



САМАРСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
SAMARA UNIVERSITY

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Самарский национальный исследовательский университет
имени академика С.П. Королева»

ул. Московское шоссе, д. 34, г. Самара, 443086
Тел.: +7 (846) 335-18-26, факс: +7 (846) 335-18-36
Сайт: www.ssau.ru, e-mail: ssau@ssau.ru
ОКПО 02068410, ОГРН 1026301168310,
ИНН 6316000632, КПП 631601001

09 ИЮЛ 2025

№ 152-3929

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Ректор Самарского университета
д.э.н., профессор



Богатырев В.Д.

2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет
имени академика С.П. Королева» на диссертационную работу Зюбина Андрея Юрьевича
«Спектрофлуорометрия и спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света в
исследованиях биомаркеров социально-значимых заболеваний», представленную на
соискание ученой степени доктора физико-математических наук
по специальности 1.5.2. – Биофизика

Диссертация Зюбина Андрея Юрьевича посвящена изучению молекулярных изменений в тромбоцитах человека, взятых от здоровых пациентов и пациентов с патологиями сердечно-сосудистых заболеваний, а также биохимических маркеров антибиотикорезистентности в микобактериях туберкулеза, маркеров клеточной гибели клеток *E.coli*. Объектами исследования являются ансамбли клеток и образцы биологических жидкостей человека – тромбоциты, клетки *E.coli*, клетки микобактерий *M.tuberculosis* пекинского штамма с различной степенью антибиотикорезистентности.

В настоящее время спектроскопия комбинационного (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) активно используется в мировой науке для быстрого и безметочного изучения структурных особенностей биомолекул. Эти методы позволяют получать точную спектральную информацию, в том числе от биологических объектов макроскопического масштаба — таких как бактериальные клетки. Технологии, основанные на металл-усиленной флуоресценции и тушении, а также подходов колебательной спектроскопии, успешно применяются для мониторинга лекарственных средств, анализа раковых клеток и изучения клеточных механизмов. В последнее время ведутся исследования широкого спектра бактериальных культур, разрабатываются методики дифференциации различных видов бактерий. ГКР-спектроскопия используется для анализа таких бактерий, как *K. pneumonia*, *E. coli*, *S. cohnii*, *Brucella*, *S. typhimurium*, *S. aureus* и других. Большинство таких исследований направлено на дифференциацию видов туберкулезных бактерий, выявление межвидовых различий штаммов или сравнение туберкулезных и нетуберкулезных форм, но не на различение клеток внутри одного штамма. Кроме того, ведутся активные исследования по применению ГКР проводятся в области сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), которые остаются ведущей причиной

смертности во всем мире на протяжении последних двух десятилетий. Спектроскопия ГКРС и КРС обладает высокой информативностью для исследования молекулярной структуры тромбоцитов: анализ аминокислот, белков и липидов позволяет получить представление о внутренней организации клеток и их спектральном ответе на действие антитромбоцитарных препаратов — что важно для развития персонализированной медицины. Эти факты подчеркивают значимость данного диссертационного исследования как для фундаментальных научных целей, так и для прикладных задач.

В связи с изложенным, цель и задачи диссертационного исследования Зюбина Андрея Юрьевича актуальны для биофизики, а полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты отличаются высокой степенью новизны. Диссертационная работа Зюбина А.Ю. включает в себя введение, пять глав, заключение и список литературы, который составляет 248 страниц машинописного текста. Диссертация содержит 61 таблицу и 128 рисунков. Библиографический список включает 452 наименований цитируемой литературы.

Во **введении** представлена актуальность проведенных исследований, сформулирована цель, поставлены задачи и отражена научная новизна диссертационной работы. Установлены объект и предмет исследования, перечислены методы исследований. Приведены основные положения, выносимые на защиту, показана практическая ценность достигнутых результатов, а также обоснована степень их достоверности и надежности. Во введении также представлена информация о личном вкладе автора, апробации проведенных работ, а также благодарности.

