

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГАОУ ВО «Сибирский
федеральный университет»

Денис Сергеевич Гуц



«13» мая 2026 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Диссертация «Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий» выполнена на кафедре биофизики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет».

В период подготовки диссертации соискатель Кириллова Мария Александровна работала в должности младшего научного сотрудника лаборатории биолюминесцентных биотехнологий ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» и являлась аспирантом кафедры биофизики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет».

В 2016 году окончила магистратуру ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» по направлению 03.04.02 – Физика.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2026 году ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет».

Научный руководитель – Кратасюк Валентина Александровна, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», кафедра биофизики, заведующий, лаборатория

биолюминесцентных биотехнологий, главный научный сотрудник.

На заседании присутствовали:

1. Кратасюк В.А., д-р биол. наук, проф., зав. кафедрой;
2. Барцев С.И., д-р физ.-мат. наук, профессор;
3. Рогозин Д.Ю., д-р биол. наук, доцент;
4. Франк Л.А., д-р биол. наук, зав. лаб.;
5. Бондарь В.С., д-р биол. наук., глав. науч. сотр.;
6. Прудникова С.В., д-р биол. наук, доцент, профессор;
7. Немцева Е.В., канд. физ.-мат. наук, доцент;
8. Есимбекова Е.Н, канд. биол. наук, доцент;
9. Буракова Л.П., канд. биол. наук, ст. науч. сотр.;
10. Торгашина И.Г. канд. биол. наук, доцент;
11. Высоцкий Е.С. канд. биол. наук, зав. лаб.;
12. Маркова С.В., канд. биол. наук, доцент; ведущ. науч. сотр.;
13. Маликова Н.П., канд. биол. наук, науч. сотр.;
14. Сушко Е.С., канд. биол. наук, мл. науч. сотр.;
15. Еремеева Е.В., канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр.;
16. Красицкая В.В., канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр.;
17. Деева А.А., канд. физ.-мат. наук, мл. науч. сотр.;
18. Лисица А.Е., канд. физ.-мат. наук, мл. науч. сотр.;
19. Кудрявцев А.Н., канд. биол. наук, мл. науч. сотр.;
20. Кесслер Е.И. д-р биол. наук., проф., гл. науч. сотр.;
21. Колесник О.В., мл. науч. сотр.;
22. Гульнов Д.В., мл. науч. сотр.;
23. Калябина В.П., вед. инженер;
24. Лемешенко Т.Л., инженер,
25. Посохина Е.Д., мл. науч. сотр.;
26. Зыкова А.И. мл. науч. сотр.;
27. Якимов А.С. мл. науч. сотр.;
28. Жукова Г.В. мл. науч. сотр.;
29. Вяткина М.О., инженер;

30. Зеньков А.В., магистрант.

Были заданы следующие вопросы:

1. Какие наночастицы являются стабильными?
2. Использовали ли шаперон при иммобилизации?
3. Как полученные результаты по чувствительности к АТР согласуются с литературными данными?
4. Почему в таблице представлены данные по условиям получения образца, а не характеристика самого образца?
5. Какие клетки использовали в качестве модельного образца?
6. Где вы брали наночастицы?
7. За счет чего второй образец наночастиц более стабилен?
8. Что такое шаперон?
9. Почему исследовали шаперон при температуре 50С?
10. Почему шаперон теряет активность с течением времени?
11. За счет чего падает активность фермента при совместной иммобилизации с субстратом?
12. Какие критерии оптимальности предполагаются при выборе компонентов ферментной реакции?
13. Как добавление шаперона влияет на интенсивность свечения?
14. Характерно ли субстратное ингибирование для люциферазы светляков?
15. За счет чего возникает фоновое свечение?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность исследования. Современный этап развития биосенсорики характеризуется стремительными темпами появления новых биосенсоров широкого профиля действий. Среди большого разнообразия биосенсоров важную нишу занимают ферментативные биосенсоры, в состав биоэлемента которых входят ферменты светящихся организмов.

В биолюминесцентных биосенсорах активно используется люциферин-люциферазная система светляков. Специфичность анализа обеспечивается взаимодействием субстрата аденозин-5'-трифосфата (АТР) и люциферазы.

Такие биосенсоры применяются для количественного обнаружения АТФ в различных образцах для контроля чистоты различных поверхностей, воздуха, воды, качества пищевых продуктов и др.

