

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата химических наук, доцента Ломакиной Галины Юрьевны

на диссертацию Жуковой Галины Викторовны

«Биоломинесцентное ферментное тестирование слюнной жидкости человека для мониторинга физиологического состояния организма» по специальности
1.5.6. Биотехнология на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Актуальность темы

Диссертационная работа Жуковой Г.В. посвящена решению важной научно-практической задачи – разработке экспрессных, неинвазивных методов контроля функционального состояния организма человека в условиях возрастающих психоэмоциональных и профессиональных нагрузок. Существующие методы диагностики либо инвазивны (анализ крови), трудоемки и дороги (определение биомаркеров), либо субъективны (психологическое анкетирование), что ограничивает их применение для оперативного и регулярного скрининга.

В данной работе в качестве диагностической среды предлагается использовать слюнную жидкость, которая легко доступна и отражает системные метаболические сдвиги в организме. Разработка технологии для проведения экспрессной интегральной оценки с использованием стандартизированных биотестов на основе биоломинесцентного ферментного тестирования представляется своевременной и практически значимой.

Структура диссертации

Диссертационная работа Жуковой Г.В. изложена на 159 страницах, содержит 34 рисунка, 9 таблиц. Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 218 наименований отечественных и зарубежных наименований.

Во Введении обоснована актуальность темы исследования, проанализирована степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, приведены ключевые положения, выносимые на защиту. Отмечен личный вклад соискателя в выполнение экспериментальной части, обработку и интерпретацию полученных данных, а также в подготовку научных публикаций. Приведены сведения об апробации основных результатов работы на научных конференциях различного уровня (международных, всероссийских) и представлен перечень публикаций, в которых отражены ключевые результаты исследования.

Обзор литературы включает в себя пять разделов.

В первом разделе рассмотрены различные виды стрессовых состояний человека, причины возникновения, стадии проявления и влияние на гомеостаз. Сделан упор на обсуждение проблем профессионального стресса, проявляющегося в повышенной утомляемости, усталости, снижении выносливости и внимания.

Второй раздел включает в себя рассмотрение различных маркеров стресса и рассмотрены разнообразные методы его тестирования. Отмечается, что стресс нарушает гомеостатическое равновесие организма, запуская каскад реакций, вызывающих метаболические, окислительные, воспалительные, геномные и протеомные изменения в организме.

В третьем разделе рассмотрены функции и состав слюнной жидкости, представляющей удобный для сбора и анализа биоматериал, отражающий физиологическое состояние человека. Приведены таблицы, в которых обобщены литературные данные по содержанию органических веществ, активность ферментов и содержание минеральных компонентов в смешанной слюне человека.

Четвертый раздел посвящен подробному рассмотрению возможностей проведения диагностики здоровья человека по компонентному составу слюны с использованием различных методов анализа, которая быстрее, чем кровь, дает отклик на стрессовые реакции организма. Рассмотренные многочисленные исследования позволяют сделать вывод о целесообразности применения саливадиагностики в качестве неинвазивного инструмента для мониторинга функциональных резервов человека.

В пятом разделе рассмотрены биолюминесцентные ферментативные системы на основе светящихся бактерий, их аналитическая ценность, которая, благодаря экспрессности, высокой специфичности, чувствительности и простоте перспективны для использования в саливадиагностике. В данной работе предлагается использовать биотесты на основе сопряженной ферментативной системы НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктаза - люцифераза (Р+Л), разрабатываемые на кафедре биофизики и с успехом примененные в экологии, сельском хозяйстве, медицине для оценки токсичности объекта по снижению интенсивности свечения.

Глава «Материалы и методы» отражает методологические подходы, используемые в работе. Представлена характеристика объектов исследования, реагентов, оборудования и протоколов проведения экспериментов по определению характеристик слюны.

Результаты и обсуждение представлены в третьей главе и содержат основные результаты работы. Глава структурно разделена на шесть разделов, раскрывающих логику

разработки и апробации предлагаемой биоломинесцентной технологии.

В разделе 3.1 представлены результаты разработки специфического метода определения лактата, традиционно используемого маркера перегрузок в спортивной медицине, в слюне с использованием трехферментной системы лактатдегидрогеназа–НАДН:ФМН-оксидоредуктаза–люцифераза. Показана принципиальная возможность использования биоломинесцентного подхода для количественного определения лактата и наличие корреляции со стандартным колориметрическим методом определения молочной кислоты по Баркеру и Саммерсону.

