

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Власенко Людмилы Викторовны "Оценка антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцирующих биосенсоров" по специальности 03.02.03 Микробиология на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

1. Актуальность избранной темы

Искусственно синтезированные углеродные наноматериалы несомненно определяют широкий круг приложений благодаря своим уникальным механическим, химическим и биологическим свойствам. Практически любой тип наноматериалов (графен, нановолокна, нанотрубки, фуллерены) демонстрирует антибактериальную активность широкого спектра действия по отношению к патогенам. Кроме того, химическая модификация данных соединений может быть эффективна при использовании их для транслокации терапевтических молекул в клетки или органы. Однако, чтобы обеспечить безопасную и эффективную интеграцию этих структур в качестве антибактериальных агентов в биоматериалы, необходимо понимать конкретные механизмы, которые управляют антибактериальной активностью наноматериалов,

Люминесцентные биотесты на основе конститутивного и индуцибельного механизма свечения довольно широко используются для оценки антибактериального действия широкого круга веществ, включая антибиотики, колицины, пробиотики и ряд других водорастворимых соединений. Взаимосвязь конститутивной биолюминесценции с энергетическими цепями в клетке позволяет оценить интегральную биоактивность соединения с учётом эффектов адаптации живого организма к стрессовому фактору. Биосенсоры с репортерными люминесцентными генами могут определить механизм действия изучаемого соединения на основе индукции анализируемого промотора генов.

Однако необходимость анализа нового типа соединений, наноматериалов, дает предпосылки к модификации уже известных подходов на основе люминесцентных бактерий, что требует дополнительных исследований. При этом учёт индивидуального и синергетического вклада физических, химических и электрических эффектов наноматериалов на бактериальные клетки является необходимым для комплексной оценки спектра применения наноматериалов. Поэтому тема диссертационной работы Л.В. Власенко является несомненно актуальной для научно-технического развития России и соответствует тенденциям развития мировой науки в данной отрасли знаний.

2. Достоверность и новизна исследований и полученных результатов

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертации не вызывает сомнений и определяется достаточным объемом проведенных экспериментов, а также использованием современных микробиологических методов исследования, атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии, определения поверхностного дзета-потенциала, седиментационного анализа. Эксперименты хорошо спланированы и выполнены в соответствии с поставленными задачами диссертации. Результаты обработаны статистически.

Автором впервые предложен новый подход использования люминесцентных биосенсоров для анализа подавления энергетического метаболизма и индукции стрессовых состояний бактерий при действии 20 соединений углеродных наноматериалов с различной морфологической организацией и характером функционализации.

Выявлена взаимосвязь между физико-химическими характеристиками углеродных наноматериалов (смачиваемость, поверхностный заряд) и их антибактериальным действием на основе анализа люминесценции биосенсоров, дзета-потенциала поверхности микроорганизмов, микроскопических исследований.

3. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Власенко Л.В. высокая. Это подтверждается подробным анализом отечественной и зарубежной литературы, который был использован для формулировки задач, постановки экспериментов с привлечением современных методов исследования.

Научные положения соответствуют основной цели и задачам исследования, изучению антибактериальной активности углеродных наноматериалов с использованием бактериальных люминесцентных сенсоров.

Основные положения, выводы и рекомендации прошли апробацию в научной периодической печати в 2012-2016 гг. и на конференциях 2011-2015 гг.

4. Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Совокупность проведенных исследований позволила более глубоко рассмотреть механизмы антибактериального действия углеродных наноматериалов: 20 образцов нанотрубок, нановолокон, графена и фуллеренов. Это может послужить теоретической

основой для ранжирования исследуемых углеродных наноматериалов с целью применения в разных областях биомедицины.

Отработана методика оценки токсичности углеродных наноматериалов с использованием 4 тест систем на основе природных, генно-инженерных грамотрицательных и грамположительных бактерий. Предложенный способ оценки позволил сопоставить полученные результаты с Российскими и зарубежными критериями.

5. Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3-х глав собственных исследований, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 243 источника, в том числе 43 отечественных и 200 зарубежных. Работа изложена на 132 страницах текста, проиллюстрирована 14 таблицами и 33 рисунками.

Введение раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследований, научную новизну, практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу.

В литературном обзоре (Глава 1) представлена характеристика и типы природных и искусственно синтезированных углеродных наноматериалов, анализ их биологической активности, информация о люминесцентных бактериальных сенсорах.

В главе 2 (Материалы и методы) подробно изложены данные о люминесцентных штаммах бактерий, использованных для оценки антибактериальной активности углеродных наноматериалов. Описаны характеристики и методы анализа физико-химических свойств (гидрофильно-гидрофобные, степень дисперсности суспензий, размер, дзета-потенциал) исследованных соединений, что даёт возможность при необходимости получить воспроизводимые результаты в подобных работах. Атомно-силовая микроскопия, Live/Dead принцип были использованы для визуализации взаимодействия наноматериалов с бактериями.

