

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента – доктора хімічних наук, завідувача відділу синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Дубея Ігоря Ярославовича
на дисертацію Мруги Дарини Олександрівни
«Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ, АСТ та їх співвідношення для медичної діагностики»,
що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертації

Робота Д.О. Мруги присвячена створенню й оптимізації амперометричних сенсорів для визначення активності двох ферментів-трансфераз, а саме аланінамінотрансферази (АЛТ) і аспартатамінотрансферази (АСТ), у тому числі одночасного. Вибір теми дослідження добре обґрунтований, а його актуальність безсумнівна. З одного боку, вказані ферменти є важливими маркерами численних патологічних станів печінки (гепатит, цироз), серцево-судинної системи (серцева недостатність, інфаркт), міопатії та ін. При цьому одночасний аналіз активності обох цих ферментів та визначення їх співвідношення дозволяє диференціювати кардіологічні та печінкові захворювання.

З іншого ж боку, портативні біосенсорні системи дозволяють проводити швидко та економічне визначення цільових аналітів, зокрема, ферментів. В цьому полягає основна перевага таких систем порівняно з класичними аналітичними методами (спектроскопічними, імуноферментними тощо), котрі вимагають як дорогого обладнання, так і та тривалого часу проведення аналізу зразків.

Виходячи з цього, створення електрохімічної біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ і АСТ у реальних біологічних зразках є перспективним і актуальним науковим і практичним завданням для біосенсорики, ензимології та медичної діагностики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконувалась у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України й відповідає основному плану його НДР. Робота проводилась у рамках двох бюджетних тем відділу (2018-2022, 2023-2027 рр.) та численних конкурсних дослідницьких грантів. Серед них три гранти НФДУ (2020-2022, 2023-2024, 2026-2028 рр.) та гранти НАН України – програми “Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій (2018-2022) та дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених (2022-2023). Робота підтримана також міжнародними грантами BioNanoSens (2020-2024) та Swiss National Science Foundation (2024-2027).

Загальна структура дисертації

Дисертація загальним обсягом 218 стор. побудована за класичною схемою. Робота складається з анотації, вступу, 4-х розділів, висновків, списку літератури, що включає 190 посилання, а також додатків А-І. Дисертація містить 50 рисунків і 11 таблиць.

Аналіз основного змісту роботи

Метою дисертаційної роботи була розробка, оптимізація та апробація амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в біологічних рідинах людини. Відповідні завдання роботи конкретні, чітко сформульовані, вибір методів дослідження (у т.ч. самого методу аналізу) добре обґрунтований. В роботі використано комплекс адекватних сучасних методів досліджень.

Перший розділ дисертації – літературний огляд. В ньому розглянуто роль ферментів АСТ і АЛТ в організмі в нормі та патології, методи визначення активності ферментів. Основну увагу сконцентовано на біосенсорних системах аналізу. Розглянуто численні варіанти таких систем (оптичні та електрохімічні, ферментативні та неферментативні, мультиферментні тощо). Огляд детальний, добре структурований, література актуальна, проблему розглянуто всебічно.

В наступних кількох розділах дисертації представлено результати власних досліджень автора.

Розділ 2 (“Матеріали і методи”) – експериментальна частина дисертації. Тут описані основні методи, що використовувались при проведенні досліджень. Зокрема, наведено детальні методики формування біоселективних елементів, описано методи вимірювання активності ферментів, підготовки біологічних зразків та визначення вмісту двох ферментів у них. Наведено методику спектрофотометричного вимірювання вмісту цих ферментів у сироватці крові, що застосовувалось як контроль.

Розділ 3 (“Результати і обговорення”) є основною частиною дисертації. В ньому описано всі безпосередньо досліджувані в роботі проблеми. Серед них розробка процедури формування біоселективних елементів сенсорів, чутливих до АСТ і АЛТ, та біоселективних мембран на основі глутаматоксидази та піруватоксидази, дослідження впливу факторів середовища (температура, рН, буферна система тощо) на функціонування біосенсорів, визначення селективності й аналітичних характеристик біосенсорів, їх стабільності. Підібрані оптимальні умови проведення аналізу. Ключовою частиною цього розділу є розробка й дослідження сенсорної системи для одночасного визначення обох ферментів та використання цієї системи в аналізі реальних біологічних зразків. Важливим елементом роботи є дослідження кореляції між розробленим біосенсорним та референсними методами аналізу сироватки крові.

Заключний **Розділ 4** роботи присвячено узагальненню й аналізу отриманих результатів на фоні попередніх досягнень в області, якій присвячена дисертація. Це концептуальний розділ. У ньому, зокрема, порівняно вже існуючі біосенсорні методи визначення АСТ і АЛТ (у т.ч. одночасного), обговорено їх переваги й обмеження, проаналізовано переваги розробленої нової системи, визначено її методологічну новизну та перспективи подальшого розвитку. Цей розділ можна вважати прикрасою даної роботи. Тут варто зазначити, що подібне важливе узагальнення далеко не завжди зустрічається в дисертаціях.

