

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН МНИИЭМ

им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
доктор биологических наук Комбарова С.Ю.

2022 г.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, дом 10).

Диссертация «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов» выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на основе результатов исследований, проведенных на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

В период подготовки диссертации соискатель Кузнецов Денис Бахтиерович работал инженером Производственно-технологического отдела в Филиале Акционерного общества «Научно-производственного объединения по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», с 2018 г. и по настоящее время работает Генеральным директором в Обществе с ограниченной ответственностью «Люмлайн».

Кузнецов Д.Б. в 2010 г. окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Пермскую

государственную фармацевтическую академию по специальности «Фармация», с присвоением квалификации «Провизор», в 2011 г. окончил Институт повышения квалификации РМЦПК с присвоением дополнительной квалификации «экономист-аналитик хозяйственно-производственной деятельности» к специальности «Провизор».

С 2010 по 2013 г обучался в аспирантуре по специальности по специальностям: 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Для завершения диссертационной работы прикреплен соискателем к Федеральному бюджетному учреждению науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Приказ № 238-2021 от 14.11.2021).

Справка об обучении № 004/11/22 выдана 08.02.2022 г. Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения.

**Научный руководитель** – Миронов Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель микробиологического отдела Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

По итогам обсуждения диссертации Кузнецова Дениса Бахтиеровича «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов» принято следующее заключение:

Диссертация Кузнецова Д.Б. является законченной научно-обоснованной и профессиональной работой, в которой на основании большого объема исследований, выполненных автором, теоретически разработан и внедрен в

практику подход к решению научно-практической сложной проблемы по оптимизации биотехнологических процессов. В диссертационной работе сделана попытка перенести приемы электромагнитного облучения на процессы культивирования бактериальных клеток с целью оптимизации получения бактериальной биомассы.

В качестве модельных организмов выбраны штаммы *Escherichia coli*. *E. coli* - первый микроорганизм, использованный в биоинженерии; к настоящему времени создано большое количество её генетически модифицированных штаммов и получаемых на основе биосинтеза терапевтических биомолекул.

С успехом рекомбинантную *E. coli* применяют для производства ряда витаминов, производства протеиногенных аминокислот, ферментов, пробиотических лекарственных препаратов.

В работе используется помимо пробиотического штамма, штамм *E. coli* K12. Данный штамм помимо прочего используется в производстве различных терапевтических рекомбинантных белков. Вероятно, наиболее ценным из которых является инсулин гларгин. Это «золотой стандарт» среди молекул инсулина, а его годовой объем продаж в мире составляет около 7 млрд долларов США.

Инновационный подход на модели *E. coli* включал поиск оптимальных переменных технологического процесса: частота излучения, продолжительность облучения, глубина проникновения поля, диаграмма направленности, концентрация бактериальной культуры и состав питательной среды. Новый подход в поиске условий, при котором все клетки находятся в электромагнитном поле с однородной мощностью падающего излучения имеют научно-прикладное для специализированного раздела биотехнологии и практическое значение для внедрения в производственную практику биотехнологических предприятий страны.

На основании самостоятельно проведенного соискателем анализа отечественных и зарубежных данных литературы определена основная идея исследования, разработаны задачи и методы для реализации поставленной цели,

выполнен сбор экспериментальных данных, проведен широкий спектр исследовательских работ.

Соискатель самостоятельно проводил исследования с биосенсором, ЯМР-релаксометрию, рефрактометрию, адсорбционную спектрофотометрию, разработал методы и технологические решения для оптимизации процессов культивирования *E. coli*, которые в совокупности являются перспективной технологией. Проводил пробоподготовку для АСМ.

Микробиологические исследования проведены на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации» совместно с профессор кафедры промышленной технологии с курсом биотехнологии д.м.н. В.А. Несчислаевым. Совместно с доцентом кафедры радиоэлектроники и защиты информации физического факультета ФГАОУ ВО ПГНИУ, к.ф.-м.н. И.В. Вольхиным выполнил работу по поиску оптимальных условий обработки СВЧ-излучением бактериальных культур, совместно с заведующим кафедрой радиоэлектроники и защиты информации физического факультета ФГАОУ ВО ПГНИУ, к.ф.-м.н. И.В. Лунеговым проводил сканирующую атомно-силовую микроскопию.

