

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Горина Дмитрия Александровича

на диссертационную работу Шельгиной Светланы Николаевны «Спектрально-селективная инактивация бактерий инфракрасным излучением фемтосекундного лазера», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19 – Лазерная физика.

Диссертация Шельгиной Светланы Николаевны посвящена исследованию воздействия фемтосекундных лазерных импульсов среднего инфракрасного диапазона на патогенные микроорганизмы в аспекте их инактивации и выяснению физических механизмов данного процесса.

Рост антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, представляющий собой одну из наиболее острых проблем современного здравоохранения, определяет высокую актуальность исследований, направленных на разработку альтернативных способов антимикробного воздействия. В этом контексте особый интерес представляют физические методы инактивации, основанные на использовании излучения, поскольку они позволяют обеспечивать требуемый антимикробный эффект бесконтактно, без применения химических агентов, способных вызывать формирование резистентности и загрязнение окружающей среды. Существует множество методов инактивации излучением, каждому из которых свойственны определенные ограничения, среди которых низкая эффективность, низкая проникающая способность и риски для клеток млекопитающих. Переход к селективным лазерным источникам среднего ИК-диапазона, способным адресно возбуждать колебательные моды функциональных групп (C–H связи при $\sim 3,4$ мкм и амидные группы белков при ~ 6 мкм), открывает возможности для энергоэффективной, спектрально-селективной инактивации. В свою очередь, использование фемтосекундных лазерных импульсов с резонансными длинами волн, исследованное в данной диссертации, позволяет реализовать многоступенчатое селективное возбуждение высоких колебательных уровней без кумулятивного нагрева. В диссертации впервые продемонстрирована возможность инактивации патогенных бактерий фемтосекундными лазерными импульсами с резонансными длинами волн и изучены ее механизмы методом динамической спектроскопии пропускания фемтосекундных лазерных импульсов. Выполненное в диссертации

экспериментальное и спектроскопическое исследование спектрально-селективной инактивации бактерий фемтосекундным ИК-излучением является актуальным и создает основу для разработки новых физических методов стерилизации и способствует пониманию процессов в смежных областях биофотоники, например, в лазерной хирургии.

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка цитированной литературы из 201 наименования. Объём работы – 131 страница, включая 32 рисунка и 4 таблицы.

Во введении диссертации обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, раскрыты научная новизна, практическая значимость полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту, а также приведены сведения о степени достоверности и апробации результатов исследования.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы, посвящённой современным подходам к инактивации микроорганизмов с использованием различных видов излучения. Рассмотрены физические механизмы соответствующих воздействий, а также их основные приложения и ограничения. На основании проведенного анализа обоснован выбор фемтосекундных лазерных импульсов среднего инфракрасного диапазона как наиболее перспективного метода инактивации.

Во второй главе описаны объекты и методы исследования: экспериментальные установки и оборудование, исследуемые образцы (микробиологические культуры, подложки), методики проведения экспериментов, а также методы обработки данных (микробиологический, оптический, структурный анализ, квантово-химическое моделирование).

В третьей главе представлены результаты экспериментального исследования инактивации патогенных бактерий при селективном возбуждении фемтосекундными импульсами среднего ИК-диапазона. Рассмотрены особенности инактивации грамположительных и грамотрицательных патогенных микроорганизмов на резонансных длинах волн 3,4 и 6 мкм и длине волны 5,2 мкм, поглощение на которой слабо выражено. Проанализирована спектральная зависимость порога инактивации, а также показана возможность обработки бактерий под полиэтиленовой плёнкой. Сделан вывод о более локальном воздействии импульсов с длиной волны 6 мкм на белки и нуклеиновые кислоты в клетке, по сравнению с

импульсами с длиной волны 3 мкм, поглощающимися С-Н связями, равномерно распределенными в объеме биополимера.

В четвертой главе представлены результаты спектроскопического исследования молекулярных механизмов инактивации на примере бактерий *P. aeruginosa* при резонансном поглощении фемтосекундных лазерных импульсов среднего инфракрасного диапазона. Рассмотрены изменения ИК-спектров бактерий при облучении на длинах волн 6 и 3,4 мкм в широком диапазоне интенсивностей. Подробно рассмотрен случай возбуждения импульсами с длиной волны 6 мкм, поскольку для излучения с данной длиной волны характерно локальное воздействие на белки и нуклеиновые кислоты. Для этого случая проанализирована динамика полос амидов I и II и показано, какие спектральные признаки связаны с денатурацией белков и нуклеиновых кислот в бактериальных клетках. На основе сопоставления экспериментальных данных с результатами квантово-химического моделирования обсуждается микроскопический механизм разрушения биомолекул при резонансном поглощении излучения фемтосекундных импульсов среднего ИК-диапазона и формулируются выводы, подтверждающие спектрально-селективный характер лазерной инактивации.

