

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біології
клітини НАН України,
академік НАН України
А.А. Сибірний



"20" листопада 2023 р.

М.П.

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів докторської дисертації кандидата хімічних наук, старшого наукового співробітника відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України **Стасюк Наталії Євгенівни** на тему «**Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів**», що подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія

ВИТЯГ

з протоколу № 25 засідання відділу відділу молекулярної генетики і біотехнології та відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини Національної академії наук України від 20 жовтня 2023 р.

ПРИСУТНІ: 20 працівників ІБК НАН України, з яких 19 наукових працівників, а саме:

- 1) д.б.н., проф. **Сибірний А.А.**, зав. відділу молекулярної генетики і біотехнології;
- 2) д.б.н., член-кор. НАН України, проф. **Стойка Р.С.**, зав. відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу;
- 3) д.б.н., зав. відділу аналітичної біотехнології, проф. **Гончар М.В.**;
- 4) д.б.н., зав. відділу сигнальних механізмів клітини, ст.досл. **Стасик О.В.**;
- 5) д.б.н., проф. **Федорович Д.В.**;
- 6) д.б.н., проф. **Луцик М.Д.**;
- 7) д.б.н., ст.н.с., пров.н.с. **Дмитрук К.В.**;
- 8) к.х.н., ст.н.с. **Гайда Г.З.**;
- 9) к.б.н., н.с. **Закальський А.Є.**;
- 10) к.б.н., м.н.с. **Прокопів Т.М.**;
- 11) к.б.н., м.н.с. **Демків О.М.**;
- 12) к.б.н., м.н.с. **Дмитрук О.В.**;

- 13) к.б.н., н.с. **Фаюра Л.Р.**;
- 14) пров. інж. **Закальська О.М.**,
- 15) інж. **Мороз А.А.**

На засіданні присутні інші співробітники ІБК НАН України:

- 1) к.б.н., м.н.с. **Вовк О.І.**;
- 2) к.б.н., м.н.с. **Шуваєва Г.Ю.**;
- 3) к.б.н., м.н.с. **Демаш Д.В.**;
- 4) доктор філософії, м.н.с. **Манько Н.О.** ;
- 5) к.б.н., н.с. **Фінюк Н.С.** (онлайн).

На засідання присутні запрошені:

1) к.х.н. **Войцех Ногала**, керівник наукової групи наноелектрохімії Інституту фізичної хімії Польської академії наук

2) д.б.н., проф. **Федоренко В.О.**, зав. кафедри генетики та біотехнології ЛНУ ім. І. Франка.

З присутніх – 8 докторів наук, 11 кандидатів наук та 1 доктор філософії – фахівці за профілем представленої дисертації.

Голова засідання – член-кор. НАН України, д.б.н., проф. **Стойка Р.С.**

СЛУХАЛИ: Доповідь здобувача **Стасюк Наталії Євгенівни** за матеріалами дисертації: «**Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів**», представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія (галузь знань 09 – Біологія).

Тему дисертації затверджено “4” травня 2023 р. на засіданні Вченої ради Інституту біології клітини НАН України, протокол № 5.

Робота виконана у відділі аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України.

Здобувачу було задано 11 запитань, на які дано правильні та ґрунтовні відповіді. Запитання задавали:

- ☐ д.б.н., проф. **Сибірний А.А.**;
- ☐ д.б.н., член-кор. НАНУ **Стойка Р.С.**;
- ☐ д.б.н., проф. **Гончар М.В.**;
- ☐ д.б.н., ст.н.с. **Стасик О.В.**;
- ☐ д.б.н., проф. **Федорович Д.В.**;
- ☐ д.б.н., проф. **Луцик М.Д.**,
- ☐ д.б.н., проф. **Федоренко В.О.**;
- ☐ д.б.н., ст.н.с. **Дмитрук К.В.**;
- ☐ к.б.н., м.н.с. **Демаш Д.В.**;
- ☐ к.б.н., м.н.с. **Вовк О.І.**;
- ☐ к.б.н., н.с. **Фаюра Л.Р.**

ВИСТУПИЛИ:

1. Рецензенти: провідний науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України д.б.н., професор **Федорович Д.В.**, з оцінкою дисертації **Стасюк Н.Є.** яка зазначила наступне:

