

**Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу  
Жибака Михайла Тарасовича «Розробка амперометричних  
нанокомпозитних біо/хемосенсорів для визначення низькомолекулярних  
метаболітів у біологічних рідинах», 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. Контроль за зміною концентрації у сироватці крові таких біомаркерів як креатинін, сечовина, іони амонію, L-аргінін та холін є важливим елементом у діагностики захворювань нирок та печінки, а також дає можливість контролювати стан життєдіяльності пацієнтів із хронічними хворобами нирок та цирозом печінки. Електрохімічні біосенсори як інструменти експрес-діагностики у даному випадку мають значу кількість переваг у порівнянні із класичними інструментальними методами. Запропоновані на даний час різними дослідниками електрохімічні (амперометричні, потенціометричні та кондуктометричні) хемо- та біосенсори для визначення згаданих вище метаболітів мають низку суттєвих недоліків, які унеможливають їх використання у практичній медицині.

Виходячи із наведеного вище сформоване здобувачем завдання щодо пошуку ефективних підходів для формування високоспецифічних амоній- та пероксидчутливих нанокомпозитів, а також іммобілізації біорозпізнавальних молекул на поверхню електродів та розробка на їхній основі нових амперометричних сенсорних систем є, безумовно, актуальною.

Для нашої країни залишається також 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.**  
Роботу виконано в лабораторії біомолекулярної електроніки відділу

механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках наступних НДР, наукових проектів: бюджетної теми 2.2.4.22 «Розробка наукових засад створення афінних біосенсорів на основі біологічних молекул та біоміметиків» (№ держ. реєстрації 012U004025); проекту «Ідентифікація низькомолекулярних метаболітів сироватки крові як основа тест-систем для діагностики ішемічного ушкодження мозку та деяких дегенеративних захворювань» (№ держ. реєстрації 0115U002948) цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства»; проекту «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору «Аргітест» для аналізу аргініну в клінічних зразках» (№ держ. реєстрації 0115U002952) у рамках загальноакадемічного конкурсу науково-технічних проектів у 2015 р.; проекту «Розробка біоселективних мембран на основі вуглецевих наноматеріалів, функціоналізованих біомолекулами для створення аналітичних мікроприладів нового покоління» (№ держ. реєстрації 0110U006053) у рамках Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали»; проекту для молодих вчених «Амоній-селективні композити як основа високочутливих тест-систем для визначення креатиніну, сечовини та аргініну – маркерів захворювань нирок» (№ держреєстрації 0113U007554). Частина результатів дисертаційної роботи отримана в рамках міжнародних проектів НАТО «Наука заради миру» (NATO Science for Peace Program; № проекту СВР.NUKR.SFPP 984173) та в рамках програми ЄС РП7 (№ проекту PIRSES-GA-2012-318053).

**Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі.** Дисертація Жибака М.Т. 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 (вольтаметрія, хроноамперометрія, хронокулонометрія, електрохімічна імпедансна спектроскопія), фізичні (оптична спектроскопія, скануюча електронна та атомно-силова мікроскопія, X-променева фотоелектронна спектроскопія), біохімічні методи досліджень ферментативних реакцій, методи ковалентної та нековалентної іммобілізації ферментів, статистичні методи.

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 5 наукових статтях у фахових журналах України та інших країн (у т.ч. тих, що включено до міжнародних наукометричних баз даних), тезах 5 доповідей на наукових конференціях. 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 наступних частин: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини та обговорення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації – 153 сторінок. Робота містить 48 рисунків і 8 таблиць. Список літератури охоплює 255 найменувань.

Літературний огляд (розділ 1) присвячений питанням сучасних напрямків розробки електрохімічних біосенсорів. Особлива увага дисертанта приділена аналізу методів визначення аргініну, креатиніну і сечовини.

У розділі 2 здобувач ґрунтовно описує матеріали та методи, використані у дисертаційному дослідженні. Опис методів проведено вкрай докладно, що є важливою передумовою можливості відтворення отриманих наукових результатів.

У розділах 3-6 дисертантом наведено результати експериментальних робіт та їх первинний аналіз. Детально описано наступні принципові блоки роботи: 1) розробка амперометричних біосенсорів для визначення холіну на основі золотих друкованих електродів; 2) розробка амперометричного біосенсору для визначення L-аргініну на основі рекомбінантної аргініндеїмінази та композиту нафіон/поліанілін; 3) розробка амоній-чутливого нанокompозитного сенсора на основі ПАНі/Нафіон/Cu; 4) розробка біосенсорів для визначення креатиніну і сечовини створені на основі амоній-селективного нанокompозиту ПАНі/Нафіон/Cu. Кожен із блоків робіт

побудовано за класичною схемою, яка передбачає наукове теоретичне та експериментальне обґрунтування конструкції біосенсора, власне його конструювання, дослідження аналітичних характеристик біосенсора, його тестування із залученням модельних зразків, зразків біологічних рідин організму людини тощо. У разі можливості дисертантом проведено порівняльні дослідження із наявними аналогами. Кожен із етапів роботи автор завершує обговоренням отриманих результатів, а також проміжними висновками, які підтверджують виконання задач, що їх було поставлено під час планування дисертаційного дослідження.

