

Рецензія

на дисертаційну роботу Мруги Дарини Олександрівни «РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТЕЙ АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ, АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ ТА ЇХ СПІВВІДНОШЕННЯ»,
представленої на здобуття наукового ступеню доктора філософії за спеціальністю 091 - Біологія та біохімія, 09 - Біологія

Актуальність вибраної теми дисертації. Дисертаційну роботу Д.О. Мруги присвячено актуальному питанню медичної біохімії – визначенню активності ензимів, які відіграють ключову роль у метаболізмі амінокислот і слугують важливими показниками функції печінки та серцевого м'яза – аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ). Вони є ключовими біохімічними маркерами функціонального стану печінки та міокарда, рівень яких суттєво зростає при патологіях печінки (гепатит, цироз), серцево-судинних захворюваннях (інфаркт міокарда, серцева недостатність) та інших патологічних станах (пreeклампсія, міопатії, метаболічний синдром).

Традиційно рівні АСТ та АЛТ у біологічних рідинах визначають за допомогою лабораторних методів, які забезпечують високу точність, чутливість та мультиплексну здатність, що робить їх незамінними в дослідженнях та централізованій діагностиці. Однак вони мають серйозні обмеження для швидкого клінічного використання. Багато з них не підходять для використання в місцях надання медичної допомоги, оскільки аналіз займає від десятків хвилин до годин і вимагає централізованої інфраструктури.

Вирішити зазначені проблеми медичної діагностики можливо за рахунок розробки нових портативних біоаналітичних пристроїв — біосенсорів, що поєднують біологічні компоненти з фізико-хімічними перетворювачами. У цьому контексті зростає потреба у швидких, точних та доступних інструментах для моніторингу біохімічних маркерів, які можуть вказувати на стан здоров'я людини, наявність патологій та динаміку їх прогресування.

Незважаючи на значну кількість наукових досліджень, жоден з існуючих біосенсорів для визначення АЛТ або АСТ не був доведений до стадії комерційного продукту. Основними перешкодами залишаються обмежені аналітичні характеристики для роботи з біологічними зразками, а також відсутність ефективних підходів до мультианалітної детекції обох ензимів. Особливо критичною є проблема одночасного диференційованого визначення АСТ та АЛТ в одному зразку. Тому розробка електрохімічної біосенсорної системи для одночасного визначення активності АЛТ та АСТ із забезпеченням селективності та достовірності аналізу в біологічних рідинах є актуальною

науковою задачею, що має важливе практичне значення для медичної діагностики.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась в рамках наступних проєктів:

- Відомча тематика 2.2.4.22 «Нові електрохімічні та оптичні біосенсиори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів» (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018-2022 рр.);
- Відомча тематика 2.2.4.22 «Складні мультифункціональні біосенсорні системи на основі ензимів, каскадів ензиматичних реакцій та біоміміків» (№ держ. реєстрації 0123U100964, 2023-2027 рр.);
- «Дослідження нових підходів інтеграції біологічного матеріалу з мікроелектронними датчиками в портативних системах персоналізованої медицини» за конкурсом НФДУ «Передова наука в Україні 2026-2028» (№ держ. реєстрації 0126U003404, 2026-2028 рр.);
- «Розробка технології створення біосенсорних тест систем для аналізу активності ензимів як діагностичних показників пошкоджень внутрішніх органів» за фінансування НАНУ (Наукові і науково-технічні (експериментальні) роботи за пріоритетним напрямом «Розроблення сучасних біологічних та біомедичних методів, діагностичних засобів і технологій для забезпечення держави у воєнний та повоєнний час» (№ держ. реєстрації 0125U000950, 2025–2026 рр.);
- «Розробка портативної системи експрес моніторингу співвідношення лактату і пірувату в крові для нагальних потреб клінічної діагностики» за конкурсом НФДУ «Наука для відбудови України у воєнний та повоєнний періоди» (№ держ. реєстрації 0124U002066, 2023-2024 рр.);
- Дослідження особливостей формування сучасних біоселективних елементів на основі наноматеріалів різної природи для електрохімічних біосенсорів та сенсорних масивів із заданими та керованими властивостями", за конкурсом НФДУ «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (№ держ. реєстрації 0120U104529, 2020-2022 рр.);
- «Розроблення та оптимізація біосенсорної системи моніторингу нейромедіаторів для експрес діагностики та контролю ефективності лікування нейропатологій» в межах цільової програми наукових досліджень НАН України «“Розумні” сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005174, 2018–2022 роки);
- «Розробка біосенсорної системи для моніторингу АЛТ та АСТ у пацієнтів із захворюваннями печінки та серця», гранти НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України для проведення досліджень

