

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кирилловой Марии Александровны «Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы исследования

Диссертация Кирилловой М.А. посвящена управлению ключевыми параметрами биолюминесцентных ферментных систем – чувствительностью и стабильностью, что является актуальной задачей современной энзимологии и биотехнологии. Люциферазные системы светляков и светящихся бактерий широко востребованы в современной лабораторной практике, прежде всего, в экспресс-мониторинге загрязнения окружающей среды, гигиены на производствах продуктов питания и в медицинских учреждениях. Поэтому оптимизация способов увеличения чувствительности биолюминесцентных систем имеет огромное практическое значение.

Работа является завершенным исследованием, в котором автором представлены разные подходы по усилению биолюминесцентного сигнала: применение стабилизирующих добавок, использование наночастиц золота и шаперона Hsp90, а также иммобилизация. Особую ценность работе придает сравнительный анализ двух принципиально различных люциферазных систем — светляков (моноферментной, АТФ-зависимой) и бактерий (биферментной, зависимой от NADH/FMN), что позволило выявить неочевидные различия в их поведении при одних и тех же воздействиях.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 121 странице, включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, две экспериментальные главы, заключение, выводы, благодарности, список сокращений и список литературы. Диссертация содержит 50 рисунков и 2 таблицы, список литературы включает 196 источников.

Во введении представлена актуальность исследования, четко сформулированы цель и задачи, описана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены положения, выносимые на защиту. Отмечен личный вклад соискателя в выполнение экспериментальной

части, обработку и интерпретацию полученных результатов, а также в подготовку публикаций. Приведены сведения об апробации полученных результатов на научных конференциях различного уровня.

В обзоре литературы описаны и проанализированы публикации, дающие необходимую информацию об объектах исследования – люциферин-люциферазных системах светляков и светящихся бактерий, ферментативных реакциях люцифераз и областях их применения, а также подходах к изменению характеристик биолюминесцентных ферментных систем, при этом акцент сделан, главным образом, на повышении чувствительности и стабильности люцифераз.

Глава «Материалы и методы» содержит информацию о реактивах, оборудовании и методах, использованных для выполнения диссертационной работы. В данном разделе отсутствует информация о методах статистической обработки результатов.

Третья глава посвящена подбору условий, способствующих увеличению чувствительности люциферазных систем, а именно, поиску оптимальных концентраций основных компонентов ферментативных реакций, использованию стабилизирующих добавок, применению наночастиц золота и белка теплового шока. Показана разная эффективность описанных подходов для люцифераз светящихся бактерий и светляков. При этом некоторые подходы были применены только для одной из ферментных систем, как, например, использование белка теплового шока было проверено только на люциферазе светляков и апиразе.

В четвертой главе описан способ создания иммобилизованных реагентов, включающих люциферазу светляков и люциферин. Показано применение полученных реагентов для анализа микробного загрязнения.

Заключение представляет собой обобщение полученных результатов. Выводы четко сформулированы, следуют из полученных результатов, соответствуют поставленным задачам, обоснованы, корректны и не вызывают сомнений.

Характеризуя диссертацию в целом, следует отметить, что в данной работе рассмотрены разные подходы по увеличению чувствительности биолюминесцентных систем, и создан иммобилизованный реагент, пригодный для использования в качестве биораспознающего элемента биосенсора. Диссертация обладает несомненной научной новизной и безусловной практической значимостью.

Несмотря на общее положительное впечатление о работе, к ней имеются замечания и вопросы:

1. Сравнивая АТР-систему с биферментной системой Red+BLuc, использовали данные, полученные в разных условиях (иммобилизованная и растворимая формы ферментов). Почему были выбраны такие условия, и почему не сравнивали обе системы в иммобилизованной форме?
2. Раздел 3.4.2. называется «Анализ рефолдинга люциферазы», однако из описания эксперимента не совсем ясно, был ли фермент предварительно денатурирован. Следовало бы более четко разграничить защиту от инактивации и восстановление активности после денатурации.
3. В работе имеются опечатки, как например, на странице 8 указано, что диссертация содержит 4 главы с результатами работы, однако таких глав всего две.
4. На стр. 90 некорректное описание рисунка 50. Указано, что при использовании FLuc и люциферина, иммобилизованных в 1% желатиновый гель как совместно, так и отдельно, интенсивность свечения находится на уровне контроля. Однако согласно рисункам 49а и 50 совместная иммобилизация снижает интенсивность минимум на 40%.
5. На некоторых рисунках не указаны доверительные интервалы.

Заключение

На основании вышесказанного считаю, что диссертация Кирилловой Марии Александровны «Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий» является научно-квалификационной работой, в которой изложены **новые научно обоснованные решения**, направленные на повышение эффективности биolumинесцентных ферментативных биосенсоров. Полученные результаты вносят вклад в развитие методов биolumинесцентного анализа клеточных метаболитов, являющихся субстратами биolumинесцентных ферментативных реакций. Научная новизна работы заключается в сравнительном анализе различных подходов к усилению сигнала и стабилизации двух типов люциферазных систем, а практическая значимость подтверждена разработкой стабильного комплекса реагентов для количественного определения АТР. Предложенные автором способы модификации биolumинесцентных реакций открывают новые возможности для создания высокочувствительных и надежных

аналитических систем. Результаты, полученные автором, обоснованы, их достоверность не вызывает сомнений, и работа **соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14** Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Кириллова Мария Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент

Доктор химических наук (02.00.04 – Физическая химия), заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), заведующий лабораторией фото- и хемилюминесцентных процессов ИБХФ РАН

03 сентября 2026 г.

Трофимов Алексей Владиславович

Подпись А.В. Трофимова заверяю.

Ученый секретарь ИБХФ РАН

кандидат биологических наук

С.И. Скалацкая

119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, ИБХФ РАН

Телефон: +7 (495)

Адрес эл. почты: a.ru