



УТВЕРЖДАЮ:

директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Федеральный исследовательский центр  
«Институт общей физики им. А.М. Прохорова  
Российской академии наук» (ИОФ РАН)  
член-корреспондент РАН,  
доктор физико-математических наук  
Гарнов Сергей Владимирович  
«18» февраля 2025 г.

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**на диссертационную работу Сычева Александра Владимировича на тему «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика**

Актуальность диссертационной работы А.В. Сычева обуславливается как фундаментальными вопросами обоснования методов биофизического эксперимента в сфере исследования жизнедеятельности микроорганизмов, так и практическими задачами биофизики клетки. Несмотря на достаточную распространенность колориметрических тестов в микробиологии как полуколичественного метода, вопрос возможности их количественной интерпретации стал привлекать внимание только в последние годы. Это во многом связано с практическими запросами на создание быстрых, простых, бесконтактных и недорогих, в идеальном случае на базе смартфона, тестовых систем, детектирования микроорганизмов, которые могут быть широко внедрены в систему здравоохранения. Для появления таких тестовых систем необходимо получение информации об изменении оптических показателей сред культивирования в процессе жизнедеятельности детектируемых микроорганизмов. Целью данной работы является разработка методов количественной индикации и характеристики роста микробных популяций на основе колориметрических измерений в ходе резазуринового теста. В свете выше написанного, поставленная в

диссертации цель и сформулированные в ее рамках задачи соответствуют современным направлениям биофизики и являются актуальными.

Научная новизна полученных результатов состоит в следующем:

- ✓ Впервые установлено, что накопление резорфина за счет дыхательной активности медленно растущей культуры *M. tuberculosis* в условиях протокола резазуринового теста в микропланшетах соответствует линейному росту интенсивности канала  $a^*$  цветового пространства CIE  $L^*a^*b^*$ , что позволяет проводить количественную оценку жизнеспособности микобактериальной культуры на основе колориметрических измерений;
- ✓ Разработан новый количественный метод характеристики роста микроорганизмов при помощи портативного микробиологического анализатора, основанный на согласовании интенсивности светопропускания с колориметрическими характеристиками резазуриновой индикаторной среды и цветовой фильтрации осветителя;
- ✓ С использованием разработанного количественного колориметрического метода получены новые данные об активности в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью четырех новых перспективных препаратов нитрофуранового ряда и определены соответствующие минимальные ингибирующие концентрации;
- ✓ Выявлено и обосновано явление спонтанной синхронизации роста и деления клеток *M. tuberculosis*, растущих в жидких культурных средах ВАСТЕС и Middlebrook 7H9;
- ✓ Впервые экспериментально подтверждена валидность новой модели построения кривых регистрируемой динамики, соответствующей популяционному росту микробных культур в индикаторных средах, учитывающей связанные процессы популяционной динамики и биохимической кинетики.

Новые результаты по экспериментальному подтверждению моделей связанных химических и биологических процессов, определяющих возможность количественной идентификации параметров кривых роста популяций микроорганизмов и кривой «доза-отклик» при воздействии на них антибактериальных препаратов, а также экспериментальное обоснование существования эффекта кворума в микобактериальных культурах составляет теоретическую значимость работы. Практическая значимость работы состоит как в разработке методик количественных колориметрического и фотометрического исследования популяционной динамики культур микроорганизмов, которые могут быть внедрены в практику биомедицинских исследований, так и в результате практической успешной (подтвержденной патентами РФ) разработки четырех новых

веществ-кандидатов с антимикобактериальной активностью в части исследования, связанного с нахождением их минимальной ингибирующей концентрации при воздействии на живые клинические штаммы микобактерий.

По структуре и содержанию диссертационная работа А.В. Сычева состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы, отражающего знакомство автора с современным состоянием исследований.

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи работы, теоретическая и практическая значимости полученных результатов и положения, выносимые на защиту, а также приведены сведения об апробации работы, публикациях и личном вкладе автора.

В первой главе приведен обзор современного состояния исследований в области экспериментального изучения популяционной динамики микроорганизмов, в котором обсуждены основные методы и их приборные реализации, используемые в современных биофизических и медицинских исследованиях. Материал данного обсуждения убедительно мотивирует ограничения существующих подходов в данной области и необходимость новых исследований, которым посвящена основная часть диссертационной работы.

Вторая глава посвящена физическим основам предлагаемого количественного колориметрического метода. С использованием химического реагента (гидразин гидрата), взаимодействие с которым приводит к эволюции цвета резазуриновго индикатора, аналогичной происходящей при наличии в растворе жизнеспособных микробных культур. Такой подход позволил убедительно провести количественно охарактеризовать спектральный отклик протекающих химических процессов и его взаимосвязь с целевыми колориметрическими показателями, которые могут быть использованы далее в биофизических экспериментах. При этом удачный подбор реагентов позволил проанализировать индикаторных процесс в чистом виде, избежав возможных неопределенностей, связанных в более сложном составе активной биологической среды.

