

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу
Кирилловой Марии Александровны
«ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНЫЕ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ И
СВЕТЛЯКОВ: СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И
СТАБИЛЬНОСТИ ДЛЯ БИОСЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»
по специальности 1.5.6. Биотехнология на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Кирилловой М.А. посвящена разработке подходов к увеличению чувствительности и стабильности ферментативных биораспознающих элементов биосенсоров. Биолюминесцентные биосенсоры на основе люцифераз занимают важное место в современных аналитических технологиях. Однако существуют две взаимосвязанные проблемы, препятствующие широкому распространению подобных сенсоров: недостаточная стабильность ферментных реагентов и необходимость обеспечения высокой чувствительности к анализам. В этой связи систематическое исследование способов управления аналитическими характеристиками люцифераз представляет не только фундаментальный, но и высокий прикладной интерес.

Научная новизна и теоретическая значимость

В диссертации впервые проведен комплексный сравнительный анализ различных подходов к усилению биолюминесцентного сигнала и стабилизации. Теоретическая значимость работы заключается в установлении закономерностей влияния различных факторов (соотношение фермент-субстрат, добавление стабилизирующих агентов, использование наночастиц и шаперонов, иммобилизация ферментов) на чувствительность и стабильность биолюминесцентных ферментных систем, что создает основу для целенаправленного конструирования биораспознающих элементов биосенсоров.

Практическая значимость

Разработанные в диссертации методические подходы имеют практическую ценность для создания биосенсоров различного назначения. Несмотря на то, что в работе рассмотрены именно биолюминесцентные ферментные системы, исследованные подходы могут быть применены и для других ферментных систем. Представленный в работе двухкомпонентный иммобилизованный реагент, включающий люциферазу светляков и люциферин, может быть использован для экспресс оценки микробного загрязнения объектов окружающей среды или пищевых продуктов. Предложенные методы стабилизации ферментов (использование ДТТ, БСА, шаперона Hsp90 или иммобилизация в гель) могут быть применены при разработке ферментных препаратов с увеличенным сроком хранения и расширенным температурным диапазоном использования.

Структура и содержание работы

Диссертация изложена на 121 странице, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, две экспериментальные главы), заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 196 источников. Работа иллюстрирована 50 рисунками и 2 таблицами.

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи, представлены научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту. Глава 1 содержит обзор литературы, отражающий современное состояние исследований в области биолюминесценции. Описаны методы стабилизации люцифераз, а также факторы, влияющие на их чувствительность. Глава 2 представляет материалы и методы, описанные с достаточной детализацией для воспроизведения экспериментов. В главе 3 представлены результаты по разработке методов повышения чувствительности люциферазных систем, с целью определения таких клеточных метаболитов как АТФ, NADH и FMN. Описанные методы включают в себя использование наночастиц золота, добавление стабилизирующих добавок или белка теплового шока. Глава 4 посвящена

разработке иммобилизованных реагентов, включающих фермент люциферазу светляков и субстрат люциферин. Выводы соответствуют поставленным задачам и отражают основные результаты работы. Список литературы оформлен корректно и содержит публикаций последних лет.

Замечания и вопросы к работе

При рецензировании возникли следующие вопросы:

1. В присутствии золотых наночастиц было продемонстрировано усиление сигнала биферментной системы светящихся бактерий в 1,6 раз, однако для люциферазы светляков такого эффекта не наблюдалось. С чем может быть связано отсутствие эффекта для люциферазы светляков? Пробовали ли использовать линкеры между ферментом и наночастицами, чтобы контролировать расстояние между ними?

2. В разделе 4.1. описано использование крахмального и желатинового гелей для иммобилизации люциферазы светляков. При этом крахмальный гель оказался «неподходящим» без детального объяснения. Было бы неплохо объяснить, с чем это связано.

3. При иммобилизации люциферазы светляков и люциферина в желатиновый гель показано снижение активности многокомпонентного реагента на 40% по сравнению с отдельной иммобилизацией. Чем обусловлено такое снижение активности ферментной системы?

4. В выводах указано, что АТР-система более чувствительна к бактериальным клеткам, чем биферментная система светящихся бактерий. Однако анализ по определению FMN или NADH проводили с растворимыми ферментами, а по АТР – с иммобилизованными. Насколько корректным является такое сравнение?

5. В работе представлены пределы обнаружения для трех субстратов: АТР, NADH и FMN. Однако отсутствует сравнительная оценка чувствительности разработанных методов с коммерческими аналогами. Было бы полезно провести такое сравнение для оценки практической значимости полученных результатов.

Указанные вопросы и замечания имеют уточняющий или дискуссионный характер, не влияют на положительную оценку работы и не затрагивают ее научную новизну и практическую значимость.

В целом, диссертационная работа Кирилловой М.А. выполнена на высоком уровне, обладает новизной, теоретической и практической значимостью и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

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 завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи увеличения чувствительности и стабильности биолуминесцентных ферментных систем с целью их применения в качестве биораспознающих элементов биосенсоров. Полученные результаты могут быть использованы при создании новых биолуминесцентных биосенсоров для мониторинга микробного загрязнения. Работа 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 ее автор, Кириллова Мария Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Решетиллов 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.: 8-9 [REDACTED]

Эл. почта: an [REDACTED] .ru

 [REDACTED]

Решетилов Анатолий Николаевич

«26» Августа 2026 г.

Подпись Решетилова Анатолия Николаевича заверяю.

Подпись Решетилов
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров ИБФМ РАН

[REDACTED]