Ферментная система светящихся бактерий также может быть использована в избирательном анализе, основанном на фермент-субстратном взаимодействии, для обнаружения таких клеточных метаболитов, как флаavinмоноклеотид (FMN) или никотинамидадениндинуклеотид (NADH), лактат, пируват и других при создании полиферментных цепочек с люциферазой.

Основными характеристиками биолуминесцентных ферментных биосенсоров являются их экспрессность, высокая специфичность и чувствительность к субстратам реакции, а также сохранение активности ферментов с течением времени, то есть их стабильность. Если «экспрессность» характерна для всех биолуминесцентных методов, то чувствительность подвержена изменениям в силу таких факторов как, например, потеря активности фермента из-за низкой стабильности или снижение светового сигнала в связи с неоптимальными условиями проведения анализа. Актуальным остается не только задача о сохранении стабильной структуры фермента, но и соблюдения оптимальных условий для сохранения высокого сигнала люминесценции. В связи с этим возникает вопрос том, какие способы усиления интенсивности свечения подходят для разных биолуминесцентных систем.

Цель работы – разработать комплекс методов усиления биолуминесцентного сигнала люциферин-люциферазной системы бактерий и светляков для создания биораспознающего элемента биосенсора, характеризующегося повышенной чувствительностью и стабильностью.

Научная новизна. Впервые проведен систематический анализ способов усиления биолуминесценции люциферин-люциферазных систем бактерий и светляков и обеспечения стабильности ферментных систем, а именно защита структуры люциферазы стабилизирующими добавками, усиление люминесценции в присутствии наночастиц золота, поддержание работы фермента с помощью шаперона Hsp90. Впервые предложен способ

стабилизации наночастиц золота липидной смесью, отличающийся своей простотой и низкой стоимостью. Показана возможность сохранения активности люциферазы светляков в условиях повышенной температуры с помощью Hsp90 без участия ко-шаперонов.

Показано, что для улучшения функциональных характеристик биолюминесцентных методов важным аспектом является подбор условий проведения анализа и компонентный состав реакционной смеси, а также использование наночастиц для усиления сигнала биолюминесценции. Стабилизация ферментной системы достигается путем иммобилизации или добавления стабилизирующих агентов.

Практическая значимость. Сравнительный анализ способов усиления биолюминесцентного сигнала ферментных систем бактерий и светляков показал, что выбранные способы, отличающиеся механизмами, лежащими в основе усиления сигнала, способствуют улучшению характеристик биолюминесцентных методов. На основе сравнения ферментных систем светляков и светящихся бактерий разработаны методы анализа клеточных метаболитов, являющихся субстратами реакций (ATP, FMN и NADH). Представленные способы были выборочно использованы для создания стабильного иммобилизованного реагента на основе люциферазы светляков, пригодного для использования в качестве биораспознающего элемента биосенсоров для количественного определения ATP. Разработан метод оценки микробного загрязнения с применением полученных реагентов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Стабильность ферментной системы светляков повышается путем иммобилизации в желатиновый гель, введения стабилизирующих агентов и применения шаперона Hsp90 (при высокой температуре).

2. Присутствие наночастиц золота способствует усилению сигнала биолюминесценции биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза.

3. Раздельная иммобилизация люциферазы светляков и D-люциферина в желатиновый гель обеспечивает создание стабильного и чувствительного реагента для количественного определения АТФ.

Личный вклад автора заключается в личном проведении экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также в написании научных публикаций и апробации результатов исследования на семинарах и конференциях.

Степень достоверности результатов подтверждается достаточным объемом данных, их внутренней согласованностью и воспроизводимостью, а также использованием при проведении научной работы современных методов исследования и статистического анализа.

Основные положения диссертационной работы представлены на конференциях и других научных мероприятиях российского и международного уровня: конференции молодых ученых Института биофизики СО РАН (Красноярск, Россия, 9 апреля 2026); Международном симпозиуме и молодежной школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, Россия, 25-28 октября 2016); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (Москва, Россия, 10-14 апреля 2017); 3-ей Международной конференции по инжинирингу продуктов питания и биосистем (Родос, Греция, 1-4 июня 2017); 9-ой Международной конференции по экологическому инжинирингу и менеджменту (ICEEM-09) (Болонья, Италия, 6-9 сентября 2017); 20-ом Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Нант, Франция, 28-31 мая 2018), III международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни» (Красноярск, Россия, 1-4 октября 2018), VI Съезде биофизиков России (Сочи, Россия, 16-21 сентября 2019), I региональном собрании РФО и Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» (Нижний Новгород, Россия, 14-19 октября 2024).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, входящих в Белый список и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов; получен 1 патент РФ.