Рецензована робота присвячена вивченню структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей нанозимів та їх поєднання з мікробними ензимами, дослідженню біологічної та токсичної дії нанозимних композитів на клітини дріжджів з метою створення нових біо(хемо)наносенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів. Найновішим досягненням аналітичної біотехнології є біосенсиори, які містять у своєму складі біологічні компоненти (ензими, антитіла, ДНК, клітинні органели, клітини чи шматочки тканин) поєднані з фізико-хімічним перетворювачем. Головними перевагами біосенсорних підходів є їх висока чутливість, специфічність, швидкість вимірювання та невисока вартість аналізу. Перспективним підходом до розробки електрохімічних біосенсорів є встановлення прямої електронної комунікації між біомолекулами та поверхнею електрода. Цей підхід дозволяє створити біосенсиори «третього покоління» на основі оксидоредуктаз або їх штучних аналогів – нанозимів. Перевагою нанозимів є їх залежність від розміру і складу наночастинок, що дозволяє створювати нові матеріали з широким діапазоном каталітичної активності, Нанозими мають також велику питому площу поверхні, що значно полегшує їх подальшу модифікацію та біокон'югацію Прості методики синтезу нанозимів та їх унікальні каталітичні властивості, здатність до специфічного зв'язування з багатьма біологічними молекулами робить їх привабливими для досліджень у біосенсорних технологіях.

Метою даної роботи було вивчення структурних, фізико-хімічних і каталітичних властивостей штучних ензимів – нанозимів у поєднанні з мікробними ензимами для створення на їхній основі нових діагностичних методів, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях, а також вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини (на моделі дріжджів). Завдання роботи чітко сформульовані дисертанткою.

Для вирішення поставленої мети Н.Є. Стасюк використано різноманітні мікробіологічні, біохімічні, генетичні, хімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження, а також статистичний і кореляційний аналіз. Для конструювання та аналізу рекомбінантних штамів-продуцентів цільових ферментів використано молекулярно-біологічні методи. Для аналізу наноносіїв використано сканувальну електронну мікроскопію, рентгеноструктурний аналіз, атомну силову мікроскопію та трансмісійну електронну мікроскопію. І це не повний перелік методів, використаних у роботі. Опис методів займає більше 20 стр. дисертаційної роботи. Саме використання різноманітних методів дозволило дисертантці отримати результати, які мають важливе фундаментальне та практичне значення.

Наукова новизна

Всі наведені дисертанткою дані є новими:

- Встановлено, що природний ензим–каталаза, може бути замінений штучними «катазимами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів *Ogataea polymorpha* рости на метанолі завдяки розщепленню токсичного пероксиду водню.
- За допомогою молекулярно-генетичного аналізу геному виявлено, що причиною утворення нефункціонального білка каталази у «безкаталазного» мутанта *O. polymorpha* є 2 мутації в гені каталази.
- На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази I отримано препарати апоензиму, позбавленого металу та здійснено реконструкцію холоензиму. На основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиду розроблено нову методику для селективного та ультрачутливого ензиматичного визначення вмісту іонів Mn^{2+} та Co^{2+} .
- Опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методики кількісного аналізу L-аргініну з флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування продукту реакції за допомогою о-фталевого альдегіду та високоочищених препаратів аргінази I і уреази або аргініндеїмінази.
- Запропоновано використати поєднання каталітичних наноматеріалів та високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази I, креатиніндеїмінази, аргініндеїмінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін.

- Розроблено нові ензимо-нанозимні методики аналізу вмісту етанолу. за використання наноміметиків пероксидази і алкогольоксидаз.

Практичне значення одержаних результатів.

- Отримано нові нанозимні композити, придатні для біоаналітичного використання.
- Опрацьовано нові ензиматичні методики та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L-аргініну та креатиніну, а також створено прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ензимів класу гідролаз, клітин дріжджів-надпродуцентів ферментів та метал-гібридних наночастинок.
- Розроблено нові методики ензиматичного та біосенсорного моніторингу вмісту етанолу, L-аргініну, глюкози та метиламіну на основі L-селективних оксидоредуктаз та наноміметиків пероксидази.
- Опрацьовано ензиматичні методики для кількісного визначення L-аргініну, креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини, в харчових продуктах та алкогольних напоях за використання високоочищених препаратів аргінази I, креатиніндеїмінази та аргініндеїмінази, відповідно.
- Про практичне значення проведеної роботи свідчать 3 отримані патенти України на корисну модель.

