

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора, завідувача відділу
аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України
Гончара Михайла Васильовича

на дисертацію **Мруги Дарини Олександрівни**

«РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТЕЙ АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ, АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ ТА ЇХ СПІВВІДНОШЕННЯ»,

подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 – Біологія (09 – Біологія).

Актуальність обраної теми дисертації.

Аланінамінотрансфераза (АЛТ) та аспартатамінотрансфераза (АСТ) є ключовими біохімічними маркерами функціонального стану печінки та міокарда, рівень яких суттєво зростає при гепатопатологіях, серцево-судинних захворюваннях та низці інших патологічних станів. Спільне визначення активності обох трансаміназ та розрахунок коефіцієнта де Рітіса (АСТ/АЛТ) мають важливе диференційно-діагностичне значення. Традиційні лабораторні методи (спектрофотометрія, флуориметрія, імуноензиматичний аналіз) потребують складного обладнання, тривалої пробопідготовки та централізованої інфраструктури, що суттєво обмежує їх застосування для експрес-діагностики поза межами стаціонарної лабораторії.

Як показав проведений дисертанткою аналіз літератури, попри багаторічний досвід розробки біосенсорних систем для визначення активності АСТ і АЛТ, жодна з них не досягла рівня комерціалізації, а серед відомих систем лише незначна частина здатна до одночасної диференційованої детекції обох ензимів; при цьому електрохімічні системи такого типу до виконання цієї роботи взагалі не були описані.

Таким чином, розробка портативної, чутливої та економічно ефективною амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ, яка дозволяє автоматично розраховувати коефіцієнт де Рітіса, є актуальним завданням сучасної аналітичної біотехнології, що відповідає світовій тенденції розвитку персоналізованої медицини та point-of-care діагностики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась у рамках наступних програм і проєктів:

- відомчих тем НАН України (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018–2022 рр.; № 0123U100964, 2023–2027 рр.), присвячених розробці електрохімічних та оптичних біосенсорів, зокрема мультифункціональних систем на основі каскадів ензиматичних реакцій;

- цільової програми НАН України «"Розумні" сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ 0118U005173, № 0118U005174, 2018–2022 рр.) та гранту НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених «Розробка біосенсорної системи для моніторингу АЛТ та АСТ у пацієнтів із захворюваннями печінки та серця» (№ 0122U002131, 2022–2023 рр.), а також бюджетної теми НАН України за пріоритетним напрямом розробки біомедичних діагностичних технологій воєнного та повоєнного часу (№ 0125U000950, 2025–2026 рр.);

- трьох проєктів НФДУ (Національний фонд досліджень України): «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (№ 0120U104529, 2020–2022 рр.), «Наука для відбудови України у воєнний та повоєнний періоди» (№ 0124U002066, 2023–2024 рр.) та «Передова наука в Україні 2026–2028» (№ 0126U003404, 2026–2028 рр.), присвячених інтеграції біоселективних елементів та ензиматичних сенсорних систем із мікроелектронними й портативними платформами;

- міжнародних грантів: № 951887 «BioNanoSens» програми Horizon 2020 (2020–2024 рр.); № 225067 Swiss National Science Foundation в рамках українсько-швейцарської програми спільних наукових проєктів (2024–2027 рр.); а також грантів Simons Foundation № 1290589, № 1030279 та № SFI-PD-Ukraine-00017453 на підтримку Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (2024–2026 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Надійність одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є цілком переконливими і статистично доказовими. Отже, результати дисертаційного дослідження Мруги Д.О. є достовірними та об'єктивними.

