

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Сычева Александра Владимировича на тему «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных», представленную к защите на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Диссертационная работа А. В. Сычева посвящена разработке экспериментальных методов количественного анализа процессов жизнедеятельности микроорганизмов и роста их культур в жидкой среде с использованием колориметрических индикаторов и, в частности, установлению зависимостей «доза-отклик» при воздействии антибактериальных лекарственных средств.

Актуальность данной работы связана с активным современным интересом к разработке методов экспресс-анализов в микробиологии, которые могут быть реализованы на основе широкодоступных реагентов, а также наличием ряда открытых вопросов фундаментального характера, связанных с использованием подобных методов, оперирующих с совокупностью связанных биофизических и химических процессов. Основной вопрос, который требует особого внимания в данном контексте, — фактически наблюдаемые кривые отклика соответствуют химической динамике индикаторной среды, которая базируется на протекающих в клетках физиологических процессах, но не динамике последних напрямую. Возникающая в результате проблема решения обратной задачи восстановления биофизической динамики по косвенным показателям в настоящее время исследована далеко не полностью, при том, что соответствующая информация критически необходима для биомедицинских приложений.

Результаты, относящиеся к указанной выше проблеме, рассмотренной путём проведения последовательной серии экспериментов с использованием как классических тестовых микрокультур (лактобактерии), так и микобактерий туберкулёза, снабжённые детальным анализом и интерпретацией, составляют теоретическую значимость работы. Одновременно с этим, установленное соответствие отклика жизнедеятельности микобактерий на воздействие биологически активных соединений, в частности, разработанная процедура количественного определения ингибирующих концентраций по колориметрическим данным составляет практическую значимость диссертации; данный метод не только использован в диссертационном исследовании для изучения биологической активности новых соединений, но и может быть рекомендован для

внедрения в практику работы микробиологических лабораторий биофизического и медицинского профилей.

Полученные результаты обладают также несомненной научной новизной в части: (1) установления взаимно-однозначного количественного соответствия между концентрацией резорурфина в индикаторном растворе и цветовой координатой a^* цветового пространства CIE $L^*a^*b^*$, которое позволяет проводить количественную оценку жизнеспособности культур микроорганизмов на основе колориметрических тестов с использованием перехода резазурин-резорурфин; (2) установления соответствия между данным колориметрическим тестом и фотометрической индикацией при помощи портативного микробиологического анализатора с предложенной автором цветофильтрацией источника освещения, верифицированного на примере исследования динамики роста культур лакто- и микобактерий; (3) получения новых данных об активности в отношении возбудителя туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью четырёх новых перспективных препаратов нитрофуранового ряда; (4) выявления и обоснования с использованием двух альтернативных экспериментальных методов явления спонтанной синхронизации процессов клеточного деления в высококонцентрированных культурах *Mycobacterium tuberculosis* в жидкой среде; (5) экспериментальной верификации валидности новой модели кривых регистрируемой динамики индикаторной среды с растущей микробной культурой, формирующихся вследствие связанных процессов популяционной динамики и биохимической кинетики.

Результаты, представленные в тексте диссертации, отражающие личный вклад автора, входят в состав публикаций, включающих три статьи в научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, статью в материалах конференции, проиндексированную Scopus, четыре патента РФ и свидетельство о регистрации программ для ЭВМ, что более чем удовлетворяет нормам, установленным ВАК РФ. Результаты диссертационной работы прошли апробацию на ряде российских (особо следует выделить VII Съезд биофизиков России) и международных (особо следует выделить XXI конгресс Международного союза чистой и прикладной биофизики) конференций. Следует отметить также определённый интерес международной научной общественности к данным результатам, выражающийся в цитировании соответствующих публикаций.

Диссертация А. В. Сычева изложена логично и последовательно, её структура включает введение, четыре главы, заключение и список литературы.

