

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.

Перспективним і дуже актуальним напрямком розвитку аналітичної біотехнології є створення біосенсорів – нових, невеликих за розмірами аналітичних інструментів, що характеризуються високою точністю визначення аналіту, селективністю аналізу різноманітних сполук, зручністю їх застосування при проведенні аналізів.

Зацікавленість в розробці таких біосенсорів, обумовлена їх перевагами у порівнянні з традиційними приладами біохімічного аналізу, які потребують тривалого визначення, вартісного обладнання і висококваліфікованого персоналу. В той же час біосенсиори є простими у використанні, мають низьку собівартість при масовому виробництві, високу чутливість до ряду аналітів та селективність. Вже доведено, що біосенсиори характеризуються значними перспективами застосування у медичній діагностиці, в екологічному моніторингу, при контролі біотехнологічних процесів, в біологічних дослідженнях, тощо.

Одним з найбільш перспективних напрямків сучасної біосенсорики є розробка мультиферментних електрохімічних біосенсорів. В процесі розробки таких сенсорних систем застосовуються різні варіанти поєднання кількох ферментативних реакцій, а саме - каскадні, циклічні, конкурентні, тощо. Кожен варіант мультиферментного біосенсора має як свої переваги, так і недоліки. При визначенні певних аналітів за застосування мультиферментних біосенсорів необхідно враховувати можливу дію ряду факторів, у тому числі інтерферуючих речовин, що здатні перешкоджати

визначенню цільового продукту. Тому важливим є дослідження та аналіз перспективності використання різних мультиферментних систем у біосенсорці.

Зважаючи на викладене, дисертаційна робота Олександра Олексійовича Солдаткіна, метою якої є в розробка фундаментальних та технологічних основ створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів для практичного застосування в різних галузях людської життєдіяльності, є актуальною. Актуальність дисертаційної роботи підтверджується її тісним зв'язком з тематикою наукових досліджень, що виконувались за участі дисертанта у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для досягнення поставленої мети Олександром Олексійовичем було використано значну кількість сучасних фізико-хімічних, біохімічних, молекулярно-біологічних, спектроскопічних та статистичних методів дослідження.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена на 378 сторінках, побудована за класичною схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка складається з трьох розділів, розділу аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, що містить 314 посилань, з яких основна частина - іноземними мовами, а також додатки, в яких приведено перелік наукових праць автора дисертаційної роботи, скан-копії методик, затверджених в ДП «Укрметр-тестстандарт» та схеми поєднання ферментативних реакцій в біоселективних елементах біосенсорів.

В літературному огляді дисертантом наводиться ґрунтовний аналіз принципів створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів та їх

використання в різноманітних галузях. Найбільш поширеною групою є біосенсиори на основі каскадів ферментативних реакцій, які використовуються для розширення кількості речовин, які можна аналізувати з використанням біосенсорів. Згідно з даними літератури, інша група біосенсорів, що базується на основі циклічних ферментативних реакцій, є менш поширеними через зниження кількості комбінацій ферментів. В той же час дана група біосенсорів характеризується найкращою чутливістю до відповідних аналітів.

Поряд з цим в огляді зазначено, що наявність в складі біоселективного елементу декількох ферментів ускладнює розробку біосенсора і може накладати суттєві обмеження на його робочі характеристики при практичному використанні. Показано, що головним фактором при розробці мультиферментного біосенсора є ретельний вибір ферментної системи та умов її роботи для запобігання небажаної чутливості до можливих інтерферуючих речовин та можливої низької стабільності біосенсора. Таким чином, перед розробкою нових варіантів мультиферментних біосенсорів необхідно враховувати як можливі позитивні, так і негативні наслідки, що можуть виникати під час експлуатації таких біосенсорних систем.

Наукова новизна досліджень, їх значення для науки і практики

Дисертантом запропоновані нові методики тестування електрохімічних перетворювачів, досліджені їх основні характеристики. Вперше проаналізовано та систематизовано різні стратегії розробки мультиферментних біосенсорів (прямий та непрямий аналіз субстратів, інгібіторний аналіз токсичних речовин та визначення реактиваторів) для застосування в різних галузях народного господарства, життєдіяльності людини.

