

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.228.03
(Д 003.075.04), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРАСНОЯРСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН),
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 21.12.2022 № 9

О присуждении Лоншаковой-Мукиной Виктории Ивановне, гражданке Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Закономерности функционирования бутирилхолинэстеразы и билюминесцентной ферментной системы светящихся бактерий в гелеобразной среде крахмала и желатина» по специальности 1.5.2. Биофизика, принята к защите 18.10.2022 (протокол заседания № 7) диссертационным советом 24.1.228.03 (Д 003.075.04), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, создан приказом Минобрнауки № 21/нк от 24.01.2017.

Соискатель Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна 07.07.1989 года рождения, в 2013 году окончила магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), г. Красноярск, Министерство образования и науки РФ, по

направлению подготовки 011200.68 «Физика», ей присвоена квалификация «Магистр». На момент подготовки диссертации и по настоящее время обучается в аспирантуре Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), г. Красноярск, Министерство науки и высшего образования РФ, по научной специальности 03.01.02 «Биофизика».

Работает инженером в лаборатории фотобиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» – обособленного подразделения «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ.

Диссертация выполнена в лаборатории фотобиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» – обособленного подразделения «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ, и на кафедре биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент, Есимбекова Елена Николаевна, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» – обособленное подразделение «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН), лаборатория фотобиологии, старший научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Евтюгин Геннадий Артурович, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение

высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (КФУ), заведующий кафедрой аналитической химии;

Кусайкин Михаил Игоревич, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН), ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов, заместитель директора по научным вопросам

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова) в своем положительном отзыве, подписанном профессором кафедры биофизики биологического факультета МГУ, доктором биологических наук Погосьяном Сергеем Иосифовичем и заведующим кафедрой биофизики биологического факультета МГУ академиком Рубиным Андреем Борисовичем указала, что решаемая соискателем научная задача актуальна как с точки зрения исследования механизмов функционирования ферментов и ферментных комплексов в иммобилизованном виде, так в целях их практического применения, представленный в работе материал выполнен на хорошем экспериментальном уровне и по объему, степени достоверности результатов исследования, новизне полученных данных представленная диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно «Положению о присуждении ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями и дополнениями).

Соискатель имеет 29 опубликованных работ, в том числе 10 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы цитирований Scopus/Web of Science; 2 патента РФ, а также 17 публикаций в сборниках докладов научных конференций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения

об опубликованных соискателем ученой степени работах, объем научных изданий (статей) составляет 75 стр., авторский вклад – 85%.

Наиболее значимые публикации:

1. Lonshakova-Mukina V. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors / V. Lonshakova-Mukina, E. Esimbekova, V. Kratasyuk // *Sens. Act. B Chem.* – 2015. – Т.213. – Р. 244-247.

2. Есимбекова Е.Н. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа/ Е.Н. Есимбекова, В.И. Лоншакова-Мукина, А.Е. Безруких, В.А. Кратасюк // *ДАН.* – 2015. – Т. 461(4). – С. 472-475.

3. Esimbekova E. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. Esimbekova, E. Nemtseva, A. Bezrukikh, G. Jukova, A. Lisitsa, V. Lonshakova-Mukina, N. Rimatskaya, O. Sutormin, V. Kratasyuk // *Toxicology in Vitro.* – 2017. – V. 45. – Р. 128-133.

4. Колосова Е. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / Е. Колосова, О. Сутормин, Е. Есимбекова, В. Лоншакова-Мукина, В. Кратасюк // *ДАН.* – 2019. – Т. 489(1). – С. 103–107.

5. Лоншакова-Мукина В.И. Стабилизация бутирилхолинэстеразы методом включения в гели на основе природных полимеров / В.И. Лоншакова-Мукина, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // *ДАН.* – 2018. – Т. 479(4). – С. 460-463.

6. Есимбекова, Е.Н. Желатин и крахмал: что лучше стабилизирует активность ферментов? / Е.Н. Есимбекова, А.Е. Говорун, В.И. Лоншакова-Мукина, В.А. Кратасюк // *ДАН.* – 2020. – Т. 491(1). – С. 151-154.

7. Kratasyuk V.A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V.A. Kratasyuk, E.M. Kolosova, O.S. Sutormin, V.I. Lonshakova-Mukina, M.M. Baygin, N.V. Rimatskaya, A.A. Shpedt // *Sensors.* – 2021. – Т. 21(3). – С. 1017.

