

Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу Жибака Михайла Тарасовича “Розробка амперметричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Відомо, що клінічним проявам захворювання відповідає глибоко запущений комплекс порушень процесів обміну речовин на молекулярному та клітинному рівнях. Тому удосконалення методів визначення вмісту та концентрації низькомолекулярних метаболітів в біологічних рідинах належить до провідних напрямків молекулярної діагностики. Подібні підходи дають змогу виявити захворювання на ранніх стадіях, оцінити перебіг патогенезу та діагностувати його можливі загострення. До визнаних молекулярних маркерів групи захворювань печінки та нирок належать креатинін, сечовина, іони амонію, L-аргінін та холін. Через притаманний цим захворюванням високий рівень летальності швидкість виявлення змін концентрації цих метаболітів в крові набуває високої актуальності, оскільки дає змогу запобігти різкому та незворотному загостренню. Водночас існуючі методи мало придатні для практичного застосування, що в першу чергу зумовлено високою вартістю відповідного обладнання. Тому в медичній діагностиці дедалі ширшого застосування набувають біосенсорні методи, що дають змогу швидко, недорого та відносно просто визначати вміст критичних метаболітів безпосередньо в діагностичній лабораторії. Щоправда, простота застосування не означає простоти створення відповідних біосенсорів, що істотно обмежує розповсюдження та застосування останніх. Зокрема, практично придатні біосенсорні експрес-системи для визначення рівня згаданої групи метаболітів є дефіцитними або відсутніми взагалі. Відомі лабораторні прототипи мають цілу низку недоліків, що істотно обмежують чи виключають взагалі їх практичне застосування. Тут і складність збереження активності ферментів за їх іммобілізації на поверхні датчика, і вкрай небажана чутливість до впливу супутніх речовин, і необхідність спільного застосування двох і більше ферментів, і низька операційна стабільність. Тому тема даної роботи – розробка амперметричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах – видається актуальною і заперечень не викликає.

Відповідно до теми поставленої роботи сформульовано мету – створення амперметричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення в біологічних рідинах зазначених низькомолекулярних метаболітів. Для досягнення поставленої мети сформульовано групу практичних завдань, що включала розробку методів електрохімічної модифікації поверхонь комерційних друкованих електродів нанокompозитами на основі золь-гелів, електропровідних полімерів,

іономерів, вуглецевих наноматеріалів, наночастинок металів та оксидів металів, удосконалення методів іммобілізації ферментів на поверхні електродів дослідження структурних та аналітичних характеристик створених електродів, конструювання лабораторних прототипів моноферментних амперометричних сенсорів для визначення зазначених метаболітів, оптимізацію характеристик створених амперометричних біосенсорів при роботі з сироваткою та плазмою крові у порівнянні зі стандартними методами. Подібна деталізація видається виправданою і свідчить про заплановану складну як за напрямками, так і за застосованими методами роботи.

Дисертація побудована за традиційною схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини та обговорення одержаних результатів, висновків, списку використаних літературних джерел. Огляд літератури свідчить про належне ознайомлення автора з найсучаснішими матеріалами з питань, що стосуються запланованої роботи. Заслуговує на схвалення й методична частина, що містить широкий набір сучасних біохімічних і біофізичних методів і, що істотно, невід'ємно пов'язана з їх удосконаленням. Варто відмітити й виконання частини експериментів у співпраці з Центром біосенсорів і біоелектроніки університету м.Лінчопінг (Швеція).

Внаслідок проведеної роботи отримано вагомі результати, що мають як науково-пізнавальне, так і практичне значення. Виявлено особливості іммобілізації холіноксидази на поверхні електродів в білковій мембрані з багат шаровими нанотрубками та за електронанесення в силікатному золі. Вперше розроблено моноферментний амперометричний сенсор для визначення концентрації аргініну на основі рекомбінантної аргініндеімінази та амоній-чутливого електроосаженного поліанілін/нафіон композиту. Вперше на основі електроосаджених частинок міді, нафіону та електрополімеризованого поліаніліну розроблено нанокompозит, чутливий до іонів амонію. Створений нанокompозит застосовано для розробки моноферментних сенсорів на основі креатиніндеімінази та уреазі для визначення креатиніну і сечовини відповідно у зразках сироватки крові людини. Створено лабораторні прототипи амперометричних біо/хемосенсорів для експрес-аналізу зазначеної групи клінічно інформативних метаболітів та успішно проведено їх апробацію на реальних зразках. В порівнянні з загальноживаними методами доведено високу селективність і чутливість створених біосенсорів, що істотно полегшує процедуру відповідних аналізів.

