

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России

410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112, СГМУ

«Утверждаю»

Ректор государственного  
бюджетного образовательного  
учреждения высшего  
профессионального образования  
«Саратовский государственный  
медицинский университет им.  
В.И. Разумовского» Минздрава  
России

д. м. н., профессор

В.М. Попков



2015 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России на диссертацию Ерохина Павла Сергеевича «Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Диссертационная работа П.С. Ерохина «Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы» направлена на развитие диапазонов использования методов атомно-силовой микроскопии для исследования

микроорганизмов, в частности, с целью определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы.

Методы атомно-силовой микроскопии обладают высокой практической значимостью для высокоточных методов сканирующей зондовой и туннельной микроскопии при визуализации пространственной структуры различных биологических объектов. Понимание процессов взаимодействия зонд-образец в процессе сканирования методами сканирующей зондовой микроскопии и, в частности, атомно-силовой микроскопии, эффектов, влияющих на качество АСМ изображений, а также достоверность получаемых результатов, позволяет оптимизировать процесс сканирования с использованием атомно-силового микроскопа для актуальных задач измерений и визуализации. Специальная математическая обработка изображений открывает дополнительные возможности при визуализации субклеточных структур микроорганизмов в различных режимах сканирования в оптимальных диапазонах сканирования. Кроме того, применение методов атомно-силовой микроскопии позволяет определять ряд параметров, несущих информацию об изменениях в геометрических, морфологических, механических свойствах микроба в неблагоприятных условиях существования. Все это обуславливает актуальность данной диссертационной работы.

В диссертационной работе П.С. Ерохина получен ряд новых результатов практического применения атомно-силовой микроскопии.

1) Предложен алгоритм оптимизации основных параметров сканирования микроорганизмов в режимах прерывистого и непрерывного контакта АСМ, позволяющих получать максимальную информацию об объекте исследования. Разработанный алгоритм позволяет минимизировать артефакты механической природы и шумы аппаратуры при исследовании микробиологических объектов, что повышает достоверность, воспроизводимость и точность получаемых данных об объекте исследования.

2) Разработана методика обработки микробиологических объектов с использованием модуля Image Analysis. Эта методика включает этапы, способствующие получению объединенного изображения более высокого качества и содержащего полную информацию об объекте исследования. С использованием разработанного подхода более четко показаны поверхностные структуры микробов – пили, жгутики, капсула.

3) Введен комплекс трех количественных показателей (индекса I, шероховатости бактериальной клетки, силы адгезии), который позволяет достоверно и объективно выявлять различия в морфологических, геометрических и механических характеристиках, как отдельных клеток, так и бактерий, подвергшихся действию различных факторов внешней среды – биотических и абиотических, а также организованного сообщества микроорганизмов.

Экспериментально обоснован выбор метода фиксации микроорганизмов. Показано, что денатурирующие фиксаторы способствуют разрушению клеток, а аддитивные методы обеспечивают предпочтительный режим фиксации, который позволяет, с одной стороны надежно фиксировать микроорганизм, с другой – максимально сохранить его морфологию и ультраструктуру. Для спорообразующих микробов предложено использование 5% глутарового альдегида.

Автором проведено изучение влияния некоторых факторов на формирование бактериальной биопленки. На первом этапе проведено определение чувствительности бактерий к антибиотикам на примере кишечной палочки и антибиотика широкого действия Цефазолин-АКОС. Показано, что комплекс биофизических параметров позволяет в течение короткого промежутка времени воздействия препарата (30-60 минут) оценить изменения клеток, подвергшихся воздействию препарата.

На втором этапе проводилось исследование влияние кислотного и «щелочного» стресса на образование биопленки *E.coli*. Для этого использовался 0,1 М раствор хлорида натрия и 2% раствор гидрокарбоната

натрия. Показано, что в данных условиях эксперимента подобного воздействия недостаточно для запуска начальных этапов формирования биопленки. Однако, показано фиксирующее действие низких значений рН среды и гетерогенные изменения структуры микробной клетки кишечной палочки при выраженном щелочном значении среды.

Зарегистрировано образование биопленки под влиянием небольших доз антибиотика. Выявлены различия биофизических показателей биопленки микроорганизмов с использованием комплексного подхода на основе режимов прерывистого и непрерывного контакта АСМ, позволяющего охарактеризовать бактерии, участвующие в начальных этапах формирования биопленок и выявить более мелкие их структуры

4) Оценено воздействие поверхностных белковых структур на альтернативные подложки – мембраны из хитозана. Показано, что активность мембран из хитозана определяется наличием пор на его поверхности, которые формируются при модификации белковыми структурами, а также наличием областей с различными коэффициентами трения.

Полученные в диссертационной работе результаты обладают теоретической и практической значимостью. Результаты работы были учтены при составлении:

- методического документа федерального уровня (Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I-IV групп патогенности»), утвержденных главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации;

- методических рекомендаций «Оптимизация параметров исследования микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии», утвержденном Ученым Советом и директором РосНИПЧИ «Микроб».

Кроме того, представленные результаты могут быть использованы при выполнении научных исследований в лабораториях, использующих методы атомно-силовой микроскопии для визуализации и характеристике субклеточных структур микроорганизмов.

По диссертации П.С. Ерохина имеются некоторые замечания.

- 1) В работе проводились исследования по воздействию препаратов, повреждающих клеточную стенку микроба. Непонятно, возможно ли определение чувствительности к антибиотикам ингибиторам синтеза нуклеиновых кислот, подавляющих синтез пуринов.
- 2) Процесс образования биопленок длительный, сложный процесс, поэтому желательно проводить исследование не только начальных этапов формирования микробных сообществ, а весь процесс полностью.
- 3) В представленной диссертационной работе имеются некоторые стилистические погрешности.

Отмеченные недостатки не снижают общий высокий уровень проведенных исследований. Основные результаты диссертации отражены в 22 научных работах, 5 из которых опубликованы в рецензируемых изданиях, установленных Министерством образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Диссертация П.С. Ерохина «Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы» является законченной научно-квалификационной работой, которая соответствует специальности 03.01.02 – биофизика. Диссертация удовлетворяет требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а сам автор, Павел Сергеевич Ерохин, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Диссертация П.С. Ерохина, автореферат и отзыв обсуждены и одобрены на научной конференции кафедры медбиофизики им. проф. В.Д. Зернова ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России (протокол № 3 от 31 марта 2015 г.).

Зав. кафедрой медбиофизики  
им. проф. В.Д. Зернова  
СГМУ им. В.И. Разумовского,  
к.ф.-м.н., доцент

**В.А. Дубровский**

