

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 исследования обусловлена необходимостью пересмотра подходов к экологическому мониторингу в условиях непрерывного роста числа ксенобиотиков и усложнения состава загрязняющих веществ. Традиционные химические методы, опирающиеся на сравнение концентраций поллютантов с предельно допустимыми, лишены возможности оценки интегрального биологического эффекта, а также не учитывают возможность их взаимодействия в смесях. В этой связи разработка ферментативного тестирования как самостоятельного направления биодиагностики, объединяющего преимущества химического анализа с использованием реагентов и биологического анализа, оценивающего эффект на молекулярном уровне, является высокоактуальной фундаментальной и прикладной задачей.

Диссертационная работа изложена на 336 страницах машинописного текста, иллюстрирована 121 рисунком и 34 таблицами, содержит список литературы из 634 источников. Работа построена по классическому принципу и включает введение, семь глав, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

Глава 1 представляет собой критический анализ современного состояния биодиагностики и ингибиторного анализа. В ней обосновываются предпосылки для использования ферментов в качестве тест-объектов экологического мониторинга, рассматриваются их преимущества и ограничения по сравнению с классическими методами биотестирования, основанными на применении живых организмов. Особое внимание автор уделяет характеристикам биолюминесцентных ферментативных систем и теоретическому обоснованию применения природных полимеров для их стабилизации с целью разработки ферментативных биосенсоров. Обзор написан профессиональным языком и свидетельствует о высокой эрудиции соискателя.

Глава 2 содержит подробное описание объектов, материалов и методов исследования. Автор приводит исчерпывающий перечень используемых ферментных препаратов и анализируемых веществ, а также подробно излагает алгоритмы расчета параметров ингибирования, включая методики коррекции оптических характеристик анализируемых растворов и подходы к получению иммобилизованных ферментных форм. Важно отметить, что автор не просто перечисляет методы, но и поясняет логику их применения для решения конкретных задач.

Глава 3 посвящена фундаментальным закономерностям ингибирования биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы различными поллютантами, включая углеродные наноматериалы, наночастицы металлов, фенолы, хиноны и пестициды. В ней наглядно продемонстрированы возможности метода для ранжирования токсичности наноматериалов и выявлен существенный вклад вспомогательных компонентов в общую ингибирующую способность коммерческих препаратов пестицидов и их смесей, а также предложена универсальная схема конструирования методов для анализа гетерогенных многокомпонентных сред.

В главе 4 описывается методология конструирования новых моно- и мультиферментных тест-систем. На примере трипсина и щелочной фосфатазы автор предлагает принципиальную схему разработки новых моноферментных тест-систем, а также демонстрирует не только преимущества, но и ограничения по применению данных тест-систем для решения реальных задач. Также в данной главе представлены оригинальные подходы к созданию сложных мультиферментных биолюминесцентных тест-систем, основанных на принципах прямого сопряжения реакций, конкурентного взаимодействия ферментов за субстрат и протеолитическом взаимодействии. Подобный подход позволяет целенаправленно управлять аналитическими характеристиками тест-систем.

В главе 5 автор обосновывает концепцию применения батареи ферментативных тестов для интегральной оценки состояния экосистем. Описана биолюминесцентная сигнальная система, успешно апробированная для мониторинга сезонной динамики природного водоема. В дальнейшем батарея ферментативных тестов была существенно расширена за счет использования новых моно- и мультиферментных тест-систем. Это позволило автору на примере пищевых консервантов и коммерческих препаратов пестицидов убедительно продемонстрировать возможности применения набора ферментативных тест-систем для выявления наиболее уязвимых звеньев метаболизма и объективной оценки комбинированного действия сложных смесей пестицидов.

Глава 6 содержит физико-химическое обоснование стабилизации ферментов в матрицах природных полимеров. На примере бутирилхолинэстеразы, NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, а также биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы автор детально исследует механизмы температурной инактивации олигомерных ферментов в крахмальном и желатиновом микроокружении, доказывая, что формирование полимерной сетки повышает энергию активации процессов денатурации и существенно расширяет диапазоны устойчивости ферментов к вариациям pH и ионной силы среды.

В главе 7 автор подробно описывает технологические аспекты создания одноразовых биологических модулей, пригодных для создания биосенсоров и микрофлюидных чипов. В ней представлены результаты оптимизации условий получения дозированных иммобилизованных реагентов, обладающих высокой активностью и стабильностью при хранении, а также описано создание многокомпонентных коммерческих продуктов, таких как реагент «ЭНЗИМОЛЮМ», подтверждена их высокая эффективность при скрининге реальных промышленных стоков.

Научная новизна работы заключается в формировании целостной теоретической базы ферментативного тестирования. Впервые предложено и обосновано использование данного метода как самостоятельного направления экологического мониторинга. Авторским достижением является формулировка шести взаимосвязанных методологических принципов, определяющих логику, границы и алгоритмы применения ферментативных тест-систем. Впервые установлены механизмы температурной инактивации олигомерных ферментов в крахмальном и желатиновом микроокружении и разработана универсальная схема конструирования мультиферментных систем на основе прямого сопряжения реакций, конкурентных и протеолитических взаимодействий между ферментами.

