

13.09.2024 № 01-01-24/511

На № _____ от _____ г

УТВЕРЖДАЮ:

Директор

ФГБНУ «Федеральный научный центр
биологических систем и агротехнологий
Российской академии наук,

С.В. Лебедев

2024 г.



Отзыв ведущей организации

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий
Российской академии наук» на диссертационную работу Сушко Екатерины
Сергеевны «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов.
Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.2 – биофизика

Диссертационная работа Сушко Е.С. выполнена в Институте биофизики
СО РАН. Она является продолжением многолетних исследований
использования свечения живых организмов для изучения биологической
активности веществ.

Работа носит, несомненно, междисциплинарный характер. В ней
изучаются воздействия фуллеренолов на биологические объекты (морские
люминесцентные бактерии и выделенные из них ферменты). Вместе с тем,
стратегия методов и подходов, основанная на анализе эффективности
элементарных физико-химических процессов, определяет принадлежность
данной работы к физическим исследованиям.

Обращает на себя внимание расширение методов исследования
биолюминесцентных систем от классического изучения кинетики
биолюминесценции до современных высокотехнологичных спектральных
методов, а также совместное применение биолюминесцентных и
хемилюминесцентных методов, что позволило отследить изменение
содержания активных форм кислорода (АФК) в исследуемых смесях.

Актуальность для науки и практики

В настоящее время темпы разработки, производства и применения фуллеренов и их водорастворимых производных значительно опережают степень изученности их свойств, представляющих важность для медицины и фармакологии. Диссертационное исследование Екатерины Сергеевны Сушко посвящено изучению биологической активности (токсичности и антиоксидантной активности) водорастворимых полигидроксилированных фуллеренов (фуллеренолов). Фуллеренолы обладают высокой биосовместимостью и биологической активностью, находят потенциальное применение в создании фармакологических и медицинских препаратов, таких как антиоксиданты, радиопротекторы, противоопухолевые, противовирусные, противогрибковые и бактерицидные агенты, а также препараты для адресной доставки лекарственных средств.

Исследования биологической активности фуллеренолов проводятся на различных моделях в условиях, затрудняющих их сравнительный анализ. В связи с этим возрастает роль тестовых систем, которые бы позволяли определять механизмы воздействия фуллеренолов на биологические системы и оценить их свойства в сопоставимых условиях. Перспективным подходом в данном направлении является использование биолюминесцентных тест-систем, основанных на морских бактериях и выделенных из них ферментов. Стоит отметить, что изучение на ферментативных системах особо актуально, так как ферментативные реакции универсальны для живых организмов всех уровней. Ферментативная система является чувствительным «аналитическим датчиком», который способен отражать ключевые функции метаболических путей живого организма и влияние на них фуллеренолов. Также, проведение экспериментов на биолюминесцентных системах в сопоставимых условиях позволяет установить связь между структурными характеристиками фуллеренолов (размер молекул, особенности модификации поверхности, природа металла-заместителя и тип его включения) и биологической активностью.

Преимуществом биолюминесцентных тест-систем является простота и высокая скорость тестирования, что позволяет проводить одновременный анализ большого количества образцов в сопоставимых условиях, обеспечивая тем самым надежную статистическую обработку данных.

Цель исследования заключалась в оценке и сравнении токсических и антиоксидантных эффектов фуллеренолов, различающихся строением (количеством кислородосодержащих заместителей, размером углеродного каркаса, включением атома металла) с использованием биолюминесцентных морских бактерий *Photobacterium phosphoreum*.

В работе проведено исследование биоэффектов фуллеренолов на морские бактерии *Photobacterium phosphoreum*. Исследованы возможные механизмы воздействия фуллеренолов (влияние на биолюминесцентную ферментативную систему, скорости реакций, а также выявление роли АФК в исследуемых процессах).