Первая глава диссертационной работы представляет литературный обзор, сосредоточенный на биофизических аспектах и применении плазмонного эффекта, индуцированного вблизи металлических наночастиц. Особое внимание уделено роли этого явления в исследовании и моделировании сложных биологических систем. Рассматриваются основные направления контролируемого синтеза и оптические свойства наночастиц, а также их применение для изучения клеточных структур, включая эукариотические клетки и бактерии. Кроме того, обсуждается потенциал данного подхода в решении актуальных медицинских и биофизических задач. Отдельно рассмотрено применение методов на базе машинного обучения для решения подобного вида проблем. Обоснована новизна и актуальность выбранного направления исследований в части прояснения свойств биологических объектов, их молекулярной структуры.

Во **второй главе** работы представлены методы исследования, детально описан инструментарий, примененный для выполнения данной диссертационной работы. Приведена методология пробоподготовки тромбоцитов и микобактерий, методы исследований их оптических свойств. Описаны эксперименты спектральной флуоресцентной и время-разрешенной спектроскопии. В главе приведена методология исследования с применением методов комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света тромбоцитарной массы, клеток *E.coli*, а также клеток микобактерий туберкулеза, в том числе одиночных. Также детально описан математический инструментарий для обработки спектральных данных и выделения биомаркеров на базе машинного обучения, корреляционного анализа. Детально описаны подходы к DFT моделированию рецепторов и ферментов тромбоцитов, клеточных стенок микобактерий.

В **третьей главе** представлены результаты исследований фотофизических свойств и биофизических характеристик тромбоцитов, зарегистрированных с применением коллоидных и планарных оптических сенсоров. В частности, сначала были проведены исследования спектральной однородности тромбоцитов, что являлось основополагающим для дальнейшего анализа колебательных спектров тромбоцитов. Был использован комбинированный подход, основанный на применении спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света и методах анализа многомерных данных, таких как метод главных компонент и алгоритмы парной корреляции, для исследования однородности спектров тромбоцитов. Рассчитаны коэффициенты корреляции для каждой

выборки и оценен средний коэффициент детерминации. Выявлена высокая степень спектральной однородности внутри одной пробы и между ними посредством проведения статистического (метод главных компонент) и корреляционного анализа (метод парных корреляций). В рамках данной работы были исследованы также спектральные и временные флуоресцентные фотопроцессы в тромбоцитах человека и их комплексах с наночастицами платины. В результате проведенной работы была выявлена возможность переноса энергии между НЧ платины, мембраной тромбоцитов и ее составляющими. Для исследования описанных фотопроцессов применялись как экспериментальные, так и теоретические подходы. Отдельной задачей диссертации являлось разработка алгоритмов классификации полученных спектров и выделение конкретных маркеров, различающих выборки. Для этого были разработаны алгоритмы на базе машинного обучения, с помощью которых были выделены возможные биохимические маркеры, классифицирующие выборки. Так, был разработан алгоритм классификации спектров и выделения биомаркеров для исследуемых групп пациентов.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки перспективных методов оптической диагностики в клинической кардиологии. В частности, очень сложно обнаружить молекулярные изменения в тромбоцитах с помощью традиционного биохимического анализа и оптической микроскопии из-за сниженной способности идентифицировать небольшое количество тромбоцитов. Кроме того, традиционные методы не могут предоставить быстрый и точный диагностический инструмент для определения как ингибирования агрегации одиночных тромбоцитов, так и конформации их структуры, что необходимо для экспресс-диагностики эффективности терапии, что определяет дальнейший выбор терапии. Этот факт открывает определенные перспективы как для фундаментальных, так и для прикладных исследовательских целей SERS. Также возможно выявление единичных тромбоцитов и исследование их структуры в материале пациента с помощью SERS, что может быть полезно для выбора адекватного лечения и прогноза терапии пациента. Достигнутая точность классификации с помощью алгоритма случайного леса спектров по группам здоровых пациентов без терапии и больных с сердечно-сосудистой патологией без терапии составила 83,4%. При классификации терапии у здоровых пациентов точность составила 76,26%, у больных с сердечно-сосудистой патологией - 70%.

