

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор – проректор по научной
деятельности ФГАОУ ВО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет»
д.ф.-м.н., профессор

«1» сентября 2026 г.

Т.А. Таюрский

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию 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. Современная наука невозможна без развития направлений, связанных с биосенсорикой. Биосенсорные устройства с различными способами регистрации аналитического отклика позволяют решать огромное количество актуальных задач, связанных с экологической, пищевой безопасностью, медицинской диагностикой. Представленная диссертационная работа Кирилловой М.А. посвящена вопросу улучшения чувствительности ферментных систем на примере ферментов люцифераз светящихся бактерий и светляков. Зачастую чувствительность ферментных тестов снижается из-за потери активности фермента или изменения его структуры в силу недостаточной стабильности в условиях проведения анализа. Поэтому актуальным остается вопрос о соблюдении баланса между стабильной структурой и высокой чувствительностью фермента к анализам.

В работе рассмотрены способы усиления биолуминесцентного сигнала ферментных систем с целью повышения их чувствительности к обнаружению таких клеточных метаболитов как аденозин-5'-трифосфат, флавиномононуклеотид и никотинамидадениндинуклеотид, являющихся одновременно и субстратами реакций люциферазных систем.

В этой связи **цель** представленной диссертации М.А. Кирилловой, направленная на разработку комплекса методов усиления биолуминесцентного сигнала люциферин-люциферазной системы бактерий и светляков для создания биораспознающего элемента биосенсора, характеризующегося повышенной

чувствительностью и стабильностью, является *актуальной, научно и практически значимой*.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертационная работа М.А. Кирилловой представляет собой комплексное систематическое исследование, направленное на изучение и анализ различных способов усиления светового сигнала люциферин-люциферазных систем бактерий и светляков. Предложенные и разработанные автором способы основаны на различных механизмах усиления сигнала. Автором впервые проведен комплексный анализ способов усиления интенсивности свечения при использовании защитных стабилизирующих добавок для сохранения структуры люциферазы, наночастиц золота, и шаперона Hsp90 для поддержания работы фермента. Один из представленных способов, а именно использование стабилизирующего агента ДТТ, применен для разработки иммобилизованного реагента, включающего люциферазу светляков, и используемого для определения микробных клеток.

Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов. Полученные результаты могут использоваться для разработки методов анализа клеточных метаболитов, являющихся субстратами реакций (аденозин-5'-трифосфата, флаavinмононуклеотида и никотинамидадениндинуклеотида) и методов оценки микробного загрязнения. Автором разработаны подходы, позволяющие иммобилизовать люциферазу светляков для последующего использования в качестве биораспознающего элемента биосенсоров для определения аденозин-5'-трифосфата.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования. С материалами диссертационной работы рекомендуется ознакомить научные и образовательные учреждения, занимающиеся разработками в области биотехнологии, биосинтетических и биосенсорных технологий: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ГНЦ ВБ «Вектор», Университет ИТМО, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Российский биотехнологический университет, Уральский федеральный университет, Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины им. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Государственный научно-исследовательский

институт биологического приборостроения. Полученные результаты и выводы могут быть использованы в качестве иллюстративного материала в курсах лекций по биологии, биосенсорике и биотехнологии.

Достоверность полученных результатов. Обоснованность положений, выносимых на защиту, и выводов по работе. Достоверность представленных в работе данных определяется большим объемом экспериментального материала, полученного с применением современных спектральных методов исследования и методов микроскопии на сертифицированном оборудовании, а также грамотным планированием эксперимента. Обработка полученных экспериментальных данных проведена методами математической статистики. Полученные результаты согласуются с литературными сведениями.

Объем полученных теоретических и экспериментальных данных достаточен для обоснования выносимых на защиту положений. Выводы по работе полностью соответствуют ее содержанию.

Структура диссертации и основное содержание работы. Диссертация имеет традиционное строение, изложена на 121 странице компьютерной верстки. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, благодарностей, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы и содержит 2 таблицы, 50 рисунков и библиографию из 196 наименований.

