

## ОТЗЫВ

**официального оппонента о диссертационной работе Петрова Никиты Александровича «Получение и оценка *in vivo* инновационных пищевых ингредиентов – биологически активных соединений с биополимерными матрицами», по специальности 1.5.4 «Биохимия» на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Актуальность и научная новизна.** Эффективность использования растительных полифенолов при метаболических нарушениях (в первую очередь нарушениях углеводного или липидного обмена) подтверждается результатами многочисленных опытов *in vivo*. Растительные полифенолы, как и другие облигатные антиоксиданты пищи, поступив в организм, становятся компонентами антиоксидантной системы, с чем, в частности, в значительной степени и связаны, проявляемые ими эффекты. Соответственно перспективны и актуальны исследования Н.А. Петрова, связанные с разработкой технологического подхода к извлечению и концентрированию полифенолов из растительного сырья, физико-химической оценкой их взаимодействия с полимерной пищевой матрицей и тестированием *in vivo* гипогликемических и гиполипидемических свойств образованных комплексов. Впервые получены концентраты полифенолов (флавоноидов и антоцианинов) листьев и ягод черники, сорбированные на полимерной белково-углеводной матрице (измельченной гречневой муке). Количественно охарактеризованы профиль сорбируемых полифенолов, кинетические параметры их деградации при хранении. Впервые с использованием модели нарушений углеводного и/или липидного обмена у мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением высоко-жирового высоко-углеводного рациона показано, что потребление в течение 130 суток концентрата полифенолов листьев черники сорбированных на полимерной белково-углеводной матрице, снижает уровень глюкозы крови, предотвращает развитие толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности, регулирует уровни лептина и грелина в крови молодых половозрелых мышей-

самцов линии С57В/6. На этой же модели выявлены регулирующее влияние потребления в течение 109 суток полученного комплекса на уровень инсулина и лептина в крови лабораторных животных и анксиолитический эффект потребления в течение 109 суток концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на полимерной белково-углеводной матрице.

Несомненно, актуален и отвечает критерию научной новизны и другой раздел диссертационной работы, посвященный впервые полученному концентрату фитоэкдистероида 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа в составе комплекса с полимерной пищевой матрицей - коагулированным белком куриного яйца. Очевидна необходимость повышения в современных условиях адаптационных возможностей организма человека к стрессорным воздействиям различного генеза, в подавляющем большинстве, сопровождающихся оксидативным стрессом. С их использованием получены новые данные об адаптогенном действии полученного комплекса, а именно о снижении тревожности в условиях принудительной иммобилизации (в течение 3 часов) и регуляции экскреции катехоламинов с мочой после физической нагрузки при потреблении животными концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов, экстрагированных из зерна черного киноа и сорбированных на коагулированном белке куриного яйца.

**Научно-практическая значимость** выполненной работы определяется сочетанием разработки технологического подхода, направленного на получение новых пищевых ингредиентов из растительного и животного сырья с комплексным физико-химическим исследованием *in vitro* и физиолого-биохимическим исследованием их эффективности тестированием *in vivo*. Возможно масштабирование разработанных технологических подходов к получению концентратов полифенолов листьев и ягод черники с гречневой мукой и концентратов 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, для производственных условий, что позволит получать новые пищевые

ингредиенты для включения в состав специализированной пищевой продукции.

Значимым с практической точки зрения результатом проведенного физиолого-биохимического исследования гипогликемических и гиполипидемических свойств концентратов полифенолов листьев и ягод черники, сорбированных на пищевой углеводно-белковой матрице, явилось доклиническое подтверждение их эффективности с целью использования в качестве функциональных пищевых ингредиентов в составе специализированных пищевых продуктов, предназначенных для питания лиц с нарушениями углеводного и/или жирового обмена. На основании результатов проведенных исследований концентрат полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, был включен в качестве пищевого ингредиента в состав специализированного пищевого продукта «Концентрата киселя с бета-глюканами, полифенолами, витаминами», который прошел клинические испытания.

Результаты тестирования *in vivo*, подтверждающие антистрессорные свойства концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированного на коагулированном белке куриного яйца, обосновывают перспективность его использования в качестве функционального пищевого ингредиента специализированной пищевой продукции, повышающей устойчивость организма человека к неблагоприятным стрессорным воздействиям.

**Оценка содержания диссертации.** Диссертация изложена на 195 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, включает 18 таблиц и иллюстрирована 47 рисунками. Список литературы включает 164 источника, из которых 22 отечественных и 142 зарубежных. Диссертация содержит 2 приложения.