В разделе 3.2 проверена гипотеза о влиянии состава слюны на степень ингибирования биферментной реакции (биотеста) и изложены результаты применения интегрального биоломинесцентного ферментного биотеста для оценки влияния различных типов нагрузок. Продемонстрировано наличие чувствительности биотеста к компонентному составу слюнной жидкости в зависимости от физической подготовленности, умственного напряжения и трудовой нагрузки. Показана возможность первичной экспрессной оценки стрессового состояния организма сотрудника, вызванного выполнением трудовых функций для выявления группы риска. На примере трех групп испытуемых (спортсмены разной квалификации, студенты в период экзаменационной сессии, работники оперативно-диспетчерского состава РЖД) продемонстрировано, что: степень ингибирования биоломинесценции после физической нагрузки коррелирует с уровнем физической подготовленности, умственное напряжение в период экзаменационной сессии вызывает достоверное увеличение ингибирования свечения, при анализе профессиональных нагрузок выявлены три типа реакции: стабильная адаптивная (устойчивое повышение или понижение ЛИ%), нестабильная (разнонаправленные изменения), что позволило впервые обосновать критерии для выделения «группы риска» среди персонала.

В разделе 3.3 представлены результаты по выявлению факторов, влияющих на вариабельность состава слюны и, соответственно, на интегральный биоломинесцентный показатель ЛИ%. Применение алгоритма машинного обучения Random Forest, позволило ранжировать факторы по степени влияния на ЛИ%.

В разделе 3.4 описана разработка программы сбора и анализа персонифицированных данных с использованием платформы Multiforms. Созданная база данных интегрирует медицинские карты, результаты лабораторных исследований слюны и данные анкетирования и позволяет интерпретировать результаты конечному пользователю самостоятельно.

В разделе 3.5 представлена разработка технологии и регламент использования

биотеста применительно к слюнной жидкости, включая пробоподготовку образцов, условия хранения и условия измерения сигнала.

В разделе «Заключение» коротко обобщены результаты работы и перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы.

Выводы, сделанные в диссертации, четко сформулированы, следуют из изложенных результатов, соответствуют поставленным в работе задачам, обоснованы, корректны и не вызывают сомнений.

Список литературы хорошо оформлен и содержит много публикаций последних лет.

При ознакомлении с диссертацией и авторефератом Г.В. Жуковой возникли некоторые вопросы и замечания:

Замечания редакционного характера:

В Литературном обзоре хотелось бы видеть основные выводы после каждой главы, а не только в ее конце. Первые две главы, возможно, следовало бы сократить, часть данных, касающихся методов тестирования дать в виде таблицы. В разделе 1.3 в приведенных таблицах 1.1 и 1.2 много грамматических ошибок. Глава Материалы и методы (разделы 2.4 и 2.5) также содержит неточности и грамматические ошибки

В главе 3.1 следовало бы привести схему реакции с использованием трех ферментов при определении лактата. Это исключило бы необходимость приводить длинное текстовое описание и сделало бы смысловую часть более наглядной.

В описании к рисунку 3.8 (стр. 86) непонятна цифра 18,8%. Из графика не следует.

В тестировании было проанализировано около 1000 проб слюны. Однако, в подписях к рисункам отсутствуют указания на размер выборки.

Вопросы

1. Как измеряли кинетику биолюминесцентной реакции? Что можно сказать о стабильности сигнала?
2. Глава 1.5. –в работе обсуждается ингибирование только люциферазы. Внешние факторы на лактатдегидрогеназу и НАДН:ФМН-оксидоредуктазу разве не оказывают влияния?
3. Стр.91, Рис.3.9 –В тексте описаны две группы - Группа 1 (подгруппы 1 и 2) и Группа 2, а на рисунке указаны три группы (Группа 1, 2.и 3)? Кроме того, в тексте диссертации представлен подробный рисунок для трех групп, описывающий корреляции ЛИ% с уровнем лактата, в то время как в автореферате приводится только небольшая диаграмма для уровня ЛИ%. Прделана большая работа по измерению показателей во времени двух параметров– ЛИ% и лактата. Возможно, их учет в паре даст более надежную информацию? Для первой

группы наблюдается резкий рост ЛИ% при сохранении уровня лактата до и после нагрузки, для второй группы – значительное снижение ЛИ% при росте уровня лактата и для третьей группы незначительные колебания уровня ЛИ% в ту или иную сторону и снижение уровня лактата.

