

**Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу
Кучеренка Івана Сергійовича «Розробка електрохімічних ферментних
біосенсорів для визначення концентрацій АТФ та активності
креатинкінази», 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, багатокомпонентні 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 на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інституту біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках 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.) та «Розроблення і створення методів іммобілізації ферментів на поверхню мультиперетворювачів» Державної цільової науково-технічної програми розроблення і створення сенсорних

наукоємних продуктів (№ держ. реєстрації 0114U000680, 2014-2017 рр.). Частина роботи була також виконана в рамках міжнародного проекту «Integrated nanodevices» 7-ої рамочної програми ЄС (PIRSES-GA-2012-318524, 2013-2015 рр.).

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі. Дисертація Кучеренка І.С. 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, а саме: електрохімічні та біохімічні методи дослідження ферментативних реакцій, амперометричний та кондуктометричний методи, методи ковалентної іммобілізації ферментів, статистичний аналіз.

Зважаючи на викладене вище, обґрунтованість наукових положень та висновків, сформованих у роботі, не викликає сумнівів.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях. Слід відзначити, що основні положення дисертаційної роботи знайшли широке висвітлення у низці наукових праць дисертанта. Матеріали дисертації опубліковано у 6 наукових статтях у фахових журналах України та інших країн (у т.ч. тих, що включено до міжнародних наукометричних баз даних), тезах 3 доповідей на наукових конференціях, захищено 1 патентом на винахід України. 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, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, переліку використаних джерел, який

охоплює 123 найменувань. Роботу викладено на 124 сторінках машинописного тексту та проілюстровано 41 рисунком та 11 таблицями.

Літературний огляд (розділ 1) присвячений питанням класифікації та сучасних напрямків розробки біосенсорів. Особлива увага дисертанта приділена аналізу методів визначення АТФ та креатинкінази.

У розділі 2 здобувач ґрунтовно описує матеріали та методи, використані у дисертаційному дослідженні. Зокрема детально зупиняється на конструкції амперометричних перетворювачів на основі дискових платинових електродів, кондуктометричних перетворювачів на основі золотих гребінчастих електродів, вимірювальної установка для амперометричних та кондуктометричних досліджень. Наведено опис методики нанесення ПФД мембрани, іммобілізації ферментів на поверхнях амперометричних та кондуктометричних перетворювачів.

У розділі 3 дисертантом наведено результати експериментальних робіт та їх первинний аналіз. Детально описано наступні принципові блоки роботи: 1) дослідження аналітичних характеристик амперометричних перетворювачів за допомогою потенціостату PalmSens та його вітчизняного аналогу; 2) розробка амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрації АТФ та глюкози; 3) розробка амперометричного біосенсора для визначення активності креатинкінази у сироватці крові; 4) розробка кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації АТФ. Кожен із етапів роботи автор завершує проміжними висновками, які підтверджують виконання задач, що їх було поставлено під час планування дисертаційного дослідження.

У розділі 4 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 розроблено кондуктометричний ферментний біосенсор на основі гексокінази для визначення глюкози та АТФ, що підтверджено відповідним патентом України на винахід, і досліджено його основні аналітичні характеристики. Розроблено амперометричний двоферментний біосенсор на основі глюкозооксидази та гексокінази та досліджено його аналітичні характеристики. Вперше запропоновано біосенсорну систему на основі двох біосенсорів для точного та одночасного визначення АТФ та глюкози. Вперше проведено одночасне визначення невідомих концентрацій АТФ та глюкози в комерційних фармацевтичних препаратах з використанням біосенсорної системи і показано

високу кореляцію отриманих результатів із номінальними, заявленими виробником, концентраціями даних речовин. Розроблено процедуру визначення активності КК за допомогою запропонованого амперометричного біосенсора і проведено визначення активності КК в сироватці крові.

Практичне значення одержаних результатів. Створено лабораторні зразки монобіосенсорів та біосенсорної системи на основі амперометричних перетворювачів та іммобілізованих ферментів, призначені для кількісного аналізу вмісту АТФ і глюкози та активності КК в біологічних зразках. Вперше розроблено кондуктометричний ферментний біосенсор для кількісного визначення АТФ у водних розчинах. Запропоновано методологію використання біосенсорної системи для одночасного визначення концентрації глюкози та АТФ у сумішах і продемонстровано ефективність біосенсорної системи при роботі з фармацевтичними препаратами. Розроблені монобіосенсори та біосенсорна система можуть бути ефективно використані при створенні комерційних біоаналітичних систем для контролю якості лікарських препаратів, а також для клінічної лабораторної діагностики.

