

Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Мацшина Миколи Йосиповича

«РОЗРОБКА АФІННИХ БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКТУВАННЯ МУТАЦІЙ, ПОВ'ЯЗАНИХ З Ph'-ПОЗИТИВНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ ТА РЕЗИСТЕНТНИМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ»

представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Дисертаційна робота Мацшина Миколи Йосиповича присвячена розробці підходів до створення оптичного біосенсора для детектування мутацій в послідовностях ДНК, пов'язаних з Ph'-позитивною лейкемією, та імпедіометричного біосенсора для детектування мутацій послідовностей ДНК, пов'язаних з резистентними формами збудника туберкульозу. **Актуальність роботи** полягає в тому, що вона присвячена розробці приладів для діагностування резистентних форм туберкульозу та хронічної мієлоїдної лейкемії на ранніх стадіях за допомогою методів молекулярної біотехнології.

В 2014 у світі було діагностовано приблизно 480 тисяч випадків резистентних форм туберкульозу. Можливості їх лікування часто обмежуються малодоступністю і складністю його діагностики. Тому, розробка надійних, простих і швидких методів діагностики резистентних форм туберкульозу набуває особливої актуальності.

Хронічна мієлоїдна лейкемія – один з найбільш частих видів лейкемії, що діагностується у дорослих. Захворюваність нею становить у середньому 3,3 випадки на 100000 населення, а у осіб старше 65 років зростає до 20 на 100000 населення. 95% випадків цього захворювання супроводжується виникненням патогенного білка p210 Bcr-Abl, активність якого може бути подавлена інгібітором тирозин-кінази. Виявлення гібридного гена *bcr-abl*, транскрипція якого приводить до появи цього патогенного білка, стане запорукою успіху в лікуванні цього захворювання базуючись на ранньому діагностуванні.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає основному плану досліджень, що проводяться на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної теми № 11БФ07-03 «Фізико-хімічні механізми функціонування живого на різних рівнях організації» (№ держ. реєстрації 0111U007663, 2011-2015 рр.), бюджетної теми лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України № 2.2.4.22 «Розробка наукових засад створення афінних біосенсорів на основі біологічних молекул та біоміметиків» за 2013-2017рр., теми № 99-Н «Дослідження взаємодії нуклеїнових кислот з нанокристалічними напівпровідниками для створення нових біонаноструктурованих матеріалів, здатних розпізнавати біологічно важливі маркери спадкових захворювань», що виконувалась в рамках проекту цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій» (№ держ. реєстрації 0110U006055 на 2010-2014 рр).

Результати роботи були використані для реалізації проекту № 20/2 «Розробка, експериментальна апробація та метрологічна атестація приладу-сенсора на основі ефекту локалізованого поверхневого плазмонного резонансу у масивах наноструктур золота та срібла. Дослідна експлуатація та метрологічне забезпечення комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002508, 2013-2017 рр.). Частина роботи була також виконана в рамках міжнародного проекту «Integrated nanodevices» 7-ї рамкової програми ЄС (2013-2015 рр., номер PIRSES-GA-2012-318524). Крім того, частину роботи було виконано в рамках проекту НТЦУ (№6044, 2015-2017рр.) «Розробка «розумних наноносіїв» на ефекті фототеплового плазмонного підсилення для цільової доставки ліків в організмі людини».

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Робота ґрунтується на значному обсязі експериментального матеріалу, виконана на сучасному науковому і методичному рівні. Особливо варто відзначити, що робота виконувалась в тому числі і в міжнародному партнерстві, про що свідчать походження окремих матеріалів та імена співавторів публікацій. В даній роботі вперше було розроблено два ДНК-біосенсиори: на основі спектроскопії поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для детектування наявності гібридного гена *bcr-abl* та електрохімічний (імпедіометричний) для виявлення мутації в гені *rpoB* *Micobacterium tuberculosis*, вперше створено їхні лабораторні макети та апробовано в модельних розчинах, досліджено варіанти покращення робочих характеристик. Крім того в роботі вперше було реалізовано концепцію термодискримінації повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів за допомогою геносенсора ППР з терморегульованою коміркою.

При виконанні роботи автор написав ряд програм для спрощення обробки даних та аналізу отриманих результатів. Приємне враження справляє їх різноманіття та сам підхід спрямований на автоматизацію та спрощення розроблених методів.

Практичне значення одержаних результатів

У результаті виконання дисертаційної роботи було створено лабораторний прототип імпедіометричного біосенсора, який може бути основою комерційного біосенсора для високоселективного розпізнавання послідовностей ДНК. За допомогою методу ППР було визначено рівноважні константи взаємодії послідовностей ДНК в гетерогенних умовах (на сенсорній поверхні). У співпраці зі співробітниками Інституту фізики напівпровідників НАН України ім. В.Є. Лашкарьова було створено і випробувано ППР спектрометр з системою контролю та регулювання температури для селективного розпізнавання повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів. Ці розробки є першим етапом в створенні

комерційного біосенсора здатного розпізнавати одонуклеотидні заміни в послідовностях досліджуваних генів. В роботі також продемонстровано метод розпізнавання ДНК-мішені по температурі плавлення її комплексу, та метод підсилення сигналу гібридизації ДНК за допомогою наночастинок золота. Ці методи здатні суттєво покращити роботу майбутнього біосенсора.

