

## **ВІДГУК**

**офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора**

**Курдиша Івана Кириловича на дисертаційну роботу**

**Яринки Дар'ї Володимирівни**

### **«ОПТИЧНІ БІОСЕНСОРНІ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ПОЛІМЕРІВ-БІОМІМЕТИКІВ ТА СМАРТФОНІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ХАРЧОВИХ**

#### **МІКОТОКСИНІВ: АФЛАТОКСИНУ В1 ТА ЗЕАРАЛЕНОНУ» ,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія».

#### **Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами**

Мікробіом рослин містить значні кількості різних видів мікроорганізмів, серед яких широко представлені мікроміцети. Поширення фітопатогенних мікроміцетів у агроценозах зернових культур може призводити до втрати 25% врожаю цих рослин, накопичення мікотоксинів у зерні та рослинній продукції. Серед цих мікотоксинів одними з найнебезпечніших для здоров'я людей і тварин є афлатоксин В1 та зеараленон, Ці мікотоксини є канцерогенами. Зважаючи на негативний вплив даних мікотоксинів на здоров'я людей та тварин, актуальною проблемою сучасності є визначення вмісту цих мікотоксинів у продуктах харчування та тваринних кормах.

Запропоновані в даний час методи хроматографічного та твердофазного імуноферментного аналізу вмісту цих мікотоксинів в продуктах харчування є недостатньо чутливими, високовартісними та мають ряд недоліків. Для визначення афлатоксину В1 та зеараленону також застосовуються біосенсорні пристройі на основі електрофізичних та оптичних перетворювачів, природних антитіл та відповідних ферментів. Однак біосенсори на основі природних

антитіл та рецепторів характеризуються низькою стабільністю. Створення біосенсорів на основі високостабільних штучних аналогів біологічних рецепторів (полімерів-біоміметиків) є перспективним підходом до розробки високочутливих методів визначення мікотоксинів. Розробка таких полімерів у вигляді молекулярно-імпринтованих полімерних (МІП) мембран є перспективною для застосування в біосенсорах нового типу, дозволить замінити високовартісне лабораторне обладнання на застосування смартфонів.

Зважаючи на викладене, метою дисертаційної роботи є створення оптичних біосенсорних систем на основі смартфонів та полімерів-біоміметиків у формі молекулярно-імпринтованих полімерних мембран для виявлення поширеніх харчових токсинів афлатоксину B1 та зеараленону у продуктах харчування та тваринних кормах.

Дослідження проводились в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України в рамках бюджетної теми «Нові електрохімічні та оптичні біосенсори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів». Державна реєстрація №0117U002879 (2018-2022 р.), проекту 8/1 «Створення сенсорних систем на основі смартфонів та «розумних» полімерів-біоміметиків для селективного визначення харчових токсинів та ендокринних руйнівників» в межах цільової програми наукових досліджень НАН України «”Розумні” сенсорні пристрії нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій»

Державна реєстрація №0118U006190 (2018-2022р.), гранту № FSA3-19-65495(a)-0 “Highly-selective recognition of aflatoxins in cereals and feeding stuffs using nanostructured polymeric membranes”, Фонд цивільних досліджень та розвитку США (CRDF).

### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та**

## **рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність**

Наукові положення, наведені в дисертаційній роботі Д.В. Яринки є результатом ретельно проведених досліджень на основі застосування сучасних методичних підходів. Мета та завдання роботи логічно пов'язані між собою. Висновки цілком відповідають поставленим завданням та отриманим результатам проведених досліджень.

## **Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи**

Наукова новизна дисертаційної роботи Д.В. Яринки полягає у визначенні оптимальних функціональних мономерів для виготовлення молекулярно-імпринтованих полімерних мембрани, необхідних для визначення мікотоксинів АФВ1 та ЗОН. Розроблено метод отримання високочутливих сенсорних елементів на основі іммобілізованих МП мембрани з вбудованими в їх структуру наночастками срібла. Визначені оптимальні умови для виявлення цих мікотоксинів у зразках.