за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки (№ держ. реєстрації 0122U002131, 2022–2023 роки);

- «Розроблення та оптимізація біосенсорної системи моніторингу нейромедіаторів для експрес діагностики та контролю ефективності лікування нейропатологій» в рамках комплексної науково-технічної програми НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005173, 2018–2022 роки);
- грант № 225067 «Novel Portable Non-Invasive Real-Time Monitoring System for Biomarker Detection in Preterm Infants» від Swiss National Science Foundation в рамках «Спільні українсько-швейцарські проєкти з виконання наукових досліджень Ukrainian-Swiss Joint Project Proposal» (2024-2027 pp.);
- грант № 951887 «BioNanoSens «Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on «smart» nanomaterials», профінансований Horizon 2020 (2020-2024 pp.);
- гранти № 1290589, № 1030279, № SFI-PD-Ukraine-00017453 від Simons Foundation на підтримку Інституту молекулярної біології і генетики (2024-2026 pp.).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи була розробка, оптимізація та апробація амперометричної біосенсорної системи для одночасного визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) у біологічних рідинах людини.

Для досягнення мети було поставлено завдання проаналізувати, обрати та перевірити ензимні системи, методи та умови їхньої іммобілізації для селективної детекції АЛТ і АСТ; розробити та оптимізувати конструкцію амперометричних ензимних монобіосенсорів для визначення активності АСТ та АЛТ в розчинах, визначити оптимальні параметри робочого розчину, зокрема склад та концентрації субстратів, коензимів та буферного розчину, для найкращого функціонування отриманих біосенсорів; підібрати умови формування додаткової напівпроникної мембрани на поверхні перетворювачів для максимального нівелювання впливу електроактивних речовин, які присутні в біологічних рідинах; об'єднати розроблені монобіосенсиори в єдину аналітичну біосенсорну систему, вивчити перехресний вплив субстратів, коензимів та кофакторів монобіосенсорів та оптимізувати функціонування обох сенсорів при одночасній роботі, вивчити селективність розроблених монобіосенсорів та об'єднаної системи відносно можливих інтерферуючих речовин; дослідити аналітичні характеристики розроблених монобіосенсорів і біосенсорної системи та проаналізувати перспективність їх застосування на практиці, перевірити стабільність (зберігання, операційну стабільність, відтворюваність сигналів, відтворюваність ензимної мембрани) розроблених монобіосенсорів та системи на їх основі; провести апробацію лабораторного прототипу розробленої біосенсорної системи при роботі зі зразками сироватки крові та провести

верифікацію отриманих біосенсорних результатів референсним спектрофотометричним методом.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено електрохімічну біосенсорну систему для одночасного диференційованого визначення активності аспартатамінотрансферази в одному зразку біологічної рідини. На відміну від усіх раніше описаних мультианалітичних систем для визначення трансаміназ, що базуються на оптичних методах детекції, запропонована система використовує амперометричний принцип реєстрації сигналу, що забезпечує високу чутливість, простоту конструкції та можливість мініатюризації. Вперше проведено порівняльну характеристику двох варіантів АЛТ-чутливого амперометричного біосенсора, створених на основі різних ензимних систем, на основі ГлОкс чи ПОкс. Встановлено переваги та обмеження кожного підходу за сукупністю аналітичних характеристик (чутливість, лінійний діапазон, селективність, стабільність) та обґрунтовано вибір оптимального варіанту для інтеграції в мультианалітичну біосенсорну систему. Продемонстровано здатність розробленої біосенсорної системи достовірно визначати активність АСТ та АЛТ у зразках сироватки крові людини; достовірність результатів біосенсорного аналізу підтверджено високим коефіцієнтом кореляції ($R = 0,989$ для АСТ та $R = 0,994$ для АЛТ) з результатами контрольного спектрофотометричного методу.

