



Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреж-
дение науки

ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧ-
НОГО СИМБИОЗА

Уральского отделения
Российской академии наук
(ИКВС УрО РАН)

Пионерская ул, 11, Оренбург, 460000
тел.: (3532) 77-54-17, факс (3532) 77-44-63,
E-mail: ikvs@csou.ru
ОКПО 23955055 ОГРН 1025601808814
ИНН/КПП 5612024039/561201001

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора
ИКВС УрО РАН
К.М.Н., доцент



А.О. Плотников

«18» 12 2018 № 16379-2114-274
На № _____ от _____

«18» декабря 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук о научно-практической ценности диссертации Безматерных Ксении Викторовны «Влияние биологически активных соединений на индукцию стрессовых регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - «Микробиология»

Актуальность темы

Актуальность работы Безматерных К.В. определяется несколькими аспектами. Во-первых, в современных условиях расширяется спектр доступных биодобавок, многие из которых содержат лекарственные растения и их компоненты, включая полифенолы и фитостероиды, применяемые для профилактики старения, а также в комплексной терапии различных заболеваний. Имеются сведения, что в основе положительного влияния этих соединений лежит их антиоксидантная активность, в частности способность к связыванию радикалов и редокс-активных металлов, а также их модулирующее действие на редокс-статус клеток и активность стрессовых регулонов.

С другой стороны, на сегодняшний день весьма актуальной является проблема резистентности патогенных микроорганизмов к широко применяемым антибиотикам. Вследствие этого, возрастает интерес к поиску новых под-

ходов в антибиотикотерапии, в том числе, к использованию в качестве анти-микробных средств биологически активных соединений растительного происхождения. Показано, что многие полифенолы обладают выраженной антимикробной активностью сами по себе или в комбинации с существующими антибиотиками в качестве адъювантов. Однако исследования, посвященные воздействию полифенолов на микроорганизмы, особенно кишечную микрофлору, крайне ограничены и связаны в основном с изучением их бактерицидного и мутагенного действия. Учитывая, что полифенолы и экдистероиды могут проявлять антиоксидантные и прооксидантные свойства, выяснение характера их взаимодействия с антибиотиками представляет большой теоретический и практический интерес.

Исходя из этого, диссертационное исследование Безматерных К.В., посвященное изучению влияния биологически активных соединений на индукцию стрессовых регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli* актуально и характеризуется достаточным уровнем новизны.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

Диссертационная работа Безматерных К. В. содержит ряд новых научных положений. Впервые на основании комплексного исследования с использованием химических тестов, а также штаммов *Escherichia coli* в качестве биологической тест-системы выявлена антиоксидантная активность нескольких биологически активных субстанций, содержащих полифенол- и экдистероиды. Установлено, что наибольший протекторный эффект в условиях окислительного стресса оказывали субстанции, содержащие полифенолы с высокой хелатирующей активностью и способностью к аутоокислению с образованием активных форм кислорода (АФК). Вещества, демонстрировавшие низкую хелатирующую и прооксидантную способность в химическом тесте, в микробной тест-системе не проявляли антиоксидантных свойств.

Впервые представлены данные о влиянии исследуемых субстанций на экспрессию четырех различных стрессовых регулонов *E. coli*, включая OxyR (ген *katG*), SoxRS (ген *sodA*), RpoS (гены *rpoS* и *katE*) и SOS-регулон (ген *sulA*). Показано, что экспрессия антиоксидантных генов *katG* и *sodA*, кодирующих каталазу-гидропероксидазу HPI и Mn-супероксиддисмутазу, тесно коррелировала с содержанием полифенолов в экстрактах, а также с их проок-

сидантной активностью. Индукция генов *katG* и *sodA*, наряду с высокой хелатирующей способностью, была обязательным условием протекторного действия субстанций на бактерии при окислительном стрессе, вызванным H_2O_2 .

Показано, что все изученные субстанции обладают способностью модифицировать толерантность бактерий к антибиотикам. Степень и направленность эффекта определялась как природой и концентрацией самого исследуемого препарата, так и типом используемого антибиотика, его концентрацией и временем экспозиции. Отмечено различие в эффектах высоких и низких доз кверцетина и ресвератрола. В отличие от высоких концентраций, проявляющих протекторные свойства, низкие дозы полифенолов, напротив, усиливали эффект канамицина и ципрофлоксацина. При низких дозах ципрофлоксацина выявлена прямая корреляция между уровнем экспрессии антиоксидантных генов *katG* и *sodA* и колониеобразующей способностью клеток *E. coli*, предобработанных исследуемыми субстанциями. Это демонстрирует сложный характер влияния субстанций на действие антибиотиков опосредованный совокупностью специфических и неспецифических механизмов, среди которых ведущую роль играет их влияние на скорость роста и индукцию защитных систем бактерий.

Впервые установлена способность исследованных субстанций модифицировать SOS-ответ, индуцированный ципрофлоксацином. 20- гидроксизидон и низкие дозы кверцетина и ресвератрола стимулировали экспрессию гена *sulA*, что сопровождалось усилением бактерицидной активности антибиотика. Высокие концентрации кверцетина и ресвератрола, напротив, снижали индукцию SOS-ответа и снижали чувствительность к антибиотику, что указывает на конкурентный характер взаимодействия между полифенолами и ципрофлоксацином за сайт связывания на ДНК-гиразе.

Достоверность полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов в исследовании Безматерных К. В. и сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Применение методов классической микробиологии, а также биохимических и молекулярно-биологических позволяет наиболее полно оценить устойчивость бактерий к стрессовым воздействиям под влиянием биологически активных соединений,

а также выявить антирадикальный, хелатирующий и прооксидантный эффекты полифенол- и экдистероидсодержащих субстанций.

