

**Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу
Кучеренко Дар'ї Юрїївни
«Розробка та оптимізація глутамат-чутливого біосенсора для потреб
медицини та контролю якості харчових продуктів», представлену
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія**

Актуальність теми.

Розвиток сучасної біотехнології тісно пов'язаний із розробкою таких унікальних інструментів сучасної аналітики як біосенсори, які поєднують досягнення біохімії, імунології, мікроелектроніки тощо. Біосенсори прості у використанні, мають низьку собівартість при масовому виробництві, високу чутливість та селективність. Нині визнано, що біосенсори мають широкі перспективи використання у біотехнологічних виробництвах, екологічному моніторингу, медико-біологічних дослідженнях, клінічній діагностиці тощо.

Біосенсори можна успішно використовувати у медичній практиці для контролю за таким відомим нейротрансмітером як глутамінова кислота, адже відомо, що підвищення позаклітинної концентрації глутамату призводить до деяких неврологічних захворювань.

З іншого боку, розробка глутамат-чутливого біосенсора може бути перспективною для потреб біотехнологічних та харчових виробництв. Відомо, що глутамат натрію є популярною харчовою добавкою, яку використовують для посилення смакових якостей продуктів. І хоча глутамат натрію в якості харчової добавки дозволений для застосування, має низьку токсичність (LD_{50} глутамату становить 15-18 г/кг ваги, а LD_{50} кухонної солі - 3-4 г/кг ваги), відомі факти негативних наслідків вживання глутамату для здоров'я людини. Так, глутамат натрію викликає переїдання, провокує ожиріння, збільшує ризик виникнення серцево-судинних захворювань. Отже, контроль за вмістом глутамату в продуктах харчування є надзвичайно актуальним.

Дисертаційна робота Кучеренко Д.Ю., що присвячена розробці амперометричного глутамат-чутливого біосенсора та його адаптації для визначення вмісту глутамату в біологічних зразках та харчових продуктах є безсумнівно актуальною, що визначається як теоретичним, так і практичним значенням проблеми.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами.

Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ) в рамках бюджетної теми (НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних наноконструктивних комплексів») та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках конкурсних науково-дослідних проектів «Глутамат-чутливий біосенсор: оптимізація, дослідна експлуатація, розробка стратегії та

методології аналізу процесів активного транспорту глутамату в нервових терміналях головного мозку та тромбоцитах як периферичній моделі пресинапса в нормі та за умов нейропатологій» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ державної реєстрації 0113U002494, 2013-2017 рр.) і «Розроблення та оптимізація біосенсорної системи моніторингу нейромедiatorів для експрес діагностики та контролю ефективності лікування нейропатологій. Розділ 2. Розроблення, оптимізація та дослідна експлуатація біосенсорної смарт-системи моніторингу нейромедiatorів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ державної реєстрації 0118U005173, 2018-2022 рр.).

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих в роботі.

Дисертація Кучеренко Д.Ю. є завершеною науковою роботою, яка містить всі необхідні елементи: обґрунтування актуальності, вибір стратегії досліджень, ретельний аналіз отриманих результатів та формулювання висновків. Всі частини роботи пов'язані між собою послідовно та логічно.

Результати наукових досліджень одержано із застосуванням сучасних методів і представлено в дисертації у достатньому обсязі. Експериментальна частина роботи виконана із залученням біохімічних та електрохімічних методів дослідження ферментативних реакцій, методу іммобілізації ферменту, спектрофотометричного та радіоізотопного методів, що свідчить про адекватний поставленим завданням високий методичний рівень роботи.

Достовірність отриманих результатів підтверджується використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки експериментальних даних.

Отримані автором результати ретельно проаналізовано та порівняно з даними, отриманими у науковій літературі.

Висновки є лаконічними та смисловими і у повній мірі відображають отримані результати.

Зважаючи на все вище викладене, обґрунтованість наукових положень, висновків, сформованих в роботі, не викликає сумнівів.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях.

Положення дисертаційної роботи у достатньому обсязі викладено у низці наукових праць дисертанта. За темою дисертації опубліковано 12 наукових праць, серед яких 5 наукових статей у фахових наукових журналах України та інших країн (в тому числі 2 статті у журналах, які входять до наукометричної бази Scopus), 6 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, 1 патент України на винахід. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності.