Із практичної сторони створені діючі лабораторні прототипи монобіосенсора для визначення АСТ, монобіосенсорів для визначення АЛТ та ПОкс та біосенсорної системи для одночасного визначення активності АСТ та АЛТ у зразках сироватки крові може бути використано як основа для розробки портативних діагностичних приладів, придатних до використання в лабораторіях клінічної діагностики, каретах швидкої допомоги або в амбулаторних палатах.

Крім того, результати досліджень щодо закономірностей функціонування іммобілізованих та вільних ензимів і мультиензимних систем дозволять доповнити існуючі фундаментальні знання ензимології, зокрема щодо впливу іммобілізації на кінетичні параметри ензимів, дифузійних обмежень у багатошарових біоселективних мембранах та особливостей функціонування каскадних ензиматичних реакцій.

Отримані дані можуть бути використані як матеріал для розширення освітніх програм з біосенсорики, біоаналітичної хімії та прикладної ензимології.

Розпочато метрологічну атестацію і впровадження розробленої системи: в ДП «Укрметртестстандарт» затверджено методику вимірювання активності АСТ № МВ 031-36-2025 та виконуються роботи з розробки методики вимірювання активності АЛТ. Розроблений біосенсор для визначення АСТ впроваджено в ТОВ «Укрмедсерт». Отримано патент на винахід № 129239, № 125811 та патент на корисну модель № 153303, № 147481.

Структура та обсяг дисертації: дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів дослідження, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаної літератури (190 джерел), 8 додатків, її основний зміст викладено на 160 сторінках машинописного тексту; містить 50 рисунків та 13 таблиць.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертації, вказано зв'язок роботи з науковими програмами, визначено мету, завдання, об'єкт і предмет досліджень, методи дослідження, вказано наукову новизну й практичне значення одержаних результатів, наведено дані щодо апробації та публікацій.

В **огляді літератури**, викладеному на 32 сторінках, наведено матеріал щодо структури та функціонального значення комплексу eEF1B еукаріот, особливостей фактора eEF1A еукаріот та деяких його можливих партнерів. Дані літератури вдало узагальнені авторкою в схеми. Літературний огляд є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки авторки. Детальний аналіз даних літератури дозволив авторці визначити напрямки та основні завдання дисертаційної роботи.

Методи досліджень детально описано у **третьому розділі**. Для виконання роботи авторка використала хроноамперометрію – як основний метод реєстрації аналітичного сигналу біосенсорів при визначенні активності трансаміназ за концентрацією утвореного пероксиду водню; циклічну вольтамперометрію – для формування додаткових напівпроникних мембран на основі полі(м-фенілендіаміну) шляхом електрополімеризації; спектрофотометрію – як референсний метод для валідації результатів біосенсорного аналізу активності трансаміназ у зразках сироватки крові; методи іммобілізації ензимів (ковалентна зшивка глутаровим альдегідом та включення у фотополімеризовану матрицю PVA-SbQ) – для формування біоселективних мембран на поверхні платинових електродів; метод скануючої електронної мікроскопії – для аналізу зміни поверхні електродів в ході підготовки біосенсорів; методи статистичної обробки даних – для визначення достовірності та відтворюваності отриманих результатів, розрахунку аналітичних характеристик біосенсорів та побудови кореляційних залежностей.

Методи, використані в роботі, не лише сучасні, але й різнопланові. Вважаю, що саме вдале та елегантне поєднання біохімічних, фізико-хімічних та біофізичних методів дало можливість вирішити поставлені авторкою завдання. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

В **четвертому розділі** викладено результати, отримані авторкою. Результати структуровано на підрозділи. В **першому підрозділі** описано принцип функціонування біосенсорної системи і проаналізовано реакції, що лежать в основі її функціонування.