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертация оформлена в виде 131 страницы машинописного текста и состоит из введения, аналитического обзора литературы, положенного в основу диссертации, описания использованных подходов и методов исследования, главы с изложением и обсуждением полученных результатов исследования, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы (219 источников) и двух приложений. Диссертация проиллюстрирована 28 рисунками, 8 таблицами.

В разделе «Введение» обоснована актуальность исследования фуллеренолов с применением люминесцентных методов, показана научная новизна, степень проработки темы, а также теоретическая и практическая значимость выполненной работы. В обзоре литературы проанализированы наиболее распространенные биотесты, структура и функционирование бактериальных биолюминесцентных систем, а также предложены механизмы воздействия модельных окислителей на биолюминесценцию. Отдельное внимание уделено преимуществам использования биолюминесцентных тестов на основе люминесцентных бактерий и их ферментов для мониторинга состояния водной среды и оценки биологической активности различных веществ, а также хемилюминесцентного метода для определения активных форм кислорода (АФК) в водных растворах.

Далее, рассмотрены преимущества применения фуллеренолов как антиоксидантных агентов, обсуждены их химические и биологические свойства, которые могут варьироваться в зависимости от их структуры. Отмечено, что механизмы биологической активности фуллеренолов (токсичности и антиоксидантной активности) требуют дальнейшего изучения и применения новых исследовательских подходов. Также были рассмотрены основные свойства модельных окислителей и антиоксидантов, включая их функции в биологических системах. Заключительным этапом обзора является формулировка основной задачи исследования — установление эффективности и механизмов воздействия ряда фуллеренолов на клетки морских люминесцентных бактерий на основе связей между их структурными характеристиками и биологической активностью.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает методологические подходы, использованные в работе. Приведены характеристики используемых приборов и химических реагентов, а также описаны методы оценки биологической активности фуллеренолов с использованием биолюминесцентных бактерий и выделенных из них ферментов. Дополнительно описаны методики выявления механизмов действия фуллеренолов, включая оценку их влияния на активность НАДН-зависимых ферментов и содержание активных форм кислорода.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены результаты анализа биоэффектов ряда фуллеренолов в сопоставимых условиях с применением биолюминесцентных тестовых систем различной сложности. Установлено, что токсичность фуллеренолов наблюдается при высоких концентрациях, в то

время как их антиоксидантная активность проявляется при низких концентрациях. Эти свойства связаны с рядом структурных характеристик фуллеренолов, таких как соотношение полярных и неполярных фрагментов, содержание металлов в структуре и взаимодействие с гидрофобными фрагментами клеточных мембран. Обращает на себя внимание «гипотеза $\frac{1}{2}$ », которая формирует основу для прогнозирования токсичности и антиоксидантной активности фуллеренолов с различными структурными характеристиками.

Раздел «Заключение» содержит обоснование взаимосвязей между биоэффектами фуллеренолов и их структурными особенностями, рассматриваются механизмы токсичности, активации и антиоксидантной активности этих соединений. Также обсуждаются перспективы практического применения результатов работы и возможность применения разработанного метода для выявления биологической активности наночастиц.

В завершении диссертационной работы представлен раздел «Выводы», в котором перечислены конкретные достигнутые результаты.

Таким образом, диссертация всесторонне охватывает процесс разработки комплексного метода биотестирования фуллеренолов, содержит подробный аналитический обзор, включает подробное описание методов и методик, достаточное количество экспериментальных данных и научно-обоснованные выводы, то есть является завершенной научно-квалификационной работой.

Новизна основных научных результатов и их значимости

Впервые бактериальные биолюминесцентные системы различной сложности применены для изучения биологической активности фуллеренолов.

