

**Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу  
Топольнікової Ярослави Віталіївни  
«Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення  
концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах для клінічної  
діагностики», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата  
біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія**

**Актуальність теми.** Біотехнологія являє собою одну з найбільш прогресуючих галузей наукової та науково-технічної діяльності людства. Досягнення у галузі природничих наук, передусім – у біології, відкривають все нові й нові властивості біологічних об'єктів (акаріотів, прокаріотів та еукаріотів), що одночасно є потенційними можливостями, реалізація яких приводить до появи нових біотехнологій. Один із напрямків біотехнології – аналітична біотехнологія – сконцентрований на розробці біоаналітичних методик та біоаналітичних пристроїв (передусім – біосенсорів).

Біосенсори знаходять все більш широке застосування у різних галузях науки, промисловості, сільського господарства, медицини та охорони здоров'я, оскільки дозволяють швидко і якісно аналізувати складні, багатокomпонентні суміші речовин.

Актуальність теми роботи обумовлена наступними міркуваннями. Сучасні досягнення біології, хімії та фізики дозволяють суттєво покращувати та вдосконалювати вже існуючі біоаналітичні методи. У той же час, до біосенсорів, що використовуються у медицині та фармації пред'являються дедалі суворіші вимоги, що також спонукає до пошуку нових наукових та науково-технічних підходів.

Для нашої країни залишається актуальним й покращення техніко-економічних показників такого роду продукції, з огляду на високу вартість біосенсорів імпортного виробництва.

**Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами.** Дисертаційна робота виконувалась в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках наступних проектів: «Розробка електрохімічних моно- та мультисенсорів для визначення основних метаболітів крові: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002509, 2013-2017 рр); «Підвищення інформативності та метрологічної надійності електрохімічних ферментних біосенсорних систем на основі сучасних матеріалів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005167, 2018-2022 рр).

**Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі.** Дисертація Топольнікової Я.В. являє собою завершену наукову роботу, яка має всі необхідні елементи: від обґрунтування актуальності та напрямків досліджень до детального аналізу отриманих результатів та висновків. Загалом робота характеризується логічною послідовністю викладення експериментального матеріалу та його аналізу, впорядкованою системою зв'язків між різними частинами роботи. Слід зауважити на прагненні автора до точності, лаконічності та однозначності при формуванні висновків.

Достовірність отриманих результатів підтверджується використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки експериментальних даних. Вибір тих чи інших методичних прийомів логічно обґрунтовано, передусім, саме з біотехнологічних позицій. Отримані автором результати проаналізовано та порівняно із результатами інших дослідників, описаними у науковій літературі.

Слід зазначити, що у дисертаційній роботі використано широкий арсенал сучасних методів досліджень. В роботі використовували методи амперометричної детекції зміни струму внаслідок ензиматичної реакції в біокаталітичному шарі біосенсорів, що супроводжується утворенням пероксиду водню. Для забезпечення селективності біосенсорів відносно інших (крім пероксиду водню) електроактивних речовин, використовували метод електрохімічної полімеризації фенілендіаміну на поверхні електродів. Для іммобілізації ензимів в біокаталітичному шарі використовували методи поперечного зшивання глутаровим альдегідом, фізичної адсорбції на шарі силікаліту, та інкапсуляції ензиму у складі полімеру PVA-SbQ. Як контрольний метод визначення лактату та пірувату у реальних зразках використовували спектрофотометрію.

**Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях.** Слід відзначити, що основні положення дисертаційної роботи знайшли широке висвітлення у низці наукових праць дисертанта. За темою дисертації опубліковано 12 наукових праць, серед яких 5 статей у фахових журналах України та інших країн (в тому числі 1 стаття в журналі, який входить до наукометричної бази Scopus), 7 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних науково-практичних конференціях та з'їздах. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

**Оцінка змісту дисертації та її завершеності.** Мета роботи та її цілі сформульовані чітко та логічно. Викладення експериментального матеріалу відповідає цілям роботи.