Обрахунки отриманого експериментального матеріалу проведено належним чином і заперечень не викликають. Висновки повною мірою відповідають отриманим результатам, хоча і видаються дещо переважаними фактичним матеріалом. Автореферат дисертації оформлений належним чином і повною мірою відповідає змісту роботи. Матеріали дисертаційної роботи опубліковано в 5 статтях у фахових

журналах, неодноразово доповідались на вітчизняних та міжнародних наукових з'їздах та конференціях.

Принципових зауважень до роботи немає. Щоправда, існує кілька зауважень та запитань, на які хотілось би отримати відповідь. Неможна погодитись з автором щодо віднесення аргініну до замінних амінокислот (с.35), оскільки біосинтез останнього є вік-залежним процесом, що з роками практично сходить нанівець і має надходити до організму з їжею. Подібні амінокислоти називають умовно-замінними. Стосовно визначення L-аргініну, хотілось би почути думку автора з наступного питання. Відомо, що за винятком гліцину всі протеїногенні амінокислоти належать до L-ряду. Однак згідно даних останніх десятиліть в організмі присутні й D-амінокислоти, що метаболізуються абсолютно відмінними від L-амінокислот шляхами. Інколи їх буває досить багато – до 10% у випадку аргініну. Якою мірою стерична специфічність застосованих автором ферментів впливає на можливий вплив D-амінокислот на відгук сенсора? Чим автор пояснює ефекти, досягнуті завдяки застосуванню нанорозмірних часток? Стосовно методичної частини, варто зазначити, що іммобілізація ферментів виявляє подвійний ефект. З одного боку, вона стабілізує іммобілізовану білкову молекулу, однак вона ж є вагомим денатуруючим чинником, що виявляється в інактивації багатьох ферментів. Класичним прикладом останнього є уреаза, що за іммобілізації втрачає значну частину активності. Чому при виконанні роботи не застосовано іммобілізації в присутності стабілізуючих лігандів – субстратів чи їх структурних аналогів, обмежившись лише старовинними багатоатомними спиртами? Застосування лігандів-стабілізаторів напевне сприяло б як зростанню активності іммобілізованих ферментів, так і збереженням ними операційної стабільності. На відміну від автореферату, дисертаційній роботі притаманні певні недоліки оформлення. По тексті зустрічаються повтори, невдалі та нековирні фрази (відмічено по тексту). Впадає в око більш ніж вільне обходження автора зі знаками пунктуації. Коми десь щедрою рукою розсипані по тексті дисертації де не треба, а десь, навпаки, пропущені. Володіти та демонструвати може лише жива істота, а різноманітні неживі об'єкти можуть лише виявляти якісь там властивості чи про щось-там свідчити. Неодноразово вживане автором написання ковалентного зв'язку амін-амін $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ взагалі-то відповідає формулі гідразину. Що таке ІБК НАНУ (С.39, 41)? Матеріали, наведені на Рис. 4.4 (С.84) та графіках Рис. 5.11 (С.105) 6.2-6.5 (С.114-116) видаються недостатньо інформативними, хоча, можливо, в кольоровому вигляді цей недолік зникне.

Як видно, зроблені зауваження не впливають на високу оцінку роботи в цілому. Вважаю, що розглянута дисертаційна робота є цілісною, закінченою науковою працею, що повною мірою відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуюються до

кандидатських дисертацій, а її автор - Жибак Михайло Тарасович - заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент -

завідувач лабораторії біохімії
ДУ "Інститут отоларингології
ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України"
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Верьовка С.В.



Підпис *Верьовка С.В.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. відділом кадрів *С.В. Верьовка*