Дисертаційна робота є рукописом і побудована за традиційним принципом. Дисертація складається зі «Вступу», «Огляду літератури», «Матеріалів та методів досліджень», трьох експериментальних розділів («Розробка амперометричного глутамат - чутливого біосенсора», «Розробка і використання методики біосенсорного визначення глутамату в зразках ізольованих нервових терміналей», «Використання глутамат - чутливого біосенсора для визначення концентрацій глутамату в продуктах харчування»), «Аналізу та узагальнення результатів досліджень», «Висновків» та «Списку використаних джерел», який охоплює 144 найменування.

Роботу викладено на 147 сторінках машинописного тексту, проілюстровано 39 рисунками та 6 таблицями.

У «Вступі» автором вказано на актуальність проблеми, визначено мету і завдання дослідження, розкрито наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи.

Розділ «Огляд літератури» містить аналіз літературних джерел за темою дисертаційної роботи. В «Огляді літератури» здобувач проаналізувала дані літератури щодо ролі глутамату у живому організмі та значення контролю вмісту глутамату в організмі людини при діагностиці деяких захворювань. Значної уваги приділено аналізу класичних методів та біосенсорному аналізу визначення вмісту глутамату в зразках різного походження.

Другий розділ («Матеріали та методи досліджень») присвячено детальному викладенню матеріалів і методів, які було використано для виконання дисертаційної роботи. Так, детально описано конструкцію амперометричних перетворювачів, методику модифікації поверхні електрода за допомогою поліфенілендіаміну, методику формування біоселективних елементів, методику амперометричних вимірювань, методику біосенсорного та спектрофотометричного визначення глутамату у зразках біологічних рідин та харчових продуктів, методику виділення синапсом з мозку щурів тощо. Адекватно представлено методи статистичної обробки отриманих експериментальних даних.

Результати експериментальної роботи викладено автором у третьому, четвертому та п'ятому розділах. Наприкінці кожного розділу зроблено висновки і вказано, в яких публікаціях висвітлено результати досліджень даного розділу.

Так, у третьому розділі «Розробка амперометричного глутамат - чутливого біосенсора» наведені експериментальні результати щодо покращення селективності амперометричного перетворювача за допомогою поліфенілендіамінової мембрани; підбору умов формування біоселективного елементу - концентрацій глутаматоксидази і глутарового альдегіду, часу іммобілізації; досліджено вплив на роботу біосенсора рН, іонної сили, буферної ємності буферного розчину; досліджено аналітичні характеристики розробленого біосенсора.

У четвертому розділі «Розробка і використання методики біосенсорного визначення глутамату в зразках ізольованих нервових терміналей» представлені результати досліджень процесів накопичення та вивільнення глутамату синаптосомами з допомогою біосенсорного аналізу та традиційних аналітичних методів.

У п'ятому розділі «Використання глутамат - чутливого біосенсора для визначення концентрацій глутамату в продуктах харчування» представлені результати експериментальних досліджень визначення концентрацій глутамату в соусах та приправах за допомогою біосенсора та контрольного методу.

В окремому розділі «Аналіз та узагальнення результатів» автор детально аналізує одержані результати, співставляючи їх з відомими літературними даними. В кінці розділу наведено економічні розрахунки виробництва розробленого амперметричного глутамат-чутливого біосенсора.

У «Висновках» дисертант формулює основні наукові надбання, які у повному обсязі відображають наукову та практичну значимість дисертаційної роботи.

Зміст автореферату у повній мірі відповідає основним положенням дисертації.

Наукова новизна одержаних результатів не викликає жодного сумніву, оскільки розроблений в даній роботі електрохімічний біосенсор на основі іммобілізованої ГлОД і платиного дискового електроду вперше було використано для визначення низьких концентрацій глутамату у зразках синапсом та досліджено процеси накопичення глутамату синаптосомами в ізольованих нервових терміналях.

Здобувачем вперше показано можливість створення глутамат-чутливого амперметричного біосенсора на основі глутаматоксидази та платиного дискового електроду, що знайшло своє підтвердження у патенті України № 113557 на винахід.