Автор лично провел статистическую обработку, интерпретировал результаты, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Диссертационная работа Кузнецова Д.Б. выполнялась в рамках темы «Разработка нового поколения пробиотиков на основе оценки состояния микробиоты человека и использование новых методов идентификации лакто- и бифидобактерий для профилактики инфекционных и неинфекционных заболеваний, связанных с дисбалансом микробиоты» ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (Рег. № 121021000283-2).

Достоверность результатов работы гарантируется существенным объемом выполненных исследований, научно-методической разработкой получения

бактериальной биомассы и методами исследований и статистики. Выводы и рекомендации, сделанные автором, обоснованы на полученных результатах научной работы.

Научная новизна работы состоит в разработке метода увеличения выхода биомассы *E. coli* с помощью микроволнового облучения, основанный на обработке культуры с однородной плотностью потока мощности на частоте 36,84÷37,04 ГГц в режиме непрерывной генерации, продолжительностью 25±5 мин, концентрацией, при которой необходимо проводить облучение 1200±240 млн кл/мл, температуре 37±1 °С. Использование этого метода в способах изготовления маточной и реакторной культуры в совокупности является перспективной технологией оптимизации upstream process.

Впервые разработан метод восстановления индикаторных свойств цельноклеточного биосенсора на основе *E. coli* с *lux*-опероном после длительного хранения и продемонстрирована его работоспособность в способе определения антагонистической активности пробиотиков. Данный способ был разработан на основе изучения реакции люминесценции биосенсора при воздействии на него электромагнитным излучением различных параметров.

Впервые изучено влияние микроволнового воздействия на продукцию рекомбинантных белков при интенсификации процесса культивирования и установлено, что оптимальные параметры облучения не приводят к потере плазмиды и снижению их биосинтеза.

Впервые с использованием методов математического планирования и оптимизации условий проведения эксперимента определены параметры продолжительности облучения и концентрации клеток, при которых культивирование штамма *E. coli* является наиболее эффективным для увеличения прироста биомассы и продукции целевого белка.

Впервые с помощью комплекса физических методов исследования были получены данные, которые подверглись математической обработке и выявлены прогнозирующие переменные, что в будущем позволит предсказывать биотехнологические эффекты с помощью компьютерного моделирования.

Впервые представлено теоретическое обоснование механизмов влияния электромагнитного излучения на метаболическую активность, бактериальную люминесценцию и изменение ростовых характеристик бактериальной культуры на основе изученных физико-химических процессов, протекающих при микроволновой обработке питательной среды и штаммов *E. coli*.

Теоретическая значимость работы состоит в разработанной научной концепции об основных звеньях механизма влияния микроволнового облучения на биологические эффекты при СВЧ-облучении на модели *E. coli* с использованием теоретического аппарата физики и химии поверхности, что позволило интерпретировать результаты СВЧ-обработки на молекулярном уровне. Такой подход является новаторским и может быть в будущем консолидирован с вычислительными методами моделирования поверхностных процессов и молекулярно-динамического моделирования взаимодействия биополимерных структур с окружением из полярного растворителя и между собой.

Предложены оригинальные научные гипотезы, в соответствии с которыми процессы изменения подвижности протонов на интерфейсах клеток, индуцированные СВЧ-излучением, приводят к сложным каскадным реакциям, выражающимися в изменении биологических параметров культуры бактерий.

В результате проведенных исследований изучено влияние переменных технологического процесса и обнаружены новые закономерности, на основании чего были разработаны оригинальные методы и доказана их перспективность использования в практике тестирования антагонистической активности и культивирования штаммов *E. coli*.

Изложены новые идеи, которые вносят вклад в расширение представлений о влиянии различных факторов на получение требуемого биотехнологического результата при микроволновой обработке, что в свою очередь, позволило раскрыть связь ряда переменных и обнаружить зависимость прироста биомассы от количества протонов с низкой подвижностью и от суммарной площади интерфейсов клеток при СВЧ-облучении в виде S-образной кривой.