Дисертанткою виконана велика за об'ємом і дуже кропітка робота та проведено ґрунтовний аналіз експериментальних даних.

Наведені в роботі результати є достовірними, основні наукові положення і висновки обґрунтовані. Дисертаційна робота містить розділи: Вступ, Огляд літератури, Матеріали та методи досліджень, 7 розділів результатів досліджень, Висновки, Перелік використаної літератури та Додаток.

Матеріали дисертації достатньо повно відображені в публікаціях автора. За темою дисертації опубліковано 24 статті у фахових виданнях (20 - у закордонних, 16 з яких у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів) з сумарним імпаکت фактором – 90,82, та 4 – у вітчизняних виданнях), 6 розділів монографій (4 - у закордонних та 2 – у вітчизняному виданні), 3 патенти України на корисну модель). Про широке ознайомлення науковців з результатами проведених досліджень свідчить перелік вітчизняних і міжнародних конференцій та з'їздів .

Однак до дисертантки є запитання, зауваження та побажання:

1. На наш погляд, назва роботи повинна бути відкоригована, оскільки мета роботи сформульована як вивчення властивостей штучних ензимів-нанозимів у їх поєднанні з мікробними ензимами і значна частина роботи присвячена власне створенню нанозимів та дослідженню їх властивостей.
2. Необхідно змінити визначення об'єкту і предмету досліджень. Згідно вимог, об'єкт дослідження – це процес або явище, якому присвячена робота, а предмет

дослідження визначає тему дисертаційної роботи. Тому об'єктом дослідження не можуть бути очищені препарати ферментів та нанозими, а предметом дослідження- властивості та дія нанозимів та їх комплексів з ензимами.

3. Розділ огляд літератури бажано було б закінчити не копією одного з опублікованих оглядів, а підсумком, який би обґрунтовував доцільність проведення досліджень у напрямку, якому присвячена дисертація.
4. Розділ 3 має назву «Скринінг нових наноматеріалів на псевдо ензиматичну активність...» хоча він містить опис різноманітних шляхів синтезу наночастинок, зокрема «зелений синтез» наночастинок за використання клітин дріжджів, та їх структурну характеристику з використанням різних фізико—хімічних методів.
5. Чи можна називати біосинтезом утворення наночастинок клітинами дріжджів (розділ 3.3) ?
6. Наскільки доступними є високоочищені ферменти, використані для створення біосенсорів, і якою може бути вартість наборів для визначення окремих аналітів? Чи є прототипи у світі?
7. Розділ 9 «Узагальнення результатів досліджень» містить короткий зміст окремих розділів роботи, але, на жаль, не має порівняння з даними літератури і треба вірити на слово автору, що запропоновані методики «відповідають рівню кращих зарубіжних прототипів».
8. Список тез доповідей займає 2 сторінки і може бути зменшений за рахунок тих, матеріал яких пізніше був опублікований у статтях.
9. Останній варіант автореферату містить узагальнену схему основних етапів роботи та результатів дисертаційної роботи по застосуванню ензимів та нанозимів для створення нових біоаналітичних методик визначення вмісту практично важливих аналітів. Однак, і в тексті і на рисунку є оцінка автором своїх здобутків: «Важливим фундаментальним здобутком є перший у світовій науковій практиці експериментальний доказ....». Це не дає можливості читачу самостійно оцінити здобутки дисертантки.
10. Є низка зауважень щодо тексту дисертаційної роботи
 - Необхідно звернути увагу на терміни, які використані у роботі. Розроблено нові методи чи методики визначення ? Ріст дріжджів у середовищі чи на середовищі? Проведено аналіз аргініну, креатиніну, етанолу? Чи аналіз вмісту цих аналітів?
 - При повторному згадуванні в тексті назви родів мікроорганізмів прийнято позначати лише однією буквою.
 - Рис.7 автореферату не має розшифрування, що таке а, в, с

10. Робота містить невдалі вирази: «предіснуюча в сироватці сечовина», детектування кольорового продукту реакції(амонію), на метанолі і т.п. , а також невіправлені граматичні помилки.

Загалом, висловлені зауваження не знижують загальної високої оцінки роботи і можуть бути легко виправлені.

Висновок.

