ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Солдаткіна Олександра Олексійовича «**Основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів**», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність теми. Вдосконалення методів визначення концентрацій різноманітних речовин у реальних зразках, таких як сироватка крові, продукти харчування, лікарські засоби, водні зразки з природних водойм, є актуальним завданням сучасної аналітичної біотехнології. Класичні методи аналізу базуються на використанні великих стаціонарних приладів (хроматографи, фотометри, спектрометри, та інші), які керуються спеціалізованим персоналом. Проте актуальною є потреба створення портативних автоматизованих приладів, які б можна було застосовувати для аналізу фізіологічного стану організму в реальному часі, іноді в домашніх умовах. Наразі в світі стрімко розвивається створення біосенсорів – аналітичних приладів, призначених в першу чергу для заміни та доповнення традиційного дорогого обладнання і спрощення процедури проведення аналізів.

Комерційні біосенсори (глюкометри) для домашнього визначення глюкози в крові людей, хворих на цукровий діабет, добре зарекомендували себе, тому в даний час розробляються і виводяться на ринок нові біосенсори для визначення низки життєво важливих метаболітів, таких як лактат, сечовина, креатинін тощо.

Обмежений діапазон речовин, які можуть визначатися біосенсорами, є одним із факторів, який лімітує їх застосування в різних сферах. Саме вирішенню даної проблеми і присвячена робота дисертанта. Ідея полягає в розширені ряду можливих біосенсорних аналітів за рахунок застосування декількох ферментів за різного поєднання у біоселективних елементах біосенсорів.

Наукова новизна отриманих результатів. Наукова новизна дисертаційної роботи полягає в отриманні нових практичних результатів стосовно одночасної іммобілізації декількох ферментів в складі єдиного чутливого елементу кондуктометричних та амперометричних біосенсорів. Також було отримано велику кількість даних про умови одночасної роботи декількох ферментів та можливості практичного використання мультиферментних біосенсорів. Про актуальність та новизну результатів дисертанта опосередковано свідчить досить високий рівень цитування його робіт, наприклад, стаття «Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection» була процитована 18 разів у закордонних публікаціях, а стаття «Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions» –47 разів у міжнародних публікаціях (згідно з даними бази даних Scopus), що є дуже гарним показником.

Ступінь обґрунтованості та достовірність наукових положень диссертаційної роботи Солдаткіна О.О. забезпечений глибоким аналізом автором сучасного стану проблеми, про що свідчить наведений у розділі 1 огляд літератури (314 цитованих літературних джерел). Автор характеризує різні типи мультиферментних біосенсорів, детальніше зупиняється варіантах поєднання ферментативних реакцій в біоселективному елементі біосенсорів. Вивчає матеріали та методи коіммобілізації ферментів, які використовуються при розробці різних варіантів мультиферментних біосенсорів, аналізує переваги і недоліки цих біосенсорів для практичного застосування в різних галузях життєдіяльності людини. Приведена у розділі 2 інформація про матеріали і методи досліджень підтверджують якісну постановку експериментів в дисертаційній роботі. Задачі дисертаційного дослідження сформульовані чітко та логічно, відповідно до поставленої мети роботи. Робота виконана із використанням сучасних, біологічних, фізико-хімічних, електрохімічних та статистичних методів аналізу, що дає підставу стверджувати, що отримані результати експериментів є **достовірними**.

Достовірність положень дисертації підтверджується отриманими експериментальними даними (розділ 3, 4 та 5) та логічною інтерпретацією цих результатів автором. Дисертантом отримано такі найвагоміші результати:

- Розроблено нові методики вибору оптимальних схем аналізу, вимірювальних приладів, а також процедур тестування електрохімічних перетворювачів, з метою забезпечення оптимально функціонування мультиферментних біосенсорів.
- Перевірено доцільність розробки біосенсорів на основі різноманітних варіантів поєднання ферментів в біоселективному елементі біосенсора та визначено переваги та недоліки цих мультиферментних біосенсорів
- Розроблено узагальнюючі схеми покрокової побудови нових електрохімічних біосенсорів з мультифункціональним використанням ферментів в біоселективному елементі.
- Виготовлено лабораторні прототипи ряду розроблених мультиферментних біосенсорів та апробовано при роботі з реальними біологічними, фармакологічними, харчовими зразками та зразками довкілля.
- Показано високий рівень кореляції результатів отриманих з використанням біосенсорних пристроїв та стандартних традиційних методів аналізу.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані автором результати з розробки і оптимізації мультиферментних біосенсорів, а також їхня апробація при аналізі реальних зразків, можуть бути використані як основа під час комерціалізації цих і подібних біосенсорів. Також описані результати сприятимуть подальшій розробці і впровадженню в повсякденне життя біосенсорних приладів для медичних, екологічних та промислових потреб.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі молекулярної біотехнології та

біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках проектів: НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних нанокомпозитних комплексів», НДР № 2.2.4.22 "Електрохімічні мультибіосенсори та сенсорні масиви: фундаментальні основи створення та функціонування", NATO Science for peace and security programme № CBP.NUKR.CLG984221 «Development of biosensors for botulinum neurotoxin determination with applicability to screening foods against biological terrorist attacks», УНТЦ № 6177 «Використання функціональних наноматеріалів для сворення біосенсорних кондуктометричних приладів для визначення аргініну», УНТЦ № 6052 «Ферментна мультибіосенсорна система для діагностики ниркової дисфункції та контролю процедури гемодіалізу», УНТЦ № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins», білатерального проекту Україна-Індія № М/384-2012 «Developing Electrochemical and Photochemical Biosensors using Chloroplast and Enzymatic Membranes», FP7-PEOPLE-IRSES-2008 проекту «Nanosensors based on nanomaterials» № 230802, FP7-PEOPLE-IRSES-2012 проекту «Integrated nanomaterials and nanodevices» № 318524, державним замовленням «Розроблення ферментного біосенсора на основі pH-чутливих польових транзисторів для визначення сечовини та креатиніну у медичній діагностиці» № ДЗ/45- 2015, державним замовленням «Розроблення портативної біосенсорної системи для експрес-діагностики інфаркту міокарда та інших захворювань» № ДЗ/25-2017, в рамках Програми «EUREKA» «Multiple biosensor device for monitoring of hemodialysis patients (HemoSensor)», № E!8835.