Публикации в международных базах данных и системы цитирования Web of Science и Scopus:

1. **Kirillova M.A.** Bioluminescent enzymatic biosensors: ways to manage their characteristics / M.A. Kirillova, E.N. Esimbekova, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // Biophysical Reviews. – 2025. – P.1-17. (*УБС 1, Q1*)
2. Esimbekova E.N. Immobilization of firefly bioluminescent system: Development and application of reagents / E.N. Esimbekova, **M.A. Kirillova**, V.A. Kratasyuk // Biosensors. – 2023. – V.13. – N.1. – P.47. (*УБС 1, Q1*)
3. **Kirillova M.A.** Role of Hsp90 and ATP in modulating apyrase activity and firefly luciferase kinetics / M.A. Kirillova, R. Ranjan, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // International Journal of Biological Macromolecules. – V.131. – 2019. – P.691-696. (*УБС 1, Q1*)
4. **Kirillova M.A.** Bioluminescent system of luminous bacteria for detection of microbial contamination / M.A. Kirillova, E.N. Esimbekova, R. Ranjan, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2018. – V.11. – N.2. – P.174-180. (*Q4*)
5. Ranjan R. Agglomeration behavior of lipid capped gold nanoparticles / R. Ranjan, **M.A. Kirillova**, E.N. Esimbekova, S.M. Zharkov, V.A. Kratasyuk // Journal of Nanoparticle Research. – 2018. – No 20. – P.107-118. (*УБС 2, Q2*)
6. Ranjan R. Metal-enhanced luminescence: Current trend and future perspectives / R. Ranjan, E.N. Esimbekova, **M.A. Kirillova**, V.A. Kratasyuk // Analytica Chimica Acta. – V. 971. – 2017. – P.1–13. (*УБС 1, Q1*)

Прочие публикации:

Патент РФ № 2654672C1. Набор реагентов для количественного определения аденозин-5'-трифосфата» дата регистрации 21.05.2018. Авторы **Кириллова М.А.**, **Есимбекова Е.Н.**, **Кратасюк В.А.** Патентообладатель

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Сибирский федеральный университет". Заявка на патент РФ № 2017121916, дата приоритета 21.06.2017.

Тезисы в сборниках материалов конференций:

1. **Кириллова М.А.** Кинетика люциферазы светляков в присутствии белка теплового шока 90 и апиразы / М.А. Кириллова, Р. Ранджан, В.А. Кратасюк // I региональное собрание РФО и Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» Сборник тезисов. – Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2024. – С. 240-241.
2. **Кириллова М.А.** Роль белка теплового шока 90 в усилении люминесценции люциферазы светляков / М.А. Кириллова, Р. Ранджан, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России: в 2 томах – Краснодар: Полиграфическое объединение «Плехановец». – 2019. – Т.2. – С.105-106.
3. **Kirillova M.A.** Lipid protection of gold nanoparticles against agglomeration / M.A. Kirillova, R. Ranjan, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Материалы III международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни». – Красноярск: Сибирский федеральный университет. – 2018.
4. **Kirillova M.A.** Bioluminescence enhancement by interactions of FMN and ATP with gold nanoparticles / M.A. Kirillova, R. Ranjan, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Abstracts of 20th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. – Nantes, France. – 2018.
5. **Kirillova M.A.** Bioluminescence application to control microbial contamination / M.A. Kirillova, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Proceedings of the 9th International Conference Environmental Engineering and Management: Circular Economy and Environmental Sustainability: Conference Abstracts Book. – Bologna, Italy. – 2017. – P.433-434.
6. **Кириллова М.А.** Фотофизические взаимодействия субстратов биолюминесцентных систем с наночастицами золота // Международная научная

конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017». – Москва. – 2017.

Диссертация «Люциферин-люциферазные системы бактерий и светляков: способы повышения чувствительности и стабильности для биосенсорных технологий» Кирилловой Марии Александровны рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Заключение принято на расширенном заседании кафедры биофизики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» с привлечением профильных специалистов кафедры биотехнологии и федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», протокол №10 от 7 мая 2026 г.

Присутствовало на заседании 30 чел., из них с правом решающего голоса – 20 чел. Результаты голосования: «за» – 20 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел.



Прудникова Светлана Владиславна,
председатель заседания,
доктор биологических наук, доцент,
профессор базовой кафедры
биотехнологии СФУ