ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.392.06, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №_____

решение диссертационного совета от 20.03.2025 № 111/25

О присуждении **Сычеву Александру Владимировичу**, гражданину РФ, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных» по специальности 1.5.2. - Биофизика принята к защите 13 декабря 2024 года, протокол № 106/24, диссертационным советом 24.2.392.06, созданным на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Совет 24.2.392.06 создан приказом Минобрнауки России № 362/нк от 19.03.2020 г.

Соискатель Сычев Александр Владимирович, гражданин РФ, 30.05.1996 года рождения, в 2020 году окончил ФГБОУ ВО «Курский государственный университет» по направлению подготовки 04.04.01 Химия с присвоением квалификации «Магистр». В период подготовки диссертации соискатель обучался в очной аспирантуре ФГБОУ ВО «Курский государственный университет» по специальности 03.06.01. Физика и астрономия, и окончил её в 2024 году.

Диссертация выполнена в ФГБОУ ВО «Курский государственный университет».

Научный руководитель: Постников Евгений Борисович, доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики и нанотехнологий ФГБОУ ВО «Курский государственный университет».

Официальные оппоненты,

Чуев Геннадий Николаевич, доктор физико-математических наук, и.о. директора федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино и

Семенов Константин Николаевич, доктор химических наук, заведующий кафедрой общей и биоорганической химии, заведующий лабораторией биомедицинского материаловедения ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова

Российской академии наук», г. Москва, в своём положительном заключении, подписанном руководителем Центра биофотоники ИОФ РАН, доктором биологических наук, профессором РАН Гудковым Сергеем Владимировичем и утвержденном директором федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (ИОФ РАН), член-корреспондентом РАН, доктором физико-математических наук Гарновым Сергеем Владимировичем, отметила актуальность проведенного исследования, новизну полученных результатов, а также теоретическую и практическую значимость работы, высокий научный уровень диссертации, и указала, что диссертация Сычева Александра Владимировича «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных» удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Сычев Александр Владимирович заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высоким уровнем экспертизы и близким соответствием проводимых ими исследований теме диссертации, высокой квалификацией в области анализа биофизических процессов, связанных с бактериальной жизнедеятельностью.

Соискатель имеет 14 опубликованных научных работ по теме диссертации, в их числе 3 статьи в изданиях, входящих в перечень ВАК или индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Наиболее значимые публикации автора по теме диссертации:

1. Lavrova A. I., Dogonadze M. Z., **Sychev A. V.**, Manicheva O. A., and Postnikov E. B. Ensemble density-dependent synchronization of mycobacterial growth: BACTEC MGIT 960 fluorescence-based analysis and mathematical modelling of coupled biophysical and chemical processes // AIMS Microbiology. 2022. Vol. 8. P. 208. DOI: 10.3390/bioengineering10080962. В работе представлен сравнительный анализ данных о росте *M. tuberculosis*, полученных с помощью системы BACTEC MGIT 960 и при помощи разработанного портативного микробиологического анализатора, аргументирующих возникновение эффекта спонтанной синхронизации клеточного деления при достижении определенной концентрации микроорганизмов в культуре.

2. **Sychev A. V.**, Lavrova A. I., Dogonadze M. Z., and Postnikov E. B. Establishing Compliance between Spectral, Colourimetric and Photometric Indicators in Resazurin Reduction Test // Bioengineering. 2023. Vol. 10. P. 962. DOI: 10.3390/bioengineering10080962. В работе рассмотрены два новых подхода к количественной индикации жизнеспособности микроорганизмов в жидкой среде при резазуриновом тесте — на основе нового метода колориметрического анализа, базирующегося на использовании цветового пространства CIE

L*a*b* при обработке фотографий микробиологических планшетов и одноканальной фотометрии с помощью разработанного портативного микробиологического анализатора, использующим фильтр со специальной полосой цветопропускания; подходы верифицированы с использованием спектрофотометрического анализа и референтных данных по биологической активности микобактерий в присутствии лекарственного препарата.

3. **Сычев А.В.**, Постников Е.Б. О взаимосвязи наблюдаемой динамики колориметрического индикатора с нелинейной динамикой исследуемого популяционного роста в случае микробиологических культур // Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика. 2024. Т. 32. С. 332–346. DOI: 10.18500/0869-6632-003095. В работе говорится о последовательном моделировании двух связанных нелинейных процессов роста, направленном на получение решения в закрытой форме в зависимости от специфики и параметров биологических и химических аналогов и его сравнение с кривыми, полученными экспериментально. При этом для количественной характеристики процесса необходимо учитывать тот факт, что регистрируются результаты химического превращения, которые могут отличаться от лежащей в основе кинетики роста популяции.

