

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Кирилловой Марии Александровны

«Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6.

Биотехнология.

Разработка высокочувствительных, стабильных и технологичных биосенсорных систем является одним из актуальных направлений современной биотехнологии. Особый интерес в данном контексте представляют биолюминесцентные ферментные системы, сочетающие высокую специфичность биохимических реакций с возможностью быстрой инструментальной регистрации аналитического сигнала. Вместе с тем практическое применение люциферазных систем в значительной степени определяется стабильностью используемых ферментов, интенсивностью генерируемого светового сигнала и достигаемыми пределами обнаружения аналитов. В связи с этим диссертационная работа Кирилловой Марии Александровны, направленная на разработку способов повышения чувствительности и стабильности люциферин-люциферазных систем бактерий и светляков для биосенсорных технологий, является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Целью диссертационного исследования являлась разработка комплекса методов усиления биолюминесцентного сигнала люциферин-люциферазных систем бактерий и светляков для создания биораспознающего элемента биосенсора, характеризующегося повышенной чувствительностью и стабильностью. Для достижения поставленной цели автором последовательно решен комплекс взаимосвязанных задач, включающий оптимизацию компонентного состава биолюминесцентных реакций, исследование возможности усиления сигнала с применением наночастиц золота, изучение стабилизирующего действия белка теплового шока Hsp90, оценку влияния иммобилизации на свойства люциферазных систем и разработку на основе полученных результатов биораспознающего элемента биосенсора.

Следует отметить комплексный характер проведенного исследования. В работе сопоставляются свойства люциферин-люциферазной системы светляков и биферментной системы светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза, при этом автор не ограничивается рассмотрением единственного способа управления аналитическими характеристиками систем, а исследует несколько принципиально различных подходов: изменение состава реакционной смеси, использование стабилизирующих агентов, наночастиц золота, молекулярного шаперона Hsp90 и иммобилизацию компонентов биолюминесцентной системы.

Научная новизна работы заключается в систематическом исследовании способов повышения интенсивности биолюминесценции и стабильности люциферазных систем различной природы. Интерес представляют полученные данные о различном эффекте наночастиц золота в отношении бактериальной люциферазы и люциферазы светляков. Показано усиление сигнала биферментной системы светящихся бактерий в присутствии наночастиц золота, тогда как для люциферазы светляков аналогичного эффекта не наблюдалось. Данные результаты подчеркивают необходимость учета структурно-функциональных особенностей конкретной ферментной системы при выборе подходов к повышению чувствительности биосенсорного анализа.

Отдельного внимания заслуживают результаты изучения взаимодействия люциферазы светляков с белком теплового шока Hsp90. Автором показана возможность сохранения активности фермента в условиях повышенной температуры в присутствии Hsp90 и АТФ, в том числе без участия других ко-шаперонов. Полученные результаты расширяют представления о возможных способах стабилизации люцифераз и имеют значение для разработки биолюминесцентных аналитических систем, предназначенных для работы в условиях воздействия неблагоприятных факторов среды.

Практическая значимость диссертационной работы определяется разработкой подходов к повышению чувствительности биолюминесцентного определения АТФ, НАДН и ФМН, а также созданием стабильных иммобилизованных реагентов на основе люциферазы светляков и D-люциферина. Важным результатом является предложенный комплекс из отдельно

иммобилизованных в желатиновый гель люциферазы светляков и D-люциферина, предназначенный для количественного определения АТФ и оценки микробного загрязнения. Показано, что разработанная система позволяет обнаруживать бактериальные клетки с пределом обнаружения 2×10^4 кл/мл. Наличие патента Российской Федерации на набор реагентов для количественного определения аденозин-5'-трифосфата дополнительно подтверждает прикладную направленность выполненных исследований.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных экспериментальных методов, включая билюминесцентный анализ, методы исследования кинетики ферментативных реакций, просвечивающую электронную микроскопию, энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию и определение физико-химических характеристик наночастиц. Представленный в автореферате экспериментальный материал является последовательным, а сформулированные выводы соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Результаты диссертационного исследования прошли широкую апробацию на российских и международных научных мероприятиях. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных, а также получен патент Российской Федерации, что свидетельствует о достаточной степени апробации основных результатов исследования.

При общей положительной оценке работы хотелось бы высказать два вопроса дискуссионного характера.

1. В работе показано, что присутствие наночастиц золота приводит к увеличению интенсивности билюминесценции биферментной системы светящихся бактерий, тогда как в системе люциферазы светляков подобного эффекта не наблюдается и отмечается некоторое снижение сигнала. Какие особенности взаимодействия наночастиц с данными ферментными системами автор считает наиболее значимыми для объяснения такого различия и какие параметры наночастиц в дальнейшем целесообразно оптимизировать для управления этим эффектом?
2. Разработанный комплекс отдельно иммобилизованных люциферазы светляков и D-люциферина рассматривается как перспективный биораспознающий элемент для определения АТФ и оценки микробного загрязнения. Какие направления дальнейшей оптимизации разработанного реагента автор считает наиболее важными с точки зрения его практического применения в составе биосенсорных систем?

Указанные вопросы носят дискуссионный характер, не снижают научной и практической значимости выполненной работы и могут рассматриваться как направления дальнейшего развития проведенных исследований.

Автореферат в достаточной степени отражает основное содержание диссертации, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Работа представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование, в котором решена актуальная задача разработки и обоснования способов повышения чувствительности и стабильности люциферин-люциферазных систем для биосенсорных технологий.

Работа «Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий» соответствует требованиям Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Кириллова Мария Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Сутормин Олег Сергеевич

кандидат биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

проректор по науке и технологиям

бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры
«Сургутский государственный университет»

Почтовый адрес: 628412, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, г. Сургут, пр. Ленина, д. 1

Сайт: <https://www.surgu.ru/>

Телефон: +7-(3- [REDACTED])

e-mail: s [REDACTED].ru

Я, Сутормин Олег Сергеевич, даю согласие на включение и дальнейшую обработку своих персональных данных при подготовке документов аттестационного дела соискателя ученой степени и защите диссертации.

«18» августа 2026 г.

✓ / О. С. Сутормин /

