

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Есимбековой Елены Николаевны

«Ферментативное тестирование: методологические принципы и применение в ингибиторном анализе» по специальности 1.5.6. Биотехнология
на соискание учёной степени доктора биологических наук

Актуальность темы диссертационного исследования

В последние десятилетия экологический мониторинг столкнулся с ситуацией, когда возможности аналитической химии по детектированию всё новых соединений значительно опережают способность интерпретировать биологическую значимость их присутствия. Факт обнаружения вещества в пробе, даже с высокой точностью, не даёт ответа на вопрос о том, представляет ли оно реальную опасность для живых организмов, особенно при совместном присутствии с другими ксенобиотиками, когда возможны эффекты взаимного потенцирования или ослабления токсичности. Диссертационная работа Е.Н. Есимбековой обращена к этой концептуальной проблеме и предлагает переход на молекулярный уровень диагностики, где объектом анализа становятся не сами загрязнители, а их воздействие на ключевые метаболические мишени – ферменты. Такой подход, с одной стороны, сохраняет стандартизацию и воспроизводимость, присущие реагентным методам, а с другой – даёт интегральную оценку биологического эффекта, сопоставимую по смыслу с классическим биотестированием, но лишённую его недостатков, связанных с длительностью и вариабельностью ответов живых организмов. В этом смысле тема диссертации является не просто актуальной, а отвечает на запрос, сформировавшийся в природоохранной практике и санитарно-гигиеническом контроле, – запрос на экспрессные, экономичные и биологически релевантные методы скрининга.

Новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна диссертации проявляется в нескольких аспектах. Первый из них – концептуальный: автор не просто адаптирует известные ферментативные реакции к задачам экологического мониторинга, а предлагает рассматривать ферментативное тестирование как самостоятельное методологическое направление. Сформулированные в работе шесть принципов – целевого выбора, мультиферментной интеграции, дифференциации подходов, интегральности экспресс-оценки, многоуровневой интерпретации и специализации – образуют не просто перечень рекомендаций, а взаимосвязанную систему, задающую логику конструирования тест-систем для любых задач, от скрининга индивидуальных веществ до комплексной оценки состояния сложных природных сред.

Второй аспект новизны связан с систематическим сопоставлением возможностей моно- и мультиферментных систем. Автор убедительно показывает,

что переход к каскадным реакциям – это не просто методический приём, а принципиальный способ управления чувствительностью и селективностью анализа. Особого внимания заслуживает демонстрация того, что разные типы межферментных взаимодействий, такие как прямое сопряжение реакций, конкуренция ферментов за субстрат и протеолиз, позволяют проводить биотехнологическое конструирование новых биолюминесцентных ферментативных тест-систем с разными аналитическими характеристиками, что открывает возможности для целенаправленного дизайна биосенсоров под конкретную задачу.

Третий значимый элемент новизны содержится в разделе, посвящённом стабилизации ферментов в матрицах природных полимеров. Автор не просто констатирует факт повышения стабильности, а выявляет механизмы этого явления на уровне кинетики температурной инактивации, показывая, что крахмальное и желатиновое микроокружение по-разному влияет на диссоциацию и денатурацию олигомерных ферментов. Это имеет не только фундаментальное, но и прямое практическое значение для выбора оптимального носителя при создании биологических модулей биосенсоров.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Теоретическая значимость работы состоит в создании непротиворечивой системы представлений о том, как следует конструировать ферментативные тест-системы для задач экологического мониторинга. Установленные зависимости между структурой ингибиторов и характером их влияния на параметры биолюминесценции (индукционный период, интенсивность свечения, константа спада) расширяют понимание молекулярных механизмов токсического действия, а сформулированные принципы дают исследователям инструмент для планирования экспериментов и интерпретации результатов.

Практическая значимость работы подтверждена не только декларативно, но и документально: автором получены десять патентов РФ, создан коммерческий продукт «Энзимолум», апробированный на реальных промышленных стоках. Разработанные одноразовые иммобилизованные реагенты решают ключевую проблему полевой энзимологии, а именно проблему стабильности и хранения ферментных реагентов, и делают ферментативное тестирование доступным для использования не только в стационарных лабораториях, но и в условиях экспедиционных работ.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений. Работа опирается на обширный экспериментальный материал, полученный с использованием современных методов и сертифицированного оборудования. Применение корректных статистических процедур, воспроизводимость результатов в независимых экспериментах и согласованность выводов с данными

других исследователей свидетельствуют о высокой степени обоснованности научных положений, выносимых на защиту, а также сделанных автором выводов.

