

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе,
цифровизации и международным связям
Курского государственного университета



Логинов С.П.

« 10 » 10.06.2024 г.

М.П.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный университет» (Курский государственный университет) о диссертации Сычева Александра Владимировича, представленной на соискание степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Диссертационная работа «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных» выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный университет».

Соискатель – Сычев Александр Владимирович – в 2020 г. окончил с отличием магистратуру естественно-географического факультета Курского государственного университета по направлению подготовки 04.04.01 «Химия» с присвоением квалификации «Магистр». В 2024 г. окончил аспирантуру Курского государственного университета по направлению подготовки 03.06.01 «Физика и астрономия» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь». В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника Научно-исследовательского центра физики конденсированного состояния Курского государственного университета .

Справка об обучении, содержащая информацию о сдаче кандидатских экзаменов по специальности (1.5.2 – Биофизика) и сдаче кандидатских экзаменов по истории и философии науки (физико-математические науки) и иностранному языку (английский), выданы в 2021 г. федеральным

государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Утверждение темы диссертации, назначение научного руководителя

Тема утверждена приказом ректора КГУ №73-а от 20.11.2020 г.; изменена решением научно-технического совета КГУ, протокол заседания № 34 от 12.02.2024 г.

Научный руководитель – Постников Евгений Борисович, доктор физико-математических наук, доцент, профессор кафедры физики и нанотехнологий, заведующий отделом теоретической физики Научно-исследовательского центра физики конденсированного состояния (НИЦ ФКС) КГУ (утвержден приказом ректора КГУ №73-а от 20.11.2020 г.) предоставил положительный отзыв о соискателе и диссертации.

Диссертация проходила экспертизу в Научно-исследовательском центре физики конденсированного состояния КГУ. На заседании присутствовали: Неручев Юрий Анатольевич (научный руководитель (НИЦ ФКС) КГУ, доктор физико-математических наук, профессор), Рышкова Ольга Сергеевна (заведующая лабораторией молекулярной акустики НИЦ ФКС, кандидат физико-математических наук, доцент), Мелентьев Вячеслав Владимирович (старший научный сотрудник лаборатории молекулярной акустики НИЦ ФКС, кандидат физико-математических наук, доцент), Верисокин Андрей Юрьевич (старший научный сотрудник отделения теоретической физики НИЦ ФКС, кандидат физико-математических наук, доцент), Вервейко Дарья Вячеславовна (старший научный сотрудник отдела теоретической физики НИЦ ФКС, кандидат физико-математических наук, доцент), Постников Евгений Борисович (заведующий отделом теоретической физики (НИЦ ФКС), доктор физико-математических наук, доцент). Рецензентами выступили: д. ф.-м.н. Неручев Ю.А., к.ф.-м.н. Мелентьев В.В., к.ф.-м.н. Рышкова О.С. Рецензенты дали положительную рецензию на работу.

Оценка выполненной соискателем работы

Диссертация посвящена разработке, исследованию и практическому применению совокупности колориметрических и фотометрических методов индикации роста микроорганизмов (с особым фокусом на микобактерии *Mycobacterium tuberculosis*) в жидкой среде на основе колориметрических и фотометрических измерений, включая особенности популяционной динамики в условиях эффекта кворума и отклика на антибактериальные лекарственные препараты.

Автором разработаны:

- подход, дающий возможность количественной характеристики роста культур микроорганизмов на базе колориметрической индикации в ходе резазуринового теста, который до настоящего времени рассматривался как качественный критерий;
- базирующаяся на проведённых экспериментах биофизическая интерпретация оптических кривых отклика на дыхательную активность микроорганизмов – возникновения нестационарной спонтанной синхронизации в колониеобразующих культурах *M. tuberculosis*;
- методика экспериментального учета соответствия масштабов времени клеточного деления и кинетических констант химической реакции, протекающей в индикаторной среде, позволяющая уточнить характер популяционного роста культуры микроорганизмов по результатам резазуринового теста.

Выполненная соискателем работа представляет собой завершённое биофизическое исследование. Полученные результаты соответствуют требованиям к диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Личное участие соискателя ученой степени в получении результатов, изложенных в диссертации

Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, получены соискателем лично или при его непосредственном участии.

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Колориметрические тесты, базирующиеся на изменении цвета индикаторных сред как отклика на процессы жизнедеятельности клеток, относятся к числу базовых методов современного микробиологического анализа. Среди них в качестве наиболее надежного выделяется метод, основанный на конверсии синего нефлуоресцентного красителя – резазурина (известен также под коммерческим названием Alamar Blue) в розовый флуоресцентный резорурфин, что позволяет использовать как визуальный, так и спектрофотометрический метод регистрации. При этом, несмотря на продолжительную историю использования резорурфина на основе эмпирических наблюдений, вопрос о количественной (а не качественной визуальной, принятой в настоящее время) зависимости между динамическими характеристиками роста микробных культур, включая их отклик на лекарственные препараты, подавляющие рост микроорганизмов, и количественными характеристиками индикатора резазуринового теста остается недостаточно разработанным.