8. Lonshakova-Mukina V.I. Thermal Inactivation of Butyrylcholinesterase in Starch and Gelatin Gels / V.I. Lonshakova-Mukina, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Catalysts.* – 2021. – Т. 11(4). – С. 492.

9. Lonshakova-Mukina V. Multicomponent Butyrylcholinesterase Preparation for Enzyme Inhibition-Based Assay of Organophosphorus Pesticides /

V. Lonshakova-Mukina, E. Esimbekova, V. Kratasyuk // *Catalysts*. – 2022. – Т. 12(6). – С. 643.

10. Esimbekova E. The Effects of commercial pesticide formulations on the function of *in vitro* and *in vivo* assay systems: a comparative analysis / V. Kalyabina, K. Kopylova, V. Lonshakova-Mukina, A. Antashkevich, I. Torgashina, K. Lukyanenko, V. Kratasyuk // *Chemosensors*, 2022. – V. 10. – N 328.

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов. Все отзывы положительные. Отзывы: доктора биологических наук, Ph.D. Лопатиной О.Л., профессора кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководителя лаборатории социальных нейронаук ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; кандидата биологических наук Сачковой А.С., доцента отделения ядерно-топливного цикла Инженерной школы ядерных технологий ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ОЯТЦ ИЯТШ ТПУ); доктора биологических наук, профессора, заслуженного работника высшей школы РФ Стома Д.И., заведующего лабораторией водной токсикологии НИИ биологии, профессора кафедры зоологии позвоночных и экологии биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»; доктора биологических наук Черкасовой О.П., заведующего лабораторией лазерной биофизики Института лазерной физики СО РАН; кандидата физико-математических наук Деевой А.А., старшего преподавателя кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии, научного сотрудника научно-исследовательской части ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» (СФУ) замечаний не содержат.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью и высокой квалификацией специалистов в области ферментативного катализа и биосенсорных систем, а также соответствием основных направлений исследований задачам диссертационной работы Лоншаковой-Мукиной В.И. Исследовательский коллектив кафедры

биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова) занимается исследованием широкого круга ферментов, среди которых холинэстеразы и ферменты светящихся бактерий, а также фундаментальных основ функционирования биологических катализаторов в идеальных растворах и в иммобилизованном состоянии. Коллектив имеет высокую квалификацию по теме диссертации, что подтверждается публикациями и выполняемыми проектами. Оппонент Евтюгин Г.А. (г. Казань) является специалистом в области закономерностей функционирования и ингибирования холинэстеразных ферментов и разработки биосенсоров, тем самым, область его компетенции существенно перекликается с темой диссертации Лоншаковой-Мукиной В.И. Оппонент Кусайкин М.И. (г. Владивосток) является специалистом в области систематического исследования распространения в организмах ферментов, принимающих участие в деградации полисахаридов, и разработок методов выделения индивидуальных ферментов, изучения их свойств, специфичности, механизма действия и возможности их применения для получения новых биологически активных веществ. Всё вышеперечисленное также существенно перекликается с тематикой диссертации Лоншаковой-Мукиной В.И.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложено, что термическая инактивация бутирилхолинэстеразы представляет собой двухстадийный процесс: диссоциация тетрамерного фермента на мономеры и инактивация образовавшихся мономеров;

доказано, что в присутствии крахмального и желатинового гелей повышается стабильность ферментов к действию повышенных температур; что также как в водном растворе, в растворах крахмала и желатина сохраняется смешанный (конкурентно-неконкурентный) тип ингибирования активности фермента;

разработан новый способ получения стабильных многокомпонентных препаратов на основе бутирилхолинэстеразы и упрощенный способ

интегрального определения фосфорорганических пестицидов в образцах сред с использованием данного препарата.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана двухстадийность процесса термоинактивации бутирилхолинэстеразы в присутствии крахмала и желатина;

изложены количественные характеристики реакций термической инактивации ферментов: параметры $\Delta H^\#$ и $\Delta S^\#$ процесса термической денатурации бутирилхолинэстеразы лошади и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в отсутствие и присутствии высокомолекулярных соединений крахмала и желатина;

раскрыты фундаментальные основы возможности применения крахмала и желатина для разработки биологических модулей тест-систем на основе бутирилхолинэстеразы;