Обоснованный таким образом подход использован в третьей главе для проведения непосредственно биофизических экспериментов, в качестве основного объекта которых использованы культуры микобактерий, что является весьма актуальными как с фундаментальной, так и практической точек зрения. В главе приведены результаты использования двух разработанных автором методов – фотографического колориметрического и фотометрического с использованием портативного колориметрического анализатора, модифицированного для согласования со спектральными характеристиками колориметрического подхода. Исследования проводились как с использованием стандартного лабораторного

штамма *M. tuberculosis* H37Rv, так и клинических лекарственно-резистентных штаммов. Использование первого из этих вариантов подтвердило адекватность предлагаемых цвето-оптических методов поставленной задаче, согласование получаемых количественных показателей отклика культуры микобактерий на воздействие антибактериальных препаратов, согласованное со референтными данными флуорометрии. Верифицированный таким образом метод применен к исследованию антибактериальных свойств ряда новосинтезированных веществ нитрофуранового ряда, рассматриваемых как кандидаты в перспективные антимикобактериальные препараты. Помимо существенной практической значимости, подтвержденной получением четырех патентов авторским коллективом, в которых входит А.В. Сычев, установление возможности получения зависимостей «доза-отклик» на основе колориметрических данных является важным результатом с точки зрения методологии биофизических экспериментов в целом.

В четвертой главе круг исследований расширен на случай экспериментального исследования динамических процессов роста культур микроорганизмов. Наиболее важными с точки зрения фундаментальной биофизики являются два результата. Первый из них – исследование вопроса о соотношении истинных кривых популяционного роста и регистрируемых кривых индикаторного отклика, в результате чего на основе наглядного эксперимента с использованием классического модельного объекта - лактобактерий, результаты которого убедительно проанализированы, обоснована применимость нового уточненного выражения для определения кинетических параметров роста микроорганизмов. Второй существенный результат – экспериментальная демонстрация, свидетельствующая в пользу наличия проявлений эффекта кворума при росте культуры микобактерий при их высокой концентрации в растворе. Данный вывод о существовании ранее не описанного эффекта подтвержден сравнительным анализом данных нескольких альтернативных экспериментальных методов и представляется убедительным.

В целом, результаты, представленные в диссертации, обладают высокой степенью достоверности, в силу грамотно поставленных и проведенных экспериментов с корректной обработкой полученных данных, проведенной верификацией тестовых экспериментов, результаты которых согласуются с надежными известными литературными данными, сравнительным анализом выводов, сделанных на основе методик, базирующихся на альтернативных физических принципах.

Количество публикаций по результатам, представленных в диссертационной работе, соответствует требованиям ВАК, апробация работы прошла на достаточном количестве представительных научных конференций в области биофизики.

Автореферат в достаточной мере отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, к изложению материалов в тексте диссертации имеется раз замечаний и вопросов:

- ✓ Известно, что цветовой баланс изображения зависит от спектра падающего света и учитывая распространение светодиодного бытового освещения, как, на Ваш взгляд, повлияет подобное освещение на результат получаемых колориметрических измерений? Как повлияет наличие присутствие в спектре солнечного света?
- ✓ В работе говорится об использовании цветового пространства CIEL\*a\*b\*. Чем обусловлен такой выбор? Почему не используются популярное пространство HSL и другие аналогичные пространства?
- ✓ Известно, что получаемая от объекта информация зависит не только от самого объекта, но и от параметров детектора и условий его применения. Есть ли разница в использовании различных вариантов получения исходных изображений (модели телефонов, матрицы, углы и т.д.?)
- ✓ Во время перемешивания микробиологических культур предотвращается агрегация и прикрепление клеток к поверхностям. Возможно ли изменение динамики роста бактерий при перемешивании образца во время экспериментов?
- ✓ Очевидно, что при использовании чистых культур или штаммов бактерий, полученных из коллекции, авторы получают идеальный вариант для анализа. При получении биообразцов почти всегда наблюдается загрязнение клетками окружающих тканей и биологическими жидкостями. Как загрязнения могут повлиять на результаты измерений, полученных с помощью предложенных методов?
- ✓ В телефонах доступны объективы с разным фокусным расстоянием (до 3 вариантов: короткофокусные, длиннофокусные, стандартные), проверялась ли зависимость качества колориметрического анализа в зависимости от типа объектива и возможно ли дать рекомендации по выбору типа объектива при использовании предложенного типа анализа?

Данные замечания относятся главным образом к представлению методов результатов в тексте диссертации и не ставят под сомнения их научный уровень как таковых.

Таким образом, на основе вышеизложенного можно заключить, что представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение совокупности научных задач, имеющий как важное теоретическое значение в области биофизики сложных систем, в частности – медицинской биофизики, так и обоснованное и продемонстрированное практическое приложение в области биофизических аспектов микробиологии, полностью соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика и требованиям

пп. 9-11, 13, 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (в текущей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Сычев Александр Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 - Биофизика.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на заседании ученого совета Центра биофотоники ИОФ РАН (протокол № 2 от 12.02.2025 г.).

Руководитель  
Центра биофотоники ИОФ РАН  
доктор биологических наук  
(спец. 1.5.2 – биофизика)  
профессор (спец. 1.5.2 – биофизика)  
Профессор РАН



С.В. Гудков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

Почтовый адрес: 119991 ГСП-1, г. Москва, ул. Вавилова, д. 38

Телефон: +7 (499) 503-87-34

E-mail: [office@gpi.ru](mailto:office@gpi.ru)

Официальный сайт организации: <https://www.gpi.ru/>