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. У Вступі у підрозділі «Актуальність теми» здобувач стверджує, що визначення концентрації АТФ у крові людини є перспективним для діагностики різноманітних хвороб, проте не зазначає яких саме. Такого роду уточнення було б доцільним для демонстрації соціальної значимості розробки.

2. У підрозділі «1.1. Класифікація та сучасні напрямки розробки біосенсорів» здобувач визначає місце та роль біосенсорів у розв'язанні завдань аналітичної хімії. На нашу ж думку, біосенсори є частиною аналітичної біохімії, а їх розроблення – завдання аналітичної біотехнології.

3. У підрозділі «2.4. Вимірювальна установка для амперометричних досліджень» здобувач зазначає, що виміри проводили за кімнатної температури. На думку здобувача, чи є прийнятним проведення досліджень за кімнатної температури, яка вочевидь, чітко не контролювалася? Чи не могли коливання температури вплинути на результати дослідження? Аналогічне запитання до результатів, що їх наведено у таблиці 3.2 (характеристика біосенсорів для визначення глюкози та АТФ): чи можуть ці показники залежати від кліматичних умов?

4. У підрозділі «2.8. Методика іммобілізації ферментів на поверхню кондуктометричних перетворювачів» здобувач описує процедуру виготовлення референтної мембрани біосенсора. При цьому здобувач використовує як зшивальний агент глутаровий альдегід. Чи можна почути від здобувача у чому суть даної реакції та чи можливо/доцільно у даному випадку використовувати інші зшивальні агенти?

5. У підрозділі «3.1.2. Порівняння біосенсорів на основі ГОД для визначенні глюкози» у таблиці 3.1, серед іншого, наведено дані щодо шуму базової лінії чистого сенсора, межі визначення H_2O_2 та похибки вимірювання H_2O_2 для різних біосенсорів, проте не проведено критичний аналіз прийнятності отриманих даних.

6. У підрозділі «3.2. Розробка амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрації АТФ та глюкози» (пункт 3.2.4, стор. 55) автор описує результати, що були отримані при визначенні найменшої межі визначення АТФ. Запитання: у який спосіб було встановлено концентрацію АТФ у зразках, що піддавалися тестуванню?

7. Наприкінці пункту «3.2.7. Використання ПФД мембрани для покращення селективності амперометричного перетворювача» автор демонструє результати дослідження впливу часу зберігання на величину відгуків біосенсорів на аскорбінову кислоту та робить висновок про цілковиту прийнятність отриманих результатів. Чи може здобувач навести посилання на роботи інших авторів чи вимоги керівних (нормативних) документів, які б підкріпляли зроблені висновки? Аналогічне запитання й до висновків, які зроблено здобувачем у пункті «3.2.12. Відтворюваність приготування біосенсорів» щодо допустимості відносного стандартного відхилення відгуків різних біосенсорів на глюкозу на рівні 14 %. Подібне уточнення доцільно зробити й до пункту «3.2.14. Вимірювання реальних зразків», де автор проводить аналіз результатів визначення АТФ у АТФ-вмісних лікарських засобів та зазначає, що відхилення від номінальних концентрацій не перевищувало 20 %.

8. У пункті «3.2.11. Відтворюваність відгуків біосенсорної системи на АТФ та глюкозу» (рис. 3.14) автор вказує на зміну межі визначення АТФ продовж роботи біосенсора (від 5 мкМ на початку роботи до 8-10 мкМ після його безперервної роботи) за рахунок деякого збільшення шуму базової лінії. У чому причина такої зміни рівня сигналу?

9. У чому на думку автора відмінність між поняттями «селективність» та «залежність величин сигналів біосенсорів від складу робочого буферу» (розділ 4, стор. 101)?

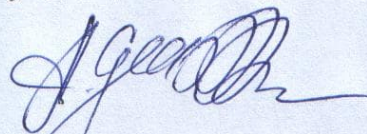
10. У розділі 4 здобувач проводить ґрунтовний аналіз отриманих результатів, проте інколи забуває робити посилання на роботи інших розробників біосенсорів. Так, наприклад, на стор. 105 автор аналізує результати розробки кондуктометричного ферментного біосенсора для визначення АТФ та глюкози й робить висновок про типовість ситуації, коли величини відгуків біосенсора сильно залежать від концентрації буферного розчину, – у даному випадку доцільно було б навести посилання на роботи інших дослідників.

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 Кучеренка І.С. «Розробка електрохімічних ферментних біосенсорів для визначення концентрацій АТФ та активності креатинкінази» 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 Кучеренка І.С. 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). Кучеренко Іван Сергійович заслуговує на присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

Професор кафедри промислової біотехнології,
перший заступник декана факультету біотехнології і біотехніки
Національного технічного університету України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
МОН України, доктор біологічних наук, доцент



О.Ю. Галкін

Підпис д.б.н., доц. 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