

**Відгук**  
**офіційного опонента на дисертаційну роботу**  
**Топольнікової Ярослави Віталіївни**  
**«Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення**  
**концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах для клінічної**  
**діагностики», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата**  
**біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія**

**Актуальність теми.**

Протягом останніх десятиліть відбувається інтенсивне вивчення аналітичних можливостей і практичного застосування біосенсорних приладів. В світі існує нагальна потреба в розробці простих в застосуванні, недорогих, високочутливих та специфічних приладів для виявлення наявності та визначення концентрацій певних речовин у зразках аналізованого матеріалу відповідно до потреб медичної діагностики, різних галузей біотехнології та промисловості.

Оскільки біосенсорні методи є високоточними та селективними, простими у використанні та портативними, і при цьому потребують незначних об'ємів зразків біологічних рідин для аналізу, цей напрям аналітичної біотехнології є перспективним для використання у медицині.

Визначення концентрацій лактату та пірувату, а також співвідношення лактату до пірувату, є актуальним у клінічній діагностиці. Зокрема, в світовій практиці визначення концентрації лактату використовується у відділеннях реанімації для оцінки тяжкості стану пацієнта, прогнозу імовірності шоків станів та смертності пацієнтів. Також в клінічних умовах інформативним є відношення лактату до пірувату. На сьогодні таке відношення у венозній крові використовується для розрізнення вроджених дисфункцій піруватдегідрогеназного комплексу та інших форм вродженого лактатацидозу у новонароджених, а також для діагностики септичних станів.

Тому розробка біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату та їхнього відношення для застосування у клінічній діагностиці є актуальною.

**Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами.**

Дисертаційна робота виконувалась в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках наступних 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); «Підвищення інформативності та метрологічної надійності електрохімічних ферментних біосенсорних систем на основі сучасних матеріалів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового

покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005167, 2018-2022 рр).

**Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі.** Дисертація Топольнікової Я.В. представляє завершену наукову роботу, що містить всі необхідні елементи: від обґрунтування актуальності та стратегії дослідження до аналізу отриманих результатів та висновків. Вибір тих чи інших методів дослідження логічно обґрунтовано, викладення експериментальних даних містить їх вичерпний аналіз. Різні частини роботи логічно та послідовно зв'язані між собою.

Обробка експериментальних результатів здійснювалась з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки даних.

Отримані результати було проаналізовано та порівняно з результатами, отриманими іншими дослідниками, та описаними у світовій науковій літературі.

Виходячи з аналізу та узагальнення результатів дисертації, можна дійти висновку, що мета дисертаційної роботи в ході виконання дослідження була повністю досягнута, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею.

Завершується робота розгорнутими висновками, які впливають зі змісту роботи, є логічними, відображують основні результати дисертаційної роботи.

**Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях.** Ключові положення дисертаційної роботи були повно та достовірно висвітлені у низці наукових праць дисертанта. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, серед яких 6 статей у фахових журналах України та інших країн (в тому числі 2 статті в журналах, які входять до наукометричної бази Scopus), 7 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних науково-практичних конференціях та з'їздах. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

**Оцінка змісту дисертації та її завершеності.** У вступі чітко обґрунтовано актуальність проблеми, науково коректно сформульовано мету, яка корелює з темою та конкретизується у завданнях, окреслено об'єкт та предмет роботи. Логічно сформовано систему використаних в роботі дослідницьких методів. Викладення експериментального матеріалу відповідає поставленим завданням.

Дисертація складається із «Вступу», «Огляду літератури», «Матеріалів та методів досліджень», 4 експериментальних розділів («Розробка лактат-чутливого монобіосенсора», «Розробка піруват-чутливого монобіосенсора», «Поєднання монобіосенсорів у систему для одночасної роботи», «Використання розробленої біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату у зразках сироватки крові»), «Аналізу та узагальнення результатів досліджень», а також «Висновків» та «Списку використаної літератури», який охоплює 100 найменувань, та додатків. Роботу викладено на 158 сторінках машинописного тексту та проілюстровано 46 рисунками та 6 таблицями.

Огляд літератури розкриває актуальність та методи визначення концентрацій лактату та пірувату у крові, охоплює сучасні аспекти біосенсорного визначення даних аналітів. Особливу увагу приділено особливостям розробки біосенсорів для аналізу зразків біоматеріалу, а також біосенсорним системам для одночасного визначення.

Розділ «Матеріали та методи» детально та ґрунтовно описує матеріали та методи, використані в дослідженні. Так, описано конструкцію амперометричного перетворювача та біосенсорної системи, детально описано методику нанесення біоселективної мембрани та захисної мембрани з поліфенілендіаміну, різні використані способи іммобілізації ензимів, а також визначення концентрації лактату у реальних зразках сироватки крові за допомогою спектрофотометричного вимірювання. Також описано методики статистичної обробки отриманих результатів.

В експериментальних розділах роботи (Розділи 3-6) описано розробку монобіосенсорів для визначення лактату та пірувату, поєднання їх у єдину систему, перевірку роботи біосенсорної системи у складі мультибіосенсорного масиву, а також використання біосенсорної системи для визначення концентрацій лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові. Всі розділи роботи автор супроводжує проміжними підсумками, в яких розкрито досягнення завдань, поставлених на етапі планування дисертаційного дослідження.

