

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Безматерных Ксении Викторовны
«Влияние биологически активных соединений на индукцию стрессовых
регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

Актуальность темы диссертации

Для большинства людей, живущих в развитых странах, регулярный прием биологически активных добавок (БАД) к пище является привычным и естественным занятием. Применение БАД, в том числе содержащих полифенолы и экдистероиды, может способствовать повышению адаптационных резервов организма, снижению риска развития заболеваний и оптимизации питания людей, получающих лекарственную терапию. В большинстве случаев положительное влияние полифенолов на организм опосредовано проявляемыми ими антиоксидантными свойствами. В свою очередь, считается, что положительные эффекты полифенолов связаны с образованием биоактивных и биодоступных метаболитов в процессе деструкции полифенолов микрофлорой кишечника. Микробиота человека – это метаболический «орган», который не только участвует в переваривании пищи, но и выделяет различные биологически активные вещества, стимулирует функции врожденного и приобретенного иммунитета, препятствует инвазии патогенных микроорганизмов, выполняет детоксикационную, антиканцерогенную и др. функции. Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что нарушение баланса микробиоты кишечника, в частности под действием факторов внешней среды, возраста, пищи, приема антибиотиков, играет большую роль в развитии воспалительных заболеваний кишечника, атеросклероза, ожирения, сахарного диабета, аллергии, аутизма, рака, ожирения и т.д. Поэтому изучение влияния БАС на одного из типичных представителей микрофлоры кишечника *Escherichia coli* является несомненно актуальным.

Известно, что совместное применение БАД и лекарственной терапии позволяет уменьшить негативное влияние лекарств на обмен веществ и повысить эффективность проводимого лечения. Однако в свете бурно дискутируемой в последнее десятилетие теории о роли окислительного стресса в механизме летального действия антибиотиков становится актуальным исследование модифицирующего влияния биологически активных соединений на устойчивость бактерий к антибиотикам. Эксперименты, проводимые в этой области, как правило, связаны с изучением бактерицидного действия БАС на бактерии, а роль экдистероидов

в этом процессе и вовсе ограничивается единичными публикациями. В связи с этим, тема диссертационной работы К.В. Безматерных является безусловно актуальной, важной для научно-технического развития России и полностью соответствующей тенденциям развития мировой науки в данной отрасли знания.

Достоверность и новизна результатов и выводов

Достоверность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения и определяется значительным объемом проведенных экспериментов, а также использованием широкого спектра современных микробиологических, молекулярно-генетических и микроскопических методов исследования. Эксперименты грамотно спланированы и выполнены, а математическая обработка результатов выполнена с привлечением адекватных методов статистического анализа.

Оценивая новизну проведенного исследования, представляется необходимым отметить следующие ключевые моменты:

1. Автором впервые с использованием химических тестов и бактерий *E. coli* в качестве биологической тест-системы было проведено комплексное изучение антиоксидантной активности исследуемых субстанций. Наибольший протекторный эффект в условиях окислительного стресса производят субстанции, содержащие полифенолы с высокой хелатирующей активностью и способностью к аутоокислению с образованием АФК. Препараты, которые обладали высокой антирадикальной активностью, но демонстрировали низкую хелатирующую и прооксидантную способность в химическом тесте, не проявляли антиоксидантных свойств в микробной тест-системе.
2. Впервые изучено влияние исследуемых субстанций на экспрессию четырех различных стрессовых регулонов *E. coli*. Индукция антиоксидантных генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу-гидропероксидазу НРІ и Mn-супероксиддисмутазу, тесно коррелирует с содержанием полифенолов в экстрактах и их прооксидантной активностью и наряду с высокой хелатирующей способностью была обязательным условием протекторного действия субстанций на бактерии при окислительном стрессе. Впервые обнаружена способность препаратов, содержащих экидистероиды, вызывать SOS-ответ в клетках *E. coli*.
3. Все изученные субстанции обладают способностью модифицировать толерантность бактерий к антибиотикам. Степень и направленность эффекта зависела как от природы и концентрации самого препарата, так и от типа антибиотика, его концентрации и времени экспозиции. Отмечено различие в эффектах высоких и низких доз кверцетина и ресвератрола.