Исследование направлено на выявление механизмов воздействия ряда фуллеренолов на клеточную систему (морские люминесцентные бактерии) на основе связей между структурными характеристиками фуллеренолов и параметрами их биологической активности – токсичностью и антиоксидантной активностью. Изучено влияние фуллеренолов как на интегральную физиологическую функцию бактерий – интенсивность биолюминесценции, так и на скорость ферментативных процессов и содержание активных форм кислорода в бактериальной суспензии. Для изучения биологической активности фуллеренолов впервые были применены биолюминесцентные тестовые системы различной сложности (морские бактерии *P. phosphoreum* и ферментативная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза). Использование этих двух типов систем позволяет выявить и сравнить клеточные и биохимические процессы, ответственные за антиоксидантные и токсические эффекты фуллеренолов разного строения.

Практическая ценность результатов

Практическая значимость работы заключается в выявлении связи между структурными характеристиками веществ и их биологической активностью; эта связь важна в качестве прогностической основы при синтезе наночастиц с

заданными характеристиками биологической активности. Предполагается, что она будет востребована в области нанобиотехнологий.

Разработанные биолюминесцентные методы и подходы к анализу биологической активности фуллеренолов могут также использоваться в экологии, фармакологии и медицине для определения и сравнения антиоксидантной активности и токсических свойств биологически активных веществ. Разработанная методология включает комплекс методов: биолюминесцентные – с использованием бактерий и их ферментативных систем, хемилюминесцентный – для мониторинга содержания активных форм кислорода, спектрофотометрический – для контроля условий эксперимента и выявления участия НАДН-зависимых редокс процессов. Кроме того, результаты исследований могут быть использованы в образовательном процессе студентов-медиков, фармакологов, биологов.

Достоверность и обоснованность полученных результатов базируется на анализе современного состояния вопроса по теме диссертации, комплексном использовании современных физико-химических методов, критического анализа полученных данных и воспроизводимости результатов. Выводы, сделанные автором, представляются достоверными, имеющими существенную новизну.

По материалам кандидатской диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых зарубежных журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов, многие из которых имеют высокий рейтинг. Работа поддержана значительным количеством российских грантов, основные результаты ее неоднократно были представлены на профильных конференциях, как российских, так и зарубежных.

Замечания и пожелания

При анализе диссертационной работы и автореферата возникли следующие вопросы:

1. Из текста работы не понятно, почему уменьшение содержания АФК может приводить к двум, казалось бы, противоположным эффектам – увеличению токсичности и антиоксидантной активности.

2. Почему именно феррицианид калия и 1,4-бензохинон выбраны в качестве модельных окислителей?

3. Каким образом можно сопоставить результаты воздействия фуллеренолов на клетки бактерий с их воздействиями на высшие организмы?

В целом указанные замечания не снижают общее положительное впечатление о выполненной диссертационной работе и не влияют на ее основные теоретические и практические результаты. Диссертация и автореферат написаны грамотно. Автореферат и диссертация в достаточной степени отражает общее содержание диссертационной работы.

Заключение

На основании рассмотрения кандидатской диссертации и автореферата ведущая организация считает, что диссертационная работа Сушко Е. С. выполнена на актуальную тему, представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу, выполненную автором самостоятельно на высоком научном и экспериментальном уровне. В работе успешно решены задачи, имеющие важное значение для развития молекулярной биофизики и биологии. Полученные результаты достоверны, выводы обоснованы, соответствуют сути работы и позволяют говорить об оригинальности и новизне обобщений. По актуальности, новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований, диссертационная работа Сушко Екатерины Сергеевны удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 ред. от 26.01.2023), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика (биологические науки).

Отзыв на диссертацию и автореферат был заслушан, обсужден и одобрен на расширенном заседании лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» «03» сентября 2024 г., протокол №1.

Отзыв подготовил:

Дерябин Дмитрий Геннадьевич

Доктор медицинских наук, профессор

Научный руководитель лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»

Почтовый адрес: 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января д. 29

Тел.: +7 (3532) 30-81-70

E-mail: dgderyabin@yandex.ru

«04» сентября 2024 г.



/ Дмитрий Геннадьевич Дерябин /

Подпись Дерябина Дмитрия Геннадьевича автора отзыва заверяю

Учёный секретарь ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН

Кизаев М.А.