1. Дисертаційна робота Стасюк Наталії Євгенівни містить наукові положення і результати вивчення структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей нанозимів та їх поєднання з мікробними ензимами, дослідження біологічної та токсичної дії нанозимних композитів на клітини дріжджів з метою створення нових біо(хемо)наносенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів.
 2. Результати дисертаційної роботи достатньо повно відображені в публікаціях автора. Дисертація за змістом відповідає спеціальності 03.00.07 – мікробіологія (09 Біологія).
 3. Дисертаційна робота Стасюк Н.Є. «Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів **відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" і наказу Міністерства освіти і науки України від 23.09.2019 № 1220 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук».
- провідний науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України, **д.б.н.Дмитрук К.В.** який зазначив наступне:

Дисертаційна робота Н.Є. Стасюк присвячена створенню нових біоаналітичних методів на основі мікробних ензимів і нанозимів та подальшому використанні розроблених підходів у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях. Представлена робота присвячена також вивченню біологічної дії (*in vivo*) нанозимних композитів на клітини дріжджів *Ogataea polymorpha*.

Постійно зростаюча необхідність ранньої діагностики багатьох захворювань, поліпшення охорони навколишнього середовища та контролю біотехнологічних

процесів, потребують дедалі ширшого використання у практиці високочутливих та економічних методів аналізу. На сьогодні, одним із таких підходів є сенсорний аналіз, в якому в ролі біоселективних елементів використовують мікробні ензими. Розглядаючи ензими в ролі біоспецифічних перетворювачів, що перетворюють аналіт у форму, яка детектується різними фізичними або хімічними методами, в останні роки особливий інтерес викликає використання нанорозмірних матеріалів, особливо у поєднанні з ензимами, у тому числі, для розробки технологій одержання біонаноматеріалів із каталітичними властивостями. Розробка нових нанокаталізаторів – нанозимів з високою каталітичною активністю розширює їх застосування в біоаналітиці. Таким чином, прості методики синтезу нанозимів, їхні унікальні каталітичні властивості, а також здатність до специфічного зв'язування ензимів робить їх привабливими кандидатами у біосенсорних технологіях. Саме тому, такі дослідження є актуальними як з фундаментальної точки зору, так і з практичної, оскільки відкривають можливості вирішення деяких задач медицини та харчової промисловості.

Про актуальність дисертаційної роботи Стасюк Наталії Євгенівни свідчить також те, що дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних тем: “Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу” (№ держреєстрації 0113U000142, 2013-2015 рр.), “Створення нових біосенсорних та ензиматичних методів визначення вмісту креатиніну як біомаркера функціонального стану нирок та контролю процесу гемодіалізу” (№ держреєстрації 0116U002208, 2016-2018 рр.), «Нанозими і наномедіатори: пошук, синтез, характеристика та використання для біосенсорного та ензиматичного аналізу на основі мікробних оксидоредуктаз» (№ держреєстрації 0119U001418, 2019-2021 рр.), комплексної науково-технічної програми фундаментальних досліджень НАН України у 2015 р. «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору “Аргітест” для аналізу аргініну в клінічних зразках. Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації» (проєкт 29-2015), цільової програми наукових досліджень НАН України у 2013-2017 рр. “Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація” (№ держреєстрації 0112U002963, 2013-2016 рр.), науково-технічної програми «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» в межах наукового проєкту «Створення смарт-сенсорних приладів для аналізу креатиніну та йонів амонію на основі нових нанокмпозитних плівок. Розділ 1. Розробка амперометричного портативного аналізатора, сумісного із сучасними гаджетами, для визначення креатиніну та йонів амонію» (№ держреєстрації 0118U006259, 2018-2022 рр.) та в рамках конкурсів

НФД України "Підтримка досліджень провідних та молодих вчених" (грант 2020.02/0100 «Створення нових нанозимів як каталітичних елементів для ензиматичних наборів та хемо/біосенсорів», № держреєстрації 0120U104115, 2020-2022 рр.) та «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (грант 2021.01/0010 «Створення ензиматичного набору та портативних біосенсорів для експрес-аналізу креатиніну – маркера гострих функціональних порушень нирок», № держреєстрації 0123U102859, 2023-2025 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