Перевірено вміст глутамату в деяких харчових продуктах, а також показано кореляцію результатів з результатами, отриманими за допомогою традиційного методу.

Практичне значення одержаних результатів.

Здобувачем створено лабораторний зразок біосенсора на основі амперметричного дискового платиного перетворювача та іммобілізованої ГлОД, призначеного для кількісного аналізу концентрацій глутамату в біологічних та харчових зразках. Автором продемонстровано можливість використання розробленого біосенсора для контролю вмісту глутамату у харчових продуктах. Розроблено новий метод створення біоселективних елементів біосенсора на основі глутаматоксидази, адсорбованої на мікрочастинках силікаліту. Для нейрохімічних досліджень здобувачем розроблено методику біосенсорного аналізу процесів накопичення та вивільнення глутамату в ізольованих нервових терміналях.

Зауваження та побажання.

При аналізі дисертаційної роботи Д.Ю.Кучеренко принципових зауважень наукового характеру не виникло. Хоча після ознайомлення дисертаційна робота справляє позитивне враження, необхідно висловити деякі зауваження і побажання.

1. У роботі зустрічаються некоректні вирази. Наприклад «мозковий метаболізм», «гарна відтворюваність відгуків», «гарна адсорбція ферменту», «фізіологічно важливі органи», «глутаматний транспорт». Також в тексті роботи є орфографічні помилки.

2. У «Огляді літератури» підрозділ 1.5. автор стверджує, що: «Визначення глутамату є необхідним ... для дослідження ролі глутамату поза нервовою системою, зокрема в тромбоцитах», а у розділі «Аналіз та узагальнення результатів» сказано, що: «ці клітини вважаються потенційними периферичними маркерами для аналізу порушень глутаматного транспорту у мозкових нейронах». Акцентування уваги на цьому є недоречним, адже в дисертаційній роботі не досліджували транспорт глутамату в тромбоцитах.

3. У підрозділі 2.4. «Формування біоселективних елементів» здобувач наводить схему поперечної зшивки ферменту і допоміжних речовин на поверхні амперометричного перетворювача, де в якості зшивального компоненту виступає глутаровий альдегід. У тексті дисертації не пояснено вибір саме такого зшивального компоненту для формування біоселективних елементів біосенсорів.

4. Чому при оптимізації розробленого біосенсора використовували різні концентрації глутамату (при дослідженні залежності величини відгуків біосенсора від іонної сили, рН буферного розчину – 100 мкМ, а при дослідженні операційної стабільності біосенсора використовували іншу концентрацію глутамату - 50 мкМ)?

5. У підрозділі 3.7.1. «Відтворюваність відгуків біосенсора при визначенні глутамату» було визначено, наскільки змінюється мінімальна межа визначення глутамату при роботі біосенсора впродовж дня. На графіках 3.11 - 3.12 по осі абсцис відкладено значення, які описано як «номери вимірювання» замість загальноприйнятого значення “час (хвилина, година тощо)”, що ускладнює оцінку відтворюваності відгуку біосенсора.

Слід зазначити, що наведені зауваження можуть бути предметом для обговорення на захисті, однак вони не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи Кучеренко Д.Ю.

Загальний висновок. Таким чином, дисертаційна робота Кучеренко Дар'ї Юріївни «Розробка та оптимізація глутамат-чутливого біосенсора для потреб медицини та контролю якості харчових продуктів» являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка містить рішення актуального завдання щодо розробки та створення амперометричного глутамат-чутливого біосенсора для визначення глутамату в біологічних зразках і харчових продуктах. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове та практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Кучеренко Дар'ї Юріївни відповідає вимогам до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеню кандидата наук, зокрема пп. 9 та 11 Порядку присудження наукових степенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами). Кучеренко Дар'я Юріївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Офіційний опонент:

Старший наковий співробітник,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Відділу колоїдної технології природних систем
Інституту біологічної хімії
ім.Ф.Д.Овчаренка НАН України

С.М. Дибкова

Підпис с.н.с., к.б.н., с.н.с. С.М.Дибкової засвідчую:

Учений секретар Інституту біологічної хімії ім.Ф.Д.Овчаренка
НАН України
кандидат хімічних наук



О.Ю.Войтенко