Во введении изложены актуальность работы, на которой базируются её цель и задачи, теоретическая и практическая значимости полученных результатов, положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях и апробации работы, личном вкладе в них автора.

Первая глава является обзорной; в ней представлена основная информация о фотометрических и флуориметрических методах анализа роста микробных популяций, используемых в современной биофизике, и дан её критический анализ, на основе которого сделаны выводы, обосновывающие глобальную цель и конкретные задачи, подлежащие разработке, что составляет материал последующих трёх глав диссертационной работы в которых представлены оригинальные подходы и результаты.

Вторая глава посвящена физическим и химическим предпосылкам экспериментальных подходов, использованным далее для решения биофизических задач. Автор грамотно и корректно использует подходы спектрофотометрии для установления калибровочных зависимостей между концентрационными соотношением резазурина и резоруфина в индикаторной среде, используемой для определения жизнеспособности микроорганизмом в жидкой среде и цветовым откликом на основе эквивалентного восстановления базового реагента — резазурина химическим способом. Основной результат, представленный в данной главе, — оригинальное положение о необходимости перехода к цветовому пространству CIE $L^*a^*b^*$, как наиболее адекватному для проведения количественного анализа цветового отклика индикатора.

Третья глава излагает результаты применения предложенного колориметрического подхода к решению конкретной биофизической задачи — нахождению минимальной ингибирующей концентрации биологически активных соединений, действующих на культуру *M. tuberculosis* в жидкой среде в рамках протокола резазуринового микротитрового теста (REMA). Исследование построено последовательным образом, начиная с колориметрической обработки цветных фотографий микропланшетов, содержащих стандартный лабораторный штамм P37Rv с использованием в качестве независимого контроля известных литературных данных по флуориметрическому отклику. Их согласование, как по МИК, так и по кривой «доза-отклик», служит подтверждением точности и надёжности нового разработанного метода. Далее разработанный подход для определения эффективности действия четырёх новых кандидатов в антимикобактериальные препараты, позволяющих преодолеть антибиотикорезистентность, и действующих на клинические штаммы микобактерий. Заключает главу описание метода использования портативного микробиологического

анализатора и его тестирования с использованием *M. tuberculosis* штамма H37Rv под действием серийных разведений стандартного антимикобактериального лекарственного вещества — изониазида. Результаты анализа поведения роста микроорганизмов и итоговой кривой отклика, соответствующие референтным данным, убеждают в работоспособности и практичности предложенного нового экспериментального подхода.

Четвёртая глава расширяет круг рассматриваемых вопросов на динамические задачи биофизики популяционного роста, обращаясь к более фундаментальным проблемам. Первая из них состоит в экспериментальном анализе соответствия регистрируемых кривых изменения концентрационной динамики индикатора роста популяции и популяционного роста как такового. С использованием стандартного объекта для таких исследований — лактобактерий — проведена экспериментальная верификация накладываемых моделью связанных биофизических и химических процессов соотношений на комбинацию параметров популяционного роста (скорость роста популяции и ёмкость среды) и кинетических констант химической реакции, которые обуславливают возможность количественной характеристики процессов роста по регрессии динамической колориметрической кривой. Вторая задача посвящена выяснению предпосылок возникновения эффекта ступенчатого характера кривой популяционного роста культуры *M. tuberculosis* при её больших концентрациях в жидкой питательной среде, исчезающего при больших разведениях. Аргументы, базирующиеся на двух альтернативных методах экспериментального детектирования — ВАСТЕС MGIT и фотоколориметрическом, делают убедительным представленный вывод об эффекте кворума как предпосылке спонтанной синхронизации, ведущей к данному эффекту.

