

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

ФГАОУ ВО «Сибирский
федеральный университет»

Денис Сергеевич Гуц



_____ 2021 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Диссертация «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение» выполнена в лаборатории биолюминесцентных биотехнологий кафедры биофизики.

В период подготовки диссертации соискатель Сутормин Олег Сергеевич обучался в аспирантуре федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» и работал в лаборатории биолюминесцентных биотехнологий кафедры биофизики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» в должности младшего научного сотрудника.

В 2011 г. окончил ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», получив квалификацию «физик» по специальности «биохимическая физика».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2020 г. федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Сибирский федеральный университет».

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор Кратасюк Валентина Александровна, заведующий кафедрой биофизики, федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет». Научный руководитель утвержден приказом № 9744/с ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» от «30» сентября 2011 г. Тема диссертационной работы утверждена на заседании кафедры биофизики ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» от 12 апреля 2012 г, Протокол №13.

На заседании присутствовали: д-р биол. наук, профессор Кратасюк В.А.; д-р физ.-мат. наук Барцев С.И.; д-р физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. Белобров П.И.; д-р биол. наук Сетков Н.А.; д-р биол. наук, доцент Рогозин Д.Ю.; д-р биол. наук, доцент Коленчукова О.А.; д-р физ.-мат. наук, профессор Кудряшева Н.С.; д-р биол. наук, профессор Полонский В.И.; канд. физ.-мат. наук, доцент Немцева Е.В.; канд. биол. наук, доцент Есимбекова Е.Н.; канд. биол. наук, доцент Сарангова А.Б.; канд. биол. наук Свидерская И.В.; Гульнов Д.В.; Колосова Е.М.; Лемешенко Т.Л.

Были заданы вопросы:

- Как часто и в каких случаях во внутриклеточном пространстве *E. coli* встречаются включения, содержащие глицерин и сахарозу?
- Какая именно структурная единица внутриклеточного пространства имитировалась во время проведенного исследования в диапазоне вязкости от 2 до 6 сП?
- Были ли проведены исследования моноферментных реакций ферментов НАДН:ФМН-оксидоредуктаза, лактатдегидрогеназа и бактериальная люцифераза в растворах повешенной вязкости?
- Как изменение термостабильности ферментативной системы может быть связано с увеличением эффективности работы ферментативной системы?
- Насколько и в какую сторону изменяется поведение ферментатов при переходе от моноферментных к полиферментным сопряженным системам?

- Почему чувствительность ферментативных систем к наноматериалам и почвенным токсикантам не изучалась в растворах повышенной вязкости?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Сутормина О.С. «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение», представляемая на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика, посвящена развитию нового исследовательского подхода установления эффектов вязкости реакционной среды на активность би- и три ферментных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой, и выяснению механизмов функционирования полиферментативных систем и их комплексов в условиях микроокружения, симулирующего внутриклеточную вязкую среду.

Личный вклад соискателя в получение научных результатов

Основная часть работы, заключающаяся в подборке реакционного состава, подборке ферментативных систем для исследования и проведении экспериментов, предварительном анализе результатов, написании научных статей и тезисов по материалам диссертации, их публикации и представлении на конференциях российского и международного уровня выполнены автором самостоятельно или при его непосредственном участии.

Достоверность полученных результатов

В работе использовалось современное научно-исследовательское оборудование и современные методы исследования. Для проверки достоверности и обоснованности результатов экспериментов, различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$).

Практическая значимость

Найдены условия микроокружения для увеличения чувствительности к токсикантам у ферментативных систем, сопряженных с люциферазой, используемых в ферментативных биолюминесцентных биотестах. На примере оценки степени загрязнения почвенных экосистем показано, что повышение сложности системы (от моно- до триферментной) увеличивает чувствительность анализа, что позволяет управлять чувствительностью ферментативных тестов за счет использования ферментативных комплексов разной сложности или подбора систем, подверженных наименьшему влиянию фоновых компонентов почвы. Показано, что биферментная система НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза имеет более высокую чувствительность к действию углеродных нанотрубок (УНТ), чем тест *in vivo* на основе люминесцентных бактерий (EC_{50} для однослойных углеродных карбоксилированных нанотрубок (ОСУНТ) и многостенных углеродных нанотрубок (МСУНТ) на 2–3 порядка ниже). Предложены современные подходы для конструирования специализированных ферментативных биотестов различной сложности для целей мониторинга экологической безопасности сред различного компонентного состава и степени загрязнения.

