

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Кучеренка Івана Сергійовича

«Розробка електрохімічних ферментних біосенсорів для визначення концентрацій АТФ та активності креатинкінази», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.20 – біотехнологія

З моменту виділення АТФ з екстрактів м'язів у 1929 році до наших днів минуло майже 90 років інтенсивного дослідження цієї унікальної сполуки, необхідної для енергетичного метаболізму живої клітини. АТФ, АДФ і АМФ присутні в живих клітинах в значних кількостях-від 2 до 15мМ. Як правило, вміст АТФ значно перевищує кількість АДФ і АМФ. Ці нуклеотиди присутні як в розчинній фракції, так і в органелах. Визначення вмісту АТФ дозволяє оцінити енергетичний потенціал клітин, може бути корисним для діагностики ряду хвороб. Відомо, що рівень АТФ може змінюватись в залежності від функціонування кіназ. Прикладом останньої є креатинкіназа, відсутня в крові за нормальних умов. В той же час, рівень цього ферменту значно зростає у випадку інфаркту міокарда.

Існуючі методи визначення рівня АТФ (біоломінесцентні, хроматографічні та інші) є точними, але потребують складної пробопідготовки, вартісного обладнання та висококваліфікованого персоналу. В останні роки запропоновані методи визначення АТФ за допомогою біосенсорів. Однак їх переважна більшість представлена монобіосенсорами, що є чутливими не тільки до АТФ, а й до глюкози та гліцеролу. Основним методом визначення креатинкінази є вартісний імунологічний метод. Зважаючи на це, дисертаційна робота І.С.Кучеренка, метою якої є розробка ферментних електрохімічних монобіосенсорів та біосенсорної системи для визначення концентрації АТФ та активності креатинкінази, а також дослідження їх ефективності при аналізі широкого спектру зразків, є актуальною. Актуальність дисертаційної роботи

підтверджується її зв'язком з тематичними планами кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Для досягнення поставленої мети І.С.Кучеренко застосував значний арсенал сучасних біохімічних, хімічних, фізичних, фізико-хімічних та статистичних методів дослідження.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 124 сторінках. Представлена робота побудована за класичною схемою і включає вступ, розділ літературного огляду, розділ матеріали та методи, один розділ, в якому викладені результати власних досліджень, розділ, що присвячений аналізу та узагальненню результатів досліджень, висновки та список цитованої літератури, що містить 123 посилання, з яких 122- іноземними мовами.

В літературному огляді дисертантом наводиться ґрунтовний аналіз існуючих методів аналізу АТФ (люмінесцентного, високоефективної рідинної хроматографії) розглянуто переваги і недоліки існуючих електрохімічних біосенсорів. Акцентується увага на тому, що застосування ВЕРХ і люмінесцентного методів є складними у виконанні, потребують вартісного обладнання і висококваліфікованого персоналу. Автором аналізується роль креатинкінази, яка забезпечує стабільне співвідношення АТФ і АДФ в клітині. Найбільш точне визначення активності цього ферменту досягається імунологічними методами. Однак вони є вартісними та потребують отримання антитіл. На основі аналізу літератури дисертантом акцентується увага на проблемах, що потребують дослідження і виконання даної роботи.

### **Наукова новизна досліджень, їх значення для науки і практики**

Наукова новизна результатів дисертаційної роботи І.С.Кучеренка полягає в наступному. Дисертантом проведено порівняльні дослідження



робочих характеристик потенціостатів українського виробництва та Palm Sens (Нідерланди). Встановлено, що обидва прилади мають лінійну, стабільну відтворюваність відгуків на одну і ту ж концентрацію пероксиду водню і можуть використовуватись в даних дослідженнях, однак останній прилад характеризувався нижчим рівнем шуму та був більш чутливим до пероксиду водню.

Встановлена можливість створення біосенсора для визначення глюкози шляхом іммобілізації глюкозооксидази на робочі електроди нікелевих та платинових амперметричних перетворювачів. Показано, що біосенсори на основі платини характеризувались вищою чутливістю до пероксиду водню, хоч і є дорожчими від нікелевих.

Дисертантом визначені оптимальні концентрації ферментів в біоселективних елементах біосенсорів. Вказується, що масова частка глюкозооксидази в біоселективному елементі складала від 0,6 до 10%.

Визначено, що збільшення концентрації глюкозооксидази в біоселективній мембрані до 2,0-2,5% є оптимальним для визначення глюкози в зразках. Для визначення АТФ найбільші відгуки біосенсора отримані за концентрації гексокінази в біоселективній мембрані на рівні 2-3%.

Іваном Сергійовичем відпрацьовані умови іммобілізації ферментів за допомогою глутарового альдегіду. Оптимальні відгуки біосенсора на додавання глюкози отримували за вмісту глутарового альдегіду від 0,1 до 1,0% , а для АТФ- тільки за вмісту глутарового альдегіду 0,1-0,2%. На думку дисертанта це обумовлено тим, що гексокіназа є менш стабільним ферментом, ніж глюкозооксидаза. Однак, виникає питання, а чи не може це бути обумовлено блокуванням активного центру гексокінази за вмісту 1% глутарового альдегіду?

Дисертантом визначена залежність роботи біосенсорів від тривалості іммобілізації ферментів, складу робочого буферу. Показано, що найбільші

відгуки біосенсора на глюкозу отримували в фосфатному буфері, а на АТФ- в HEPES-буфері, що містив 2 мМ  $Mg^{2+}$ .