В заключительной части работы подводятся итоги исследования и приводятся основные результаты.

По тексту диссертационной работы имеются следующие замечания, вопросы и предложения:

1. Стр. 60. Автор использует для исследования инактивации микроорганизмов излучение с длинами волн в среднем ИК-диапазоне с частотами следования импульсов 1 кГц и 10 кГц. Чем был обусловлен выбор данных частот следования импульсов?
2. Стр. 63, рис. 2.7. Чем обусловлено уменьшение пропускания (просветление)?
3. Стр. 74, Автор работы показал, что пороговая интенсивность инактивации бактерий *P. aeruginosa* фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 3,4 мкм более чем в три раза превышает порог инактивации для импульсов с длиной волны 6 мкм. Чем обусловлена такая разница в интенсивностях? Во сколько раз отличается поглощение или оптическая плотность на данных длинах

волн для бактерии *P. aeruginosa*? Это отношение можно было бы получить из Рис. 3.4 и сравнить это отношение с отношением порогов инактивации для импульсов при 3,4 и 6 мкм.

4. Стр. 75, исследование порога инактивации от длины волны фемтосекундных импульсов среднего ИК-диапазона в отношении патогенных микроорганизмов *S. aureus* (золотистый стафилококк). Проводилось на трех длинах волн: 3,4 мкм (алифатические С–Н связи), 6 мкм (колебания амида I белков и нуклеиновых кислот) и 5,2 мкм (область слабого поглощения, выбранная для сравнения). Почему длина волны 5,2 мкм (область слабого поглощения, выбранная для сравнения) не использовалась в экспериментах по инактивации бактерий *P. aeruginosa*?
5. Стр. 80. Автор связывает темные области модификации размером ~100 нм с воздействием излучения (рис. 3.5в). Какие аргументы можно привести для доказательства данного факта?
6. Автор считает, что накопление энергии в амидных связях после термализации приводит к денатурации вторичной и третичной структуры белков и нуклеиновых кислот бактерий и гибели клетки. Для определения вторичной структуры белка и конформации белка полезно было бы применить метод кругового дихроизма.

Приведённые замечания носят характер уточнений и пожеланий, и не влияют на общую высокую оценку полученных результатов и уровня представленной диссертации. Диссертационная работа выполнена на актуальную тему. Представленные в работе научные положения, выводы и практические результаты в достаточной степени обоснованы. Полученные автором данные характеризуются научной новизной и практической ценностью. Основные результаты диссертации апробированы на всероссийских и международных научных конференциях и отражены в публикациях в рецензируемых научных изданиях. Достоверность результатов не вызывает сомнений и подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, а также корректным использованием современных методов исследования.

Список основных работ д.х.н. Горина Дмитрия Александровича по тематике диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет

1. D. Terentyeva, Z. Kozyreva, O. Gusliakova, P. Demina, A. Kosov, A. Sain, A. Abdurashitov, P. Proshin, S. German, D. Bratashov, G. Sukhorukov, D. Gorin, O. Sineeva, Macrophage-Mediated Delivery of Microcapsules for Enhanced Photodynamic Therapy of Colon Cancer, *Light: Advanced Manufacturing*, 2026, DOI: <https://doi.org/10.37188/lam.2026.002>
2. T. Torokhov, S. Perkov, M. Mokrousov, E. Prikhozhenko, M. Shkykov, E. Maksimov, I. Sergeev, S. Korchagin, E. Ershov, V. Shcheslavskiy, D. Gorin, Indocyanine Green -Based Test-Platform With Tunable Contrast for Optoacoustic and Fluorescence Lifetime Visualization, *Laser & Photonics Reviews*, p. e02094, 2025, DOI: <http://doi.org/10.1002/lpor.202502094>
3. S. German, V. Chernyshev, E. Moiseeva, D. Gorin, Photoacoustic monitoring of freezing-induced loading and freeze-casting processes, *Biomedical Optics Express*, vol. 16, no. 12, p. 4979--4992, 2025, DOI: <https://doi.org/10.1364/BOE.577321>
4. E. Vavaev, J. Cvjetinovic, E. Lyubin, Y. Bedoshvili, N. Davidovich, P. Lagoudakis, A. Fedyanin, D. Gorin, Laser tweezers manipulation of diatom chloroplasts and intracellular viscosity evaluation, *Applied Physics Letters*, vol. 127, no. 3, 2025, DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0266103>
5. S. Dyakov, J. Cvjetinovic, E. Maksimov, N. Davidovich, E. Statnik, Y. Bedoshvili, D. Dresvyankin, I. Fradkin, A. Salimon, P. Lagoudakis, A. Korsunsky, N. Gippius, D. Gorin, Talbot effect in nanostructured diatom frustules, *Optica*, vol. 12, no. 7, p. 1003--1013, 2025, DOI: <https://doi.org/10.1364/OPTICA.561663>
6. A. Savelyev, A. Sochilina, G. Babayeva, M. Nikolaeva, V. Kuziaeva, A. Prostyakova, I. Sergeev, D. Gorin, E. Khaydukov, A. Generalova, R. Akasov, Photocrosslinking of hyaluronic acid-based hydrogels through biotissue barriers, *Biomaterials Science*, vol. 13, no. 4, p. 980--992, 2025, DOI: <https://doi.org/10.1039/D4BM01174K>
7. V. Vorobev, O. Goryacheva, J. Skibina, A. Kozyrev, A. Smirnov, P. Lagoudakis, D. Gorin, Optical Properties Control of Hollow Core Microstructured Optical Fibers by Layer-by-Layer Assembled Quantum Dots and Annealing, *Annalen der Physik*, vol. 537, no. 5, p. 2400147, 2025, DOI: <https://doi.org/10.1002/andp.202400147>
8. S. Perkov, J. Cvjetinovic, A. Sydygalieva, S. Gorodkov, G. Li, D. Gorin, Optical Based Methods for Water Monitoring in Biological Tissue, *Journal of Biophotonics*, p. e202400438, 2025, DOI: <https://doi.org/10.1002/jbio.202400438>
9. A. Abalymov, M. Kurochkin, S. German, A. Komlev, E. Vavaev, E. Lyubin, A. Fedyanin, D. Gorin, M. Novoselova, Functionalization and magnetonavigation of T-lymphocytes functionalized via nanocomposite capsules targeting with electromagnetic tweezers, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 57, p. 102742, 2024, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2024.102742>
10. A. Korobov, Z. Besedovskaia, E. Petrova, A. Kurnikov, A. Glyavina, A. Orlova, S. Nemirova, I. Druzhkova, M. Sirotkina, E. Shirshin, D. Gorin, L. Xi, D. Razansky, P.

Subochev, SKYQUANT 3D: Quantifying Vascular Anatomy With an Open-Source Workflow for Comprehensive Analysis of Volumetric Optoacoustic Angiography Data, *Journal of Biophotonics*, vol. 17 , no. 11, p. e202400143, 2024, DOI: <https://doi.org/10.1002/jbio.202400143>

11. V. Zaytsev, M. Tutukina, M. Chetyrkina, P. Shelyakin, G. Ovchinnikov, D. Satybaldina, V. Kondrashov, M. Bandurist, S. Seilov, D. Gorin, F. Fedorov, M. Gelfand, A. Nasibulin, Monitoring of meat quality and change-point detection by a sensor array and profiling of bacterial communities, *Analytica Chimica Acta*, vol. 1320 , p. 343022, 2024, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.343022>

12. R. Noskov, A. Machnev, I. Shishkin, M. Novoselova, A. Gayer, A. Ezhov, E. Shirshin, S. German, I. Rukhlenko, S. Fleming, B. Khlebtsov, D. Gorin, P. Ginzburg, Golden vaterite as a mesoscopic metamaterial for biophotonic applications, *Advanced Materials*, vol. 33 , no. 25, p. 2008484, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202008484>

13. S. German, G. Budylin, E. Shirshin, D. Gorin, Advanced technique for in situ Raman spectroscopy monitoring of the freezing-induced loading process, *Langmuir*, vol. 37 , no. 4, p. 1365--1371, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02593>