изучен процесс температурной инактивации бутирилхолинэстеразы лошади в гелеобразных средах, созданных полимерами крахмала и желатина, и кинетика её ингибирования фосфорорганическими соединениями в гелеобразном окружении.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан оптимизированный по составу реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, обладающий чувствительностью к действию фенолов, хинонов и тяжелых металлов;

определены перспективы практического использования разработанного ферментативного препарата на основе бутирилхолинэстеразы для интегральной оценки загрязнения водных растворов фосфорорганическими соединениями;

созданы многокомпонентные реагенты, применимые для проведения экспресс-анализа загрязнения сточных вод промышленных предприятий и экологического мониторинга токсикантов в природных водах.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ: достоверность полученных данных подтверждается их воспроизводимостью в серии экспериментов и статистической обработкой;

теория построена на известных, проверяемых данных и согласуется с опубликованными результатами по теме диссертации и в смежных областях;

идея базируется на анализе данных получения иммобилизованных ферментов и обобщении передового мирового опыта аналогичных исследований;

использованы сравнения данных автора и данных других исследователей, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

установлено качественное и количественное совпадение результатов автора с результатами, представленными в независимых источниках научной информации по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение являлось возможным и обоснованным.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы: формулирование цели и задач исследования, планирование и проведение экспериментов, анализ и обобщение полученных данных, их апробация на научных конференциях и использование в подготовке публикаций.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний, относящихся к сути диссертации, однако был задан ряд вопросов: является ли достоверным различие максимальной скорости реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой в крахмале в присутствии и отсутствие ингибитора, и определенной с использованием координат Лаинуивера-Берка; какие выводы были сделаны по полученным значениям энтальпии активации температурной инактивации в гелевом окружении; тест системы на основе бутирилхолинэстеразы и ферментов светящихся бактерий, представленные вами в виде гелеобразных дисков, являются одноактными или способны к многократному использованию; есть ли погрешность у определенного предела обнаружения ингибиторов, с использованием разработанных препаратов; при использовании ферментов из других источников будут ли выполняться

представленные вами закономерности функционирования ферментов в гелеобразных средах; какова возможность интерпретации активационных параметров реакции температурной инактивации в отношении биферментной системы светящихся бактерий, и какой фермент в ней является ведущим; с чем связаны небольшие погрешности определения активности бутирилхолинэстеразы при низких концентрациях субстрата; насколько полученные выводы универсальны в отношении многообразия существующих видов крахмалов и желатина.


Соискатель Лоншакова-Мукина В.И. согласилась с замечаниями и ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы, в частности: различия между полученными значениями максимальных скоростей реакций можно считать достоверными; сохранение теплового эффекта, то есть энтальпии активации процесса температурной диссоциации, свидетельствует об отсутствии дополнительных взаимодействий фермента с полимером и стабилизации, преимущественно за счет ограничения количества степеней свободы; гелеобразные диски рассчитаны на одно измерение; погрешность определения ингибиторов составляет 5%, в том числе и для концентраций, равных пределам обнаружения; степень обобщения полученных результатов на другие источники фермента определяются степенью гомологии этих белков; ведущим ферментом является NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза, так как она поставляет субстрат для люциферазы; помимо этого, наблюдать излом на кинетических кривых, построенных в координатах уравнения первого порядка, вряд ли возможно, так как с потерей четвертичной структуры происходит и потеря каталитической активности люциферазы; в ходе эксперимента получаемые значения активности бутирилхолинэстеразы для трех независимых опытов при одинаковой «низкой» концентрации субстрата практически не отличались, что привело к маленькой погрешности; сформулированные выводы универсальны в отношении разнообразия ферментов и особенностей их катализа в окружении картофельного крахмала и желатина, при определённом значении прочности студня, который он образует.


На заседании **21 декабря 2022 года** диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, разработку нового способа получения многокомпонентных ферментных препаратов, перспективных для интегрального определения фосфорорганических пестицидов в различных средах, присудить **Лоншаковой-Мукиной В.И.** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования с использованием информационно-коммуникационных технологий диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 4 доктора наук по специальности 1.5.2. Биофизика отрасли биологические науки, участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – **17**, против – **0**.

Заместитель председателя

диссертационного совета,


д.б.н., с.н.с. 

 Болсуновский Александр Яковлевич

Ученый секретарь

диссертационного совета,

к.б.н. 

 Дементьев Дмитрий Владимирович

22.12.2022