С помощью кластерного и регрессионного анализа изучен генезис процесса СВЧ-интенсификации роста бактериальной культуры и вычислены профили оптимальности концентрации клеток, при которой необходимо проводить облучение и его продолжительность.

На основании результатов исследований предложен новый метод повышения максимальной концентрации клеток при культивировании *E. coli*, который позволяет увеличить прирост биомассы *E. coli* K12 TG1 до 64% и *E. coli* LEGM-18 до 81% по сравнению с контролем.

Разработанный метод восстановления индикаторных свойств биосенсора с помощью микроволнового облучения в экспериментах с тестированием антагонистической активности дал возможность оценить его потенциал. Метод может иметь ценность не только в оценке качества пробиотических препаратов, но и в методах оценки интегральной токсичности с помощью автоматизированных мобильных лабораторий на базе беспилотных летательных аппаратов, что вероятно позволит снизить частоту валидационных мероприятий и упростит процесс пробоподготовки на месте.

Разработаны теоретические основы промышленной технологии и концепции устройств, позволяющие перенести лабораторные исследования в пилотное и серийное производство.

Ценность научной работы соискателя состоит в разработке технологии интенсификации upstream process, которая заключается в комбинации двух методов воздействия на биомассу на различных стадиях технологического процесса её получения и СВЧ-облучением и культивирование.

Научные положения и выводы, сформулированные Кузнецовым Д.Б., аргументированы, подтверждены приведенным материалом и вытекают из результатов проведенных исследований.

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям, и выводам, диссертационная работа соответствует паспорту специальности научных работников 1.5.6 – биотехнология и области исследования: пункт 4 Изучение и разработка процессов и аппаратов

микробиологического синтеза, включая физико-химическую кинетику, гидродинамику, массо- и теплообмены в аппаратах для ферментации, сгущение биомассы, разделения клеточных суспензий, сушки, грануляции, экстракции, выделения, фракционирования, очистки, контроля и хранения конечных целевых продуктов. Разработка теории моделирования, оптимизации и масштабирования процессов и аппаратов микробиологического синтеза.

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 10 работ в рецензируемых журналах, 3 статьи в других журналах, 5 тезисов в материалах конференций и форумов.

#### **Публикации:**

1. **Кузнецов, Д.Б.** Перспективы применения электромагнитных излучений крайне высокой частоты малой мощности в фармации / Д.Б. Кузнецов // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 10 (часть 2). – С. 400–404.
2. **Кузнецов, Д.Б.** Каталитические технологии в биоиндустрии на основе физических механизмов воздействия / Д.Б. Кузнецов, Т.Ф. Одегова // *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. – Пермь. – 2012, – №9, – С. 236-239.
3. **Кузнецов, Д.Б.** Молекулярные механизмы воздействия инфракрасного излучения на микроорганизмы / Д.Б. Кузнецов // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 4 (часть 2), – С. 414–418.
4. **Кузнецов, Д.Б.** Физико-химические механизмы воздействия крайне-высокочастотного излучения на микроорганизмы / Д.Б. Кузнецов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2013. – № 1; URL: <http://www.science-education.ru/107-8226> (дата обращения: 28.01.2013).
5. **Кузнецов, Д.Б.** Исследование реакции бактериальной люминесценции под воздействием электромагнитного излучения миллиметрового и инфракрасного диапазонов / Д.Б. Кузнецов, Т.Ф. Одегова, В.А. Несчислаев, В.Л. Гейн, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин // *Бутлеровские сообщения*. – Казань. – 2013. – Т.36. - №12. – С. 8-14.
6. **Кузнецов, Д.Б.** Исследование изменений на поверхности клеток *E. coli lum+* под влиянием СВЧ-излучения миллиметрового диапазона / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин, В.Л. Гейн, В.А. Несчислаев, А.А. Широких // *Бутлеровские сообщения*. – Казань. – 2013. – Т.36. – №12. – С.53-58.
7. **Кузнецов, Д.Б.** Исследование влияния СВЧ-излучения миллиметрового диапазона на бактериальную суспензию тест-штамма / Д.Б. Кузнецов, И.Л. Вольхин, И.В. Лунегов // *Материалы краевой научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Физика для Пермского края»* – Пермь. – 2013. – С.133–136.