На **автореферат** диссертации поступило **6** положительных **отзывов**. В них отмечены актуальность, высокий уровень работы, научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Отзывы поступили от:

1) Ягофарова Михаила Искандеровича, доктора химических наук, доцента кафедры физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; отмечены незначительные грамматические и опечатки;
2) Емельянова Никиты Александровича, кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника лаборатории функциональных материалов для электроники и медицины ФИЦ Проблем химической физики и медицинской химии РАН;

   Замечания:

   - В то время как значительное число результатов получено на основании обработанных цифровых фотографий, в автореферате не сообщается сведений о спектральной чувствительности использованной для их регистрации ПЗС матрицы.
   - В главе 4 в ходе описания эксперимента по изучению динамики роста культур лактобактерий отмечается, что временной интервал между последовательными фотометрическими измерениями составлял 15 минут. Был ли данный интервал выбран на основе каких-либо критериев (технических условий или параметров модели)? Может ли повышение дискретизации данных измерений улучшить точность результатов, ведь речь идет о количественном анализе?

- Кроме того, автореферат не свободен от опечаток, например «объем диссертации 120 странице», «портативный микробиологический анализатор (МПА), планшета, помещенного в ПМА».

3) Зюбина Андрея Юрьевича, кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанофотоника» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»; замечания отсутствуют.
4) Мизевой Ирины Андреевны, доктора физико-математических наук, старшего научного сотрудника Отдела физической гидродинамики ИМСС УрО РАН; замечания отсутствуют.
5) Гордлеевой Сусанны Юрьевны, доктора физико-математических наук, профессора кафедры нейротехнологий ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; замечания отсутствуют.
6) Виноградовой Татьяны Ивановны, доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника, руководителя НИЛ экспериментальной медицины ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России»; замечания отсутствуют.

На все высказанные замечания соискателем даны исчерпывающие ответы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

1. Разработана концепция количественного микробиологического исследования роста микобактериальных культур в рамках протокола REMA, основанная на выявлении соответствия между изменениями значений канала a* цветового пространства CIE L*a*b* и концентрации резоруфина, образующегося из резазурина в индикаторной среде вследствие клеточного дыхания микроорганизмов.
2. Установлено, что полученная закономерность позволила провести модернизацию портативного микробиологического анализатора, работающего с 96-луночными микробиологическими планшетами, путем введения светофильтра с цветом в системе CIE L*a*b* дополнительным к цвету резазурина, таким образом, что результирующие одноканальные измерения количественно характеризуют процессы популяционного роста исследуемых микроорганизмов.
3. Доказана перспективность использования разработанного метода колориметрического анализа, прошедшего калибровку с помощью определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) ряда известных антитуберкулезных препаратов, для установления

МИК четырех новых синтезированных соединений нитрофуранового ряда, рассматриваемых в качестве перспективных действующих веществ.

4. Выявлено, что результаты фотометрических измерений, проведенных при помощи портативного микробиологического анализатора, совместно с данными альтернативных измерений на стандартной флуориметрической системе BACTEC MGIT 960, позволили экспериментально установить существование эффекта спонтанной синхронизации роста и деления в высоконцентрированных колониеобразующих культурах микобактерий *M. tuberculosis*, растущих в жидкостной среде.
5. Определено, что динамика индикатора роста культуры жизнеспособных микроорганизмов в резазуриновом тесте совпадает с кривой популяционного роста только при специальном согласовании констант размножения микроорганизмов, индикаторной химической реакции, катализируемой их дыхательной активностью и емкостью среды, и в общем случае анализ данных данного типа биофизических экспериментов должен включать композитную модель, учитывающую связанные биологические и химические процессы.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что 1) применительно к проблематике диссертации результативно развит подход, дающий возможность количественной характеризации роста культур микроорганизмов на базе колориметрической индикации в ходе резазуринового теста, который до настоящего времени рассматривался как качественный критерий; 2) на основе разработанных экспериментальных методик в комплексе с существующими флуориметрическими методами регистрации дыхательной активности микроорганизмов изложены аргументы в пользу существования явления нестационарной спонтанной синхронизации в колониеобразующих культурах *M. tuberculosis* при их больших начальных концентрациях в пробе и раскрыта специфика количественного учета соотношения между периодами клеточного деления и кинетической константой химической реакции, протекающей в индикаторной среде, для интерпретации данных биофизических экспериментов.

Полученные результаты имеют **практическую значимость** прежде всего в разработке практических методик исследования роста культур *M. tuberculosis* и контроля их отклика на антимикобактериальные препараты, в том числе в ходе разработки новых лекарственных средств, действующих на антибиотикорезистентные штаммы, при помощи портативного микробиологического анализатора и методики колориметрического анализа фотографий микробиологических планшетов в ходе резазуринового теста. Данные подходы дают альтернативу использованию дорогостоящего флуорометрического оборудования, повышая тем самым доступность соответствующих тестов для системы здравоохранения.

Достоверность описанных в диссертационном исследовании результатов, сделанных выводов, обсуждений и заключения обусловлена:

1. Использованием современного научно-исследовательского оборудования и программного обеспечения и применением апробированных методик расчёта.
2. Достаточным объёмом использованного в работе материала.
3. Применением хорошо апробированных статистических методов обработки результатов.
4. Воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также, где это возможно, их соответствием результатам, полученным другими авторами.
5. Опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных журналах.