Дисертація складається із Вступу, Огляду літератури, Матеріалів та методів досліджень, 4 експериментальних розділів («Розробка лактат-

чутливого монобіосенсора», «Розробка піруват-чутливого монобіосенсора», «Поєднання монобіосенсорів у систему для одночасної роботи», «Використання розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату у зразках сироватки крові»), Аналізу та узагальнення результатів досліджень, а також Висновків, Списку використаної літератури, який охоплює 100 найменувань, та Додатків. Роботу викладено на 158 сторінках машинописного тексту та проілюстровано 46 рисунками та 6 таблицями.

Літературний огляд (розділ 1) присвячений медико-біологічним та біотехнологічним аспектам визначення концентрацій лактату і пірувату у біологічних рідинах. Особлива увага дисертанта приділена аналізу проблем та перспектив розробки мультибіосенсорних систем для одночасного визначенні кількох аналітів.

У розділі 2 здобувач ґрунтовно описує матеріали та методи, використані у дисертаційному дослідженні. Зокрема детально зупиняється на описі конструкції амперометричних перетворювачів, схем експериментальної установки для амперометричних вимірювань. Детально описано методики нанесення поліфенілендіамінової мембрани, формування біоселективних мембран, конструювання виготовлення мультибіосенсорного масиву, визначення концентрації лактату у реальних зразках сироватки крові за допомогою спектрофотометричного вимірювання. На достатньому рівні описано й методики статистичної обробки отриманих результатів.

У розділах 3-6 дисертантом наведено результати експериментальних робіт та їх первинний аналіз. Детально описано наступні принципіві блоки наукового обґрунтування біотехнології отримання та характеристики біосенсорних систем: 1) розробка лактат-чутливого монобіосенсора; 2) розробка піруват-чутливого монобіосенсора; 3) поєднання монобіосенсорів у систему для одночасної роботи; 4) використання розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату у зразках сироватки крові. Кожен із етапів роботи автор завершує проміжними висновками, які підтверджують виконання задач, що їх було поставлено під час планування дисертаційного дослідження.

У розділі 7 здобувач проводить ґрунтовний аналіз отриманих результатів та їх широке обговорення. Власні результати порівнюються із сучасними результатами інших дослідників, що працювали у аналогічною чи близькою тематикою. Висновки, які у повній мірі відображають наукову та практичну значимість дисертації, логічно завершують узагальнення отриманих результатів.

Автореферат у повній мірі відображає зміст дисертації.

**Наукова новизна роботи.** Здобувачем вперше проведено наукове обґрунтування біотехнології створення біосенсорної системи на основі

амперометричних платинових дискових електродів для селективного одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату та їхнього співвідношення. Запропоновано нову методику аналізу співвідношення концентрацій лактату та пірувату у зразках сироватки крові людини з метою розпізнавання відповідних патологічних станів, а саме лактатацидозу А або В типу, та диференційної клінічної діагностики патологічних станів у новонароджених.

**Практичне значення одержаних результатів.** Здобувачем створено лабораторні прототипи амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрацій лактату, пірувату та співвідношення лактат/піруват у сироватці крові людини. Продемонстровано ефективність застосування біосенсорної системи для визначення концентрацій лактату та пірувату у зразках біологічного матеріалу. Отримані дані можуть бути використані для виготовлення дослідно-промислових серій біосенсорів для лабораторної клінічної діагностики.

Об'єм та характер проведених досліджень є цілком достатніми для формування технічного файлу з метою оцінки відповідності розробленої біосенсорної системи вимогам Технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 754 (у частині наукової розробки виробу).

**Зауваження та побажання.** Ми не маємо принципових зауважень до дисертаційної роботи. У той же час, робота не позбавлена деяких недоліків. Під час аналізу роботи у нас виникли певні запитання до здобувача.