Практическая значимость исследования подтверждена десятью патентами Российской Федерации и созданием коммерчески востребованных продуктов. Разработанные методы успешно апробированы на реальных объектах, включая сточные воды промышленных предприятий и природные водные экосистемы, что доказывает их высокую воспроизводимость и адаптивность к полевым условиям.

Достоверность изложенных результатов определяется применением современных экспериментальных и статистических методов, высказанные научные положения и сформулированные выводы обоснованы.

В ходе анализа работы возник **ряд вопросов** для уточнения:

1. В связи с формулировкой автором шести методологических принципов, в том числе принципа многоуровневой интерпретации и принципа дифференциации подходов, возникает вопрос о том, каким образом эти принципы реализуются при анализе гетерогенных экологических сред (почвы или промышленные стоки).

2. Касаясь физико-химических аспектов стабилизации ферментов в крахмальном и желатиновом микроокружении, хотелось бы услышать более подробное объяснение молекулярных механизмов взаимодействия полимерных цепей амилозы, амилопектина или тройных спиралей желатина с активными центрами иммобилизованных олигомерных ферментов, а также оценки того, как формирующаяся полимерная сетка влияет на диффузионные ограничения субстратов и ингибиторов.

3. При анализе смесей пестицидов и коммерческих препаратов автором выявлены эффекты синергизма и сенсibilизации; в этой связи возникает вопрос о том, как разработанная методология позволяет экспериментально разграничить аддитивный эффект активных ингредиентов и синергетический вклад поверхностно-активных формулянтов, входящих в состав коммерческих форм, при проведении ингибиторного анализа, особенно с учётом возможной нелинейности концентрационных зависимостей.

4. Учитывая высокую скорость и чувствительность разработанных ферментативных биосенсоров, необходимо уточнить, какова степень корреляции интегральных показателей токсичности, полученных с помощью предложенной батареи ферментативных тестов, с результатами классических биотестов на целых организмах (например, дафниях или водорослях), и в каких нормативных рамках разработанные экспресс-методы могут выступать полноценной альтернативой, а не лишь дополнением к существующим протоколам биодиагностики.

На основании полученных результатов можно сформулировать **следующие рекомендации** по дальнейшему внедрению разработок в практику. Автор может инициировать процедуру гармонизации разработанных методов ферментативного тестирования с действующими нормативными документами в области экологического контроля, интегрировав батарею тест-систем и реагент «ЭНЗИМОЛЮМ» в качестве первичного этапа для проведения экспресс-скрининга, например, при мониторинге сбросов сточных вод и оценке сельскохозяйственных угодий. Было бы целесообразно расширить область применения созданных микрофлюидных чипов и одноразовых иммобилизованных реагентов в пищевой промышленности, например, для оперативного выявления фальсифицированной продукции. Автору следует продолжить работу по созданию программного обеспечения для портативных биолунометров, способного в автоматическом режиме рассчитывать класс опасности пробы на основе матрицы ответов различных ферментативных тест-систем, что позволит полностью исключить субъективный фактор при полевых измерениях. Автор приводит мало примеров об использовании разработанных методов в образовании, а между тем, эта область весьма перспективна для внедрения, например, в школах для повышения экологической грамотности.

Диссертация Есимбековой Елены Николаевны является **научно-квалификационной работой**, которая посвящена развитию существующих ферментативных методов и знаменует формирование принципиально нового научного направления на стыке прикладной энзимологии, экотоксикологии и биотехнологии. Масштаб решенных задач, охватывающий как глубокое фундаментальное обоснование кинетики и термодинамики ферментативных процессов в полимерных матрицах, так и создание готовых коммерческих биотехнологических продуктов, **свидетельствует о решении крупной научной**

проблемы. Формулировка целостной системы методологических принципов, разработка оригинальных мультиферментных конструкций и создание высокостабильных биосенсорных модулей обладают несомненной новизной и определяют вектор развития современных методов биодиагностики. Совокупность полученных результатов, их теоретическая обобщенность, фундаментальная значимость для понимания механизмов токсического действия на молекулярном уровне и возможность практического внедрения в экологическом контроле, вносят значительный вклад в развитие прикладной энзимологии и биосенсорных технологий.

Диссертация Есимбековой Елены Николаевны **соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14** Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а её автор заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Решетилов Анатолий Николаевич

доктор химических наук по специальности 03.00.23. Биотехнология, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук ФИЦ ПНЦБИ РАН

142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д. 5

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Тел.: 8-91 [REDACTED] Эл. почта: a[REDACTED].ru



Решетилов Анатолий Николаевич

«25» августа 2026 г.

Подпись Решетилова Анатолия Николаевича заверяю.

Подпись 
УДОСТОВЕРЯЮ 
Начальник отдела кадров ИБФМ РАН