Во введении представлены актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, личный вклад соискателя, соответствие папорту специальности, а также положения, выносимые на защиту. Представлены сведения об апробации работы и публикациях по ее теме.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором достаточно подробно рассмотрены биоломинесцентные ферментные системы светляков и светящихся бактерий, влияние соотношения компонентов ферментных реакций, стабилизирующих агентов, наночастиц металлов на чувствительность биоломинесценции. Также внимание уделено влиянию шаперонов на состояние ферментов, рассмотрены различные варианты иммобилизации и ее влияния на активность биоломинесцентных ферментных систем. Представленный материал, характеризуется высокой степенью обобщения, глубиной и достаточной степенью критического анализа.

Во второй главе (материалы и методы) подробно описаны реактивы, препараты ферментов, методики синтеза наночастиц, протоколы оценки активности, приборная база и методы исследования.

Третья глава посвящена способам управления чувствительностью биоломинесцентных методов за счет варьирования концентраций основных компонентов ферментных реакций: NADH:FMN-оксидоредуктазы, бактериальной люциферазы, люциферазы светляков и их субстратов. Выбраны соотношения компонентов, для которых нормированная интенсивность свечения была максимальна, что позволило определять низкие уровни содержания флавиномононуклеотида и никотинамидадениндинуклеотида в анализируемых образцах. Для люциферазы светляков показано, что увеличение количества фермента и D-люциферина приводило к усилению нормированной интенсивности свечения. Добавление БСА и ДТТ повышало интенсивность свечения биоломинесцентной системы, тогда как в присутствии сахарозы увеличения активности фермента не наблюдали. Наночастицы золота, полученные цитратным методом, приводили к усилению биоломинесценции, тогда как наночастицы золота, покрытые оболочкой аденозин-5'-трифосфата, не оказывали подобного эффекта.

Четвертая глава посвящена созданию чувствительного реагента для количественного определения АТФ. С этой целью была изучена активность иммобилизованной люциферазы светляков в присутствии стабилизирующих добавок, таких как сахароза, БСА и ДТТ. Показано, что введение сахарозы препятствует высыханию иммобилизованных реагентов, БСА не оказывает влияния на активность фермента, а ДТТ усиливает интенсивность свечения люциферазы светляков в 2-2,5 раза. Разработанные биоломинесцентные ферментные системы на основе люциферазы светляков были использованы для оценки микробного загрязнения сред после разрушения бактериальных клеток по содержанию АТФ. Предел обнаружения бактериальных клеток, полученный с системой на основе NADH:FMN-оксидоредуктазы и бактериальной люциферазы, был в 40 раз выше, чем для люциферазы светляков. Иммобилизация D-люциферина в крахмальный гель, приводила к большому разбросу в значениях биоломинесцентного сигнала. При отдельной иммобилизации люциферазы светляков и D-люциферина в желатиновый гель активность фермента не снижалась.

В заключении диссертации обобщены результаты и подведены итоги проведенного исследования, а также отмечены перспективы его дальнейшего развития. Выводы логично следуют из представленного фактического материала, сформулированы на высоком научном уровне и отражают основные достижения проделанной работы.

Следует отметить, что диссертационная работа Кирилловой М.А. характеризуется системным подходом к решаемой проблеме. Все главы и разделы логично связаны между собой и органично обобщены в заключении и выводах.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями о порядке присуждения ученых степеней.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 6 статьях в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК России, входящих в Белый список и индексируемых в базах Web of Science и Scopus, а также в 6 тезисах доклада в сборниках материалов конференций. Также по результатам исследования имеется 1 патент. Работа прошла всестороннюю апробацию на профильных научных мероприятиях всероссийского и международного уровня.

Необходимо отметить, что диссертационная работа М.А. Кирилловой выполнялась при поддержке грантов РФФИ и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности №18-44-242003, №16-44-242126, а также гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере №9590ГУ/2015.

Замечания и вопросы по диссертации. Замечания по существу представленных данных и уровню их обсуждения отсутствуют. Однако следует отметить некоторые вопросы и замечания, не имеющие принципиального характера.