Встановлено, що зміна концентрації глюкози в робочому розчині впливає на визначення АТФ біосенсором. Таким чином, неможливо точно визначити вміст АТФ, якщо в розчині присутня невідома концентрація глюкози. Тому дисертант приходиться до цілком аргументованого висновку щодо доцільності при визначенні АТФ застосовувати також другий біосенсор, чутливий лише до глюкози.

Для зниження впливу інтерферуючих речовин на відгук біосенсора відпрацьовані умови нанесення на чутливу частину амперометричного перетворювача поліфенілендіаміну, що здатний утворювати пори, доступні для проникання молекул пероксиду водню, тоді як інші інтерферуючі речовини не проникали через таку мембрану. Це покращувало відгук біосенсора на глюкозу та АТФ. Показано, що екрануючий ефект поліфенілендіамінової мембрани був стабільним за зберігання біосенсора протягом 50 діб.

На стор. 72 вказано, що за такого терміну зберігання відгуки біосенсора на глюкозу не зменшувались взагалі. На думку опонента, таке твердження дещо протирічить результатам, наведеним на рис. 3.17, де показано, що за 14 діб зберігання біосенсора відгуки на глюкозу зменшувались на 10-15%.

Ефективність розроблених дисертантом підходів доказана при визначенні вмісту АТФ і глюкози в реальних зразках цих речовин, закуплених в фармацевтичних препаратах. При визначенні цих речовин відхилення показників від їх номінальної концентрації складало до 20%.

Важливим етапом даної роботи була розробка методики біосенсорного визначення креатинкінази. Цей фермент є чутливим до 2 субстратів, а саме АТФ і креатинфосфату. Активність креатинкінази визначали за швидкістю генерації нею АТФ. Встановлено, що найвищу чутливість до креатинкінази біосенсор мав при 1 мМ АТФ та при 10 мМ креатинфосфату. Показано, що

чутливість біосенсора до креатинкінази зменшувалась зі збільшенням концентрації глюкози в розчині. В роботі оптимізовано умови визначення активності креатинкінази в сировотці крові. Біосенсор є придатним для експрес-аналізу КК у пацієнтів з підозрою на інфаркт міокарда та пошкодження інших м'язів.

Дисертантом акцентується увага на певних перевагах кондуктометричних біосенсорів (простота будови та дешевизна) у порівнянні з амперометричними і потенціометричними. Для створення кондуктометричного біосенсора відпрацьовані умови іммобілізації гексокінази разом з бичачим сироватковим альбуміном в присутності гліцеролу та глутарового альдегіду. Найкращі результати отримані при застосуванні 0,5 % глутарового альдегіду, а також за вмісту 3 мМ іонів магнію та при мінімальній концентрації (1 мМ) HEPES-буферу. Відпрацьовані умови зберігання біосенсорів для кондуктометричного визначення АТФ і глюкози. Показано, що такий біосенсор може використовуватись протягом тижня.

### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації**

Вищенаведене свідчить про те, що дисертаційна робота Кучеренка Івана Сергійовича має не тільки фундаментальне, а й практичне значення, оскільки розроблені дисертантом методи визначення вмісту глюкози, АТФ та активності креатинкінази можуть знайти застосування як в наукових дослідженнях, так і в медичній практиці.

Результати дисертаційної роботи добре висвітлені в 10 наукових публікаціях, серед яких 6 статей, один патент України на винахід та три тези доповідей. Статті за темою дисертаційної роботи опубліковані як в українських фахових виданнях, так і в зарубіжних журналах. 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 деякі питання та зауваження.**

1. На стор. 52 дисертантом вказано, що масова частка глюкозооксидази в біоселективному елементі становила від 0.6 до 10%. Як визначали цей показник в біоселективному елементі, чи ці дані відносяться до вмісту в суміші, що використовувалась для іммобілізації?
2. В останні роки науковці різних країн значну увагу приділяють розробці біосенсорів для визначення різних речовин і ферментів. Зважаючи на це, виникає питання чому список літератури містить лише 123 посилання.
3. На стор. 80 дисертант застосовує термін «спершу». На думку опонента краще було б писати «насамперед» чи «спочатку».
4. В табл.3.7 та по тексту (стор.79 та інші) приводиться «розведення зразку». Доцільно- «розведення зразка».

Вказані зауваження та питання не знижують наукового значення представленої дисертаційної роботи, яка є важливим досягненням дисертанта.

**Висновок по дисертації.** Дисертаційна робота « Розробка електрохімічних ферментних біосенсорів для визначення концентрацій АТФ та активності креатинкінази», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20- біотехнологія, є завершеним науковим дослідженням, в якому на основі сучасних методичних підходів розроблено нові амперметричні та кондуктометричні біосенсори для визначення АТФ і глюкози та активності креатинкінази в біологічних зразках і сироватці крові. Робота виконана на високому науково-методичному рівні. За актуальністю, новизною, науково-практичною значимістю результатів дисертаційна робота відповідає вимогам «Порядку присудження наукових степенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07. 2013 р. № 567, а її автор, Кучеренко Іван Сергійович, заслуговує присудження




наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20-біотехнологія.

Офіційний оponent, завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології


і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,

доктор біологічних наук, професор

 І.К.Курдиш

26 березня 2017 р.



  
ПОВІДОМЛЯЄ  
ЗАБЛОТНОГО  
МАКАРЕЧЬ  
А.В.МАКАРЕЧЬ