

О Т З Ы В

официального оппонента, доктора биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики — обособленного структурного подразделения федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук Салтыковой Елены Станиславовны на диссертационную работу Клыченкова Сергея Викторовича «Биологическая активность низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 — Биохимия

Актуальность темы диссертационного исследования

За последние годы в научной литературе существенно выросло количество публикаций на тему изучения биологической активности продуктов пчеловодства. Активные исследования ведутся в Южной Корее, Японии, Китае, Канаде и других странах. Интерес широкого круга учёных из разных областей биологических наук к пчелопродуктам, прежде всего к маточному молочку и пчелиному мёду, обусловлен также их длительным применением в народной медицине. Цель подобных исследований — достоверно установить наличие того или иного биологического эффекта и детально изучить механизмы, приводящие к их проявлению. Однако большая часть публикаций в данной сфере относится к изучению антибактериального эффекта продуктов пчеловодства, при этом на другие виды биологической активности обращено незаслуженно меньше внимания. Тем не менее, существуют достоверные сведения о наличии антиоксидатного, противовоспалительного, противотревожного, нейро- и кардиопротекторного, противоопухолевого, иммуномодулирующего и т. д. эффектов продуктов пчеловодства. В последние десятилетия было открыто присутствие в составе маточного молочка и пчелиного мёда разнообразных пептидов, роль которых не установлена. В связи с тем, что пептидные молекулы активно вовлечены в различные процессы биорегуляции, изучение биологической активности

низкомолекулярных пептидов, выделенных из продуктов пчеловодства, является актуальной научной задачей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Анализ текста диссертации Клыченкова С. В. позволяет заключить, что задачи исследования сформулированы в соответствии с поставленной целью, а выводы, сделанные на основе полученных результатов, согласуются с задачами. Методологический аппарат диссертационного исследования адекватен поставленным целям и соответствует современному уровню развития биохимической науки. Полученным экспериментальным данным дано логическое объяснение с опорой на актуальные литературные источники. Интерпретация результатов исследования не вызывает нареканий. Рекомендации по практическому использованию результатов исследования выполнимы. Полученные результаты апробированы должным образом: доложены на 6 научных конференциях всероссийского и международного уровня, опубликованы в 14 печатных работах, 4 из которых — статьи в журналах Списка ВАК РФ.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и заключений

Достоверность научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации, подтверждается надлежащей обработкой и интерпретацией полученных экспериментальных данных, в том числе с использованием специализированного программного обеспечения, и их корректным статистическим анализом. В части эксперимента, касающейся работы с лабораторными животными, были соблюдены необходимые требования, предъявляемые к исследованиям в данной области (количество особей в группах, длительность эксперимента, методика подготовки животных к проведению физиолого-фармакологических тестов и т. п.) Полученные в ходе диссертационного исследования результаты отличаются значительной научной новизной. Так, впервые был качественно охарактеризован спектр низкомолекулярных пептидов маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда; впервые была показана

способность пептидов с массой до 5 кДа, выделенных из трутневого расплода и маточного молочка, влиять на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса, уменьшая степень проявления тревожного поведения; впервые установлена связь между снижением интенсивности поведенческих реакций экспериментальных животных под действием интраназального введения низкомолекулярных пептидов маточного молочка и трутневого расплода и уровнем ферментативной активности карбоксипептидазы E и пептидилдипептидазы A в различных отделах нервной ткани; впервые показано, что низкомолекулярные пептиды из трутневого расплода и маточного молочка влияют на каталазную и общую дегидрогеназную активность *E. coli* и *S. aureus*.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Теоретическая значимость диссертационного исследования Клыченко С. В. состоит в расширении научного знания не только в области изучения биологической активности продуктов пчеловодства, но и в области изучения биохимической регуляции в общем и биохимии мозга в частности. Также полученные результаты способствуют ускорению прогресса в решении задачи стандартизации отрасли пчеловодства и продуктов, производимых на основе маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда.

Практической значимостью характеризуется разработанный соискателем способ выделения и очистки низкомолекулярных пептидов (массой до 5 кДа) из продуктов пчеловодства. Данный способ, возможно, применить для решения аналогичной задачи при изучении других природных источников биологически активных пептидов, обладающих многокомпонентным составом с преобладанием низкомолекулярных примесей.

Общая оценка содержания диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, заключение и список цитируемой литературы, который содержит 408 наименований на русском и ан-

грийском языках. Работа изложена на 150 листах, иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами.