У **другому і третьому підрозділах** детально описано розробку та оптимізацію двох типів моносенсорів для визначення трансаміназ: АЛТ-

чутливого біосенсора на основі ПОкс (з детекцією через проміжний аналіт піруват) та біосенсора на основі ГлОкс (з детекцією через проміжний аналіт глутамат), здатного визначати як АСТ, так і АЛТ через детекцію спільного продукту обох трансаміназних реакцій — глутамату. Досліджено аналітичні характеристики біосенсора та його стабільність. Проведено апробацію біосенсорної системи при вимірюванні вмісту трансаміназ в сироватці крові та визначено кореляцію між біосенсорними та референсними вимірюваннями сироватки крові. Проведені авторкою дослідження дозволили підтвердити здатність розробленої біосенсорної системи вибірково та достовірно визначати активність трансаміназ як при фізіологічних, так і при патологічних рівнях АСТ і АЛТ у сироватці крові.

В **узагальненні** обговорено і систематизовано великий обсяг отриманого фактичного матеріалу, узагальнено наведену інформацію, проаналізовано наукові знахідки в контексті їхнього фундаментального значення та практичного застосування.

Наведені **висновки** відповідають меті та завданням, поставленим авторкою.

Перелік **використаних джерел літератури** містить 190 англомовних посилань.

Наостанок слід зазначити, що в дисертаційному дослідженні ретельно виконано великий обсяг експериментальної роботи. Проведення таких досліджень свідчить про кваліфікацію дисертантки і високий науковий рівень роботи в цілому. Достовірність отриманих в роботі результатів і обґрунтованість положень дисертації забезпечуються широким спектром використаних авторкою надійних сучасних експериментальних методів.

Таким чином, дисертація Мруги Дарини Олександрівни «РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТЕЙ АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ, АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ ТА ЇХ СПІВВІДНОШЕННЯ» є завершеною науковою роботою.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 9 статей у фахових наукових журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus (2 з яких належать до першого квартилю (Q1), 3 – до Q2) бази даних Web of Science Core Collection відповідно до класифікації Journal Citation Reports – International Journal of Biological Macromolecules, The FEBS Journal, Nucleic Acids Research), 16 тез доповідей на наукових конференціях та 4 патенти.

Дисертаційну роботу оформлено належним чином і у відповідності до вимог державних стандартів і МОН України. Матеріал дисертації викладено ясно і послідовно, ілюстрації виконано на належному рівні.

Поряд з наведеною позитивною оцінкою дисертаційної роботи слід виділити такі основні дискусійні питання, побажання та зауваження:

1. Висновок 5 – звернути увагу на стилістику.
2. На рис. 4.2, 4.3, 4.14Б, 4.21, 4.36А по осі ординат замість Струм потрібно Сила струму. На рис. 4.3 по осі ОХ: Потенціал чого? Або який? На рис. 4.11 по осі ОУ: Response замість Відгук. Рис. 4.36: в яких одиницях вимірювання представлено час по осі ОХ?
3. Всі осі координат на рисунках розділу 4 необхідно привести до однаковості: початок координат – від 0, там, де необхідно, – поставити розрив.
4. Таблиця 4.1: глутамат і аспартат не є амінокислотами.
5. Як запобігти відмінностей іммобілізації і як можна стандартизувати цей процес? (рис. 4.16). Як автоматизація може допомогти? В такому випадку необхідно мати точний стандарт АСТ як контроль.
6. Бажано було б надати хоча би пару прикладів вимірювання активності АСТ і АЛТ в біологічних зразках за патологій.

Висловлені зауваження не впливають на теоретичне і практичне значення досліджень і не зменшують високої оцінки представленої роботи.

Висновок щодо відповідності дисертаційної роботи встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Мруги Дарини Олександрівни «РОЗРОБКА ДІАГНОСТИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТЕЙ АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗИ ТА ЇХ СПІВВІДНОШЕННЯ» є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 - Біологія та біохімія, 09 – Біологія.

Заступник директора Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
д.б.н., старший дослідник

Володимир ЧЕРНИШЕНКО

Підпис Чернишенко В.О.
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"31" 08 2026 р.

