РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу **Мруги Дарини Олександрівни**

на тему

«РОЗРОБКА БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АЛТ, АСТ ТА ЇХ СПІВВІДНОШЕННЯ ДЛЯ МЕДИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ»,

подану на здобуття ступеня доктора філософії

за спеціальністю 091 «Біологія»

кандидатки біологічних наук, старшого наукового співробітника

відділу молекулярної онкогенетики

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Маньковської Оксана Сергіївни

Актуальність теми дисертації. Дисертаційна робота Мруги Дарини Олександрівни присвячена розробці, оптимізації та апробації амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази у біологічних рідинах людини.

Актуальність обраної теми не викликає сумнівів, адже АЛТ та АСТ належать до основних біохімічних маркерів функціонального стану печінки, міокарда та скелетних м'язів. У зв'язку з цим визначення активності цих ензимів і розрахунок коефіцієнта де Рітіса мають важливе значення для диференційної оцінки патологічних станів, зокрема уражень печінки, серцево-судинних захворювань, міопатій та метаболічних порушень.

Традиційні методи визначення активності трансаміназ, передусім спектрофотометричні, хоча й характеризуються високою точністю, потребують спеціалізованого обладнання, значного об'єму зразка, додаткових реагентів, дотримання складної послідовності операцій та, як правило, функціонування в умовах централізованої лабораторії. Тому створення нових, портативних, швидких, доступних і придатних до мініатюризації біосенсорних систем є важливим завданням сучасної медичної біотехнології.

Особливої актуальності роботі надає вирішення проблеми диференційованого визначення АЛТ та АСТ в одному біологічному зразку. У дисертації запропоновано поєднання двох амперометричних моносенсорів, що функціонують на основі різних ферментних систем, а також розроблено спеціальну процедуру послідовного внесення реагентів і математичної обробки отриманих сигналів.

Загальна характеристика дисертаційної роботи. Дисертаційна робота має логічну структуру та складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів, експериментальної частини, розділу аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел і додатків.

Загальний обсяг дисертації становить 218 сторінок. Робота містить 50 рисунків, 11 таблиць, 190 бібліографічних джерел і додатки, у яких наведено додаткові експериментальні матеріали, результати кінетичної характеризації біосенсорів, затверджену методику вимірювання активності АСТ та акт упровадження розробки.

Мета і завдання дослідження сформульовані чітко та відповідають змісту дисертації. Для досягнення поставленої мети авторкою послідовно вирішено завдання щодо:

- вибору та оптимізації ферментних систем для визначення АЛТ і АСТ;
- розроблення амперометричних моносенсорів на основі глутаматоксидази та піруватоксидази;
- підбору умов іммобілізації ферментів;
- оптимізації складу робочого середовища, субстратів, коензимів і кофакторів;
- підвищення селективності електродів за рахунок застосування полімерної напівпроникної мембрани;
- дослідження аналітичних характеристик, стабільності та відтворюваності сенсорів;
- об’єднання моносенсорів у єдину біосенсорну систему;
- апробації системи у зразках сироватки крові та порівняння результатів із референсним спектрофотометричним методом.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна дисертаційної роботи полягає насамперед у розробленні мультианалітної амперометричної біосенсорної системи для диференційованого визначення активності АЛТ та АСТ в одному зразку.

До основних нових результатів роботи належать:

1. Розроблено систему, у якій для селективного визначення АЛТ використано біосенсор на основі іммобілізованої піруватоксидази, а для визначення АСТ — біосенсор на основі глутаматоксидази.
2. Запропоновано процедуру послідовного внесення реагентів, що дає змогу розділити в часі реакції АСТ та АЛТ і забезпечити окреме визначення активності кожного ензиму в спільному зразку.