Значимість роботи підтверджується її зацікавленістю і закордонними фахівцями, про що свідчить те, що вона виконувалась також і у рамках міжнародних наукових грантів, зокрема, наукового гранту НАТО в рамках програми «Наука заради миру»: «Сучасні електрохімічні наносенсиори для виявлення токсичних йонів» (SPS(NUKR)SFPP 984173, 2012 – 2016 рр.) та міжнародних індивідуальних проєктів: FEMS-2013 (UA-SMU2013-1Stasyuk) «The development of the new bioanalytical approaches for L-arginine assay by the use recombinant human liver arginase I and the yeast cells, over-producers of the target enzyme»; FEBS-2022 “Enzymatic biofuel cells and bionanosensors for monitoring of creatinine, a marker of acute functional disorders of the kidneys”, гранту для підтримки молодих вчених провідних вищих навчальних закладів та наукових установ від компанії «ОПТЕК» для проведення наукового дослідження: «The development of the new bioanalytical approaches for L-arginine assay by the use of recombinant human liver arginase I conjugated with nanocarriers» (2014 р.) та стипендії президента України для молодих вчених у 2016-2017 р.

Робота Н.Є. Стасюк побудована традиційно, вона складається із наступних розділів: «Анотація», "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати та їх обговорення", "Аналіз та узагальнення результатів", "Висновки", "Список використаних джерел" та додаток "Список опублікованих праць за темою дисертації".

Не викликають сумніву наукова новизна роботи та її важливе теоретичне та практичне значення.

Експериментальна частина роботи, яка складається з шести розділів, присвячена вирішенню поставлених задач та обговоренню результатів проведеної роботи. Вражає широкий арсенал сучасних методів, наведених в розділі «Матеріали та методи», який був використаний дисертантом для одержання результатів роботи. Це різноманітні мікробіологічні, генно-інженерні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження. Всі використані дисертантом методи описані в роботі досить повно. Саме ця розмаїтість використаних методик і обумовила успішне виконання роботи і одержання

важливих наукових результатів, які представлені різними підрозділами одного розділу.

Наукова новизна та основні здобутки дисертаційної роботи, що мають фундаментальне значення, наступні:

- Уперше в науковій практиці показано можливість заміни природного ензиму – каталази штучними «катазимами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів рости на метанолі. Молекулярно-генетичний аналіз та секвенування локусу геному штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна С у 895 положенні кодуючої послідовності на Т та делеція С у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у клітинах штаму C-105 продукцію нефункціонального, неповного протеїну.

- Уперше показано різну цитотоксичну дію синтезованих нанозимів (НЗ) на клітини дріжджів *O. polymorpha*.

- На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази I вперше отримано препарати апоензиму, позбавленого металу, та здійснено реконструкцію холоензиму.

- Уперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму для селективного та ультрочутливого визначення вмісту іонів Mn^{2+} та Co^{2+} (на рівні 1 пМ та 2,5 пМ для йонів Mn^{2+} та Co^{2+} , відповідно).

- Уперше опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції (амонію) за допомогою о-фталевого альдегіду та високоочищених препаратів аргінази I і уреазі або аргініндеїмінази.

- Уперше використано поєднання каталітичних наноматеріалів та високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази I, креатиніндеїмінази, аргініндеїмінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін.

- Уперше за використання наноміметиків пероксидази і алкогольоксидази створено нові ензимо-нанозимні методи аналізу етанолу.

Результати аналізу фактичних даних, які наведені в дисертаційній роботі, свідчать на користь того, що сформульовані Н.Є. Стасюк основні наукові положення, висновки та рекомендації базуються на використанні широкого спектру сучасних засобів та методів проведення досліджень, послідовно викладені і повністю витікають із змісту дисертації. Статистичний аналіз результатів досліджень проведений на сучасному рівні за допомогою стандартних програм статистичного і кореляційного аналізу. Результати роботи представлені в достатній

кількості (60) публікацій у наукових фахових виданнях та апробовані на багатьох наукових форумах різних рівнів. **Перераховане вище дозволяє оцінити основні наукові положення, висновки та одержані результати експериментальних досліджень Н.Є. Стасюк як достовірні і науково обґрунтовані.**

Практична значимість одержаних дисертантом експериментальних результатів заключається у тому, що отримано нові нанозимні композити, придатні для біоаналітичного використання. Опрацьовано нові ензиматичні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L-аргініну та креатиніну, а також створено прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ензимів класу гідролаз, клітин надпродуцентних штамів дріжджів та метал-гібридних наночастинок. Опрацьовано нові методи ензиматичного та біосенсорного моніторингу етанолу, L-аргініну, глюкози та метиламіну на основі L-селективних оксидоредуктаз та наноміметиків пероксидази. За результатами виконання дисертаційної роботи одержано три патенти України на корисну модель (№142490 від 10.06.2020 р.; №107543 від 10.06.2016 р.; №108773 від 25.07.2016 р.), що стосуються розробки ензиматичних методів для кількісного визначення L-аргініну, креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини, в харчових продуктах та алкогольних напоях за використання високоочищених препаратів аргінази I, крeатиніндеімінази та аргініндеімінази, відповідно.