Структура дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Солдаткіна О.О. побудована по традиційному плану. Вона складається з **вступу**, де представлена інформація про актуальність роботи, мети та завдань

дослідження, наукової новизни, практичної цінності та звязку роботи з державними науковими програмами, планами. **Перший розділ** дисертації присвячений огляду літератури, де автор провів глибокий аналіз сучасного стану проблеми, про що свідчить 314 цитованих літературних джерел. Автор характеризує різні типи біосенсорів, детальніше зупиняється на варіантах поєднання ферментативних реакцій в біоселективному елементі біосенсорів. Вивчає матеріали та методи коіммобілізації ферментів, які використовуються при розробці різних варіантів мультиферментних біосенсорів, аналізує переваги і недоліки цих біосенсорів для практичного застосування в різних галузях життєдіяльності людини. **Другий розділ** присвячено матеріалам та методам, де детально представлена інформація про матеріали, методи та електрохімічні схеми, які були використані, чи створені при виконанні дисертаційної роботи. **Розділи 3, 4 та 5** присвячені власним експериментальним роботам дисертанта, де детально описано запропоновані автором методики тестування фізичних перетворювачів, електрохімічних схем та порівняння розроблених та комерційних приладів. Також детально представлено розробку мультиферментних приладів, створення відповідних робочих прототипів біосенсорів, які використано при аналізах реальних біологічних, фармацевтичних, харчових та екологічних зразків, проведено верифікацію розроблених приладів з використанням традиційних методів аналізу. Показано високий рівень кореляції біосенсорних та традиційних методів аналізів. Потім в **аналізі та узагальненні результатів** автором обговорено недоліки та переваги розроблених систем, та створено узагальнюючі схеми покрокової розробки біосенсорів, підводено підсумки результатів. Робота завершується **7 висновками** та **списком літератури.**

Основні положення дисертації викладено у 70 наукових публікаціях, які включають статті в таких відомих міжнародних журналах, як Analytica Chimica Acta, Analytical Chemistry, Talanta, Bioelectrochemistry (які входять до наукометричних баз даних Scopus та Web of Science і мають високий імпакт-фактор), а також тези доповідей міжнародних та національних

наукових конференцій. Слід відмітити наявність у дисертанта 5 патентів України на винахід та корисну модель.

Автореферат дисертації логічно узагальнює основні положення дисертації і повністю відповідає її змісту.

Також слід відмітити, що список літератури налічує 314 літературних джерел, абсолютну більшість з яких було опубліковано в міжнародних виданнях. Це підтверджує високу обізнаність автора у своїй темі і збільшує цінність дисертаційної роботи.

В цілому дисертація є завершеною, якісною науковою роботою, втім, слід відмітити певні зауваження та запитання, які виникли у рецензента після ознайомлення з нею.

1) Яка доцільність розробки біосенсорів для контролю складу лікарських засобів? Склад лікарського засобу визначається згідно до нормативної документації щодо контролю кожного лікарського засобу, яку надає виробник. Навряд чи використання сенсорів передбачене цією документацією.
2) Як розраховувався відгук сенсора виходячи зі змін його вольт-амперної характеристики?
3) Які аналітичні характеристики мають біосенсори по визначенню важких металів та «реактиваторів»? Яку вони мають операційну стабільність та відтворюваність результатів?
4) Чи достатніми є характеристики біосенсорів, наприклад чутливість, для проведення визначення мальтози та ацетилхоліну в реальних зразках?
5) Чому при оптимізації деяких біосенсорів використовували різні концентрації субстратів (при дослідженні залежності величини відгуків біосенсора від іонної сили, pH буферного розчину – одну концентрацію субстрата, а при при дослідженні операційної стабільності або відтворюваності - іншу концентрацію субстрата)?
6) Висновки в кінці розділів бажано було б пронумерувати, оскільки в наведеному вигляді вони більше схожі на узагальнення, чим на висновки.

Всі підрозділи мають підсумкову частину, проте існування такої частини не передбачено вимогами ДАКу.

7) В тексті дисертації та на вісях графіків часто зазначено, або «відгук», або «відгук біосенсора», або «зміна провідності». Мається на увазі одне й те ж саме, але в дисертації краще було уніфікувати.
8) В дисертаційній роботі є некоректне використання термінів. Наприклад, «суміш», хоча, на думку опонента, в даних випадках більш коректним є термін «розчин». Часто застосовується вираз «іммобілізація в краплі глутарового альдегіду», який коректніше замінити фразою «в розчині глутарового альдегіду». Ряд специфічних термінів з «біосенсорики», використані дисертантом, детально не пояснюються, наприклад «медіатор», «інтерферент», «реактиватор» тощо.

Висунуті зауваження і питання не мають принципового значення і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Заключення. Дисертаційна робота Солдаткіна Олександра Олексійовича «Фундаментальні основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів» за своєю актуальністю, новизною, практичною значимістю, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. щодо дисертацій, поданих на здобуття наукового ступеня доктора наук, а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора біологічних наук.

Завідувач лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
проф., д.б.н. Колибо Д.В.

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
Ідентифікаційний код 05417288
м. Київ

Підпис Колибо Д.В.
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"12" 11 2018 р.