В заключении с достаточной полнотой сформулированы основные выводы по результатам диссертационного исследования.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, к тексту диссертации имеется ряд вопросов и замечаний, которые, однако, не снижают вывод о её научной ценности, но требуют уточнения изложения материала:

1. Почему в качестве модельной системы использовалась смесь резазурина с гидратом гидразина? Как известно, гидразин является сильно токсичной жидкостью. Почему в качестве модельной системы нельзя было выбрать смесь резазурина с коферментами

НАДН и НАДФН? Требуется пояснения фраза: «в отличие от твёрдых растворителей, гидразин гидрат не требует катализатора, что существенно упрощает работу с ним».

2. На схеме 2.1 не указан продукт реакции (вода). Безусловно, необходимо представить участие гидразина в окислительно-восстановительном процессе.

3. В главе 3.2.2 (стр. 53) диссертационной работы указаны химические соединения, с которыми проводились эксперименты, однако в диссертационной работе отсутствует их описание, включая сведения о чистоте. Более того, следовало бы более подробно остановиться на их уникальности, которая позволяет говорить о данных молекулах как о «перспективных кандидатах в лекарственные средства». Проводилось ли сравнение МИК указанных веществ с известными препаратами? Данные сведения и их анализ сделали бы соответствующие утверждения более обоснованными.

4. В подписях к Рис. 3.6–3.9 некорректно употребляется термин «лекарственное соединение». В данном случае обсуждаются новые молекулы, которые показали активность в определённом эксперименте, но при этом отсутствует информация о доклинических и клинических испытаниях.

5. В диссертационной работе идёт речь о разработке «недорогой портативной альтернативы коммерческим спектрофотометрам» (стр. 60), однако не проводится сопоставление разработанного подхода с имеющимися аналогами. В чём заключаются преимущества? Что оказывает влияние на снижение цены? Насколько получится удешевить лабораторные исследования? Планируется ли внедрение разработанного подхода для проведения рутинных анализов в бактериологических лабораториях?

6. На стр. 63 при описании Рис. 3.11 указано, что в случае с контрольным раствором красителя наблюдается линейность роста сигнала, которая может быть связана с «переносом метаболитов или бактерий при испарении растворителя». Данная фраза требует пояснения. Более того, легенда Рис. 3.11 не совсем понятна: возникают вопросы по концентрациям, единицам измерения и обозначениям.

7. Диссертационная работа содержит ряд опечаток и некорректных терминов, например, «культурная среда» (стр. 13), «чистый водный раствор резазурина» (стр. 77) и др.

8. Экспериментальное исследование:

— на стр. 26 указано, что погрешность взвешивания составляет $\pm 0,0002$ г, однако масса навески указана с другой точностью;

— на стр. 26 указано, что содержание красителя в натриевой соли резазурина составляет 75 %. Что приходится на оставшиеся 25 % (аналогичный вопрос по поводу гидразина)?

Что представляет из себя указанная концентрация?

— почему во всех экспериментах использовалась кипячёная дистиллированная вода? В чём смысл? Изучались ли физико-химические характеристики растворителя? Почему нельзя было использовать стерильную воду?

— не указано, каким образом осуществлялось термостатирование изучаемых систем;

— не указано, каким образом проводилась калибровка приборов (иономер, спектрофотометр);

— Таблица 2.1: значения pH указаны с разной точностью.

В целом, представленная диссертация содержит всю необходимую совокупность оригинальных научных результатов, обобщений и выводов, удовлетворяет всем требованиям пп. 9–11, 13–14 действующего «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённом постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в текущей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Сычев Александр Владимирович, заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент

доктор химических наук (02.00.01. Неорганическая химия,

02.00.04. Физическая химия), доцент,

заведующий кафедрой общей и

биоорганической химии, заведующий

лабораторией биомедицинского материаловедения

ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова



Семёнов Константин Николаевич

Федеральное государственного бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России).

Почтовый адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

Телефон: +7 (812) 4284109; электронная почта: ksemenov@gmail.com

Согласен на обработку персональных данных



Я, нижеподписавшийся, подтверждаю: Семёнов К.Н.
подпись
" 27. 02. 2025 " 20