



УТВЕРЖДАЮ:
Проректор по научной и
исследовательской деятельности Южного
федерального университета,
Д.х.н., с.н.с.

А.В. Метелица
_____ 2021 г.

Отзыв ведущей организации

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет» на диссертационную работу **Сутормина Олега Сергеевича «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02. – биофизика

Актуальность темы исследования

В современной биофизике наблюдается тенденция к более активному исследованию активности ферментативных реакций в условиях, моделирующих или близких внутриклеточные. Уровень понимания уточенной организации метаболических процессов, протекающих внутри клетки, может быть существенно повышен при регистрации кинетики ферментативных систем, различной сложности, в *in vivo*-подобных условиях реакционной среды. Проведение работ, направленных на исследование характеристик олигоферментных систем в условиях реакционной среды и микроокружения, близкого к внутриклеточному, представляет большой научный и практический интерес. В этой связи **актуальность** диссертационного исследования Сутормина О.С. не вызывает сомнений.

Цель диссертационной работы заключалась в установлении механизмов функционирования ферментов в биферментных и триферментных цепях сопряжения с бактериальной люциферазой в условиях вязкого микроокружения, имитирующего внутриклеточную среду клетки, влияющих на чувствительность ферментативных биотестов.

В представленной работе охарактеризованы эффекты вязкости реакционной среды, создаваемые глицерином и сахарозой, на активность ферментативной системы, катализируемой НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза и на активность ферментативной системы, катализируемой лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза. Представлены зависимости изменений основных кинетических параметров биOLUMИнесцентных систем в условиях вязкого микроокружения. На основании полученных термодинамических характеристик исследованных двух ферментативных цепей

сопряжения установлено, что вязкость реакционной среды влияет на подвижность пространственных структур ферментов, что объясняет зарегистрированные уменьшения каталитической активности на примере триферментной системы. В работе разработан подход к созданию перспективных и высокочувствительных биолюминесцентных биотестов на основе подбора ферментативных комплексов разной длины (один, два, три фермента), подверженных наименьшему влиянию фоновых компонентов исследуемого образца.

Исследование, представленное в диссертации, представляет научно-квалификационную работу, направленную на последовательное решение вышеперечисленных научных задач.

Оценка структуры и содержания диссертации, ее завершенности

Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, положенного в основу диссертации, описания использованных подходов и методов исследования, обсуждения полученных результатов исследования, в трех главах (глава 3-5), заключения, выводов, списка использованных сокращений, списка цитируемой литературы (169 наименований). Общий объем работы составляет 141 страницу, включая 28 рисунков и 7 таблиц.

В главе 1 приведен аналитический обзор литературных данных, представлена информация об объектах исследования. Подробно изложены современные представления о природе происхождения эффектов вязкости реакционной среды и их влиянии на кинетические характеристики и пространственную структуру ферментов. Даны сведения о применяемых, в настоящее время, подходах при планировании и проведении экспериментальных и теоретических исследований, связанных с установлением механизмов и закономерностей функционирования ферментативных систем в условиях, имитирующих внутриклеточное окружение. Рассмотрены основные модели, основанные на вкладе пространственных изменений белковых глобул в условиях молекулярного краудинга, которые могут помочь в глубинной интерпретации результатов в *in vivo*-подобном микроокружении. Рассмотрены пространственные структуры исследованных в работе ферментов (лактатдегидрогеназа, НАДН:ФМН-оскидоредуктаза и бактериальная люцифераза). Приведены сведения о работах, проведенных ранее другими авторами с использованием указанных выше ферментов в контексте проблематики, посвященной тому, чем следует дополнить проведенные ранее исследования, чтобы углубить биофизические подходы для исследования внутриклеточного поведения ферментов.

В главе 2 излагаются экспериментальные методы и подходы для достижения поставленных задач в рамках настоящего исследования. Представлена подробная информация о методике приготовления реакционной смеси для регистрации активности ферментов в условиях вязкого микроокружения и для достижения задач прикладного значения. Указана аппаратная часть, использованная в исследовании, с подробным описанием режимов, параметров съемки и регистрации информативных параметров ферментативных систем.