Личный вклад соискателя: в рамках выполнения диссертационного исследования автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведенных исследований: от постановки задач до обсуждения результатов и написания статей.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания и вопросы:

1. Какая точность у применяемой установки (ПМА) и чем обусловлена погрешность?
2. В каком виде производилось считывание данных с микробиологического планшета? Использовался ли стандартный планшетный ридер или была использована собственная установка? Какая разница была между полученными результатами?
3. Известно, что изменение спектра поглощения отражается на цвете и таким образом может быть зарегистрировано с помощью цветовой шкалы. Есть ли специфика того, что изменение цвета связано непосредственно с микроорганизмами, которые Вы изучаете, или аналогичные изменения можно увидеть с теми же химическими реакциями, если их реализовать без участия микроорганизмов?
4. Как резазуриновый тест работает с разными видами бактерий, грамположительными или грамотрицательными?
5. Резазуриновый тест часто используется для определения жизнеспособности эукариотических клеток и реже для бактерий. В случае эукариотических клеток, когда исследуется действие какого-либо препарата, резазуриновый тест проводится через разные временные промежутки для определения обратимости ингибирующего действия. Через какой временной промежуток после добавления антимикобактериального препарата Вы проводили резазуриновый тест и чем это было обусловлено?
6. На 15 слайде приведена зависимость доза-отклик и усы маркеров соответствуют среднему медианному отклонению. Что имелось в виду?

7. На слайде 17 представлены уравнения. Диссертант утверждает, что приведенная модель была разработана. Но на слайде рядом с уравнением присутствует другая фамилия. Возникает вопрос, модель была вами разработана или использована?

8. Как Вами использовалась модель Ферхюльста? Предложенная Вами модель была рассчитана с нуля или это модификация?

9. Для каждого эксперимента с использованием разработанной установки всегда использовались стандартизированные сертифицированные аппараты, ридеры или бактериостаты. Все проведенные исследования можно провести с помощью данных приборов, а Вы предлагаете свою установку. В чем ее преимущество? Прошла ли она сертификацию? Доступна ли она для любой лаборатории? Поясните.

Соискатель Сычев Александр Владимирович ответил на заданные ему вопросы, и привел собственную аргументацию:

1. Чувствительность используемой установки по тесту без реакции составляла 0.2%. Погрешность является приборозависимой.

2. В своей работе мы использовали собственную разработанную установку, но также данные сравнивались с результатами, которые были получены с помощью стандартного планшетного ридера. Основная разница заключается в получаемых данных. Стандартный планшетный ридер измеряет изменение сигнала флуоресценции резоруфина, но известно, что при высоких начальных концентрация резазурина, относительно резоруфина, флуоресценция последнего гасится, что может привести к неточности в измерении. В своей установке мы используем колориметрический подход, который является более точным.

3. Если говорить о колориметрических характеристиках исследуемого процесса, их можно воспроизвести в пробирке. В работе мы использовали химическое восстановление резазурина в пробирке с использованием гидразин гидрата при моделировании изменения окраски в бактериологической среде.

4. В своей работе мы не рассматривали данный вопрос.

5. Резазуриновый тест был проведен в соответствии со стандартным медицинским протоколом и измерения проводились через 24 часа после добавления ингибирующего вещества.

6. Имелось ввиду медианное усреднение отклонений для каждого отдельного ряда планшета.

7. На слайде были приведены модель Ферхюльста для популяционного роста и разработанная нами модель.

8. Модель Ферхюльста была взята за основу нашей модели, так как для лактобактерий рост был хорошо изучен, и данная модель подробно описывает рост лактобактериальных культур. Нами было предложено уравнение, которое учитывает непосредственно изменение

динамики по Ферхюльсту и также значения, которые регистрирует прибор, основанные на химической кинетике индикатора. Т.е. наше уравнение учитывает изменение динамики индикаторной среды.

9. Наша установка пока не сертифицирована, так как мы продолжаем этап разработки. Преимуществом является как минимум цена, т.к. стандартизированные планшетные ридеры стоят довольно дорого. Так же наша установка может работать от аккумулятора, ее можно использовать практически в любых условиях. Т.к. данная работа является совместной с Санкт-Петербургским НИИФ, у них установка помещалась в термостат и использовалась при стандартных условиях культивирования микобактерий. Но в дальнейшем мы планируем сертифицировать установку и использовать ее в других лабораториях.

В результате рассмотрения диссертации Сычева Александра Владимировича «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных» на заседании 20 марта 2025 года диссертационный совет принял решение:
за достижения в области разработки новых методов количественной колориметрической индикации бактериального роста, базирующихся на анализе соответствующих биофизических процессов и практическом применении разработанных методов в области медицинской биофизики культур штаммов *M. tuberculosis*, присудить Сычеву Александру Владимировичу учёную степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

При проведении тайного электронного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 5 человек, участвующих в интерактивном режиме, 9 докторов наук по специальности 1.5.2. – Биофизика, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали за – 15, против – нет, воздержались – нет.

Отзыв составил
Член диссертационного совета
д.ф.-м.н., проф. Скрипаль Анатолий Владимирович

Председатель диссертационного совета,
д.ф.-м.н., проф., чл.-корр. РАН Тучин Валерий Викторович

Учёный секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н., профессор Генина Элина Алексеевна
20.03.2025