Розділ «Узагальнення результатів» містить ґрунтовний аналіз отриманих результатів та їх обговорення. Також автором запропоновано схему визначення концентрацій лактату та співвідношення лактату до пірувату за допомогою розробленої біосенсорної системи для клінічного застосування. Отримані дисертантом результати порівняно з іншими сучасними розробками близької тематики. Висновки повно розкривають як наукове, так і практичне значення дисертації.

Автореферат у повній мірі відображає зміст дисертації.

**Наукова новизна роботи.** Оцінюючи найважливіші здобутки дисертаційного дослідження, варто вказати на наступні результати, що мають вагомому наукову новизну. Здобувачем вперше розроблено біосенсорну систему на основі амперометричних платинових дискових електродів для селективного одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату та їхнього співвідношення. Також здобувачем розроблено нову методику аналізу співвідношення концентрацій лактату та пірувату у реальних зразках сироватки крові з метою розпізнавання відповідних патологічних станів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Здобувачем розроблено лабораторні прототипи амперометричних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрацій лактату, пірувату та співвідношення лактат/піруват у сироватці крові людини. Показана ефективність застосування даної системи для визначення концентрацій даних аналітів у зразках сироватки донорської крові. Отримані дані можуть бути використані для виготовлення промислових моделей біосенсорів для клінічної діагностики.

**Зауваження та побажання.** Суттєвих зауважень до дисертаційної роботи немає. Водночас робота містить певні недоліки, зокрема:

1. У огляді літератури трапляється невдала або незрозуміла лексика, наприклад «розлади дисфункції піруватдегідрогенази» у такому реченні: «Особливе клінічне значення має швидкість диференційної діагностики піруватдегідрогеназних розладів та розладів дихального ланцюга у новонароджених, оскільки використовується дуже специфічне лікування для розладів дисфункції піруватдегідрогенази».

2. Також огляд літератури містить деякі елементи наукового сленгу, на кшталт «робочий гел», «клініка», «буфер».

3. У огляді літератури подекуди опис розроблених іншими авторами біосенсорів для визначення концентрації лактату та пірувату було зведено до простого перерахунку деяких результатів, практично без їхнього порівняння та аналізу, наприклад, якими підходами вдалося досягти кращого рівня чутливості або більш широкого лінійного діапазону визначення тощо.

4. На деяких рисунках автореферату та дисертації відсутні похибки вимірювання.

5. До розділу «Матеріали та методи» бажано було б додати пояснення того, як саме визначали такі аналітичні характеристики, як мінімальна межа визначення, оптимальний діапазон роботи і т.п.

6. При визначенні оптимальних умов іммобілізації піруватоксидази (підрозділ 4.2) перевірялись різні методи іммобілізації. Але немає пояснення, чому обирались саме ці методи іммобілізації.

7. В роботі, при розробці лактат-чутливого біосенсора було перевірено різні умови його зберігання та обрано оптимальні. Чому не приведено такого ж експерименту для піруват-чутливого біосенсора?

8. При дослідженні операційної стабільності біосенсорної системи, що складається з лактат-чутливого біосенсора та піруват-чутливого біосенсора, використовувались умови зберігання + 4 °C, в сухому стані (рис. 5.10), що є не оптимальними умовами для зберігання лактат-чутливого біосенсора, що було показано раніше на рис. 3.9. Поясніть.

9. В роботі не приведено пояснення стосовно збільшення похибки вимірювання сигналів біосенсорної системи на піруват і лактат в сироватці крові (рис. 6.3). Чому погіршується відтворюваність порівняно з модельними рідинами (рис.4.6 та рис.3.8) і як це може вплинути на результати аналізу?

10. Крім того, у висновках до розділу 6 анонсовано, що після послідовних аналізів 7 зразків сироватки крові, біосенсорна система демонструє незначне збільшення чутливості до субстратів, але ця інформація не узгоджується з результатами, приведеним на рис. 6.3 стосовно дослідження відтворюваності відгуків біосенсорної системи при роботі з сироваткою крові.

Слід зазначити, що перелічені вище зауваження не є принциповими і суттєвими, вони можуть бути предметом для обговорення на захисті, проте не знижують загальний високий науковий рівень роботи



**Загальний висновок.** Таким чином, дисертаційна робота Топольнікової Ярослави Віталіївни «Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення концентрацій лактату та пірувату в біологічних рідинах для клінічної діагностики» являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка містить рішення актуального завдання щодо розробки та створення амперометричних високоінформативних біосенсорів для одночасного визначення лактату і пірувату та їхнього співвідношення в сировотці крові. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Топольнікової Я.В. 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). Топольнікова Ярослава Віталіївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

**Офіційний опонент:**

Професор, доктор біологічних наук,  
головний науковий співробітник  
відділу молекулярної імунології  
Інституту біохімії імені О.В. Паладіна НАНУ

Д.В. Колибо



Колібо Я.В.  
ЗАСВІДЧУЮ  
Зав. канцелярією  
Інституту біохімії ім. О.В.Паладіна  
національної академії наук України  
"29" 03 2019 р.