

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Зюбина Андрея Юрьевича «Спектрофлуорометрия и спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния света в исследованиях биомаркеров социально-значимых заболеваний» на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Диссертация Зюбина Андрея Юрьевича направлена на выявление молекулярных маркеров, характеризующих изменения в биологических системах при факте наличия патологических процессов и резистентности. В работе выполнены исследования тромбоцитов человека от доноров с патологией сердечно-сосудистых заболеваний, микобактерий *Mycobacterium tuberculosis* пекинского штамма, а также популяций *E. coli*.

В работе решен *актуальный* круг задач, получены новые результаты, связанные с развитием методов проведения эксперимента, анализом и интерпретацией данных. Накоплен большой массив экспериментальных и теоретических данных. В диссертационной работе решены новые биофизические задачи, связанные с применением методов колебательной спектроскопии, спектрофлуорометрии. Выполнен детальный анализ молекулярной структуры различных биологических объектов и их компонентов: белков, аминокислот, липидов. Результаты работы ценны, поскольку позволяют выделить спектральный ответ на проводимую антитромбоцитарную терапию, а также выделить факторы, связанные с антибиотикорезистентностью. Результаты диссертации имеют несомненную ценность для решения задач, связанных с персонализированной медициной. Эти факты подчеркивают *теоретическую* и *практическую* значимость данного диссертационного исследования как для фундаментальных научных целей, так и для прикладных задач.

Полученные в диссертационной работе результаты обладают *научной новизной*, поскольку впервые:

- Выделены спектральные внутриштаммовые различия клеточной стенки *MbT* для штамма *Beijing spp.* с различной степенью лекарственной устойчивостью и местом локализации, в том числе на единичных клетках посредством спектрального анализа клеточной стенки микобактерии в результате действия лекарственных препаратов;
- Выполнено соотнесение физического состояния тромбоцитов периферической крови с колебательными полосами ГКР спектров;
- Определены и объяснены потенциальные маркеры антибиотикорезистентности на основе детально изученных спектров ГКРС клеток микобактерий туберкулеза (в том числе одиночных) с различной степенью антибиотикорезистентности;

- уточнены молекулярно-биологические характеристики выявленных биомаркеров, связанных с антибиотикорезистентностью и механизмами связывания лекарственных препаратов с мишенями.

Достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью полученных экспериментальных и теоретических данных, применением современных методов обработки эксперимента, публикациями в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях, степенью глубокой проработки обозначенных в диссертации проблем.

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.

Первая глава работы отражает литературный обзор, описывающий биофизические аспекты изучаемых молекулярных систем и применение оптических методов, в частности методов КРС и ГКРС спектроскопии для их исследований. Обсуждается потенциал таких методов для решения биофизических задач. Приведен детальный обзор подходов к классификации данных, рассмотрены подходы на базе машинного обучения для решения подобного рода задач. Приведено детальное обоснование выбранного направления исследований в разрезе изучения свойств выбранных биологических объектов и их структуры.

Во **второй** главе детально описана методология исследований. Описаны методы биологической пробоподготовки, а также приведены применяемые для исследования подходы методов флуоресценции, комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния света для тромбоцитарной массы, клеток *E.coli*, а также клеток микобактерий туберкулеза. Описан математический и статистический инструментарий для обработки спектральных данных и выделения биомаркеров на базе машинного обучения, корреляционного анализа. Описаны подходы к DFT моделированию рецепторов и ферментов тромбоцитов, клеточных стенок микобактерий.

В **третьей** главе представлены результаты теоретические и экспериментальные результаты применения спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света и методов анализа многомерных данных. Приводятся результаты применения метода главных компонент, показана однородность спектров тромбоцитов человека. Рассчитаны коэффициенты корреляции для каждой выборки и оценен средний коэффициент детерминации. Выявлена высокая степень спектральной однородности внутри одной пробы

и между ними. Показано, что полученные данные с успехом могут быть использованы для различения выборок спектров тромбоцитов по исследуемым группам.

В **четвертой** главе представлены результаты биофизических исследований клеток *E.coli* и *M.tuberculosis*. Проведен большой объем исследований бактериальных клеток. Проведены исследования также на одиночных клетках, что является особенно интересным. По результатам выполненной работы выделены характерные колебательные полосы - биомаркеры действия антибиотиков на чувствительный штамм *E.coli*, а также биомаркеры воздействия антибактериальных препаратов на чувствительный штамм *E. coli* для составляющих клеточной стенки бактерии. В работе показано, что для отдельных компонент клеточной стенки наблюдается уменьшение интенсивности максимумов колебательных полос, характеризующих нуклеиновые кислоты, белковые полосы.