Одновременно с этим следует отметить, что индикаторные методы характеристики роста микробных культур, в отличие от прямого микроскопического подсчета клеток или колониеобразующих единиц, относятся к числу косвенных. Регистрируемые наблюдателем данные обусловлены целым рядом взаимосвязанных процессов -- физиологических, связанных с ростом и делением клеток, биофизических и биохимических, связанных с транспортом индикаторных веществ в среде и клетке, а также редокс-механизмами в последней, обуславливающими целевой переход восстановления индикатора, физико-химических и оптических, отвечающих за скорость протекания химической реакции и наблюдаемый целевой цветовой переход. В данных условиях требуются дополнительные исследования, позволяющие связать классические модели популяционной динамики и динамические характеристики, выявляемые при обработке экспериментальных индикаторных кривых.

Степень достоверности результатов проведенных соискателем исследований

Достоверность полученных результатов в части экспериментальных данных обеспечивается их калибровкой с использованием стандартизированного специализированного оборудования; достоверность результатов обработки данных и следующих из них интерпретаций взаимосвязанных биофизических и физико-химических процессов обеспечивается применением как стандартных численных методов, так и верификацией на основе альтернативных методов проведения эксперимента. Результаты и положения работы докладывались и обсуждались на следующих научных конференциях:

- XXV Saratov Fall Meeting 2021 (27.09-1.10.2021, Саратов, Россия);
- 13th International Conference Dynamical Systems Applied to Biology and Natural Sciences (DSABNS) (8-11.02.2022, Bilbao, Spain [online]);
- VII Съезд биофизиков России (17-23.04.2023, Краснодар, Россия);
- AIMECS 2023. 14th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (25-28.06.2023, Seoul, South Korea);
- XII-й Конгресс «Национальной Ассоциации Фтизиатров», посвященный 100-летию со дня основания Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (20-23.11.2023, Санкт-Петербург, Россия);
- TransMat 2K24: International Conference on Translational Materials for Sustainable Technology (1-4.02.2024, Varanasi, India).
- IUPAB2024: 21st Congress of the International Union for Pure and Applied Biophysics & 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (24-28.06.2024, Kyoto, Japan).

Научная новизна результатов проведенного исследования

Все положения и результаты диссертации, выносимые на защиту, обладают новизной, в частности:

- впервые установлено, что накопление резорфина за счет дыхательной активности медленно растущей культуры *M. tuberculosis* в условиях протокола резазуринового теста в микропланшетах (REMA) 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 BASTEC 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.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в развитии подхода, дающего возможность количественной характеристики роста культур микроорганизмов на базе колориметрической индикации в ходе резазуринового теста, который до

настоящего времени рассматривался как качественный критерий; выявлении на основе разработанного метода и альтернативного ему количественного флуориметрического подхода особенностей интерпретации оптических кривых отклика на дыхательную активность микроорганизмов – возникновения нестационарной спонтанной синхронизации в колониеобразующих культурах *M. tuberculosis* при их больших начальных концентрациях в пробе и специфики количественного учета соответствия масштабов времени клеточного деления и кинетических констант химической реакции, протекающей в индикаторной среде.

Практическая значимость работы состоит, 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 флуориметрического оборудования, повышая тем самым доступность соответствующих тестов для системы здравоохранения.

Ценность научных работ соискателя

Ценность научных работ соискателя заключается в оригинальности полученных результатов. Подтверждением этому является публикация этих работ в рейтинговых международных журналах.

Полнота изложения материала диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени

Основные материалы диссертации полностью изложены в следующих работах:

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых Scopus и Web of Science

1. 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.
2. Sychev A.V., Lavrova A.I., Dogonadze M.Z., Postnikov E.B. Establishing compliance between spectral, colourimetric and photometric indicators in Resazurin reduction test. Bioengineering. 2023. V. 10:962.
3. Lavrova A.I., Dogonadze M.Z., Sychev A.V., Manicheva O.A., 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. V. 8:208.

Статья в трудах конференции, проиндексированная Scopus

4. Sychev A.V., Belenkov R.N., Ukolov D.N., Budaev A.V., Lavrova A.I., Postnikov E.B. Revealing kinetics of chemical transitions in colorimetric indicators of microorganisms growth based on photometric data from a portable microbiological analyser. Proceedings of SPIE. 2022. V. 12194: 121940Z.