3. Проведено порівняльне дослідження двох варіантів АЛТ-чутливих біосенсорів — на основі глутаматоксидази та піруватоксидази. Показано, що варіант на основі піруватоксидази є доцільнішим для інтеграції в мультианалітну систему завдяки специфічності щодо пірувату, ширшому лінійному діапазону та нижчій межі визначення.
4. Оптимізовано умови формування ферментних мембран. Для глутаматоксидази застосовано ковалентну поперечну зшивку за участю глутарового альдегіду, а для піруватоксидази — включення ферменту у фотополімерну матрицю PVA-SbQ.
5. Удосконалено конструкцію електрохімічного перетворювача шляхом формування двошарової системи, що дозволило зменшити вплив електроактивних інтерферентів під час аналізу біологічних зразків.
6. Встановлено основні закономірності впливу складу робочого середовища, концентрацій субстратів, коензимів, кофакторів, білка та іонної сили на функціонування розроблених біосенсорів.

Таким чином, наукова новизна роботи має водночас методологічний і прикладний характер.

Обґрунтованість і достовірність результатів. Достовірність одержаних результатів забезпечується використанням комплексу взаємодоповнювальних методів дослідження, зокрема хроноамперометрії, циклічної вольтамперометрії, спектрофотометрії, методів іммобілізації ензимів, сканувальної електронної мікроскопії та статистичного опрацювання експериментальних даних.

Авторкою досліджено не лише принципову можливість функціонування окремих моносенсорів, а й особливості їх спільної роботи в єдиній вимірювальній системі. Окремо вивчено перехресний вплив компонентів системи, субстратів, коензимів і кофакторів, а також вплив біологічної матриці.

Важливим результатом є підтвердження придатності системи для аналізу сироватки крові людини. Результати вимірювань, наведені акторкою, свідчать про сильний лінійний зв’язок між даними, отриманими за допомогою розробленої біосенсорної системи та контрольного методу, у дослідженому діапазоні активностей трансаміназ.

Позитивної оцінки заслуговує також дослідження стабільності та відтворюваності сенсорів. Для різних варіантів біосенсорів визначено відтворюваність повторних вимірювань, відтворюваність процедури іммобілізації, операційну стабільність і стабільність під час зберігання.

Практичне значення результатів. Практичне значення дисертаційної роботи полягає у створенні лабораторного прототипу біосенсорної системи, придатної для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ у сироватці крові.

Розроблена система має низку потенційних переваг, серед яких хочеться виділити невеликий об'єм біологічного зразка, відсутність складної пробопідготовки, можливість багаторазового використання платинових електродів, можливість автоматизації та мініатюризації і потенційну придатність для створення point-of-care пристроїв, адже усе перелічене вище створює гарні передумови для потенційного впровадження у клінічну практику.

Практична спрямованість роботи підтверджується проведенням метрологічної роботи та впровадженням результатів. За результатами роботи отримано патенти на винаходи та патенти на корисні моделі.

Одержані результати можуть бути використані як науково-технологічна основа для подальшого створення портативних аналізаторів, призначених для використання у клініко-діагностичних лабораторіях, амбулаторній практиці, мобільних медичних пунктах та інших умовах, де необхідне швидке визначення біохімічних показників.

Особистий внесок здобувачки. Згідно з наведеними в дисертації відомостями, здобувачкою самостійно виконано основний обсяг експериментальної роботи, зокрема планування та проведення досліджень, оптимізацію складу біоселективних мембран і робочих розчинів, апробацію біосенсорної системи у зразках сироватки крові, статистичне опрацювання та інтерпретацію результатів.

У спільних публікаціях особистий внесок здобувачки зазначено. Участь інших співавторів стосувалася окремих експериментальних процедур, проведення спектрофотометричних вимірювань, дослідження морфології електродів, консультацій та обговорення результатів.

Вважаю, що особистий внесок Мруги Дарини Олександрівни у виконання дисертаційної роботи є суттєвим і відповідає рівню здобувачки ступеня доктора філософії.

Апробація та публікація результатів. Основні результати дисертаційного дослідження оприлюднено на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях. За темою дисертації опубліковано наукові статті у фахових виданнях, зокрема виданнях, що індексуються у міжнародних наукометричних базах даних Web of Science та Scopus. Результати роботи також відображено у патентах на винаходи та корисні моделі.