В **пятой** главе была осуществлена проверка гипотезы о применении инструментов квантово-механического моделирования для расчета полос - биомаркеров ответа на антиагрегантную терапию. В главе проведены расчеты части рецептора циклооксигеназы COX-1, а также части рецептора P2Y12 тромбоцитов. Был проведен анализ и рассчитаны спектральные сдвиги в месте стыковки COX-1 и P2Y12 с аспирином и клопидогрелем соответственно. В главе также представлены расчеты колебательных спектров клеточной стенки микобактерии. Продемонстрирована корреляция теоретических и экспериментальных колебательных полос, выполнено их соотнесение с молекулярной структурой биологических объектов. В *заключении* приведены основные выводы по результатам диссертационного исследования.

К диссертации имеются следующие замечания:

- 1) Стр. 65. Раздел 2.2. Повторяется одинаковый текст до рисунка 18 и после него: "методом фемтосекундной лазерной абляции золотой пластины в дистиллированной воде на установке TETA-X, (AVESTA, Россия) (длительность импульсов 280 фс, частота 25 кГц) при различной энергии лазерного излучения. Для получения наночастиц с размером 20-100 нм энергия лазера варьировалась в диапазоне $E = 10-25$ мкДж. Объем воды в кювете с мишенью составлял 1,2 мл, толщина слоя растворителя над золотой поверхностью – 1 мм. Время абляции составляло 4 минуты. Кювета с образцом помещалась на вращающуюся систему позиционирования, таким образом, чтобы в процессе абляции лазерный пучок фокусировался в новом месте пластины. Наночастицы, полученные в кювете, в результате абляции, впоследствии помещались в колбу, а процедура синтеза повторялась, пока объем полученных частиц не составлял 5 мл."

- 2) Стр.65, Рисунок 18 - не очень информативен, читатель должен сам догадаться из каких компонентов состоит установка. Было бы полезно пометить составляющие установки цифрами и дать наименование компонент, либо представить схематично данную установку;
- 3) Стр.67. Рисунок 19 Б. На рисунке 19 Б изображены не спектры поглощения, а спектры экстинкции, поскольку речь идет о золях, для которых характерно и поглощение и рассеяние;
- 4) Стр.67. Рисунок 19 В - нельзя прочесть значение масштабного отрезка на СЭМ изображении;
- 5) Стр. 68. Рисунок 20 Б - На рисунке 20 Б изображен не спектр поглощения, а спектр экстинкции, поскольку речь идет о золях, для которых характерно и поглощение и рассеяние. Это повторяется на рисунке 23, стр.71;
- 6) Стр.68. Автор пишет: "средний размер нанозвезд в оболочке (85,3 процента частиц) составляет $33,460 \pm 9,842$ нм. С учетом значений абсолютной погрешности правильным было бы написать результат в следующем виде с учетом правил округления: 34 ± 10 нм;
- 7) С.127, табл 13, значение абсолютной погрешности представлено с избыточной точностью, например вместо 0.14 ± 0.0103 , следует написать 0.14 ± 0.01 ;

Указанные замечания не снижают в целом положительного впечатления о работе и носят характер пожеланий на будущее.

Таким образом, можно заключить, что 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», утвержденном постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в текущей редакции), предъявляемым к докторским диссертациям, соответствует паспорту специальности, по которой она представлена к защите, а её автор, Зюбин Андрей Юрьевич, заслуживает присуждения ему учёной степени доктора физико-математических наук по специальности 1.5.2. — Биофизика.

Я, Горин Дмитрий Александрович, даю свое согласие на обработку моих персональных данных в рамках подготовки аттестационных документов соискателя в соответствии с Приказом Минобрнауки РФ № 662 от 1 июля 2015 года.

Доктор химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия, профессор,

профессор центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» (Сколтех),

Российская Федерация, 121205, г. Москва, тер. Сколково инновационного центра б-р Большой, д.30, стр.1

Телефон: +79172077630

E-mail: d.gorin@skoltech.ru

Дата «17» сентября 2025


Горин Дмитрий Александрович

Подпись д.х.н., проф. Д.А. Горина заверяю:

РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ
Гук О.С.