## **Практичне значення отриманих результатів**

Дисеранткою створені лабораторні прототипи біосенсорних систем на основі полімерів-біоміметиків з вбудованими наночастками срібла та застосування смартфону для високоселективного і високочутливого визначення афлатоксину В1 та зеараленону. Розроблені біосенсори можуть використовуватись для визначення цих мікотоксинів в реальних зразках харчових продуктів. Спільно з державним підприємством «Укрметртестстандарт» розроблено та затверджено методики визначення цих мікотоксинів у зразках харчових продуктів та тваринних кормів. Розроблені біосенсорні системи мають ряд переваг порівняно з традиційними аналітичними

методами та можуть бути використані для експрес-тестування харчових мікотоксинів в лабораторних та польових умовах.

### **Повнота викладу результатів дисертаційної роботи та наукових положень у наукових публікаціях за темою дисертації, апробація роботи**

Результати роботи викладені у 6 статтях в наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science, Core Collection та Scopus (сумарний імпакт-фактор становить 24,24). Дисертантою опубліковано 11 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, затверджено 2 методики визначення афлатоксину B1 та зеараленону.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 176 сторінках. Вона містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», чотири розділи з описом результатів досліджень, розділ «Аналіз та узагальнення результатів», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток А». Дисертація містить 27 рисунків та 8 таблиць. Список використаних джерел складає 226 найменувань.

### **Загальна характеристика роботи**

Структура роботи в цілому відповідає загальній схемі побудови дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

**Вступ.** В цьому розділі сформульовано та обґрунтовано актуальність обраної теми, визначено мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження. Також, чітко описано наукову новизну і практичне значення дисертаційної роботи, її обсяг і структуру.

### **Огляд літератури.**

В цій частині дисертації наведено аналіз мікотоксинів, можливі впливи афлатоксину B1 та зеараленону на живі організми. Аналізуються особливості застовування існуючих методів визначення мікотоксинів у зразках та недоліки

їх застосування у реальних умовах. Наведені переваги застосування молекулярно-імпрентованих полімерів, в тому числі з використанням певних наночасток для визначення мікотоксинів.

В розділі «**Матеріали та методи досліджень**» приведені методи досліджень, використаних дисертанткою при виконанні даної роботи. Нею застосовані методи флуоресцентної спектроскопії, ковалентної іммобілізації полімерів-біоміметиків, метод радикальної полімеризації *in situ*, метод отримання наночасток срібла, методи рідинної екстракції мікотоксинів, трансмісійної електронної мікроскопії, комп’ютерного моделювання та статистичні методи обробки отриманих результатів.

### **Результати досліджень.**

Дисертанткою отримані селективні мембрани для визначення мікотоксинів АФВ1 та ЗОН. Оптимізовано склад реакційних середовищ для визначення цих мікотоксинів. Найвищі показники сенсорного відгуку при визначенні АФВ1 отримані в натрій-фосфатному буфері за pH 5,0-8,0, а для ЗОН - в подібному буфері за pH 6,0-7,0 і внесення до нього хлориду натрію.

Оптимізовані селективні МП мембрани для визначення мікотоксинів АФВ1 та ЗОН були використані для створення лабораторних прототипів оптичних біосенсорних систем на основі смартфону. Для детекції цих мікотоксинів МП мембрани опромінювали УФ світлом. Дисертанкою отримано калібрувальні графіки інтенсивності флуоресценції від концентрації мікотоксинів. Межа визначення АФВ1 становить 15 нг/мл, а лінійний динамічний діапазон визначення - 15-300 нг/мл. Межа визначення ЗОН становить 1 мкг/мл, а лінійний динамічний діапазон визначення - 1-10 мкг/мл. Цей метод визначення є чутливим, маловартісним, швидким в проведенні аналізу.

Важливим досягненням дисертантки є розробка підходів щодо підвищення чутливості створених МП мембран шляхом введення до їх складу наночасток

срібла. З цією метою розроблено метод відновлення  $\text{AgNO}_3$  до НЧ срібла в МП мембранах. При додавання до МП мембрани 1,5 мМ  $\text{AgNO}_3$  флуоресцентні сигнали при визначенні АФВ1 значно підсилювались. Якщо до введення наночасток срібла межа визначення АФВ1 токсину становила 10 нг/мл, то за додавання цих наночасток даний показник досягав 0,3 нг/мл, а лінійний діапазон визначення цього мікотоксину становив 0,3-25 нг/мл. Максимальні показники визначення ЗОН спостерігались за введення до МП мембрани 59 мМ  $\text{AgNO}_3$ . В цьому разі межа визначення ЗОН становила 5 нг/мл, а динамічний діапазон визначення від 5 нг/мл до 25 мкг/мл. Запропоновані біосенсорні системи на основі МП- AgНЧ мембрани для визначення мікотоксинів є високоселективним.