В главе 3 излагаются экспериментально полученные результаты о влиянии вязкости реакционной среды на основные кинетические характеристики (максимальная интенсивность свечения, общее количество высвеченных квантов света и константа спада светоизлучения) сопряженных би- и триферментных систем с бактериальной люциферазой. Продемонстрировано, что триферментная система (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + бактериальная люцифераза) демонстрирует меньшую каталитическую активность в присутствии вязких агентов (глицерина и сахарозы) по сравнению с биферментной системой (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + бактериальная люцифераза). Полученные данные о изменении величин общего количества высвеченных квантов света и константы спада светоизлучения показали, что на исследованные ферментативные системы оказывает существенное влияние природа агента, которым моделируется вязкость реакционной среды в кювете. При этом, природа происхождения водно-сахарозных растворов оказывает существо больший вклад, чем водно-глицериновые растворы, на исследованные кинетические параметры би- и триферментной систем.

В главе 4 представлены результаты посвященные исследованию влияния глицерина и сахарозы, различных концентраций, на термостабильность исследованных ферментативных систем при варьировании температуры. Показано, что в присутствии концентраций 50% глицерина и 40% сахарозы происходит повышение каталитической активности биферментной системы при температурах выше 30 °С, по сравнению с буферными значениями. Для триферментной системы, катализируемой лактатдегидрогеназой + НАДН:ФМН-оксидоредуктазой + люциферазой, присутствие глицерина и сахарозы не приводит к каким-либо явным и существенным различиям термостабильности триферментной системы по сравнению с буферным раствором при варьировании температуры в диапазоне от 15 до 80 °С.

С помощью графического способа определения энергии активации показано, что в присутствии глицерина происходит уменьшение величины энергии активации, как в би- так и в триферментных системах, по сравнению с буферным раствором и водно-сахарозными.

Получены данные о кинетике термоинактивации биферментной и триферментной систем при температуре 35 °С в присутствии буферного раствора, глицерина и сахарозы. При помощи спектрофотометрических методов анализа, показано, что в присутствии глицерина и сахарозы наблюдается стабилизация белковых глобул НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и бактериальной люциферазы.

Глава 5 посвящена описанию результатов, посвященных возможности практического использования исследованных ферментативных систем в аналитических целях. Первая часть главы 5 содержит данные о возможности применения биолюминесцентного ферментативного анализа, на основе биферментной системы (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза), для прогнозирования потенциальной токсичности углеродных наноматериалов, представленных одностенными и многостенными нанотрубками (ОСУНТ и

МСУНТ) и водными растворами гидратированного фуллерена C_{60} ($C_{60}HyFn$). Для корректировки результатов билюминесцентного анализа был разработан протокол, основанный на оптических свойствах исследованных наноматериалов. Было показано, что ингибирующее действие наноматериалов на активность биферментной системы снижается в ряду следующего порядка: МСУНТ > ОСУНТ > C_{60} ($C_{60}HyFn$). Установлен параметр ингибирования (IC_{50}) биферментной системы для МСУНТ и ОСУНТ, который составляет 0,012 и 0,16 мг/л соответственно.

Вторая часть главы 5 посвящена исследованию возможности использования ферментных систем разной сложности в качестве биотестов для оценки степени загрязнения почв почвенными токсикантами. Получены данные о чувствительности моно (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза), би (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) систем к пестицидам (диазинон и малатион) и ионам меди в воде и водных экстрактах из почв, различающихся гранулометрическим составом и содержанием гумуса. Чувствительность для каждого тестируемого образца определена на основании токсикологического параметра ингибирования активности системы IC_{20} , отражающего предел чувствительности ферментативной тест-системы к загрязнителю. Получено, что повышение сложности системы (от моно- до триферментной) увеличивает чувствительность биотеста, в некоторых случаях на несколько порядков. Продемонстрировано, что при разработке комплексного ферментативного биотеста для оценки степени загрязнения почвенных образцов токсикантами, наиболее высокочувствительными являются следующие ферментативные системы: моноферментная, катализируемая бутирилхолинэстеразой, биферментная система (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментная система (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза). Выбранные три ферментативные системы проявляют избирательную реакцию к определенным классам токсикантов и разным типам почв, что обеспечивает всесторонний ответ при оценке загрязнения сред сложного состава.

