

ВІДГУК

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

Глутамат, іонізована форма глютамінової кислоти, є важливим метаболітом живих організмів, що виступає донором аміногруп в процесі біосинтезу ряду амінокислот, глутатіону, поліамінів, сечовини та інших сполук. В центральній нервовій системі ссавців глутамат є важливим збуджуючим нейромедіатором, що має пряме відношення до процесів розпізнавання, пам'яті, навчання. В той же час глутамат є попередником синтезу головного гальмівного нейромедіатора- γ -аміномасляної кислоти. Порушення транспорту глутамату в організмі людини супроводжується рядом патологічних неврологічних процесів.

Різкі зміни вмісту глутамату в організмі людини часто є наслідком патологічних процесів у печінці, серцево-судинній системі. Для корекції цих патологій застосовують деякі фармацевтичні препарати, а також ряд харчових продуктів, що можуть збагачуватись глутаматом. Враховуючи на це виникає необхідність розробки точного, простого і швидкого методу визначення глутамату для потреб медицини, фармацевтики і харчової промисловості.

Зважаючи на викладене, дисертаційна робота Д.Ю. Кучеренко, метою якої є розробка ферментного електрохімічного глутамат-чутливого біосенсора та його адаптація для визначення глутамату в біологічних зразках і харчових продуктах, є актуальною. Це підтверджується її зв'язком з тематикою робіт кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені

Тараса Шевченка та лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Для досягнення поставленої мети Д. Ю. Кучеренко застосувала значну кількість сучасних фізико-хімічних, біохімічних, молекулярно-біологічних, статистичних методів дослідження.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках, побудована за класичною схемою і включає вступ, розділ літературного огляду, розділ, в якому наведені матеріали та методи досліджень, три розділи, в яких викладені результати власних досліджень, розділ, що присвячений аналізу та узагальненню результатів досліджень, висновки та список цитованої літератури, що містить 144 посилання, з яких основна частина - іноземними мовами, а також додаток А, в якому приводиться перелік наукових праць автора дисертаційної роботи.

В літературному огляді дисертанткою наводиться ґрунтовний аналіз ролі глутамату в живому організмі, в функціонуванні центральної нервової системи ссавців. Вказується, що визначення глутамату є важливим в клінічній біохімії при діагностиці ряду захворювань, в фармакології, а також в харчовій промисловості, де глутамат додається у вигляді харчових добавок. Дисертанкою аналізуються сучасні методи визначення глутамату, які потребують вартісного обладнання, що не завжди дозволяє проводити аналіз в режимі реального часу. Акцентується увага на необхідності розробки та адаптації глутамат-чутливих біосенсорів для аналізу біологічних зразків і харчових продуктів.

Наукова новизна досліджень, їх значення для науки і практики

Наукова новизна результатів представленої дисертаційної роботи полягає в наступному. Д.Ю. Кучеренко розроблено амперометричний глутамат-чутливий біосенсор, відпрацьовані оптимальні умови іммобілізації глутаматоксидази на платиновому дисковому електроді. Показана

можливість створення глутамат-чутливого амперметричного біосенсора на основі глутаматоксидази, іммобілізованої на часточках силікаліту. Серед ряду досліджених підходів був обраний метод іммобілізації ферменту з використанням розчину глутарового альдегіду. Визначені оптимальні для роботи біосенсора співвідношення ферменту і глутарового альдегіду в біоселективній мембрані. Досліджені умови формування біоселективної мембрани на поверхні електрода, необхідні для усунування можливої інтерферуючої дії на роботу біосенсора інших речовин. Дисертанткою показано, що застосування поліфенілендіамінової мембрани значно покращує селективність перетворювача при визначенні глутамату в дослідних зразках.

Встановлені оптимальні показники ряду фізико-хімічних факторів для визначення вмісту глутамату в зразках. Показано, що найкращі відгуки біосенсора на глутамат спостерігались в діапазоні рН 7-9. Відпрацьовані оптимальні умови зберігання біосенсора. Встановлено, що за його зберігання в сухому стані при температурі 4°C протягом 2 місяців чутливість сенсора знижувалась на 40%, а при -18°C – лише на 30%. Показана стабільність відгуків біосенсора за багаторазового його застосування. Встановлено, що його чутливість до глутамату є в 50-100 разів вищою, ніж до ряду інших амінокислот. Лінійний діапазон роботи біосенсора для глутамату становив від 5 до 700 мкМ.