**Обзор литературы.** Проведенный автором анализ отечественной и зарубежной литературы позволяет составить представление о современном состоянии исследуемой проблемы. Первый раздел обзора посвящен общей характеристике и структурным особенностям различных групп полифенольных соединений, начиная с простых фенольных кислот и заканчивая конденсированными танинами. В следующем разделе, автором рассмотрены основные биологические эффекты полифенольных соединений, а именно антиоксидантные, противовоспалительные, гиполипидемические, особое внимание уделено гипогликемическим эффектам, в частности связанным с метаболизмом глюкозы. Для большей наглядности предложена схема с представлением потенциальных механизмов воздействия полифенольных соединений на пути метаболизма глюкозы. Следующая глава обзора посвящена полифенольному составу листьев и ягод черники, которые являются объектами данного исследования. В данной главе представлены результаты многочисленных работ, свидетельствующих о том, что полифенольный состав, как листьев, так и ягод черники зависит от сорта растения и условий его произрастания, включая климатические и географические условия. Учитывая, что цель работы – создание пищевого ингредиента для включения в состав специализированных пищевых продуктов, автор логично выделил в отдельный раздел описание метаболизма полифенолов в желудочно-кишечном тракте, представив соответствующую схему. Следующий раздел посвящен обсуждению современных технологических подходов к повышению эффективности полифенольных соединений. Представлены такие технологии как: создание комплексов с дендримерами, получение нанокристаллов, наноэмульсий, создание фитосом и дана их характеристика. Особое внимание уделено работам, посвященным сорбции полифенольных соединений на различных носителях, которые послужили основой для разработанной Н.А. Петровым технологии их концентрирования. Последний раздел литературного обзора посвящен биологически активным веществам зерна черного киноа. В этой части обзора

обсуждаются работы, посвященные исследованию и характеристике полифенольного состава зерна различных видов киноа, а также биологическим эффектам содержащихся в зерне полифенолов. Обосновывается выбор черного киноа, в зерне которого наиболее высоко содержание полифенольных соединений. В заключительной части раздела автор дает характеристику второго класса минорных биологически активных веществ, содержащихся в зерне – фитоэкдистероидов и их мажорного представителя – 20-гидроксиэкдизона. В растениях фитоэкдистероиды выполняют защитную функцию против членистоногих-фитофагов, в то время как у млекопитающих эти соединения проявляют широкий спектр биологических эффектов, основным из которых считается адаптогенный. В обзоре рассмотрены адаптогенные эффекты 20-гидроксиэкдизона и других фитоэкдистероидов как в индивидуальном виде, так и в составе растительных экстрактов.

Стоит отметить, что автор при написании обзора использовал в основном современную зарубежную литературу, опубликованную за последние 5 лет. Изложение материала не вызывает сомнений в грамотности исследователя, работа написана в корректном научном стиле в соответствии с литературными нормами русского языка, с использованием широкого словарного запаса.

**Методы и дизайн исследования.** В разделе «Материалы и методы исследования» детально описано выполнение физико-химических, физиологических и биохимических методик, использованных автором в работе. Достаточно подробно описаны объекты исследования. Детально представлены использованные в работе аналитические методы исследования. Гранулометрическую характеристику образцов муки проводили с использованием электронно-сканирующей микроскопии, содержание общих полифенолов определяли спектрофотометрически, профили и суммарное содержание флавоноидов и антоцианинов, состав и содержание углеводов и содержание 20-гидроксиэкдизона в образцах определяли с помощью методов ВЭЖХ. Технологии получения исследуемых в работе пищевых ингредиентов

представлены очень подробно и структурировано, что позволит достаточно легко воспроизвести их. Дано описание используемых в работе лабораторных животных – мышей и крыс с указанием возраста (5 недель), исходной массы тела ( $20 \pm 2$  г и  $130 \pm 5$  г, соответственно), пола (самцы) и количества (145 и 72 особи, соответственно). Приведены ссылки на действующие нормативные документы по работе с лабораторными животными, а также на заключение локального этического комитета. Далее подробно представлены примененные в работе биохимические методы исследования. Содержание гликированного гемоглобина в крови определяли спектрофотометрически. Уровни лептина, грелина, инсулина, кортикостерона в крови и простагландин E2 в моче определены с использованием методов иммуноферментного анализа. Показатели липидного обмена в печени определены с использованием автоматического анализатора, при этом подробно описана методика экстракции жира из печени по общепризнанному методу Фолча. Также с использованием анализатора проведен общий биохимический анализ крови. Уровни гормонов в моче определяли с использованием метода ВЭЖХ. Углеводный обмен животных оценивали, измеряя уровень глюкозы в крови животных, а также и использованием глюкозотолерантного и инсулинорезистентного тестов. В работе представлен широкий набор физиологических методов исследования. Когнитивные функции животных, в частности обучаемость, тревожность, исследовательские навыки, память оценивали, используя тесты Приподнятый крестообразный лабиринт, Открытое поле, Условный рефлекс пассивного избегания. Оценивали и статический компонент выносливости, проводя измерение силы хватки передних лап животных.