4. Стр.93, описание к таблице 3.4 «Показатели состава слюны до и после физической нагрузки у спортсменов» – концентрация ионов Zn после тренировки не снижается, как написано в тексте, а согласно данным таблицы увеличивается (0,35 - 0,5). Возможно, на снижение сигнала может влиять увеличение концентрации переходных металлов (в данном случае ионы Zn^{2+}), а на рост сигнала – снижение концентрации ионов Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} . Было ли изучено влияние отдельно взятого компонента слюны (например, Cu^{2+}) на ферментативную активность?
5. Значения индекса биотеста, представленные на рис.3.5, 3.7, 3.8 и 3.9 (рисунки 4-6 в автореферате) до нагрузки (большинство из них - это здоровые молодые люди) сильно различаются (от 18 до 80). С чем это может быть связано? Разные условия измерения? Можно ли сделать вывод о том, что аналитическое значение имеет только сам факт изменения индекса после нагрузки в ту или иную сторону для конкретного человека и отсутствие значимых колебаний свидетельствует о перегрузке организма?
6. В работе указано, что сбор слюны производился «натощак или через час после приема пищи». Такой временной интервал представляется слишком широким, учитывая, что даже небольшое количество пищи может существенно влиять на биохимический и ионный состав слюны. Кроме того, не уточняется, контролировался ли такой важный параметр, как объем потребленной жидкости перед забором пробы, что также может влиять на показатели. Более жесткая стандартизация условий сбора повысила бы воспроизводимость результатов.

Указанные вопросы и замечание имеют уточняющий или дискуссионный характер, не умаляют достоинств данной работы и не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов.

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений. В работе впервые рассмотрен оригинальный методологический подход к созданию экспрессных интегральных билюминесцентных ферментных тест-систем для персонализированной оценки физиологического статуса человека по слюнной жидкости для быстрого мониторинга перегрузок и стрессовых состояний.

Диссертационная работа Жуковой Г.В. имеет **практическое значение** для развития биотехнологии, профилактической медицины и организации охраны труда.

В целом, диссертация Жуковой Г.В. выполнена на достаточно высоком научно-

техническом уровне и обладает новизной, теоретической и практической значимостью.

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ - 7 статей в журналах из «Белого списка и имеющих квартиль от Q1 до Q3, одна работа из списка ВАК и 2 патента РФ. Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли апробацию на научных конференциях, проходивших в России преимущественно с 2022 по 2025 год, опубликовано 15 тезисов докладов в сборниках материалов конференций.

Текст автореферата и печатные работы Жуковой Г.В. отражают содержание диссертации.

Представленная работа по обоснованности суждений, достоверности выводов, теоретической и практической значимости соответствует основным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Тема диссертации «Биолюминесцентное ферментное тестирование слюнной жидкости человека для мониторинга физиологического состояния организма» соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Заключение

На основании вышесказанного считаю, что диссертация Жуковой Галины Викторовны «Биолюминесцентное ферментное тестирование слюнной жидкости человека для мониторинга физиологического состояния организма» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных задач по разработке и обоснованию нового персонализированного неинвазивного метода экспресс-оценки функционального состояния человека на основе интегрального биолюминесцентного анализа слюны, характеризующих индивидуальную реакцию организма на физические, умственные и профессиональные нагрузки, имеющих значение для развития биотехнологии в части создания биоаналитических систем для медицинской диагностики и физиологии труда, а также прикладной энзимологии, и соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Жукова Галина Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Ломакина Галина Юрьевна

Кандидат химических наук

(по специальности 02.00.15 Химическая кинетика и катализ),

доцент, старший научный сотрудник кафедры химической энзимологии
химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3 ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова», химический факультет

тел.: 7 [redacted] 80,

e-mail: lo [redacted].com


[redacted]
(подпись)

/ Ломакина Г.Ю. /
(расшифровка подписи)

Дата «26» марта 2026 г. Печать организации