4. Впервые установлена способность исследованных субстанций модифицировать SOS-ответ, индуцированный ципрофлоксацином. 20-гидроксиэксдизон и низкие дозы кверцетина и ресвератрола стимулировали экспрессию гена *sulA*, что сопровождалось усилением бактерицидной активности антибиотика, тогда как высокие концентрации кверцетина и ресвератрола, напротив, снижали индукцию SOS-ответа и снижали чувствительность к антибиотику. Это может свидетельствовать о конкурентном характере взаимодействия между полифенолами и ципрофлоксацином за сайт связывания на ДНК-гиразе.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Диссертационное исследование К.В. Безматерных сочетает в себе значимые фундаментальные научные достижения и результаты, ориентированные на практическое использование в микробиологии и медицине. Полученные данные расширяют представления о молекулярных механизмах действия БАС на микроорганизмы. Проведенные модельные эксперименты дополняют и расширяют знания об адаптационном потенциале микроорганизмов и характере их реагирования на стрессы, вызванные оксидантами и антибиотиками. Важным моментом данной работы является оценка возможности использования изученных биодобавок в качестве синергистов при антибиотикотерапии.

Содержание диссертации, ее завершенность, публикации автора в научной печати

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов, 2-х глав собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 318 наименований работ отечественных и преимущественно зарубежных авторов. Работа достаточна по объему (изложена на 165 страницах), проиллюстрирована 51 рисунком и 7 таблицами.

Введение содержит доводы в пользу актуальности выбранной темы. Этот раздел включает формулировку цели и задач работы, ее научную новизну и практическую значимость.

В литературном обзоре (главы 1-3) представлено состояние научной проблемы, которой посвящена диссертация, а в конце данного раздела определены приоритетные направления собственного исследования.

В главе 4 (Объекты и методы исследования) изложенный материал позволяет получить исчерпывающее представление об объектах и использованных подходах и дает возможность в дальнейшем при необходимости получить воспроизводимые результаты в подобных

исследованиях. Внушителен спектр использованных методов и методик, представленных сочетанием испытанных временем традиционных бактериологических методов и современных биохимических и молекулярно-генетических подходов. Полученные результаты подвергались адекватной статистической обработке.

Результаты исследований приведены в 2-х главах. Первым значимым результатом было изучение свойств исследуемых препаратов с использованием химических тестов. Знание качественного и количественного состава полифенолов и экдистероидов в составе испытуемых препаратов, а также проявляемых ими антирадикальных, хелатирующих и прооксидантных свойств, способствовало лучшему пониманию механизмов воздействия препаратов на растущие культуры бактерий.

В тестах на модельных бактериальных культурах предобработка бактерий испытуемыми субстанциями, как правило, оказывала ингибирующее действие на рост бактерий и вызывала значительные изменения активности генов антиоксидантных и стрессовых регулонов, что существенно модулировало устойчивость бактерий при стрессах, индуцированных H_2O_2 и антибиотиками. Установлено, что определяющий вклад в повышение устойчивости *E. coli* к окислительному стрессу вносили хелатирующая активность исследуемых субстанций и их способность к аутоокислению и индукции генов, кодирующих каталазу HPI и Mn-супероксиддисмутазу. В тесте на чувствительность бактерий к антибиотикам направление и степень влияния субстанций зависела как от вида и концентрации испытуемого препарата, так и от типа антибиотика, его концентрации и времени воздействия. Автор предполагает, что модулирующий эффект вызван совокупностью специфических и неспецифических механизмов, среди которых ключевую роль играет влияние препаратов на скорость роста и индукцию защитных систем бактерий. Выявлена способность полифенол- и экдистероидсодержащих субстанций влиять на степень индукции SOS-ответа, вызванного ципрофлоксацином.

Работу завершает «Заключение», в краткой форме обобщающее результаты проведенного исследования и расставляющее наиболее значимые акценты. Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора, достоверны и обоснованы.

Замечания и вопросы

Существенных недостатков у оппонируемой работы не выявлено, а указанные частные замечания никак не изменяют ее общую положительную оценку.

При прочтении работы у оппонента возникли следующие вопросы:

1. Чем обосновывался выбор антибиотиков и их действующих концентраций?
2. В Вашей работе экидистероид 20-гидроксиэкидизон (20E) и биодобавка Серпистен, содержащая 20E в качестве основного компонента, противоположным образом влияли на бактерицидную активность аминогликозидов. Как Вы можете объяснить наблюдаемый эффект?

Опубликованные результаты диссертации в научной печати

Материалы диссертации опубликованы в научной печати, всего опубликовано 26 работ, в том числе 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК, из них 2 статьи – в журналах, цитируемых в базе Web of Science.

Содержание автореферата

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Безматерных Ксении Викторовны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи о влиянии биологически активных соединений на стрессовые регулоны и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli*, имеющей важное значение для развития микробиологической отрасли научного знания, что полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842. А ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.03 – Микробиология.

14.01.2019

Официальный оппонент,
доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ, кандидат медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26
+7(342) 236-44-85, AGodovalov@gmail.com

Годовалов Анатолий Петрович