Розроблені біосенсори можуть бути використані для створення комерційної діагностичної системи, що забезпечить екстракцію, ампліфікацію і розпізнавання ДНК. Вона буде здатна діагностувати Ph'-позитивну лейкемію на ранніх стадіях та визначати збудників резистентних форм туберкульозу.

Особистий внесок здобувача. Викладені в дисертаційній роботі результати було отримано особисто здобувачем або за його безпосередньої участі.

Відповідність автореферату змісту дисертації. Автореферат адекватно відображає матеріали дисертації, які в достатній мірі віддзеркалюють основні отримані результати.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях. За темою дисертації опубліковано 7 статей у фахових наукових журналах та зроблено 7 доповідей на міжнародних конференціях. Серед семи наведених публікацій п'ять англійськомовних в міжнародних наукових журналах. Таким чином, дисертація пройшла повноцінну апробацію.

Оцінка мови і стилю дисертації. Дисертація в цілому написана грамотною науковою мовою.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, третього та четвертого розділу власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків і списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 125 сторінок машинописного тексту. Ілюстративний матеріал дисертації подано у вигляді 43 рисунків та 5 таблиць. Список використаної літератури охоплює 118 найменувань.

У вступі обґрунтовано актуальність проведених досліджень, визначено мету, завдання, об'єкт та предмет дослідження, наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, показано зв'язок теми роботи із науковими програмами та темами, зазначено особистий внесок та наведено перелік конференцій, на яких було апробовано результати роботи.

Розділ «Огляд літератури» складається з шести підрозділів, що описують усі положення роботи і утворюють вступ до експериментальної частини. Інформація в цьому розділі викладена логічно і відповідає тим питанням, які було розглянуто в дисертаційній роботі.

В розділі матеріали і методи дисертант описує використані в роботі типи електрохімічних перетворювачів, методи поверхневого плазмонного резонансу та електричної імпеданс-спектроскопії, методики створення біоселективних елементів геносенсорів, методи синтезу та модифікації наночастинок золота, розроблені програми для обробки результатів вимірювань.

У розділі 3 наведено результати розробки електрохімічного ДНК-сенсора, що здатний визначати мутації в гені *rpoB M. tuberculosis*, продемонстровано можливість з його допомогою селективного розпізнавання фрагментів гена *rpoB* з заміною в 531 кодоні.

Розділ 4 демонструє результати розробки біосенсора ППР для детектування мутацій в гібридному гені *bcr-abl*, описує методику селективного розпізнавання послідовностей ДНК за допомогою регулювання температури у вимірювальній комірці сенсора ППР та метод підсилення сигналу біосенсора ППР за допомогою наночастинок золота.

Аналіз та узагальнення результатів досліджень наведено в розділі 5. Він містить підсумки всіх отриманих результатів досліджень, та порівняння можливостей розробленого методу та інших вже існуючих методів. Викладене в цьому розділі логічно підводить роботу до її висновків, які обґрунтовані результатами і відповідають меті і завданням дисертаційної роботи.

Окремі дискусійні питання та зауваження до дисертації. У опонента є кілька зауважень до роботи, на які хотілось би отримати пояснення дисертанта:

- після прочитання роботи виникає певне непорозуміння щодо її актуальності, яка здається слабо аргументованою. Автор наводить графік (рис. 1.1) який демонструє зростання кількості публікацій по темі ДНК біосенсорів тільки до 2010 р, тим самим не розглядає динаміку останніх років. Складається враження, що список літератури дисертації містить дуже багато «застарілих» посилань, роботи від 2000 до 2016 року рідко цитуються в роботі;
- автор у дисертації не зазначає, який етап розробки ДНК сенсорів він провів. В роботі не вказано чи лежали в основі реальні зразки відповідних матеріалів від хворих і здорових людей;
- оскільки робота має безпосереднє відношення до збудника туберкульозу, *Mycobacterium tuberculosis*, а не до прояву симптомів хвороби, то у відповідних місцях тексту, а, особливо в назві слід було б наголосити на цьому;
- нажаль, у деяких «Висновках» не відображені конкретні результати, одержані в роботі. У першому з них, наприклад, не відображено які довжини олігонуклеотидних проб необхідні для розпізнання гібридного гена *bcr-abl* і мутованого гена *groV*;
- В роботі є невідповідності скорочень загальноприйнятим правилам. Наприклад при першому згадуванні *Mycobacterium tuberculosis* не потрібно скорочувати, крім того наявна невідповідність між скороченням і розшифруванням при першому згадуванні для МРТБ та ДВРР. Крім того, ці два скорочення не внесені в список скорочень.

Зрозуміло, що наведені зауваження не знижують загальної високої оцінки розглянутої роботи.

Висновок. Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну одержаних результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Мацишина Миколи Йосиповича «Розробка афінних біосенсорних систем для детектування мутацій, пов'язаних з Rh'-позитивною лейкемією та резистентними формами туберкульозу» **повністю відповідає вимогам** постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 “Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,

Завідувач відділу молекулярної генетики бактеріофагів

Інституту мікробіології і вірусології

імені Д.К. Заболотного НАН України

доктор біологічних наук,

член-кореспондент НАН України

старший науковий співробітник.

Ф. І. Товкач

Підпис зав. відділу молекулярної генетики бактеріофагів,

д.б.н., с.н.с., чл.-кор. Ф. І. Товкач

ЗАСВІДЧУЮ

Вчений секретар

Інституту мікробіології і вірусології

імені Д.К. Заболотного НАН України

к.б.н.

О.В. Андрієнко