1. В огляді літератури автор подекуди використовує не найкращу форму подання інформації. Так, підрозділ 1.2 варто було б доповнити таблицею, присвяченою порівняльній характеристиці традиційних методів вимірювання концентрації (вмісту) лактату та пірувату. Рис. 1.1 (Методи іммобілізації ензимів у біосенсорах для вимірювання лактату та пірувату) є неінформативним. Більш логічним було б надати узагальнюючу таблицю із порівняльною характеристикою різних методи іммобілізації ензимів при розробці біосенсорів.

2. В огляді літератури у пункті 1.3.3 (Поширені проблеми при біосенсорному вимірювання реальних зразків) автор стверджує, що «біозабруднення та пасивацію можуть спричиняти багато речовин, присутніх в біологічних рідинах». Що здобувач має на увазі під «біозабрудненням» та «пасивацією»? Чи є такі терміни загальноновживаними?

3. Підрозділ 2.5 (Методика нанесення біоселективних мембран) містить серед іншого опис методики іммобілізації ензимів шляхом поперечного зшивання за допомогою глутарового альдегіду. Це власна методика автора чи запозичена із літератури? Чому використано саме такі концентрації глутарового альдегіду (0,7%, 0,5% та 0,3%)?

4. У підрозділі 3.3 (Забезпечення селективності перетворювачів до електроактивних речовин) для запобігання окиснення ряду електроактивних сполук автором було використано *полі-м-фенілендіамін* для формування захисної плівки. Чи існують інші полімери, які потенційно можуть бути використані з такою ж метою? У чому переваги обраного варіанту?

5. Підрозділ 3.5 (Вплив характеристик буферного розчину на роботу лактат-чутливого біосенсора). Для визначення впливу високої концентрації протеїнів на роботу біосенсора на основі лактатоксидази було використано БСА. Чи достатньо експерименту із цим єдиним протеїном для оцінки роботи біосенсора?

6. Підрозділ 3.6 присвячено визначенню стабільності лактат-чутливого монобіосенсора при безперервній роботі та при зберіганні. Автором визначено оптимальні умови для зберігання біосенсорів. Хотілося би порівняти такого роду умови для описаних у літературі біосенсорів чи комерційних аналогів. Такого роду порівняння дасть змогу оцінити отриманий дисертантом результат.

7. Підрозділ 5.3 (Вплив концентрації буферу на роботу біосенсорної системи – біосенсорна система для одночасного вимірювання лактату та пірувату). Обговорення рис. 5.5, на нашу думку, є неповним, доцільно додати значення абсолютного та/або відносного відхилення при відгуку біосенсора за різних концентрацій буферного розчину.

8. Підрозділ 5.7 (Аналітичні характеристики біосенсорної системи для визначення пірувату та лактату). Таблиця 5.1 містить серед іншого такий показник як стабільність при зберіганні (рівний 14 днів для обох біосенсорних систем – для вимірювання лактату та пірувату). Як така характеристика співвідноситься із іншими біосенсорними системами, описаними у літературі, та комерційними аналогами, що присутні на ринку?

9. У роботі подекуди зустрічаються невдалі вирази та елементи лабораторного жаргону (наприклад, «буфер» замість «буферний розчин» чи «клініка» замість «клінічна медицина»). У роботі знайдено чимало орфографічних помилок.

Сформовані зауваження не зменшують наукової та практичної значимості роботи, а наведені запитання мають, у тому числі, й дискусійний характер.

**Загальний висновок.** Таким чином, дисертаційна робота Топольнікової Ярослави Віталіївни «Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах для клінічної діагностики» являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка містить рішення актуального завдання щодо наукового обґрунтування конструкції високоінформативних біосенсорів. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Топольнікової Я.В. відповідає вимогам до дисертаційних робіт на здобуття

наукового ступеню кандидата наук, зокрема пп. 9 та 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (із змінами). Топольнікова Ярослава Віталіївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

**Офіційний опонент:**

Професор кафедри промислової біотехнології  
Національного технічного університету України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
МОН України, доктор біологічних наук, професор



О.Ю. Галкін

*Підпис д.б.н., професора О.Ю. Галкіна засвідчую:*

Учений секретар Національного технічного університету України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
МОН України, кандидат філософських наук, доцент



А.А. Мельниченко