В главе 1 соискатель приводит современные литературные данные по теме исследования. Раскрыты вопросы, касающиеся не только компонентной характеристики пчелиного мёда, маточного молочка, трутневого расплода, но также их антибактериальной активности и способности влиять на поведение экспериментальных животных. Особый акцент делается на белково-пептидный состав данных продуктов пчеловодства. В п. 1.3 приведены актуальные представления о нейробиологических основах развития тревожности: дано определение тревожности, классификация тревожных состояний, подробно изложена роль нейромедиаторных систем (холинергической, катехоламиновой, серотонинергической и т. п.) в развитии тревожности. Особое внимание обращено на роль отдельных компонентов пептидергической системы мозга — нейрпептидов и ферментов их обмена, в частности карбоксипептидазы E и пептидилдипептидазы A.

В главе 2 подробно изложена методология исследования. Пептиды массой до 5 кДа были выделены и очищены с использованием комбинации методов ультрафильтрации, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Молекулярная масса пептидов была определена с применением гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Разнообразие выделенных пептидов было оценено с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Биологическая активность низкомолекулярных пептидов пчелопродуктов была оценена в двух аспектах: влияние на жизнедеятельность микроорганизмов и влияние на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса. Влияние на жизнедеятельность микроорганизмов ряда штаммов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae*) оценивали с использованием диско-диффузионного метода и метода определения минимальной ингибирующей

концентрации, а также путём измерения общей дегидрогеназной и каталазной активности *S. aureus* и *E. coli*. Для изучения влияния пептидов на поведение экспериментальных животных в условиях хронического стресса использовали крыс классической породы Wistar. Состояние хронического стресса моделировали с применением методики хронического случайного умеренного стресса. Пептиды маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда вводили интраназально в концентрации 300 мкг/кг массы тела. Поведение животных изучали в с использованием физиолого-фармакологических тестов: «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Тёмная/светлая комната», «Вынужденное плавание», «Предпочтение сахарозы». Силу биохимического ответа на стресс и введение изучаемых пептидов оценивали путём измерения уровня кортикостерона и адренкортикотропина экспериментальных животных, а также по изменению активности карбоксипептидазы E и пептидилдипептидазы A в различных частях ЦНС, сыворотке крови и надпочечниках. Полученные данные были обработаны с применением специализированного ПО и корректных статистических подходов параметрического и непараметрического анализа.

В главе 3 — «Результаты собственных исследований» — Клыченков С. В. приводит полученные экспериментальные данные, а в главе 4 («Обсуждение результатов исследований») диссертант даёт им характеристику. Объяснение полученных результатов логично и не противоречит современным научным представлениям в области пептидомии, биохимии микроорганизмов и нейрохимии.

В главе выводов и заключения даётся резюме всей работы, формулируются перспективы дальнейших исследований в данной области. Выводы диссертационного исследования четко сформулированы и соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат в краткой форме отражает суть диссертационной работы, содержит положения, выносимые на защиту, основные результаты исследования, выводы и список работ, опубликованных по теме диссертации.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Существенных замечаний к содержанию работы нет. Однако, имеются отдельные вопросы и комментарии, в целом не противоречащие положительной оценке работы и не снижающие ее научно-практическую значимость.

1. Не прозвучало достаточно вразумительного объяснения, почему большинство выделенных пептидов трутневого расплода и пчелиного мёда не задерживается на ДЭАЭ-целлюлозе и выходит в свободном объёме колонки.
2. Хотелось бы услышать пояснения, почему из столь обширного спектра микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae* были выбраны для дальнейшего тестирования только первые два из этого списка.
3. Таблица 6. Влияние пептидов продуктов пчеловодства на каталитическую активность клеток *E. coli* и *S. aureus*, что означает в данном контексте выражение «каталитическая активность клеток»?
4. Были ли обнаружены в мёде пептиды аналогичные низкомолекулярным пептидам маточного молочка?
5. Как были подобраны действующие концентрации низкомолекулярных пептидов на животных для оценки протективного действия при стрессе?

Заключение

Таким образом, диссертация Клыченкова Сергея Викторовича «Биологическая активность низкомолекулярных пептидов из продуктов пчеловодства», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 — Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача определения биологической активности пептидов массой до 5 кДа, выделенных из маточного молочка, трутневого расплода и пчелиного мёда.

Диссертационная работа полностью соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям, установленным разделом 2 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), а её автор — Клыченков Сергей Викторович — достоин присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 — Биохимия.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник
лаборатории биохимии
адаптивности насекомых
Института биохимии и генетики
— обособленного структурного
подразделения федерального
государственного бюджетного
научного учреждения Уфимский
федеральный исследовательский
центр Российской академии наук,
доктор биологических наук
(03.00.04 — Биохимия)

Салтыкова Елена Станиславовна

Адрес места работы: 450054, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, д. 71, Институт биохимии и генетики — обособленное подразделение федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук.
тел./факс: +7 347 235-60-88, e-mail: molgen@anrb.ru

Подпись с.н.с., д.б.н. Салтыковой Е. С. заверяю
ученый секретарь Института биохимии и генетики
УФИЦ РАН, д.б.н.



Бермишева М.А.