Оценка содержания диссертации

Диссертация Е.Н. Есимбековой представляет собой завершённое научное исследование, отличающееся продуманной структурой и внутренней согласованностью. Автор последовательно проводит читателя от теоретического обоснования необходимости перехода к ферментативному тестированию через детальную экспериментальную проработку отдельных тест-систем к созданию готовых биотехнологических продуктов.

Обзор литературы (**глава 1**) не является формальным перечислением источников, а представляет собой критический анализ состояния проблемы, задающий вектор всему последующему исследованию. Автор не просто суммирует известные факты, а выявляет противоречия и нерешённые вопросы, существующие в области биодиагностики и ингибиторного анализа. На основе этого анализа формулируются собственные исследовательские задачи, а также обосновывается выбор конкретных ферментов, типов реакций и способов стабилизации. Такой подход позволяет избежать декларативности и придаёт работе характер целенаправленного научного поиска, а не эмпирического перебора вариантов.

Методическая глава (**глава 2**) демонстрирует высокий уровень метрологической культуры: автор уделяет внимание учёту оптических помех, выбору контрольных образцов и стандартизации условий измерений. Детальное описание протоколов иммобилизации ферментов и методик оценки их активности создаёт надёжную основу для воспроизводимости результатов в других лабораториях.

В экспериментальных **главах (3–5)** показана эволюция подходов – от использования одной ферментативной тест-системы к созданию батареи тестов, что логично подводит к обоснованию необходимости комплексной оценки. Автор последовательно наращивает сложность аналитического инструментария, начиная с моно- и биферментных систем и переходя к мультиферментным каскадам, построенным на разных типах межферментных взаимодействий. Такая градация позволяет не только продемонстрировать возрастание аналитических возможностей при усложнении тест-систем, но и выявить границы применимости каждого из подходов, что важно для выбора оптимальной стратегии в зависимости от конкретной задачи.

Экспериментальные **главы 6 и 7**, посвящённые стабилизации ферментов и созданию биологических модулей, органично завершают работу, демонстрируя, что фундаментальные исследования доведены до стадии практического внедрения. Автору удаётся преодолеть традиционный разрыв между академическими изысканиями и прикладными разработками: предложенные способы иммобилизации не только теоретически обоснованы, но и реализованы в виде

конкретных продуктов, прошедших апробацию на реальных объектах. Завершение работы описанием технологических решений и получением патентов придаёт исследованию законченный характер и подтверждает его практическую востребованность.

Заключение содержит не просто пересказ результатов, а их обобщение в виде системы методологических принципов, что свидетельствует о высоком уровне теоретического обобщения.

Замечаний по оформлению текста, таблиц и графического материала, снижающих научную ценность работы, не имеется. Диссертация оформлена в соответствии с установленными требованиями, текст изложен ясным научным языком, таблицы и рисунки информативны. В качестве пожелания можно отметить, что отдельные сложные зависимости в главе 3 (например, при описании ингибирования хинонами) могли бы быть дополнительно проиллюстрированы, но это не умаляет качества представленного материала.

Вопросы по диссертационной работе

1. В работе установлено, что коммерческие препараты пестицидов с одинаковым активным ингредиентом, но от разных производителей, существенно различаются по ингибирующей способности. Это объясняется разным составом формулянтов. Однако остаётся открытым вопрос: можно ли на основе полученных данных предложить конкретные классы химических соединений (например, определённые типы ПАВ или растворителей), которые систематически дают наибольший вклад в усиление ингибиторного эффекта? Иными словами, существует ли возможность ранжировать формулянты по их «ингибиторному потенциалу» независимо от активного ингредиента?

2. В главе 4 показано, что трипсин и щелочная фосфатаза, будучи гидролазами, демонстрируют сравнительно низкую чувствительность к большинству пестицидов и тяжёлых металлов. В то же время трипсин оказался высокочувствительным к действию сорбата калия, активно применяющего в качестве пищевого консерванта. Чем автор объясняет этот парадокс? Связано ли это с особенностями химической структуры консерванта, его способностью взаимодействовать с активным центром фермента?