Зміст опублікованих праць відповідає основним положенням дисертації: у них висвітлено розроблення АСТ-чутливого біосенсора, створення та порівняння двох варіантів АЛТ-чутливих біосенсорів, удосконалення полімерних мембран, оптимізацію умов функціонування сенсорів і розроблення мультианалітної біосенсорної системи.

Таким чином, публікаційна активність здобувачки є достатньою для висвітлення основних результатів дисертації.

Зауваження та питання для дискусії. Дисертаційна робота Мруги Дарини Олександрівни містила дрібні помилки і стилістичні неточності, абсолютна більшість яких були прийняті до уваги і виправлені здобувачкою у процесі роботи над рукописом**.** Втім, як і кожна завершена наукова робота, дисертація містить окремі положення, які можуть бути предметом наукової дискусії:

1. У роботі основну апробацію проведено на зразках сироватки крові. Водночас перспективним напрямом є дослідження можливості застосування системи для інших біологічних рідин, зокрема плазми, слини, поту або інших мінімально інвазивних зразків. **Запитання:** Як Ви оцінюєте перспективу апробації створеної біосенсорної системи на зразках інших біологічних рідин, з урахуванням її технічних характеристик і потенційного клінічного значення такого використання?

2. Потребує подальшого розвитку питання стандартизації ручного нанесення ферментних мембран, оскільки саме ця процедура зумовлює частину варіабельності між окремими сенсорами. **Запитання:** Які шляхи такої стандартизації Ви бачите на даному етапі розробки? Наскільки велике значення має стандартизація ручного нанесення ферментних мембран для якості роботи біосенсорної симтеми?

3. Для повноцінного клінічного застосування системи доцільним є подальше розширення кількості реальних клінічних зразків, залучення зразків пацієнтів із різними патологіями та проведення розширених валідаційних досліджень. **Запитання:** Чи плануєте Ви в подальшому продовжувати апробацію системи на клінічних зразках? Які результати додаткових досліджень, на вашу думку, необхідні для підтвердження клінічної значущості розрахованого співвідношення АСТ/АЛТ у пацієнтів із конкретними захворюваннями печінки або серцево-судинної системи?
4. У дисертації коефіцієнт де Рітіса розглядається як важливий напрям практичного використання системи, однак основний експериментальний матеріал зосереджено переважно на окремому визначенні активності АЛТ та АСТ. **Запитання:** Яким є алгоритм розрахунку коефіцієнта де Рітіса за результатами роботи запропонованої

системи? Які обмеження виникають під час його розрахунку, якщо активність АЛТ або АСТ наближається до межі визначення?

Зазначені зауваження мають дискусійний і рекомендаційний характер, не стосуються принципових положень роботи та не знижують її загальної наукової і практичної цінності.

Висновок. Дисертаційна робота Мруги Дарини Олександрівни на тему «Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ, АСТ та їх співвідношення для медичної діагностики» є завершеною самостійною науковою працею, у якій розв'язано важливе науково-прикладне завдання в галузі біології, біосенсорики та медичної біоаналітики.

У роботі одержано нові наукові результати щодо розроблення амперометричних моносенсорів, оптимізації ферментних мембран, підвищення селективності електрохімічних перетворювачів та інтеграції сенсорів у єдину систему для диференційованого визначення активності АЛТ та АСТ.

Дисертація характеризується належним рівнем наукової новизни, обґрунтованістю експериментальних результатів, логічністю структури, достатнім рівнем апробації та практичною спрямованістю. Основні положення дисертації відображено в наукових публікаціях і патентних документах, а окремі результати пройшли метрологічне опрацювання та впровадження.

Вважаю, що дисертаційна робота Мруги Дарини Олександрівни відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року, а її авторка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент:

К.б.н., с.н.с. відділу молекулярної онкогенетики

Інституту молекулярної біології і генетики Оксана МАНЬКОВСЬКА