8. **Кузнецов, Д.Б.** Влияние СВЧ-излучения низкой интенсивности на рост штамма *Bifidobacterium bifidum* при глубинном культивировании / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин // Материалы краевой научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Физика для Пермского края». – Пермь. – Вып. 6, – 2013. – С. 137–141.
9. **Кузнецов, Д.Б.** Эффекты воздействия СВЧ-излучения на *Escherichia coli lum+* / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин, Одегова Т.Ф., Несчисляев В.А. // Вестник Пермского Университета. (Серия: Физика) – 2013. – Вып. 2 (24). – С. 71–75.
10. **Кузнецов, Д.Б.** Методика исследования влияния ИК- и СВЧ-излучения на микроорганизмы / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин, Т.Ф. Одегова // Вестник Пермского Университета. (Серия: Физика) – Пермь. – 2013. – Вып.3 (25). – С. 83-87.
11. **Кузнецов Д.Б.** Использование микроволнового излучения низкой интенсивности в процессах культивирования микроорганизмов / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин, А.А. Широких, А.В. Баландина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. №4 (13). – С. 92-95
12. **Кузнецов, Д.Б.** Перспективный метод оптимизации производства пробиотических препаратов / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин, А.А. Широких, А.В. Баландина // Биофармацевтический журнал. – 2015. – Т.7. – №6. – С. 19-22.
13. **Кузнецов Д.Б.,** Орлова Е.В., Несчисляев В.А. Изучение воздействия электромагнитного излучения на процесс культивирования пробиотических клеток // Материалы 18-го международного славяно-балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2016» / Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2016. – №1-2. – С. М17-М18
14. **Kuznetsov D.V.** Epitaxy of the bound water phase on hydrophilic surfaces of biopolymers as key mechanism of microwave radiation effects on living objects / D.V. Kuznetsov, E.V. Orlova, V.A. Neschislyayev, I.L. Volkhin, I.V. Izmetiev, I.V. Lunegov, A.V. Balandina, D.G. Dianova // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 154 (2017) 40–47.
15. **Кузнецов Д.Б.** Концепт-вариант биотехнологической установки на базе ферментера с электромагнитным излучателем / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин // Пермские перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке: Материалы конференции. – Пермь, 2018. – С. 218-220.
16. **Kuznetsov D.** Microwave radiation effect on the process of *Escherichia coli* cultivation / D. Kuznetsov, I. Volkhin, E. Orlova, V. Neschislyayev, A. Balandina, A. Shirokikh // Microbiology and biotechnology letters. – 2019. – V. 47. – №. 3. – P. 372-380.
17. **Кузнецов Д.Б.** Основы разработки микроволновой интенсификации upstream process на примере *Escherichia coli* / Д.Б. Кузнецов, А.Ю. Миронов, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин, А.М. Королук, Е.В. Орлова, А.Д. Шилина //

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(4).  
<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-00-00>

18. **Kuznetsov D.** Restoration of the Indicator Properties of Whole-cell Luminescent Biosensors / D.B. Kuznetsov, A.Yu. Mironov, V.A. Neschislyayev, I.L. Volkhin, E.V. Orlova, A.D. Shilina // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2022.  
<https://doi.org/10.1631/jzus.B2200107>

Диссертация Кузнецова Дениса Бахтиеровича «Применение СВЧ-излучения при получении пробиотических и диагностических препаратов» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6 – биотехнология (биологические науки).

Заключение принято на заседании секции «Медицинская биотехнология» Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Присутствовали на заседании 11 человек. Результаты голосования: «за» - 11 чел., «против» - 0 чел., «воздержались» - 0 чел., протокол №1 от 07 июня 2022 г.

Председатель секции «Медицинская биотехнология» Ученого совета  
ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора  
доктор биологических наук, профессор  
Ученый секретарь ФБУН МНИИЭМ  
им.Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора  
Кандидат медицинских наук



В.А. Алешкин

А.В. Сафронова