Кучеренко Д.Ю. вперше досліджено процеси накопичення глутамату синапсами та визначено його вміст в ізольованих нервових терміналях. Розроблено алгоритм біосенсорного аналізу вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу та білками-транспортерами. Результати визначення загальної концентрації глутамату, його вмісту в позаклітинних зразках синапсом за його вивільнення в процесі екзоцитозу порівняні з даними, отриманими методом спектрофлуориметричного аналізу та з використанням амінокислотного аналізатора. Отримані результати свідчать про майже повне співпадання з даними, визначеними за біосенсорного аналізу.

Розроблена методика біосенсорного аналізу процесів накопичення та вивільнення глутамату в ізольованих нервових терміналях може бути використана в процесах нейрохімічних досліджень для діагностики патологічних станів.

Поряд з цим дисертанткою розроблені методичні підходи і показана перспективність біосенсорного визначення глутамату в зразках харчових продуктів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації

Аналіз дисертаційної роботи Кучеренко Д.Ю. свідчить про значний внесок дисертантки в розробку та оптимізацію роботи амперметричного біосенсора для визначення глутамату в різних зразках. Отримані результати є перспективними для їх застосування в нейрохімічних дослідженнях, визначення вмісту глутамату в крові та ряді харчових продуктів. Вищенаведене свідчить про те, що дисертаційна робота Д. Ю. Кучеренко має значне фундаментальне та практичне значення.

Результати дисертаційної роботи добре висвітлені в 12 наукових публікаціях, серед яких 5 статей. Висновки дисертаційної роботи є аргументованими і логічно витікають з отриманих автором результатів. Автореферат дисертації відповідає її змісту. Все це свідчить про те, що робота заслуговує схвалення і підтримки.

До дисертантки є ряд питань та деякі зауваження.

1. Яким чином визначили масову частку глутаматоксидази в біоселективному елементі (на стор.69 вказано, що вона складала 0,5-6,0%)?
2. На стор. 29 приводиться діаметр мікродіалізного зонда 200-500 мкМ, а міжклітинна відстань -0,1-0,2 мкМ, де мкМ- М-великою літерою написано. Але ж це не мікромоль, а мікрометр. Якщо так, то потрібно «М» писати прописною.
3. На стор. 94 в одному реченні повтор слів «зберігали» та «здатність».

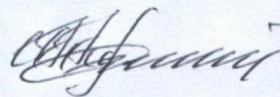
4. Підпис до рис. 4.5 «...шляхом заморозки...». Краще «заморожування».
5. На стор. 90 вказано «...радіоактивність зразку...». На думку опонента необхідно писати «радіоактивність зразка».
9. У висновку 3 слід було конкретизувати отримані результати досліджень. В дисертаційній роботі містяться ще деякі граматичні помилки, які не впливають на загальну значимість дисертаційної роботи. Вказані зауваження та питання не знижують наукового значення представленої дисертаційної роботи, яка є важливим досягненням дисертантки.

Висновок по дисертації. Дисертаційна робота «Розробка та оптимізація глутамат-чутливого біосенсора для потреб медицини та контролю якості харчових продуктів», що представлена Кучеренко Д.Ю. на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20- біотехнологія, є завершеним науковим дослідженням, в якому на основі сучасних методичних підходів розроблено метод іммобілізації глутаматоксидази. Відпрацьовані умови оптимізації роботи амперметричного біосенсора для визначення глутамату в різних зразках. Отримані результати є перспективними для застосування в нейрохімічних дослідженнях, визначення вмісту глутамату в ряді харчових продуктів.

Робота виконана на високому науково-методичному рівні. За актуальністю, новизною, науково-практичною значимістю результатів дисертаційна робота відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Кучеренко Дар'я Юріївна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20-біотехнологія.

Офіційний опонент, завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,

доктор біологічних наук, професор
10 травня 2019 р.

 І.К. Курдиш