У **Додатках** представлено список публікацій автора за темою дисертації, додаткові експериментальні дані (передусім, кінетичні), а також копії перших сторінок затвердженої методики та акту впровадження розроблених біосенсорів.

Наукова новизна роботи

Наукова новизна й теоретичне значення роботи не викликають жодних сумнівів. В ній вперше запропоновано електрохімічну біосенсорну систему для одночасного визначення активності двох амінотрансфераз (АЛТ і АСТ) в одному біологічному зразку. В запропонованій системі інтегровано два моносенсиори, що використовують іммобілізовану піруватоксидазу (ПОкс) та глутаматоксидазу (ГлОкс) для визначення відповідно АЛТ і АСТ. На відміну від уже відомих мультианалітичних систем для визначення трансаміназ, у яких використовують оптичні методи детекції, нова система ґрунтується на амперометричній реєстрації сигналу, що забезпечує простоту конструкції і одночасно високу чутливість визначення, а також можливість мініатюризації пристрою.

Запропоновано спеціальну процедуру внесення субстратів для покращення диференціації сигналів від двох аналітів. При цьому вперше порівняно характеристики АЛТ-сенсорів на основі ПОкс і ГлОкс і вибрано перший варіант за сумарними критеріями ефективності. Запропоновано конструкцію сенсорної системи, що використовує 2-шарову мембрану для підвищення селективності детекції аналітів у реальних зразках.

Продемонстровано здатність розробленої системи достовірно визначати активність АСТ та АЛТ у зразках сироватки крові людини. Достовірність результатів біосенсорного аналізу підтверджено високим коефіцієнтом кореляції з результатами контрольного спектрофотометричного аналізу. Встановлено лінійні діапазони визначення для обох ферментів, які перекривають їх клінічно значущі концентрації в нормі та патології.

Практичне значення отриманих результатів

Результати роботи мають і безумовне практичне значення. Перш за все, дисертанткою розроблені прості у використанні та економічно ефективні моно- та мультисенсорні системи, що за своїми характеристиками перевершують більшість традиційних біоаналітичних методів. При цьому інтегрована система дозволяє

одночасно визначати два ферменти та їх співвідношення у зразку. Автором отримано 4 патенти України (2 на винахід і 2 на корисну модель). Розроблену методику вимірювання вже затверджено “Укрметртестстандартом”, а саму сенсорну систему впроваджено в практику, що підтверджує акт про впровадження розроблених біосенсорів. Все це підкреслює вагоме практичне значення роботи.

Розроблені й охарактеризовані моносенсорні та інтегрована сенсорна системи перспективні для застосування в медичній практиці, зокрема, в експрес-діагностиці патологічних станів печінки та серцево-судинної системи в клінічних умовах, а також обстежень пацієнтів із груп ризику.

Достовірність отриманих результатів

Достовірність результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів. Вона ґрунтується передусім на застосуванні сучасних експериментальних методів дослідження. Комплекс методів включає, зокрема, електрополімеризацію, методи ковалентної іммобілізації ферментів на поверхнях та їх інкапсуляції в полімерну матрицю, спектрофотометрію, амперометрію, скануючу електронну мікроскопію, кінетичний аналіз, а також методи статистичної обробки даних. Використані в даній роботі методи дозволили автору отримати достовірні результати, на яких ґрунтуються зроблені висновки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків дисертації

Матеріали роботи викладено відповідно до мети й завдань дослідження, які чітко сформульовані. Дисертанткою проведений ґрунтовний аналіз літератури за темою дослідження, що дозволило виявити наукову новизну одержаних у роботі результатів. Застосування вказаних вище методів дало змогу розв’язати проблеми, що лежали в основі проведеного дослідження. Висновки дисертаційної роботи ясно сформульовані та висвітлюють її основний зміст. Наукові положення та висновки дисертації обґрунтовані й відповідають отриманим результатам.

Повнота викладу результатів роботи в опублікованих працях

Основні результати дисертації повністю опубліковані, причому в серйозних фахових виданнях. Так, усі статті вийшли в журналах, що індексуються в наукометричних базах Scopus та Web of Science Core Collection. 6 із 8 статей надруковані в рейтингових міжнародних журналах, серед яких *Sensors* (квартиль Q1), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Q2), *Applied Nanoscience* (Q2), *Micromachines* (Q2), *Electroanalysis* (Q3). Дисертантка є першим співавтором огляду в престижному *Trends in Analytical Chemistry* (імпакт-фактор 12.0, квартал Q1). Публікації свідчать про високий рівень проведених досліджень, наукову новизну й вагомість отриманих результатів. Як уже сказано, отримано 4 патенти України.