Также, в главе 5 описывается разработанный алгоритм и специализированное программное обеспечение для хранения, анализа и визуализации данных с использованием языка программирования JavaScript. Разработанное программное обеспечение основано на сопоставлении данных 51 некоммерческих стандартных образцов почвы и их ингибирующем воздействии на три ферментные системы различной сложности (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза и лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза). Данное программное обеспечение позволяет выявить влияние физико-химических свойств образцов почвы, не содержащих каких-либо почвенных загрязнителей, на активность ферментативных биосенсоров.

В **заключении** подытоживается информация, представленная в главах с 3 по 5, указываются перспективы и возможные дальнейшие научные направления для продолжения исследования.

Работу завершат раздел **выводы**, в которых перечислены достигнутые конкретные научные результаты.

Таким образом, диссертация содержит подробный аналитический обзор по обозначенной актуальной проблеме исследования, включает подробное описание методов и методик, необходимое количество экспериментальных результатов для проведения их анализа и представления научно-обоснованных выводов.

Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Впервые в результате изучения эффектов вязкости реакционной среды, имитируемой добавлением различных концентраций глицерина и сахарозы, на активность биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза – Р + Л) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза – ЛДГ + Р + Л) систем. Получены зависимости изменений кинетических (константа спада, общее количество высвеченных квантов света) и термодинамических (энергия активации, константа термоинактивации) характеристик сопряженных ферментативных комплексов в зависимости как от длины цепи сопряжения, так и от вязкости микроокружения. Показано, что увеличение вязкости реакционной среды влияет на подвижность пространственных структур ферментов, что объясняет уменьшение каталитической активности ЛДГ + Р + Л системы. Предложенный критерий оценки эффективности взаимодействия сопряженных ферментов по изменению термостабильности показал, что в триферментной системе ЛДГ + Р + Л теряется сопряжение по НАДН при увеличении вязкости микроокружения, в то время как эффективность сопряжения ферментов в Р + Л 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.

Достоверность и обоснованность полученных результатов базируется на комплексном анализе современного состояния вопроса по теме диссертации с привлечением имеющихся достижений в области биофизики, комплексном использовании современных физико-химических методов, широким арсеналом научного оборудования кафедры биофизики для успешного осуществления экспериментальной работы, критического анализа полученных данных и воспроизводимости результатов.

Выводы, сделанные автором, представляются достоверными, имеющими существенную новизну и могут быть использованы при разработке высокочувствительных реагентов для проведения билюминесцентного биотестирования сред и компонентов сложного состава.

По материалам кандидатской диссертации опубликовано 8 работ в научных журналах, рекомендованных ВАК и включенных в базы цитирования Web of Science и Scopus.

Основные результаты диссертации были представлены на 17 всероссийских и международных конференциях.

Практическая ценность результатов

В работе проведена оценка использования биферментной биолюминесцентной системы в качестве тест-системы определения потенциальной токсичности наноматериалов. Показано, что чувствительность биферментной системы к исследованным наноматериалам уменьшается в следующей последовательности: многостенные углеродные нанотрубки > одностенные углеродные нанотрубки > водный раствор гидратированного фуллерена. При этом чувствительность ферментативного биолюминесцентного биотеста оценки токсичности наноматериалов превосходит существующие методы, разработанные на основе бактериальных клеток. В дополнение, в работе предложена концепция комплексной оценки загрязнения почвы, в которой заключение о наличии токсических веществ в анализируемой пробе делают на основе ингибирования ими ферментативных реакций, отвечающих за проявление разных функций живого организма. Установлены закономерности воздействия разных классов токсикантов на активность отдельных ферментов и их олигоферментных цепей сопряжения, выбранных в качестве потенциальных тест-объектов - маркеров загрязнения. Для комплексной ферментативной тест-системы, пригодной для оценки экологического статуса почвенного покрова, отобраны три ферментные системы, обладающие максимальной чувствительностью к разным классам токсикантов. Показана возможность использования ферментативных тестов вместо живых организмов при биотестировании сложных природных сред.