В следующем разделе автор подробно описывает используемые в экспериментах с животными биологические модели. Дано обоснование использования высокожирового, высокоуглеводного рациона, индуцирующего нарушения углеводного и липидного обмена. В работе использована также модель принудительного иммобилизационного стресса с

использованием домиков-фиксаторов. При описании модели истощающей физической нагрузки даны не только параметры самой модели, но и протокол предварительных тренировок для обучения животных.

В заключительной части главы «Материалы и методы» представлены дизайны всех проведенных в рамках исследований экспериментов *in vivo*. Все дизайны описаны в достаточной степени подробно, чтобы их можно было воспроизвести. Хотелось бы отметить удачное решение автора с использованием схематичного представления дизайнов исследований в виде рисунков. Учитывая сложную структуру экспериментов, особенно первого, в котором оценивались профилактические и терапевтические эффекты Пищевого ингредиента 1, такие схемы сильно упрощают понимание представленных дизайнов.

При интерпретации полученных результатов автор использовал корректные статистические методы оценки результатов и специализированное программное обеспечение. Количество животных в группах статистически обосновано, что подтверждает достоверность полученных автором данных.

Таким образом, использованные в работе модели *in vivo*, представленный дизайн экспериментов, адекватность использованных современных наукоемких методов исследований, в которых Н.А. Петров принимал непосредственное участие, свидетельствуют о его высокой профессиональной методической подготовке и способности самостоятельно планировать и осуществлять научные исследования.

**Результаты и их обсуждение.** Данный раздел в логичной и структурированной форме описывает результаты, полученные в диссертационной работе Н.А. Петрова.

При выполнении технологического раздела исследований с применением комплекса методов препаративного выделения и концентрирования, включающих технологии экстракции, мембранной обработки, измельчения, коагуляции, сорбции, получены три новых пищевых ингредиента - концентраты полифенолов листьев или ягод черники,

сорбированных на измельченной гречневой муке, и концентрат полифенолов и 20-гидроксиэдилона зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, охарактеризован их химический состав и проведена физиолого-биохимическая оценка гипогликемических, гиполипидемических и антистрессорных свойств в опытах *in vivo* на лабораторных животных. Определены оптимальные условия сорбции полифенолов листьев черники на измельченной гречневой муке, включающие рН смеси, соотношение компонентов, температуру, продолжительность процесса сорбции. Количественно охарактеризован профиль сорбированных индивидуальных полифенолов в составе полученного пищевого ингредиента и определено их общее содержание по методу Фолина-Чокальтеу, составившее  $23,7 \pm 0,5$  мг-экв. галловой кислоты/г муки. Протестирована стабильность полученного ингредиента при хранении (161 ч,  $50^{\circ}\text{C}$ , влажность 50%) и показано, что сорбция полифенолов на белково-углеводной матрице увеличивает их стабильность по сравнению с исходным экстрактом. Получен концентрат полифенолов, экстрагированных из ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке. Разработанный автором технологический подход позволил исключить сорбцию на муке простых углеводов. Определено общее содержание полифенолов в составе данного пищевого ингредиента:  $65,5 \pm 0,7$  мг-экв. галловой кислоты/г муки, антоцианов –  $27,3 \pm 2,7$  мг/г муки, флавоноидов –  $1,2 \pm 0,1$  мг/г муки. Водно-спиртовой экстракцией 20-гидроксиэдилона и комплекса флавоноидов из зерна черного киноа с использованием мембранной технологии и сорбцией на коагулированном белке куриного яйца получен соответствующий пищевой ингредиент, содержание 20-гидроксиэдилона и общее содержание флавоноидов составили соответственно  $3,4 \pm 0,3$  мг/г и  $14,1 \pm 1,4$  мг/г концентрата. Содержание 20-гидроксиэдилона и комплекса флавоноидов в составе концентрата возросло более чем в 20 и 50 раз по сравнению с их исходным содержанием в зерне.



Применимость моделей (принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузки) для тестирования *in vivo* антистрессорных свойств биологически активных веществ подтверждена, во-первых, достоверным отставанием в приросте массы тела животных, подверженных принудительной иммобилизации, и, во-вторых, достоверным повышением содержания в крови основного активатора стресса кортикостерона (в 2,5 раза при принудительной иммобилизации и в 1,7 раза при истощающей физической нагрузке).

По результатам первого эксперимента *in vivo* длительностью 130 суток показано, что потребление концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (120 мг-экв. галловой кислоты/ кг массы тела), мышами-самцами линии C57Bl/6 с нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными ВЖВУ рационом, оказывало достоверное гипогликемическое и гиполипидемическое действие, снижая уровень глюкозы крови в 1,2 раза, снижая развитие инсулинорезистентности на 24,3%, а также снижая в 2,7 раза уровень лептина и повышая в 36,6 раз уровень грелина в крови этих животных. Потребление концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (60 мг-экв. галловой кислоты/кг массы тела) в течение 109 суток мышами-самцами линии C57Bl/6 с нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными ВЖВУ рационом, снижало развитие инсулинорезистентности на 5,7% и уровни инсулина и лептина в крови в 1,4 и 1,2 раза, соответственно. Потребление в течение 35 суток концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (0,5 г концентрата/кг массы тела), крысами-самцами линии Вистар, подверженными принудительной иммобилизации, достоверно снижало суточную экскрецию норадреналина и адреналина с мочой, соответственно в 2,6 и 2,2 раза, не влияя на прирост массы тела и уровень кортикостерона в крови. Повышался в крови уровень ЛПВП в 1,2 раза, снижались уровни ЛПНП и триглицеридов в 1,3 раза и 1,5 раза,

соответственно. Потребление этого концентрата крысами-самцами линии Вистар на протяжении 35 суток не влияло на содержание в их крови кортикостерона, значительно снижало в 1,6 раза уровень триглицеридов и после однократной истощающей беговой нагрузки достоверно повышало суточную экскрецию с мочой дофамина в 1,6 раза и адреналина в 1,4 раза.

Диссертационная работа хорошо оформлена, фактический материал, представленный в виде 47 рисунков и 18 таблиц, наглядно иллюстрирует полученные результаты.

Достоверность полученных Н.А. Петровым результатов не вызывает сомнений. Выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы, логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и поставленным задачам исследования.

В целом, высоко оценивая представленную диссертационную работу, хотелось бы предложить диссертанту ответить на некоторые **вопросы и замечания**.

1. В конце главы «Аналитический обзор литературы» следовало дать краткое общее заключение по результатам проведенного обзора.

2. Каким способом был получен сухой экстракт листьев черники? Автор в работе указывает, что использовался коммерческий препарат, однако при описании экстракта, возможно, стоило кратко указать метод его получения.

3. Чем обоснован выбор животных для моделирования нарушений углеводного и липидного обмена?

4. Чем обоснованы различия в изменении уровней катехоламинов при потреблении животными Пищевого ингредиента 3 в экспериментах с использованием принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузки в качестве моделей стресса?

5. С каким механизмом, по мнению автора, связаны гиполипидемические эффекты Пищевого ингредиента 3, которые были выявлены в ходе проведения исследований?

6. В выводах не отражены полученные соискателем, несомненно, важные результаты, касающиеся стабильности полифенольных соединений в комплексе с белково-углеводной матрицей.

7. Выделение в качестве отдельной задачи № 7 «Разработка и воспроизведение на лабораторных животных (крысах линии Вистар) двух моделей стрессорного воздействия: принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузки на беговой дорожке» кажется излишним, поскольку обозначенные модели стандартны и многократно описаны. Если же в известные модели были внесены существенные изменения, то это необходимо было отметить в ходе описания.

8. Автору действительно удалось впервые установить ряд биологических эффектов концентратов полифенолов листьев черники, ягод черники, а также концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа сорбированных на полимерной белково-углеводной матрице. При этом в качестве контроля в данных экспериментах не использованы собственно концентраты полифенолов листьев черники, ягод черники, или 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов киноа, как нет и контроля с изолированной полимерной белково-углеводной матрицей. Возможно ли сравнение собственных данных, относительно эффектов оригинальных пищевых ингредиентов, с результатами исследований изолированных составных частей, хотя бы по литературным данным?

9. Предложенные вопросы и замечания, не влияют на высокую положительную оценку диссертационной работы и не снижают ее научной и практической ценности.

### **Заключение**

Диссертационная работа Петрова Никиты Александровича «Получение и оценка *in vivo* инновационных пищевых ингредиентов – биологически активных соединений с биополимерными матрицами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 «Биохимия», представляет собой законченный научный труд, который по