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ

5. Беленьков Р.Н., Уколов Д.Н., Будаев А.В., Сычев А.В. Программа обработки результатов экспериментов, полученных с портативного микробиологического анализатора. // Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2023619711, 15.05.2023.

Патенты на изобретения

6. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догонадзе М.З., Комарова К.Ю., Виноградова Л.В., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 8-(4-Метил-4Н-1,2,4-триазол-3-ил)-6-(метилсульфонил)-2-(5-нитро-2-фурил)-2,6-дiazаспиро[3.4]октан, обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его

получения. // Заявка № 2023123064 на получение патента РФ от 04.09.2023. Решение о выдаче патента РФ от 12.07.2024.

7. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догондзе М.З., Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-циклогексил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фуоро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения // Заявка № 2023123605 на получение патента РФ от 11.09.2023. Решение о выдаче патента РФ от 10.07.2024
8. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догондзе М.З., Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-пропил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фуоро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. // Патент РФ № RU 2 824 817, дата регистрации 14.08.2024.
9. Лукин А.Ю., Виноградова Т.И., Догондзе М.З., Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Дарьин Д.В., Лаврова А.И., Постников Е.Б., Сычев А.В., Яблонский П.К. 1-[(5-нитрофуран-2-ил)карбонил]-2'-фенил-1Н,7'Н-спиро[азетидин-3,5'-фуоро[3,4-d]пиримидин], обладающий противотуберкулезной активностью в отношении возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, и способ его получения. // Патент РФ № RU 2 824 815, дата регистрации 14.08.2024.

Прочие публикации – тезисы докладов на конференциях

1. Sychev A.V., Lavrova A.I., Postnikov E.B. Quantitative correspondence between drug-response curves in the REMA test measured fluorometrically and colourimetrically // IUPAB2024: Abstract Book, Kyoto, 2024. P. 835.
2. Sychev A.V., Lavrova A.I., Postnikov E.B. Quantitative colourimetry as an inexpensive alternative to spectrofluometry for drug response screening

- // TransMat 2K24: International Conference on Translational Materials for Sustainable Technology. Abstract Book. IIT (BHU) Varanasi, 2024. P. 50.
3. Sychev A.V., Lavrova A., Dogonadze M., Postnikov E. Interplay Between Coupled Chemical, Biochemical, and Colorimetric Processes as a Basis for Fast Drug Activity Screening with a Portable Analyzer // AIMECS 2023. 14th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Abstract Book. New Era of Medicinal Chemistry: Challenges and Opportunities. Seoul, 2023. P.180--181.
4. Сычев А.В., Лаврова А.И., Догонадзе М.З., Постников Е.Б. Колориметрический метод определения роста микобактерий и МИК с использованием нового портативного микробиологического анализатора // VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов. В 2-х томах. Том. 2. Краснодар, 2023. С. 210.
5. Sychev A.V., Belenkov R.N., Ukolov D.N., Budaev A.V., Lavrova A.I., Postnikov E.B. Microbial population growth indication by coupled electro-optical and chemical dynamic systems // 13th International Conference Dynamical Systems Applied to Biology and Natural Sciences (DSABNS): Book of Abstracts. Basque Center for Applied Mathematics, Bilbao, 2022. P. 347--349.

Специальность, которой соответствует диссертация

Содержание диссертационной работы соответствует специальности 1.5.2 – Биофизика (отрасль науки – физико-математические) по направлению исследований п. 1.4 «Биофизика сложных систем: медицинская биофизика» и п. 4 «Теоретическое и экспериментальное исследование физических процессов, протекающих в биологических системах разного уровня организации».

Заключение

Представленная Сычевым Александром Владимировичем диссертационная работа является научно-квалификационной работой, в которой

на основании выполненных соискателем исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение важной задачи в области биофизики, связанной с разработкой новых экспериментальных методов исследования популяций микроорганизмов и биофизической интерпретации получаемых на их основе данных.

Таким образом, диссертационная работа Сычева Александра Владимировича на тему «Количественный анализ характеристик бактериального роста на основе колориметрических данных» полностью отвечает критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в действующей редакции) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Заключение принято на заседании Научно-исследовательского центра физики конденсированного состояния КГУ (протокол № 1 от « 8 » 07 2024 г.).

Присутствовало на заседании НИЦ ФКС 6 чел., из них 2 доктора физико-математических наук и 4 кандидата физико-математических наук.

Результаты голосования:

«ЗА» – 6,

«ПРОТИВ» – 0,

«ВОЗДЕРЖАЛСЯ» – 0

Неручев

Неручев Юрий Анатольевич,
научный руководитель
научно-исследовательского центра физики
конденсированного состояния КГУ
доктор физико-математических наук,
профессор