Результати досліджень представлено також у 16 тезах доповідей на конференціях, серед яких 5 міжнародних в Україні та 1 за кордоном.

Загальна оцінка змісту дисертаційної роботи

Дисертаційна робота справляє дуже позитивне враження. Дисертанткою виконаний справді великий обсяг експериментальних досліджень, що дозволило розробити й оптимізувати ряд сенсорних систем для розв'язання актуальних біоаналітичних задач. Сформульовані автором мета і завдання роботи успішно реалізовані. Висновки чіткі й відповідають отриманим результатам і основним положенням роботи. Сама дисертація добре організована та гарно оформлена.

В цілому, дисертація Д.О. Мруги – це серйозна наукова праця, виконана на високому експериментальному й теоретичному рівні. В цій роботі отримано нові результати, важливі для розвитку біології та біосенсорики.

Дискусійні положення, зауваження та запитання до дисертації

За змістом, отриманими результатами та глибиною їх аналізу дисертація є дослідженням високого рівня. Принципових зауважень до неї у рецензента немає, а серед окремих зауважень та запитань можна навести наступні.

1. Для сенсорів на основі ГлОкс вказано, що “Для уникнення спотворення результатів вимірювань активності АСТ електроактивними сполуками було запропоновано використовувати додаткову ПФД мембрану, яка фізично блокує дифузію високомолекулярних та позитивнозаряджених молекул до поверхні електрода» (с. 108). Водночас “підтверджено, що типові компоненти біологічних рідин – сечова кислота, ЕДТА, глюкоза, лимонна кислота, бензойна кислота, азид натрію, солі Na^+ , K^+ та Ca^{2+} – у концентраціях до 1 мМ не викликали жодного відгуку біосенсора” (с. 109). Всі ці сполуки є низькомолекулярними. А який вплив глутамату, що може бути присутнім у зразку, і як уникнути його в аналізі?

2. Подібне запитання стосується й сенсорів на основі ПОкс. Показано, що вони малочутливі до амінокислот, глюкози, сечовини, лимонної кислоти та інших сполук, проте очікувано дають сильний відгук на піруват – субстрат ПОкс (с. 135-136, Рис. 3.28). При цьому сказано, що при визначенні АЛТ можна знехтувати даним впливом. Це коректно для наведених вище сполук, але навряд чи для пірувату. Як це пояснити, і як уникнути інтерференції сигналу пірувату в зразку?

3. Чи можливий двостадійний аналіз, при якому спочатку вноситься тільки зразок і вимірюється сигнал інтерферуючих домішок, присутніх у ньому (таких, як глутамат чи піруват), а вже тоді в систему додається субстрат АЛТ чи АСТ і проводиться повторне вимірювання? Це дозволило б мінімізувати інтерференцію.

4. В анотації та в Додатку А список статей за темою дисертації містить 9 назв, одна з яких (№1 у списку) ще знаходиться в друці, а такі публікації не враховуються. В англійській анотації коректно наведено 8 статей. У будь-якому випадку, кількість і якість публікацій більш ніж достатні для захисту.

5. У Вступі в роздділі “Публікації” (с. 39) та в розділі “Практичне значення отриманих результатів” (с. 37) помилково вказано, що оформлено 2 патенти, тоді як насправді їх 4 (що відображено в списку публікацій в анотації та Додатку А).

6. Форматування нумерації списку публікацій автора в Додатку А зроблене з помилками.

Ці зауваження не стосуються суті роботи і жодним чином не впливають на її загальну високу оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Представлена дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею, що становить вагомий внесок у галузь біосенсорних технологій, біоаналітичної хімії, ензимології та наук про життя в цілому. Актуальність теми роботи, достовірність, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, повнота їх викладу в опублікованих працях, обґрунтованість положень і висновків свідчать про високий науковий рівень роботи. Її результати забезпечують вирішення актуальних наукових завдань у галузі знань 09–“Біологія”. Робота оформлена відповідно до вимог наказу МОН України №40 від 12 січня 2017 р. “Про затвердження вимог до оформлення дисертації”.

У підсумку, дисертація Дарини Олександрівни Мруги на тему “Розробка біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ, АСТ та їх співвідношення для медичної діагностики” відповідає спеціальності 091–“Біологія” і вимогам “Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах)”, що затверджений постановою Кабінету міністрів України №261 від 23 березня 2016 р. (зі змінами й доповненнями №283 від 3 квітня 2019 р.) та “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 січня 2022 р. (зі змінами, внесеними постановами Кабінету міністрів України №341 від 21 березня 2022 р. і №502 від 19 травня 2023 р.), а її автор повністю заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 “Біологія”.

Офіційний рецензент:

завідувач відділу синтетичних біорегуляторів
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України, д.х.н., ст.н.с.



Ігор ДУБЕЙ