Розроблені оптичні біосенсорні системи апробовані для аналізу мікотоксинів в борошні та меленій кукурудзі. Ці біосенсорні системи є високочутливим, надійним методом визначення мікотоксинів АФВ1 та ЗОН в харчових продуктах. Він характеризується високою стабільністю при тривалому зберіганні.

Створені сенсори на основі МП-АгНЧ мембрани для визначення мікотоксинів АФВ1 та ЗОН апробовані в реальних умовах. Показано, що ці сенсорні елементи дозволяють з високою точністю та чутливістю виявляти ці мікотоксини в харчових продуктах і тваринних кормах. Метод займає менше часу та знижує вартість аналізу. Розроблена дисертанткою методика визначення вказаних мікотоксинів затверджена Державним підприємством «Укрметртестстандарт».

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» автором наведені найважливіші положення досліджень, аналізується співвідношення власних результатів досліджень з даними літератури.

В процесі ознайомлення з дисертаційною роботою у опонента виникли деякі питання та зауваження.

1. На стор.77 вказано, що для перерахунку отриманих результатів визначення кількості мікотоксинів використовували формулу  $CxV/kxV_2x$  m. В даній формулі потрібно було б вказати, який показник визначали за її застосування.

2. На стор. 105 та 109 вказано, що лінійний динамічний діапазон визначення АФВ1 становить 15-300 нг/мл. В той же час на стор.108 у висновках до цього ж розділу даний діапазон становить 10-500 нг/мл. Чому так?

3. Стосовно лінійного динамічного діапазону визначення токсину ЗОН на с.108 вказано показник 1-10 мкг/мл, а у висновках до розділу на тій же сторинці 1-25 мкг/мл. Де правільно?

4. На стор.117 вказано, що розмір наночасток срібла в АФВ1 чутливих МП мембронах становить 30-70 нм, а в мембронах для визначення ЗОН- 20-30 нм. Чим обумовлені ці відмінності в розмірі наночасток срібла?

В дисертаційній роботі містяться деякі граматичні похибки.

На стор.38 написано «Зеараленон утворюється в результаті життєдіяльності мікроскопічних пліснявих грибів». Термін «життєдіяльність» застосовується для визначення осмисленої діяльності людини. Для інших об'єктів краще застосовувати термін «функціонування».

В розділі 3 відсутній рис.6. Є рис.4, 5, а потім 7.

На стор.99 вказано «...за зберігання розробленої системи вона залишалась стальною...». Потрібно було б «сталою чи стабільною»?

Вказані зауваження та запитання на применшують значення дисертаційної роботи, яка є значним внеском Д.В. Яринки в розвиток оптичних біосенсорних систем для визначення біологічно активних сполук в продуктах харчування та довкіллі.

## ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Яринки Дар'ї Володимирівни «ОПТИЧНІ БІОСЕНСОРНІ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ПОЛІМЕРІВ БІОМІМЕТИКІВ ТА СМАРТФОНІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ХАРЧОВИХ МІКОТОКСИНІВ: АФЛАТОКСИНУ В1 ТА ЗЕАРАЛЕНОНУ» є завершеним науковим дослідженням з актуального напрямку біології та біохімії. Приведені у роботі результати є новими та мають теоретичну і практичну цінність.

Аналіз роботи та публікацій авторки з урахуванням актуальності, новизни та наукової цінності отриманих результатів, практичного значення дисертаційної роботи свідчить, що вона є актуальну, цілісною та завершеною науковою роботою, яка відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження наукового ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р. та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року №40, які висуваються до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія».

За свою актуальністю, новизною отриманих результатів, обсягом виконаних досліджень, за повнотою оприлюднених результатів досліджень у науковій періодиці дисертаційна робота Яринки Д. В. заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
професор, д.б.н.

Іван Курдиш



Курдиш  
М.В.  
Солов'я Р.В.