3. При сравнении чувствительности моно- и мультиферментных систем к пищевым консервантам (глава 5) показано, что удлинение цепи сопряжения не всегда приводит к усилению ингибирования, а в некоторых случаях даже ослабляет его. Автор объясняет это отсутствием чувствительности АДН и ЛДН к данным соединениям. Однако возможно ли, что ключевую роль играют не сами дополнительные ферменты, а изменение микроокружения в мультиферментном комплексе, которое влияет на доступность активного центра наиболее чувствительного фермента (редуктазы) для ингибитора?

4. В работе продемонстрирована успешная апробация реагента «Энзимоллюм» на сточных водах целлюлозно-бумажного комбината. Однако сточные воды предприятий других отраслей (например, химической, металлургической, пищевой) могут существенно различаться по составу и наличию интерферирующих веществ. Проводились ли испытания на представительных пробах других типов промышленных стоков?

Рекомендации по использованию результатов и развитию исследований

Целесообразно инициировать сравнительные испытания разработанных методов с участием аккредитованных лабораторий. Результаты таких испытаний могли бы стать основой для методических рекомендаций по оценке безопасности различных веществ и материалов, в том числе наноматериалов. Для практического использования разработанной батареи тестов в условиях производственных лабораторий, где персонал не всегда имеет глубокую биохимическую подготовку, перспективной представляется разработка программного модуля, который на основе матрицы ответов различных ферментов автоматически рассчитывал бы интегральный индекс токсичности и с высокой точностью указывал на вероятный класс присутствующих загрязнителей. В качестве следующего шага в развитии метода можно предложить создание мультиплексного чипа, в котором на одной подложке иммобилизовано несколько ферментов, а регистрация сигнала ведётся одновременно для всех тест-систем. Это сократило бы время анализа и минимизировало расход реагентов. Материалы диссертации, особенно разработанные методологические принципы и конкретные методические приемы, могут быть рекомендованы для включения в учебные курсы по биотехнологии, экологическому мониторингу и биоаналитике в высших учебных заведениях – как для студентов, так и для программ повышения квалификации специалистов природоохранных служб.

Заключение

Диссертация Есимбековой Елены Николаевны является **научно-квалификационной работой**, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения о методологических принципах конструирования ферментативных тест-систем и механизмах стабилизации ферментов в полимерных матрицах, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области прикладной энзимологии и биотехнологии. В работе **решена крупная научная проблема** разработки теоретических основ и практических алгоритмов ферментативного ингибиторного анализа для интегральной экспрессной оценки состояния окружающей среды, имеющая важное значение для экологического контроля. Предложенные научно-методические подходы реализованы в виде созданных стабильных иммобилизованных ферментных реагентов и коммерческого продукта

«Энзимолуом», внедрение которых вносит значительный вклад в развитие отечественной биотехнологической отрасли. Докторская диссертация Е.Н. Есимбековой производит впечатление масштабной, многовекторной, научно обоснованной, системно построенной работы; выполнена с очень большим усердием, отличается высокой ответственностью автора за предоставленные результаты и научные положения.

Диссертация Есимбековой Елены Николаевны **полностью соответствует требованиям пунктов 9–11, 13, 14** «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а её автор, Есимбекова Елена Николаевна, заслуживает присуждения искомой учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Артюхов Валерий Григорьевич

доктор биологических наук по специальности 03.00.04. Биохимия, заслуженный деятель науки РФ, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Тел.: 8-9 [redacted]

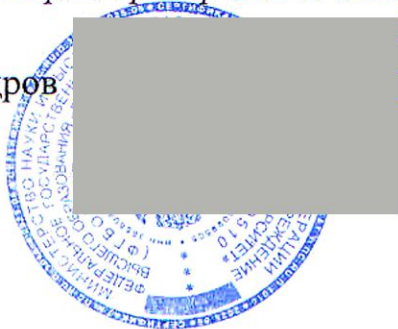
Эл. почта: a [redacted] .ru

[redacted] / Артюхов Валерий Григорьевич /

Дата «22» сентября 2026 г.

Подпись *Артюхова Валерия Григорьевича* заверяю.

Начальник отдела кадров



[Handwritten signature]