Несомненным достоинством работы является использование репортерных штаммов, позволивших выявить вклад регуляторов общих стрессовых регулонов и отдельных генов в модифицирующее действие изученных субстанций на восприимчивость бактерий к окислительному стрессу и действию антибиотиков.

Результаты работы обеспечивают доказательность положений, вынесенных на защиту. Выводы основаны на обширном экспериментальном материале. Все данные обработаны статистически, что позволяет оценить обоснованность полученных результатов, выводов и рекомендаций, изложенных в работе.

В целом диссертацию Безматерных К. В. следует оценить как фундаментальную работу с обоснованными выводами, которые вытекают из анализа представленных материалов собственных исследований и анализа литературных данных.

Общая оценка работы

Диссертация изложена на 165 страницах, иллюстрирована достаточным количеством рисунков и таблиц (51 рисунок и 7 таблиц). Работа написана грамотным языком и хорошо оформлена.

Обзор литературы, включающий три главы, выполнен по материалам более 300 научных публикаций и содержит информацию о биологических функциях и метаболизме двух групп биологически активных соединений - полифенолов и экдистероидов, их воздействии на клеточные культуры млекопитающих и бактерии. Подробно рассмотрены механизмы адаптивного ответа бактерий *E. coli* на окислительный стресс и действие различных классов антибиотиков. Проведенный автором анализ состояния проблемы свидетельствует о его компетентности в изучаемой области, аргументирует цель работы и позволяет оценить степень новизны полученных результатов.

Следует отметить большой объем и новизну полученного материала, а также внутреннее единство диссертации, что свидетельствует о глубоком понимании автором изучаемой проблемы и личном вкладе автора в науку.

Работа проведена в русле научных исследований, проводимых сотрудни-

ками Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН по изучению регуляции экспрессии антиоксидантных регулонов эшерихий и устойчивости бактерий к окислительному стрессу, и является их логическим продолжением.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

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 WoS. Основные положения диссертации обсуждены на Международной научной конференции «ЭкоБиотех-2013», Уфа, 2013; II Всероссийской школе- конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии», Пермь, 2015; IX Международной конференции «Биоантиоксидант», Москва, 2015; Всероссийской научно- практической конференции с международным участием «Наукоемкие биомедицинские технологии», Пермь, 2016; Научной конференции «История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований», Пермь, 2017; Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни», Пермь, 2018.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты исследований, полученные автором, расширяют представления о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений растительного происхождения на бактерии *E. coli* и имеют фундаментальное значение для микробиологии и медицины. Данные о модифицирующем влиянии полифенол- и экдистероидсодержащих субстанций на толерантность бактерий к окислительному стрессу и антибиотикам представляют большой теоретический и практический интерес, поскольку открывают возможности для более рационального применения антимикробных препаратов. Выявлены конкретные субстанции, способные снижать или усиливать бактерицидную активность антибиотиков, принадлежащих к разным классам. К числу таких субстанций относятся биодобавки «Трансверол» и «Серпистен», используемые как кардиопротекторы и адаптогены.

Полученные результаты полностью соответствует основному направлению раздела НЗ Стратегии НТР РФ: «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарств

венных препаратов (прежде всего антибактериальных)».

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные в ходе исследования основные результаты диссертации представляют собой новые фундаментальные материалы, ценные для биологии и микробиологии. Они раскрывают особенности формирования стрессового ответа бактерий, а также их толерантности к антимикробным препаратам под действием биологически активных соединений. Представленные материалы представляют практический интерес для фармакологии, медицины, ветеринарии, биотехнологии и должны быть учтены при скрининге и создании новых антимикробных препаратов. Использование микробной тест-системы дает возможность исследовать различные лекарственные экстракты, пищевые продукты, напитки, БАД на наличие у них антиоксидантной активности и адаптогенных свойств. Теоретические положения, сформулированные в диссертации, целесообразно использовать в учебных курсах при подготовке специалистов в области микробиологии и биотехнологии.

Замечания и дискуссионные вопросы

Принципиальных замечаний по диссертации и автореферату нет. Вместе с тем, хочется обсудить следующие вопросы, которые носят дискуссионный характер и не умаляют достоинств работы:

1. Чем объясняется выбор *E. coli* в качестве модельного объекта исследований, хотя по материалам многих исследователей микроорганизмы данного вида не являются преобладающими в структуре микробиоценоза кишечника?
2. Какова вероятность полного воспроизведения *in vivo* эффектов, аналогичных тем, которые выявлены Вами в эксперименте *in vitro*?

Заключение

Принимая во внимание все вышесказанное, диссертация Безматерных Ксении Викторовны «Влияние биологически активных соединений на индукцию стрессовых регулонов и толерантность к антибиотикам у бактерий *Escherichia coli*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований выявлено наличие

сложных взаимодействий кишечных бактерий с полифенолами и экидистероидами в составе растительных продуктов и пищевых добавок. Результаты имеют существенное значение для развития экспериментальной биологии и микробиологии, что соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор - Безматерных Ксения Викторовна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Диссертация и отзыв на диссертацию обсуждены и одобрены на заседании Ученого Совета Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (Протокол № 11 от 18 декабря 2018 г.).

Заведующая лабораторией
водной микробиологии
Института клеточного
и внутриклеточного
симбиоза УрО РАН
д.м.н., профессор

Немцева Н.В.

18.12.2018 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН): 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская д. 11, к. 309. Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, телефон: 8 (3532) 775417, e-mail: ikvs@esoo.ru

Подпись зав. лабораторией водной микробиологии ИКВС УрО РАН д.м.н., профессора Немцевой Н.В. заверяю

Начальник отдела кадров ИКВС УрО РАН



Турленко И.В.