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 виявлено особливості іммобілізації холіноксидази на поверхні золотих друкованих електродів в БСА мембрані за присутності амінованих багат шарових нанотрубок, а також за допомогою електронанесення в силікатному золі. Вперше розроблено моноферментний амперометричний сенсор на основі рекомбінантної аргініндеімінази та амоній-чутливого поліанілін/нафіон композиту, електроосадженого на друкований платиновий електрод, для визначення концентрації аргініну у зразках плазми крові людини. Вперше розроблено високочутливий до іонів амонію нанокompозит на основі електроосаджених частинок міді, нафіону та електрополімеризованого поліаніліну (ПАНі/Нафіон/Cu). Вперше нанокompозит ПАНі/Нафіон/Cu застосовано для розробки моноферментних сенсорів на основі креатиніндеімінази та уреазі для визначення креатиніну і сечовини у зразках сироватки крові людини.

**Практичне значення одержаних результатів.** Створено лабораторні прототипи амперометричних біо/хемосенсорів для експрес-аналізу низькомолекулярних клінічно важливих метаболітів (холін, іони амонію, L-аргінін, креатинін та сечовина) та успішно проведена їх апробація в реальних зразках (дитячі молочні суміші, фармацевтичні препарати, сироватка і плазма крові). Висока селективність і чутливість, а також простота запропонованих методів значно полегшують процедуру аналізу та можуть скласти конкуренцію традиційним низькоселективним хімічним та дорогим загальноживаним методам.

**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 здобувачем наведено ґрунтовний аналіз принципів конструювання, переваг та недоліків біосенсорних систем для визначення концентрації аргініну, креатиніну і сечовини. Низка такого роду характеристик

має й числові значення, тому було б значно кращим узагальнити основні характеристики для кожного з проаналізованих типів біосенсорів у формі таблиці.

2. Під час розробки амперометричних біосенсорів для визначення холіну (розділ 3) дисертантом використано золь-гель-технологію з метою досягнення високої активності іммобілізованих ферментів. Чому серед всього арсеналу кремнійорганічних реагентів здобувач зупинився лише на одному з алкілсиланів – тетраетоксисилану? Чому не було проведене порівняльне дослідження із іншими речовинами, наприклад, метилтриетоксисиланом чи тетраетилсилікатом? Для завершення процесу формування золь-гель плівки дисертантом використано електродіаліз. Чи можливо (доцільно) використовувати у даному випадку альтернативні підходи до гелюутворення? З метою оптимізації складу золь-гелю автором запропоновано використання такої поверхнево-активної речовини як цетилтриметиламоній бромід. Чи відомі здобувачу інші речовини, що можуть використовуватися для підвищення однорідності та стабільності золь-гелю?

3. На рис. 4.4 (Вибір оптимального значення потенціалу для амперометричного вимірювання іонів амонію) та рис. 4.5 (Вибір оптимального значення рН для амперометричного визначення L-Арг) не представлено посилань на статистичну достовірність отриманих даних.

4. Чи на думку дисертанта достатній об'єм досліджень щодо селективності (специфічності) розробленого амперометричного біосенсора для визначення L-аргініну на прикладі визначення інтерферуєчого впливу лише двох амінокислот – L-лізину і ГАМК (підрозділ 4.3, рис. 4.8)? Чи може наявність у досліджуваному зразку високих концентрацій багатьох амінокислот вплинути на селективність та точність аналізу?

5. Чому при дослідженні інтерферуєчого впливу на роботу амперометричного амоній-чутливого сенсора (композит ПАНі/Нафіон/Cu) (підрозділ 5.2, рис. 5.12) було використано доволі низьку концентрацію альбуміну (лише 0,1%)?

6. Нажаль, для оцінки стабільності при зберіганні розробленого амоній-чутливого сенсора здобувачем не наведено числових значень характеристик останнього після одного року зберігання (підрозділ 5.5).

7. Які б здобувач міг би запропонувати шляхи підвищення стабільності при тривалому зберіганні амперометричного біосенсора для визначення креатиніну і сечовини?

8. У роботі подекуди містяться невдалі вирази або неузгоджені твердження. Наприклад, висновки щодо незначності інтерферуєчого впливу канаваніну при вимірюванні L-Арг (підрозділ 4.3) чи твердження про те, що роботи з ідентифікації біомаркерів різних захворювань є напрямком розвитку молекулярних біотехнологій (Вступ).

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 Жибака Михайла Тарасовича «Розробка амперометричних нанокompозитних біо/хемосенсорів для визначення низькомолекулярних метаболітів у біологічних рідинах» 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 Жибака М.Т. 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). Жибак Михайло Тарасович заслуговує на присудження йому 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, доцент