Результаты исследований и их обсуждение приведены в трех главах. В третьей главе представлены результаты динамики свечения 4 типов сенсора с конститутивным свечением, данные вычисления параметра EC50. Показано, что ряд наноматериалов, одностенные углеродные нанотрубки с аминными группами, многостенные углеродные нанотрубки, нановолокна, графен, фуллерен C60 и C70, были инертны в отношении сенсоров на основе грамотрицательных бактерий. Токсический эффект на основе биолюминесцентного анализа зафиксирован у одностенных углеродных нанотрубок с

карбоксильными группами, многостенных углеродных нанотрубок, нановолокон с кислотной модификацией, оксида графена, фуллеренола в отношении *Bacillus subtilis*. Четвертая глава посвящена изучению физико-химических свойств углеродных наноматериалов (смачиваемость, степень дисперсности) и их взаимосвязи с антибактериальным действием. По мнению соискателя, положительный знак дзета-потенциала и высокая дисперсность, являлись ключевыми факторами в развитии токсического эффекта ряда наноматериалов. В пятой главе приведены изображения с атомно-силового микроскопа по взаимодействию *E. coli* с различными типами наноматериалов, при этом фуллерены с высокой токсичностью по данным биолюминесцентного анализа не влияли на морфологию бактерий. Кроме этого инверсия или снижение дзета-потенциала клеток *E. coli* после воздействия углеродных нанотрубок рассматривается как основа их антибактериального действия. В главе приведены данные по влиянию изучаемых соединений на индукцию стрессовых промоторов *E. coli*.

Работу завершает раздел Заключение, который обобщает полученные данные проведенного исследования. Выводы диссертации основаны на результатах исследования автора и достаточно глубоко обсуждены в работе.

6. Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них пять – в изданиях, рекомендованных ВАК России, 5 статей – в журналах, цитируемых в базах *Scopus* и *Web of Science*.

7. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание и оформление автореферата соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ и в достаточной мере отражает основные положения диссертации.

8. Достоинства и недостатки диссертационной работы, оценка научной работы соискателя в целом, замечания по работе, вопросы

Соискателем представлена завершенная научная работа, результаты экспериментов математически обработаны, проанализированы и представлены в виде публикаций или докладов на конференциях.

К достоинствам представленной работы относится расширение сферы использования бактериальных биосенсоров в отношении новых наноматериалов и разработка подходов к оценке их антибактериальной активности.

По мере прочтения работы возник ряд вопросов:

1. Какой люминесцентный сенсор вы бы рекомендовали использовать при оценке токсичности новых химически синтезированных или модифицированных углеродных наноматериалов.
2. Как вы оцениваете насколько перспективным является использование биолюминесцентных сенсоров с индуцибельным типом свечения для оценки механизма действия наноматериалов. Какие могут быть ограничения или рекомендации по их использованию?
3. Какова возможная область применения исследованных в Вашей работе наноматериалов, исходя из данных об их биологической инертности или токсичности в отношении бактерий.
4. По данным таблицы 2 автореферата, *B. subtilis* был чувствителен к большинству исследованных углеродных наноматериалов по биолюминесцентному анализу. Как вы можете это объяснить? Будет ли применима и информативна оценка дзета-потенциала данного вида бактерий при взаимодействии с углеродными наноматериалами.

В качестве небольшого замечания хотелось бы отметить, что во всех таблицах с параметрами EC50 не очевиден смысл отсутствия значений в ячейках таблицы: или эксперименты не проводились, или это показатель биологической инертности материала. Во избежание недопонимания необходимы пояснения к таблицам.

В качестве рекомендации хотелось бы пожелать соискателю продолжить работы по расширению сферы использования биолюминесцентных сенсоров как с индуцибельным, так и с конститутивным типом свечения с учётом новых подходов и замечаний. Возможно в будущих работах кроме показателя токсической концентрации EC50 использовать ещё EC20 как параметр безвредной концентрации, что также может быть информативно при оценке антибактериальной активности или биологической инертности углеродных наноматериалов.

Необходимо подчеркнуть, что заданные вопросы носят уточняющий характер и не умаляют значение полученных автором результатов.

Заключение

Диссертационная работа Власенко Людмилы Викторовны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи исследования антибактериальной активности углеродных наноматериалов с применением биолюминесцентных систем, имеющей важное значение для развития микробиологической отрасли научного знания, что полностью соответствует

требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842. А ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.03 – Микробиология.

09.11.2020

Официальный оппонент,
старший научный сотрудник
лаборатории иммунорегуляции
«ИЭГМ УрО РАН»

к.б.н. по специальности
03.02.03 – микробиология

Масленникова Ирина Леонидовна



Контактные данные официального оппонента:

Почтовый адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения наук Российской академии наук.

Контактный телефон: 8 (342) 280-84-31

Адрес электронной почты: I.Maslennikova1974@gmail.com

Подпись Масленниковой И.Л. удостоверяю:

Директор «ИЭГМ УрО РАН», чл.-корр. РАН



В.А.Демаков