1. В названии работы фигурируют «биосенсорные технологии», тем не менее, в литературном обзоре раздел, посвященный биосенсорам, не представлен. Подобный раздел позволил бы дополнительно усилить научную значимость данной работы.
2. В работе рассмотрены несколько способов усиления сигнала биолюминесценции. Какой из представленных способов наиболее предпочтителен для люцифераз светляков и светящихся бактерий?
3. При разработке иммобилизованного реагента в качестве способа улучшения чувствительности и усиления сигнала использовали только стабилизирующие добавки, и не использовали наночастицы или белок теплового шока. Чем обоснован выбор именно этого способа?
4. Разработанные реагенты хранятся при 4 °С. Какова их стабильность при комнатной температуре (например, при транспортировке или в полевых условиях)? Какой срок годности у полученных реагентов?
5. Комбинация ферментов, демонстрировавшая минимальную интенсивность свечения (рис. 16а), привела к максимальному отношению сигнал/фон (рис.16б). Чем можно объяснить это поведение, отличное от других аналогичных примеров, приведенных в диссертации?

6. Авторы вводят термин «нормированная интенсивность свечения», но далее по тексту используются фразы «отношение интенсивности свечения» или «сигнал/фон». Вероятно, следовало бы использовать один из предложенных вариантов на протяжении всей работы.
7. Большинство аббревиатур представлено на английском языке, хотя для них имеются русские аналоги. На рисунках 4, 6, 8, 11, 13 часть информации приведена на английском языке без соответствующего перевода. Данные иллюстрации и схемы следовало представить с русскими комментариями и подписями.
8. Неверно представлено число значащих цифр величины относительного стандартного отклонения и среднего значения, приводимых в таблицах 1 и 2.
9. На с. 90 приведена фраза: «Показано, что при использовании FLuc и D-люциферина, иммобилизованных в 1% желатиновый гель как совместно, так и по-отдельности, интенсивность свечения находится на уровне контроля, т.е. интенсивности свечения растворимой FLuc в присутствии раствора D-люциферина.» Данное утверждение противоречит рисунку 50 и Выводу №5, сделанному по результатам работы. В автореферате обсуждение результатов проведено верно.
10. На с.19 приведена фраза: «Также важной характеристикой биосенсора является диапазон концентраций аналита, при котором наблюдается линейный отклик биосенсора. Эта характеристика указывает на верхний и нижний предел обнаружения, т.е. максимальную и минимальную обнаруживаемую концентрацию аналита.» В данном случае, речь, скорее идет о нижней и верхней границах определяемых содержаний. В выводе №1 следовало использовать термин «предел обнаружения» вместо «чувствительности».
11. В тексте диссертации встречаются опечатки и неудачно сформулированные фразы.

Отмеченные замечания не снижают общую положительную оценку работы. В целом диссертация производит впечатление законченного исследования, проведенного на высоком научно-методическом уровне, и соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Заключение

На основании вышеизложенного считаем, что диссертация Кирилловой Марии Александровны «Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий» является научно-квалификационной работой, в которой содержится

решение задачи, имеющей значение для развития новых способов и подходов к повышению чувствительности биолюминесцентных ферментных биосенсоров в области биотехнологий. Работа **соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14** Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв составлен кандидатом химических наук, старшим преподавателем кафедры аналитической химии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Шамагсумовой Р.В.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», протокол № 1 от «1» сентября 2026 г.

Старший преподаватель кафедры аналитической химии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
кандидат химических наук



Шамагсумова Резеда Вакифовна

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Почтовый адрес: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Тел.: +7 (843) 233-77-44

Адрес электронной почты: г. [redacted].ru

1 сентября 2026 г.

Заведующий кафедрой аналитической химии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
доктор химических наук, профессор



Зиятдинова Гузель Камилевна

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Почтовый адрес: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Тел.: +7 (843) 233-77-36

Адрес электронной почты: G [redacted].ru

1 сентября 2026 г.



Шамагсумовой Р.В. заверяю
спец. по пер. [redacted] Д.Р. Камилевна

7



Зиятдинова Р.К. заверяю
спец. по пер. [redacted] Д.Р. Камилевна