Значна увага в дисертаційній роботі приділяється розробці мультиферментних біосенсорів, що створених на основі іммобілізації двох чи більшої кількості ферментів, завдяки чому відбувається ряд ферментних

реакцій, в процесі яких аналіт перетворюється в електроактивну речовину, яку можна зареєструвати електрохімічними перетворювачами. Дисертантом створено ряд біосенсорів на основі іммобілізації двох чи трьох ферментів для прямого та непрямого визначення ряду важливих метаболітів.

Серед перших розроблено двоферментний біосенсор для **визначення аргініну** на основі іммобілізованих ферментів аргінази та уреази, створено амперометричний біосенсор для визначення **ацетилхоліну** (ферменти ацетилхолінестераза, холіноксидаза). На основі коіммобілізації на дисковому платиновому мікроелектроді глюкозооксидази та гексокінази розроблено біосенсор для **визначення АТФ**. Дисертантом створено біферментний амперометричний біосенсор для **визначення глутамату** на основі іммобілізованих глутаматоксидази та аскорбатоксидази.

Дисертантом створено біосенсор на основі іммобілізованих ферментів для непрямого визначення ряду важливих метаболітів. Для аналізу **активності креатинкінази**, що є маркером інфаркту міокарда, застосовували біосенсори, що містили глюкозооксидазу та глюкозокіназу.

Олександром Олексійовичем Солдаткіним запропоновано ряд триферментних біосенсорів. Серед них кондуктометричний біосенсор для **визначення лактози** на основі іммобілізованих ферментів бета-галактозидази, мутаротази, глюкозооксидази, триферментний кондуктометричний біосенсор для **визначення мальтози** (на основі альфа-глюкозидази, мутаротази, глюкозооксидази), а також триферментний біосенсор для **визначення ЕДТА, цистеїну та іонів важких металів**.

Цим розробкам передували дуже широкі дослідження визначення оптимальних режимів іммобілізації ферментів, забезпечення стабільності функціонування біосенсорів, в тому числі за дії інтерферуючих речовин, порівняння результатів, отриманих за даними технологіями з такими, що визначаються традиційними методами. В роботі приведено розроблені автором методики попереднього тестування електрохімічних перетворювачів

для подальшого використання в складі мультиферментних біосенсорів. Запропоновано методики підбору оптимальних схем електрохімічного аналізу для найкращого функціонування біосенсорів.

Автором дисертаційної роботи проведено широкі порівняльні дослідження ефективності визначення ряду речовин за використання розроблених біосенсорних систем з традиційними методами аналізу вмісту цих речовин. Проведені дослідження свідчать про високий рівень кореляції показників за їх визначення цими методами.

Таким чином, розроблено ряд нових біосенсорних систем за різних варіантів поєднання ферментативних реакцій в біоселективному елементі біосенсора для визначення ряду аналітів. Частина розроблених біосенсорів захищена 5 патентами України на корисну модель та винахід, що також свідчить про наукову новизну одержаних результатів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації.

Дисертація Солдаткіна О.О. є завершеною науковою роботою, що містить всі необхідні елементи: обґрунтування актуальності, вибір стратегії та плану проведення досліджень, результати досліджень і їх ретельний аналіз та висновки, які логічно витікають з отриманих результатів. Всі частини роботи пов'язані між собою послідовно та логічно. Наукові дослідження проведені з використанням сучасних підходів та методів і представлені в дисертаційній роботі у достатньому обсязі.

Експериментальна частина роботи виконана із залученням біохімічних та електрохімічних методів дослідження ферментативних реакцій, різноманітних методів коїмобілізації ферментів та стандартних традиційних контрольних методів, що свідчить про адекватний поставленим завданням, високий методичний рівень роботи. Достовірність отриманих результатів підтверджується використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки експериментальних даних.

Отримані дисертантом результати ретельно проаналізовані та порівняні з даними, опублікованими в науковій літературі. Висновки є обґрунтованими, лаконічними і у повній мірі відображають отримані результати. Зважаючи на все вище викладене, обґрунтованість наукових положень, висновків, що представлені в роботі, не викликає сумнівів. Вищенаведене свідчить про те, що дисертаційна робота О.О. Солдаткіна має значне фундаментальне та практичне значення.

Результати дисертаційної роботи добре висвітлені в 70 наукових публікаціях, серед яких 31 наукова стаття, що опублікована у фахових вітчизняних наукових журналах та закордонних виданнях, 5 патентів України на корисну модель та винахід, а також 34 тези доповідей на наукових конференціях. Висновки дисертаційної роботи є аргументованими і логічно витікають з отриманих автором результатів. Автореферат дисертації відповідає її змісту. Все це свідчить про те, що робота заслуговує схвалення і підтримки.

До дисертанта є ряд питань та деякі зауваження.

1. В роботі дисертантом вказано, що при перевірці стабільності нанесення ПФД мембран, відбувалось збільшення чутливості перетворювача до пероксиду водню протягом перших годин роботи. Як можна пояснити цей ефект? Чи не може це негативно вплинути на селективність перетворювача?

2. В 4-му розділі приведено результати стосовно розробки біосенсорів для визначення ЕДТА та цистеїну. Але основних важливих етапів розробки кожного біосенсора, наприклад, дослідження впливу параметрів розчину, або дослідження стабільності чи селективності не приведено. Чому? Крім того, для визначення цих реактиваторів, час аналізу буде складати більше години. Чи є такий підхід перспективним?

3. Оскільки дисертаційна робота має значний потенціал для практичного застосування отриманих результатів, виникає питання чи застосовуються отримані результати в якихось сферах людської діяльності?

4. В роботі розроблено кондуктометричні біосенсори для визначення

мальтози, лактози, сахарози в продуктах харчування. Відомо, що реальні зразки можуть містити різні харчові добавки: консерванти, підсолоджувачі, стабілізатори, тощо. Чи будуть вони впливати на результати біосенсорного аналізу?

5. В розділі 4 вказано, що іони срібла і двовалентної ртуті суттєво впливають на показники біосенсора, в той час як катіони інших важких металів впливали незначно. Однак у висновку 5 мова йде не про катіони срібла і ртуті, а взагалі про іони важких металів. Потрібно було б вказати конкретні іони.

6. Як зауваження, іноді на графіках в тексті дисертації та автореферату не представлено довірчих інтервалів похибок вимірювання. Крім того, на рисунку 29 автореферату наведені 2 криві, на яких є ряд точок, що відповідають певним цифрам, якими позначені катіони в підрисунковому підпису, але відсутні ці цифри на кривих.

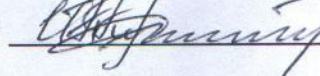
7. В дисертаційній роботі містяться деякі граматичні та стилістичні помилки, які не впливають на загальну значимість дисертаційної роботи. Вказані зауваження та питання не знижують наукового значення представлені дисертаційної роботи.

Висновок по дисертації.

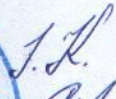

Дисертаційна робота «Основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів», що представлена Солдаткіним О.О. на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20-біотехнологія, є завершеним науковим дослідженням, в якому на основі сучасних методичних підходів, науково обґрунтовано та розроблено фундаментальні та технологічні основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів для практичного застосування в медичній діагностиці, охороні навколишнього середовища, сільському господарстві, для контролю якості продуктів харчування та перебігу біотехнологічних процесів на виробництві.

Робота виконана на високому науково-методичному рівні. За актуальністю, новизною, науково-практичною значимістю результатів дисертаційна робота відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Солдаткін Олександр Олександрович, заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія.

Офіційний опонент, завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,

доктор біологічних наук, професор  І.К. Курдиш
11 листопада 2019 року




 (Курдиш І.К.)