. Громовых, И.Е. Иванова, А.С. Торкова // Вестник РАСХН. – 2012. – № 6. – с. 53-55. 2. Громовых, Т.И. Исследование токсических свойств штамма <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill. L. и оценка перспектив его использования / Т.И. Громовых, И.Е. Иванова, А.В. Шнырева, Г.Г. Барсегян, Т.Н. Данильчук // Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т.15, № 4. – с. 63-69. 3. Gromovykh, T.I. Express-method to determine bacterial cellulose productivity by <i>Gluconacetobacter hansenii</i> GH -1/2008 / T.I. Gromovykh, Phan My Hahn, G.S. Byryukov, T.N. Danilchuk, G.G. Abdrashidova // Nauka i studia, Nauk Biologicznych Medicyna weterynaria. – 2012. – №22 (67). – p. 14-22. 4. Sadykova, V.S. Antitumor activity of <i>Trichoderma</i> metabolites and extracts / V.S.Sadykova, E.V. Inzhevatin, E.S. Zubareva, T.I. Gromovykh, E.V. Svirshchevskaya // Nauka i studia. – 2012. – №10 (55). – p. 17-25. 5. Громовых, Т.И. Оценка фунгицидной активности штаммов базидиомицетов в отношении возбудителей плесневения пищевых продуктов / Т.И. Громовых, Л.С. Кузнецова, Н.В. Жилинская, К.В. Лушина // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, № 1. – с. 40-45. 6. Патент RU 2458987 МПК C12N 15/00 приоритет от 27.06.2011 Способ

	получения рекомбинантного фрагмента плазминогена человека, обладающего антиангиогенным действием / А.А. Свистунов, С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, А.И. Соловьев. – № 2011126031/10; Заявл. 27.06.11; Оpubл. 20.08.12, Бюлл. № 23. 7. Патент RU 2464307 МПК C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01 Штамм бактерии <i>Gluconacetobacter hansenii</i> GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы / Т.И. Громовых, Фан Ми Хань, Т.Н. Данильчук. – № 2011121841/10; Заявл. 31.05.11; Оpubл. 20.10.12, Бюлл. № 29. 8. Патент RU 2465314 МПК C12N 1/14, A61K 36/06, A61P 35/00 Штамм микромицета <i>Trichoderma harzianum</i> М 99/51, используемый в качестве продуцента биологически активных противоопухолевых препаратов / Т.И. Громовых, В.С. Садыкова, Е.С. Свирщевская, Е.С. Зубарева. – № 2011140094; Заявл. 04.10.11; Оpubл. 27.10.12, Бюлл. № 30. 9. Патент RU 2499802 МПК C07K 19/00, C12N 15/09, C12N 15/12 Рекомбинантный гибридный ингибитор ангиогенеза и способ его получения / П.В. Глыбочко, А.А. Свистунов, В.Н. Николенко, С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, А.И. Соловьев. – № 2012110799/10; Заявл. 22.03.2012; Оpubл. 27.11.2013, Бюлл. № 33.
--	---

Адрес ведущей организации

Город	Москва
Улица	Трубецкая
Дом	8
Строение	2
Индекс	119991
Телефон	(495) 609-14-00
e-mail	rectorat@mma.ru
Web-сайт	http://www.mma.ru

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

Ученый секретарь ГБОУ ВПО
Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
Минздрава России
д.м.н., профессор

«3» апреля 2015г.



Воскресенская

О. Н. Воскресенская