У вступі до дисертації автор послідовно розкрила суть проблеми, обґрунтувала актуальність теми, сформулювала мету і завдання дослідження, висвітлила наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

Розділ 1 містить ретельний огляд сучасних даних літератури щодо біосенсорних підходів до визначення активності аланін- та аспартат-селективних трансаміназ, проведено критичний порівняльний аналіз існуючих електрохімічних та оптичних методів детекції цих ензимів. Узагальнення літературних даних дозволило авторці виявити, що серед 58 описаних біосенсорних систем лише 7 здатні до одночасної диференційної детекції АЛТ і АСТ, і жодна з них не є електрохімічною, що й обґрунтувало вибір напрямку власного дослідження.

У розділі 2 наведено опис використаних матеріалів та методів дослідження: електрополімеризації поліфенілендіаміну (ПФД), іммобілізації ензимів (поперечне зшивання глутаматоксидази (ГлОкс) з бичачим сироватковим альбуміном глутаровим альдегідом); включення піруватоксидази (ПОкс) у фотополімер PVA-SbQ), амперометричних вимірювань, сканувальної електронної мікроскопії, а також методів статистичної обробки результатів.

Розділ 3 є основним за обсягом і викладає послідовну логіку дослідження: (1) обґрунтування вибору амперометричного принципу детекції та аналіз ензиматичних реакцій, покладених в основу біосенсорної системи; (2) розробку та оптимізацію АСТ-чутливого біосенсора на основі ГлОкс; (3) розробку й порівняльну характеристику двох варіантів АЛТ-чутливих біосенсорів — на основі ПОкс та на основі ГлОкс — з обґрунтованим обранням варіанту на основі ПОкс за критеріями специфічності та стабільності; (4) інтеграцію оптимізованих моносенсорів у єдину амперометричну систему зі спеціальною процедурою послідовного внесення субстратів для диференціювання сигналів АЛТ та АСТ; (5) апробацію розробленої біосенсорної системи на зразках сироватки крові людини та порівняння отриманих результатів із референтним спектрофотометричним методом (коефіцієнти кореляції $R=0,994$ для АЛТ та $R=0,989$ для АСТ).

У розділі 4 обґрунтовано клінічне значення одночасного визначення активності трансаміназ і коефіцієнта де Рітіса для диференційної діагностики уражень печінки та міокарда, проаналізовано обмеження існуючих лабораторних та біосенсорних методів, здійснено порівняння характеристик розробленої системи з відомими аналогами, а також окреслено перспективи її практичного застосування, зокрема в якості point-of-care технології.

Висновки дисертаційної роботи відповідають її змісту та поставленій меті, ґрунтуються на значному експериментальному матеріалі й не викликають сумнівів.

Достовірність і новизна основних наукових положень, висновків та рекомендацій.

Наукові положення дисертаційної роботи Мруги Д.О. побудовані на матеріалах власних досліджень з використанням сучасних методів і є достовірними.

Аналізуючи наукову новизну дисертаційного дослідження, необхідно відзначити наступні положення. Вперше розроблено бінарну електрохімічну біосенсорну систему для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ на основі інтеграції двох амперометричних моносенсорів на основі іммобілізованих ПОкс та ГлОкс відповідно, а також запропоновано спеціалізовану процедуру послідовного внесення субстратів для диференціювання сигналів обох трансаміназ. Вперше здійснено порівняльний аналіз характеристик двох типів АЛТ-чутливих біосенсорів (на основі ПОкс та ГлОкс) з науковим обґрунтуванням вибору оптимального варіанту. Удосконалено конструкцію амперометричної біосенсорної системи для визначення активності трансаміназ шляхом застосування двошарової мембранної системи (ПФД + ензимна мембрана), що покращило селективність детекції у зразках сироватки крові.

Практичне значення роботи.

Розроблена біосенсорна система перевершує низку традиційних методів за мінімальним об'ємом зразка, простотою виконання аналізу та собівартістю вимірювання, а також придатністю до мініатюризації й автоматизації для створення point-of-care технологій. Практичну цінність результатів підтверджено чотирма охоронними документами (патенти на винахід № 129239 та № 125811, патенти на корисну модель № 153303 та № 147481), затвердженою методикою вимірювання активності АСТ у ДП «Укрметртестстандарт» та впровадженням розробленого біосенсора в ТОВ «Укрмедсерт».