Недостатки в диссертации и автореферате

При рассмотрении диссертации возникли следующие вопросы:

1. В диссертации не представлены сведения о том, почему в качестве эталонных образцов почв были выбраны «природные условно-чистые почвы», а не образцы почв с использованием искусственной почвы стандартного состава?
2. Поскольку автор исследовал почвенные образцы, то в работе желательно было бы представить данные о свойствах данных образцов, которые оказывают ингибирующее действие на загрязняющие вещества и влияют на активность ферментных систем: органического вещества, рН, физической глины. Чем руководствовался диссертант при выборе токсических веществ нанотрубок, фуллеренов, пестицидов и других загрязнителей и чем обусловлен выбор концентраций (доз) загрязняющих веществ (разделы 5.1 и 5.2)?
3. Поскольку при биолюминесцентном биотестировании регистрация сигнала происходит оптическим способом, абсорбционные характеристики исследуемых образцов могут существенно повлиять на результаты. К сожалению, в главе 2 не указано: были ли изучены абсорбционные характеристики (рассеяние, поглощение) исследованных почвенных образцов во избежание искажения биолюминесцентного сигнала?

4. К каким эффектам приведет оценка потенциальной токсичности почвенных образцов и наноматериалов, при использовании разработанных ферментативных систем, в условиях вязкого микроокружения?

5. Какой срок инкубации загрязняющих веществ в почве при проведении эксперимента (раздел 5.1 и 5.2)? И насколько, по мнению автора, надо учитывать временной фактор в предлагаемом специализированном программном обеспечении ферментативного биосенсора для анализа загрязнения почв и почвенных грунтов?

Пожелания: при описании объектов исследования желательно было привести названия всех исследуемых почв, имеющих песчаный, легко, средне или тяжелосуглинистый гранулометрический состав, и в то время указать гранулометрический состав чернозема. На рисунках 1.9 и 1.10 (стр. 57 и 58) подписи приведены на английском языке, их нужно было адаптировать на русский язык.

Указанные замечания не снижают общего положительного впечатления о выполненной диссертационной работе. Диссертация и автореферат написаны грамотно, оформлены в соответствии с требованиями ГОСТ 7.0.11.-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления». Автореферат и диссертация в достаточной степени отражает общее содержание диссертационной работы.

Содержание диссертации Сутормина Олега Сергеевича «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение» соответствует паспорту специальности 03.01.02. – биофизика, пункт 1 – молекулярная биофизика.

Значимость результатов для науки и производства

Результаты работы могут быть рекомендованы для использования в области аналитической билюминесценции и мониторинге окружающей среды. Полученные в работе данные, несомненно, будут интересны для исследовательских групп и лабораторий в Федеральных бюджетных учреждениях государственных центрах стандартизации, метрологии и испытаний, территориальных органах Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), лаборатории водной токсикологии научно-исследовательского института биологии Иркутского государственного университета, Институте биофизики КНЦ СО РАН. Полученные результаты представляю интерес при разработке учебных курсов по фотобиофизике, физики и химии билюминесценции и практических курсов по биофизике.

Заключение

На основании рассмотрения материала диссертации и автореферата, ведущая организация считает, что диссертационная работа Сутормина О.С. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную автором самостоятельно на высоком экспериментальном уровне. В ней содержатся научно-обоснованные решения проблемы в разработке подходов исследования внутриклеточного поведения полиферментных систем в условиях

приближенных к внутриклеточным, а также основы биофизического конструирования комплексного ферментативного биотеста, обладающего избирательной специфичностью к определенным классам токсикантов и разным типам почв, что обеспечивает всесторонний ответ при оценке загрязнения сред сложного состава.

По актуальности, новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований, диссертационная работа О.С. Сутормина соответствует требованиям, установленным пунктам 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168), а ее автор Сутормин Олег Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02. – биофизика.

Отзыв подготовлен Минкиной Татьяной Михайловной, д.б.н., профессором, заведующей кафедрой почвоведения и оценки земельных ресурсов Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета (Почтовый адрес: просп. Стачки, д.194/1, к. 107, г. Ростов-на-Дону, 344090, Тел.: +7 (863) 243-33-55, e-mail: tminkina@mail.ru).

Отзыв был заслушан и утвержден на заседании кафедры почвоведения и оценки земельных ресурсов Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета от «20» августа 2021 г., протокол № 8.

Заведующий кафедрой почвоведения
и оценки земельных ресурсов
Академии биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского
Южного федерального университета,
доктор биологических наук,
профессор

/ Минкина Татьяна Михайловна /