Научная новизна

Впервые в результате изучения эффектов вязкости реакционной среды, имитируемой добавлением различных концентраций глицерина и сахарозы, на активность биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназой + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) систем получены зависимости изменений кинетических (константа спада, общее количество высвеченных квантов света) и термодинамических характеристик (энергия активации, константы термоинактивации) метаболических ферментативных комплексов в зависимости как от длины цепи сопряженных ферментов, так и от вязкости микроокружения. Показано, что увеличение вязкости реакционной среды влияет на подвижность пространственных структур ферментов, что объясняет

уменьшение каталитической активности системы. Предложенный критерий оценки эффективности взаимодействия сопряженных ферментов по изменению термостабильности показал, что в триферментной системе: лактатдегидрогеназой + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза теряется сопряжение по НАДН при увеличении вязкости микроокружения, в то время как эффективность сопряжения ферментов в биферментной НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза системе сохраняется в растворах повышенной вязкости даже при повышении температуры до 35 С.

Впервые предложены структурные элементы и критерии для построения экспериментальной модели эффективного взаимодействия ферментов в метаболических фрагментах в условиях вязкости реакционной среды, приближенных к внутриклеточным.

Апробация работы

Результаты в полном объеме были изложены в статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых международных журналах, что является подтверждением обоснованности полученных в работе результатов и сделанных выводов.

Основные результаты диссертации изложены в 25 печатных изданиях, в том числе: 3 статьи в российских журналах из перечня ВАК, 5 статей в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus; 17 – в тезисах докладов всероссийских и международных конференций.

Статьи в российских журналах из перечня ВАК:

1. Сутормин, О. С. Спектры флуоресценции ферментов билюминесцентной реакции бактерий в вязких средах / О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. — 2014. — № 7. — С. 20–26.
2. Сутормин, О. С. Влияние вязкости реакционной среды на кинетику биферментной билюминесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-

оксидоредуктаза-люцифераза / О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Известия Алтайского государственного университета. — 2013. — № 3(79). — С. 47-51.

3. Сутормин, О. С. Стабилизирующий эффект глицерина и сахарозы на биферментную систему светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2013. — № 10. — С. 148-151.

Статьи в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

4. Kratasyuk V.A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V. A. Kratasyuk, E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, V. I. Lonshakova-Mukina, M. M. Baygin, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, A. A. Shpedt // Sensors. — 2021. — V 21(3). — P. 1017.
5. Kolosova, E. M. Set of Enzymatic Bioassays for Assessment of Soil Contamination / E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, E. N. Esimbekova, V. I. Lonshakova-Mukina, V. A. Kratasyuk. // Doklady Biological Sciences. — 2019. — V 489. — P. 1-4.
6. Sutormin, O. S. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, S. Pande, V. A. Kratasyuk // Molecular Catalysis. — 2018. — V 458. — P. 60-66;
7. Сутормин, О. С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би-и триферментной систем / О. С. Сутормин, Е. М. Колосова, Е. В. Немцева, О. В. Искорнева., А. Е. Лисица., В. С. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк // Цитология. — 2018.— № 10. — С. 826-829.
8. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. N. Esimbekova, E. V.

Nemtseva, A. E. Bezrukikh, G. V. Jukova, A. E. Lisitsa, V. I. Lonshakova-Mukina, N. V. Rimatskaya, O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk. // *Toxicology in Vitro*. — 2017. — V 45. — P. 128-133.

Тезисы докладов всероссийских и международных конференций:

1. O. S. Sutormin. Bioluminescent Experimental Model for Investigation Enzyme Behavior under Viscous Cellular Conditions / O. S. Sutormin, V.A. Kratasyuk // Abstracts from the International e-Conference on "Sustainable Development after COVID-19: Environmental issues and challenges", 01-02 June 2020. — 2020. — P. 19.
2. Сутормин, О. С. Экспериментальная модель взаимодействия ферментов в би-и триферментных цепях сопряжения ферментов с люциферазой в условиях, приближенных к внутриклеточным / О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России, 16-21 сентября, Сочи, Россия. — 2019. — С. 396-397.
3. Sutormin, O. S. Sensitivity comparison of double- and triple- bioluminescent enzyme systems to soil toxicants / O. S. Sutormin, E. M. Kolosova, V. A. Kratasyuk // Abstract book of SETAC Europe 29th Annual Meeting, 26–30 May, Helsinki, Finland. — 2019. — P. 317.
4. Sutormin, O. S. Artificial enzyme-based model of living organism for integrated assessment of potential risk of toxicants / O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk // Abstract book of the 8th Young Environmental Scientists Meeting, 5 - 10 February, Ghent, Belgium. — 2019. — P. 70.
5. Sutormin, O. S. Influence of viscosity and temperature on coupled bioluminescent enzyme systems / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 9th International Congress on Biocatalysis, 26-30 August, Hamburg, Germany. — 2018. — P. 56.
6. Sutormin, O. S. The study of in vivo-like enzyme kinetics based on bacterial luciferase coupled with multi-enzyme systems / O. S. Sutormin, I. E.

- Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of SETAC Europe 28th Annual Meeting, 13–17 May, Rome, Italy. — 2018. — P. 130.
7. Sutormin, O. S. Viscosity-temperature dependence of enzymatic activity of bacterial luciferase coupled with NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and the multi-enzyme system / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 20th International Symposium for Bioluminescence and Chemiluminescence, - 28-30 May, Nantes, France. — 2018. — P. 183657.
 8. Sutormin, O. S. Roles of viscosogens on functional stability of bacterial luciferase coupled with multi-enzyme system LDH + NADH:FMN-oxidoreductase / O. S. Sutormin, M. S. Nemchinova, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 19th International Symposium for Bioluminescence and Chemiluminescence, 29 May – 2 June, Tsukuba, Japan. — 2016. — P. 187.
 9. Nemchinova, M. S. The effect of viscosity on the thermal stability of coupled multi-enzyme system lactate dehydrogenase + NAD(P)H:FMN-oxidoreductase + bacterial luciferase / M. S. Nemchinova, O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk / Abstract book of SFM'15 International Symposium 'Optics and Biophotonics-III', 21-25 September, Saratov, Russia. — 2015. — Режим доступа: <http://sfm.eventry.org/report/1555>.
 10. Немчинова, М. С. Активность и стабильность ферментов биолюминесцентной системы бактерий в составе полиферментной цепи в вязких средах / М. С. Немчинова, О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая // Материалы 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015: Физические методы в естественных науках, 11-17 апреля, Новосибирск, Россия. — 2015. — С. 67.
 11. Тюменцева Д. И. Влияние вязкости и pH реакционной среды на кинетику полиферментной системы светящихся бактерий / Д. И. Тюменцева О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая // Материалы 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015: Физические методы в

- естественных науках, 11-17 апреля, Новосибирск, Россия. — 2015. — С. 74.
12. Sutormin, O. S. Stabilization of coupled triple enzymatic system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase- lactate dehydrogenase in water-organic solvent systems / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 10th International Conference on Protein Stabilisation 7-9 May, Lake Maggiore, Italy. — 2014. — P. 192.
 13. Sutormin, O. S. Effect of structured microenvironments on stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 23-28 June, Uppsala, Sweden. — 2014. — P. 97-98.
 14. Sutormin O. S. The effect of surfactants on the sensitivity of coupled luciferase systems of luminous bacteria / O. S. Sutormin, G.O. Zhdanova, M.S. Nemchinova, D. I. Tyumentseva // Материалы V международной научно-практической конференции «21 ВЕК: ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И ТЕХНОЛОГИИ». — 2014. — С. 1-2.
 15. Sukovataya, I. E. The modeling of viscous microenvironment for the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria / I. E. Sukovataya, O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk // World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. — 2013. — № 11. — P. 1070-1072.
 16. Sutormin, O. S. Thermal stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in solvents of different viscosity / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 28 May – 2 June, Guelph, Canada. —2012. — №2. — P. 162.
 17. Sutormin, O. S. Fluorescence studies of thermal affect on enzymes of coupled enzymatic system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase

in viscous media / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 28 May – 2 June, Guelph, Canada. —2012. — №2. — P. 161.

Диссертационная работа Сутормина Олега Сергеевича «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение» соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 23 сентября 2013 года, с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 года №335 в редакции Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 года №748, и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Заключение принято на расширенном заседании кафедры биофизики и лаборатории биоллюминесцентных биотехнологий.

Присутствовало на заседании 15 чел., из них с правом решающего голоса – 12 чел. Результаты голосования: «за» - 12 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол № 4 от «2» декабря 2020 г.

Председатель заседания:
Кратасюк Валентина Александровна,
д-р биол. наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики