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях.

Основні результати дисертаційної роботи достатньо повно викладено в опублікованих працях здобувачки: 9 статей у наукових фахових виданнях (у тому числі в періодичних виданнях, що індексуються у міжнародних наукометричних базах даних), 4 патенти (2 патенти на винахід та 2 патенти на корисну модель) та 16 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях. Слід особливо відзначити, що сумарний імпакт-фактор дисертаційних публікацій Мруги Дарини становить 28,2, що унікально для здобувача ступеня доктора філософії. Це свідчить про високий рівень проведених

досліджень та належну апробацію основних наукових положень дисертаційної роботи на міжнародному рівні.

Щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Мруги Д.О. є завершеною науковою працею, оформлення якої відповідає встановленим вимогам. Використані у дисертації ідеї та результати інших авторів супроводжуються відповідними посиланнями на джерела літератури.

Оцінка змісту дисертації.

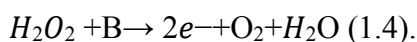
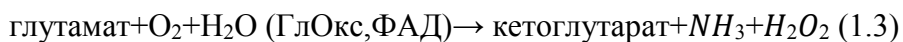
Дисертаційна робота викладена на 218 сторінках, основний текст (від вступу до висновків) — на 171 сторінці. Структура дисертації відповідає меті і завданням дослідження та складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень з обговоренням, висновків, списку використаних літературних джерел (190 найменувань) та 10 додатків. Робота добре проілюстрована рисунками і таблицями, які висвітлюють хід оптимізації та аналітичні характеристики розроблених біосенсорів.

Зауваження до дисертаційної роботи:

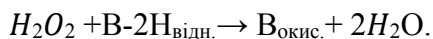
Оцінюючи дисертаційну роботу загалом позитивно, хотілося б висловити такі побажання, зауваження та отримати відповіді на наступні запитання:

Побажання та зауваження.

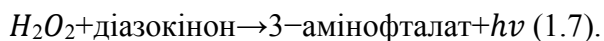
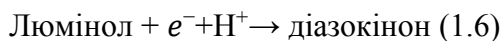
1. Слід вживати в наукових працях терміни, рекомендовані міжнародною номенклатурною системою IUPAC, зокрема: замість «пероксид водню» - гідроген пероксид. Це ж стосується для назв хімічних елементів, напр., замість *вуглецеві* – карбонові, замість активні форми *кисню* – активні форми Оксигену і т.п.
2. Зустрічаються неточності у термінах, напр.: «скануюча електронна мікроскопія» - краще «сканувальна електронна мікроскопія»; «методи виявлення концентрації трансаміназ» – краще «методи виявлення трансаміназ», оскільки виявляти можна речовини, а не їхні концентрації. Терміни «вміст трансаміназ» і «активність трансаміназ» у тексті дисертації використовуються як синоніми, хоча, безперечно, вони не є ідентичними. У контексті виконаної роботи, слід було вживати тільки другий термін.
3. На с. 60 наведено реакції:



Якщо мова йде в другій реакції про окиснення ТМВ як хромогена, то тут не протікає реакція диспропорціювання H_2O_2 , а має місце класична реакція окиснення-відновлення з утворення окисненої (хіноїдної) форми ТМВ за схемою:



4. На с. 61 наведено реакції:



Що таке «діазокінон»? Можливо, малось на увазі **діаніон** люмінолу? До речі, він утворюється простим відщепленням двох протонів (реакція дисоціації), без участі електрону, як невірно вказано в першій реакції (1.6).

5. У ВИСНОВКАХ зазначено, що вивчався вплив різних параметрів інкубаційної суміші для біосенсорного аналізу активності трансфераз АлТ і АсТ, включно «кофакторів ПОкс». У ВИСНОВКАХ має бути наведено **конкретний перелік** коензимів/кофакторів, які використовувались у роботі для оптимізації аналізу. Які кофактори/коензими маються на увазі? Адже для цього необхідні FAD (правда, він міцно зв'язаний з апопротеїном, а тому можна його не додавати), а також тіамінпірофосфат, йони двовалентних металів (напр., Mg^{2+}), а для амінотрансфераз - піридоксаль-5'-фосфат.

6. Замість «кінетика Міхаеліса-Ментен~~а~~» має бути «кінетика Міхаеліса-Ментен», бо Ментен – це жінка, асистентка Міхаеліса, а жіночі прізвища в українській мові не відмінюються.

7. Не «графік Лайнвівера-Бурка», а Лайнвівера-Берка (від англ. Lineweaver–Burk).

8. Не «референсним спектрофотометричним методом», а референтним спектрофотометричним методом.

9. Хоча робота написана дуже добре з точки зору граматики та стилістики, інколи зустрічаються невдалі вирази, напр., «активний *каталізаційний* процес» (мав би бути «каталітичний процес»); зрідка зустрічаються граматичні помилки, напр., «порівнянно» у ВИСНОВКАХ (замість порівняно).

Запитання.

1. Використаний в роботі принцип функціонування біосенсорів полягає в тому, що «продукти трансаміназних реакцій окиснюються іммобілізованими оксидазами (піруватоксидазою ПОкс або глутаматоксидазою ГлОкс) з генерацією електроактивного пероксиду водню, який у свою чергу окиснюється на платиновому дисковому електроді при потенціалі +600 мВ відносно електроду порівняння Ag/AgCl, створюючи амперометричний

сигнал». Такий підхід характерний для біосенсорів першого покоління, коли використовувались високі робочі потенціали окиснення, які спричиняли аналітичні помилки, пов'язані із електроактивними інтерферентами, присутніми у біологічних рідинах (аскорбінова кислота, урати, ацетамінофен).

Для розв'язання проблеми негативного впливу таких інтерферентів, Ви використовували модифікацію електрода електрополімеризованим поліфенілендіаміном (ПФД), який фізично гальмує дифузію об'ємних молекул інтерферентів.

Але існують альтернативні методи розв'язання такої проблеми. Чи не пробували Ви моніторувати утворення гідроген пероксиду за використання **підходів зниження робочого потенціалу**, зокрема, природну пероксидазу хрому, неорганічний міметик пероксидази Пруську блакить, деякі медіатори або нанозими? Якщо ні, то чи зацікавлені Ви у застосуванні таких підходів у майбутньому?

У цілому, вищезазначені зауваження та запитання мають дискусійний характер і не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи в цілому, а також викладених дисертанткою основних наукових положень та висновків.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота **Мруги Дарини Олександрівни «Розробка діагностичної біосенсорної системи для одночасного визначення активностей аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та їх співвідношення»**, виконана в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, є самостійною завершеною науковою працею у галузі науки 09 Біологія (спеціальність 091 – «Біологія»), в якій отримано нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності є суттєвими для розробки електрохімічних мультиензимних біосенсорних систем медичного діагностичного призначення.

Оформлення дисертації відповідає діючим нормативним документам. Отримані Дариною Олександрівною результати мають як теоретичну, так і практичну цінність. Зроблені зауваження не знижують значення отриманих результатів і не впливають на загальну високу оцінку роботи.

Отже, за актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням, обсягом експериментального матеріалу, самостійного внеску дослідниці і зроблених висновків дисертаційна робота **«Розробка діагностичної**

біосенсорної системи для одночасного визначення активностей аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та їх співвідношення» відповідає спеціальності 091 – Біологія та вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12.01.2022 року, а її автор **Мруга Дарина Олександрівна** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу аналітичної біотехнології
Інституту біології клітини НАН України



Михайло ГОНЧАР

3 вересня 2026 р.