В четвертой главе представлены результаты биофизического анализа клеток *E.coli* и *M.tuberculosis*, в том числе одиночных. Для решения задач диссертации были применены оптические сенсоры на базе плазмонного эффекта, обладающие свойствами генерации плазмонного резонанса в видимой и ближней ИК-области. Был зарегистрирован спектральный профиль клеток. В результате проведенного анализа выявлены биомаркеры действия антибиотиков на чувствительный штамм *E.coli*. Установлено его действие на ароматические компоненты, составляющие клеточную стенку бактерии. Были проведены детальные исследования бактериальных конгломераций и единичных клеток микобактерий туберкулеза с применением КР спектроскопии. Были исследованы референтные и клинические штаммы микобактерий, составлены спектральные карты микобактерий. Выборка включала в себя референтные (H37Rv, H37Ra, Erdman) штаммы и клинические штаммы: монорезистентные (МоноЛУ), полирезистентные (ПолиЛУ), с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ). С помощью КРС и ГКРС спектроскопии был анализирован моды трипептида глутатиона микобактерий, состоящего из L-цистеина, глицина и L-глутамата, который (или его составляющие) может являться потенциальным маркером антибиотикорезистентности микобактерии к кислородосодержащим производным азота. Отдельным этапом работ являлось исследование с применением методик ГКРС единичных клеток микобактерий туберкулеза и проведение их спектрального картирования в разных точках клетки, которое было успешно выполнено.

В **пятой** главе была осуществлена проверка гипотезы об использовании инструментов квантово-механического моделирования биомаркеров ответа на антиагрегантную терапию. Для этого была выбрана часть рецептора циклооксигеназы COX-1, а также часть рецептора P2Y₁₂ тромбоцитов. Проверялась гипотеза о возможности подтверждения экспериментально полученных биомаркеров при образовании связей между частью фермента/рецептора и аспирином/ метаболитом клопидогреля путем расчета соответствующих колебательных полос. Для этого, с помощью программного пакета Gaussian 16 была рассчитана стыковка Arg и активного метаболита клопидогреля и аспирина на рецепторах P2Y₁₂ и ЦОГ-1 тромбоцитов соответственно. Мишенью для ЦОГ-1 был выбран аспирин, мишенью P2Y₁₂ был выбран активный тиольный метаболит клопидогреля H₄. По результатам, полученным в главе, был апробирован подход, направленный на математическое моделирование методом DFT спектров КРС для антитромбоцитарного препарата и взаимодействия целевого рецептора тромбоцитов с ферментом на ограниченной области. Выявлены полосы комбинационного рассеяния света, соответствующие препарату аспирин/метаболит клопидогреля и его взаимодействию в месте связывания. Определенные колебательные моды могут быть потенциальными биомаркерами взаимодействия метаболита клопидогреля/аспирина с соответствующими рецепторами тромбоцитов (P2Y₁₂/COX-1). В результате выполненной работы были получены теоретические КРС спектры области взаимодействия лекарственного средства с рецептором. Уточнены полосы характеристик, соответствующие колебаниям метаболитов/ферментов и антиагрегантов. Показана перспективность получения результатов по патологиям, основанным на конформациях белков тромбоцитов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Также, в результате выполненной работы были произведены расчеты оптических спектров для компонент клеточной стенки микобактерии методом DFT. Получены теоретические спектры КРС для разных типов миколовых кислот (альфа, кето, метокси), а также элементов арабиногалактана. Теоретические данные были сопоставлены с полученными ранее экспериментальными результатами для КРС микобактерий для штаммов, описанных в методологической главе работы, уточнены полученные ранее результаты. Приводятся рассчитанные теоретические КРС спектры соединений, входящих в состав бактериальной стенки микобактерий. Уточнены и подтверждены полосы спектральных характеристик, соответствующие колебаниям альфа-, кето-, метоксимиоловых кислот на частотах 1061 см⁻¹, 1295 см⁻¹ и 1437 см⁻¹ и арабиногалактана на 822 см⁻¹, 1076 см⁻¹, 1269 см⁻¹. Было показано, что колебательные КРС спектры могут быть рассчитаны с помощью DFT. Этот подход может быть применен для отдельных компонентов клеточной стенки, их составных частей, после чего они могут быть сопоставлены с экспериментальными результатами. Ввиду разной интенсивности максимумов и выделения теоретических спектров по каждой миколовой кислоте, этот факт может быть использован как для дифференциации чувствительных и резистентных клеток, так и для анализа места действия препарата на мишень. Данные результаты демонстрируют перспективы использования предложенных подходов для исследования изменений в проблемах для *MbT*, связанных с устойчивостью к антибиотикам

В **заключении** обобщаются результаты выполненной работы, приводятся результаты диссертационного исследования.

Автореферат написан ясным и грамотным языком, полно отражает основное содержание диссертационной работы.

Обоснованность и достоверность результатов, полученных при выполнении диссертационной работы, обусловлена их соответствием современному пониманию

проблематики исследуемых объектов, изложенному в известных работах. Значимость результатов подкреплена статистическим анализом, выполненном на значительном ансамбле экспериментальных данных.

Научная новизна результатов заключается в следующем:

1. Впервые было выполнено определение спектральных внутриштаммовых различий клеточной стенки *MbT* для *Beijing spp.* с различной степенью лекарственной устойчивости и места локализации, в том числе на единичных клетках, базирующееся на спектральный анализ молекулярных изменений компонентов в структуре клеточной стенки микобактерии в результате действия лекарственных препаратов.
2. Впервые функциональное состояние тромбоцитов периферической крови было сопоставлено с детальными характеристиками спектров КР и ГКР на основе новых методов, оптимизирующих их регистрацию.
3. Потенциальные маркеры антибиотикорезистентности получили новое объяснение на основе детально изученных спектров КРС и ГКРС рассеяния клеток микобактерий туберкулеза (в том числе одиночных) с различной степенью антибиотикорезистентности.
4. Уточнены молекулярно-биологические характеристики выявленных биомаркеров, связанных с антибиотикорезистентностью и механизмами связывания лекарственных препаратов с мишенями. Данные характеристики были определены на основе интеграции экспериментальных результатов и математического моделирования колебательных спектров комбинационного рассеяния света (КРС) биомолекул, входящих в состав клеточной стенки микобактерий и рецептора тромбоцита.

По результатам исследований в рамках темы диссертации опубликованы 56 исследовательских работ, из них 22 – статей в изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science/Scopus, 19 работ опубликованы в сборниках трудов международных и всероссийских научных конференций и симпозиумов. Зарегистрировано 4 патента РФ на изобретение, 11 свидетельств о государственной регистрации программ ЭВМ и баз данных. Результаты диссертационной работы прошли апробацию и были представлены на 19 всероссийских и международных конференциях. По результатам опубликовано 19 тезисов.

Полученные новые фундаментальные результаты с применением КРС- и ГКРС-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии (в том числе с временным разрешением) имеют **практическую ценность** для исследований комплексов НЧ со сложными объектами на примере тромбоцитов, которые могут быть положены в основу практической разработки оптических сенсоров для целей диагностики состояния клеток крови человека, а также для объяснения биофизических механизмов.

Таким образом, научная новизна, практическая ценность, обоснованность и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений и полностью соответствуют специальностям 1.5.2 - «Биофизика» (отрасль науки – физико-математические) по направлению исследований п.1.2. «Молекулярная биофизика: физика белка; физика нуклеиновых кислот; физика биологических мембран), п.1.4 «Медицинская физика», п.4 «Теоретическое и экспериментальное обоснование физических процессов, протекающих в биологических системах разного уровня организации, в том числе исследование воздействия различных видов излучений и других физических факторов на биологические системы».

По работе имеется ряд **вопросов и замечаний**:

1. Что подразумевается под «маркерами заболеваний» диссертационной работе?
2. Какая стоимость каждого вида использованных субстратов и какие перспективы их внедрения в практику?
3. Не совсем понятны используемые конфигурации ГКРС субстратов для исследований бактериальных клеток, проводились ли сравнительные исследования на указанных длинах волн в привязке к каждому субстрату?
4. Из спектров тромбоцитов для разных выборок видны спектральные различия на величине спектрального сдвига 829 см^{-1} , 851 см^{-1} , почему они выбраны в качестве маркеров? Как объяснялась дальнейшая проработка тех или иных идентифицированных компонент спектра флуоресцентным методом или методом КРС? Возможно ли было применить DFT расчеты оптических спектров КРС к вышеобозначенным колебаниям или это не являлось важным? Чем DFT метод может быть полезен в ключе выделения спектральных маркеров, какие базисы использовались для расчетов?
5. Для каких бактериальных клеток применялась спектроскопия КРС, а для каких ГКРС и чем был обусловлен выбор?
6. Как спектрально определить действие антибиотика на *E.Coli*? Почему были выбраны именно моды 1005 см^{-1} и 758 см^{-1} в качестве маркеров клеточной гибели?
7. На рис. 122, стр. 209 диссертации интенсивность расчетных спектральных максимумов альфа-миколовой в максимуме 1280 см^{-1} выше экспериментального значения на той же частоте. Как это можно объяснить?
8. Какова сложность пробоподготовки биообъектов (время исследований, требования к квалификации исследователей и т.д.). Необходимо обозначить преимущества предложенных подходов по сравнению со стандартными методами анализа (простота, стоимость, дополнительные возможности и т.д.).
9. Поскольку микобактерии быстро мутируют, резистентность к лекарствам меняется, поясните, сохранится ли воспроизводимость полученных результатов при анализе легочных бактериальных через определенное время?

Указанные замечания не снижают ценность и общую положительную оценку диссертационной работы, не влияют на основные научные и практические результаты и не затрагивают основных положений, вынесенных соискателем на защиту.

Диссертация Зюбина Андрея Юрьевича удовлетворяет всем требованиям пп. 9-11, 13, 14 действующего «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к докторским диссертациям, а автор работы заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальностям 1.5.2 - «Биофизика».

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на заседании кафедры лазерных и биотехнических систем ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» (протокол № 10 от 17.06.2025 года).

Отзыв подготовили:

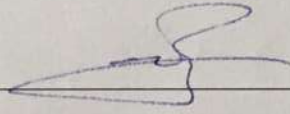
Братченко Иван Алексеевич - профессор кафедры лазерных и биотехнических систем ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», доктор физико-математических наук, (специальность 1.5.2-Биофизика);

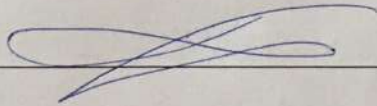
Захаров Валерий Павлович - заведующий кафедрой лазерных и биотехнических систем, доктор физико-математических наук, профессор (специальность 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики).

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» Почтовый адрес: 443086, Приволжский федеральный округ, Самарская область, г. Самара, Московское шоссе, д. 34. тел.: +7 (846) 267-43-70 факс: 7 (846) 267-43-70 Адрес электронной почты: ssau@ssau.ru Адрес официального сайта в сети «Интернет»: <https://ssau.ru/>

Я, Братченко Иван Алексеевич, даю согласие на обработку моих персональных данных (Приказ Минобрнауки России от 01.07.2015 №662) и на включение моих персональных данных в аттестационные документы соискателя ученой степени доктора физико-математических наук Зюбина Андрея Юрьевича.

Я, Захаров Валерий Павлович, даю согласие на обработку моих персональных данных (Приказ Минобрнауки России от 01.07.2015 №662) и на включение моих персональных данных в аттестационные документы соискателя ученой степени доктора физико-математических наук Зюбина Андрея Юрьевича.

< 18 > июня 2025г.  Братченко И.А.

< 18 > июня 2025г.  Захаров В.П.