Характеризуючи в цілому розділ власних досліджень, можна стверджувати, що Н.Є. Стасюк одержала результати, які мають певну наукову і практичну цінність. Результати власних досліджень представлено автором послідовно, з використанням загальноприйнятих для подібних робіт стилем. Узагальнення результатів дослідження свідчать про високий науковий потенціал дисертанта. Висновки повністю відображають результати проведених досліджень.

Дисертаційна робота Н.Є. Стасюк, присвячена створенню нових біоаналітичних методів на основі мікробних ензимів і нанозимів та подальшому використанні розроблених підходів у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях. Представлена робота присвячена також вивченню біологічної дії (*in vivo*) нанозимних композитів на клітини дріжджів *Ogataea polymorpha*, **відповідає профілю «мікробіологія».**

Високо оцінюючи експериментальний рівень дисертаційної роботи, є необхідність задати дисертанту кілька дискусійних запитань стосовно фактичного матеріалу та інтерпретації одержаних даних.

1. В роботі ідентифіковано мутації штаму *Ogataea polymorpha* C-105, які локалізовано в гені, що кодує каталазу. Чи проводилась робота по визначенню

природи регуляторної мутації *gcr1*? Чи існують гіпотези, щодо гена/генів, які можуть бути пошкоджені у цього мутанта?

2. Питання до розділу 2.7.1. Який сенс синтезу НЧ в культуральному середовищі після вирощування дріжджів, де важко стандартизувати метаболіти, що викидаються в середовище клітинами? Наскільки синтез НЗ в культуральному середовищі є відтворюваним?

3. Розділ 3.3. Описано синтез позаклітинних стабільних біонаночастинок золота з тетрахлораурату за допомогою дріжджів *O. polymorpha*. Як в синтезі біонаночастинок золота залучені дріжджі, можливо їх поверхня чи позаклітинні метаболіти? Чи впливали на синтез компоненти середовища? В чому перевага застосування клітин *O. polymorpha*, чи були спроби використати інші, неметилотрофні дріжджі?

4. Чому НЗ з пероксидажною активністю підвищують виживання клітин? Яка при цьому локалізація НЗ в клітинах дріжджів?

5. Розділ 5.3. Описано розробку нового фотометричного методу аналізу етанолу на основі АО на НЗ PtCu. Яка операційна стабільність альгінатних кульок? Чи не пробували використовувати замість АО клітини дріжджів *O. polymorpha*?

6. Чи при конструюванні амперометричного біосенсора для аналізу Гідроген пероксиду можна використовувати лише НЗ з пероксидажною активністю без пероксидази хрому?

7. Розділ 6. Описано створення мікробних амперометричних біосенсорів із введенням в клітину цільових ензимів іммобілізованих на НЧ. За рахунок чого зростає активність цільових ферментів при введенні їх в клітину? Чи пермеабілізовані клітини захищають ферменти? Чи можливо використовувати інші носії чи «оболонки» замість пермеабілізованих клітин для застосування ензимів іммобілізованих на НЧ для розробки амперометричних біосенсорів?

8. Розділ 7.4. Чи описано в літературі апоензими металовмісних ферментів, окрім апоензиму Mn^{2+} -залежної аргінази I, які можна було би використати для детекції металів?

9. В дисертації зустрічаються дрібні друкарські помилки, які вказано на полях тексту дисертації. В таблицях в розділі 9 радив би привести дані з однаковою кількістю знаків після коми.

Однак, ці запитання не мають кваліфікаційного характеру, не стосуються суті роботи і тому не впливають на високу позитивну оцінку виконаних досліджень. Їх сучасний рівень, однозначність отриманих результатів і використання широкого спектру найбільш сучасних методів аналізу, а також надзвичайно професійна апробація на сторінках 59 наукових

праць, включаючи 24 статті у фахових виданнях (20 – у закордонних та 4 – у вітчизняних виданнях), з них 16 статей у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (*Q1* і *Q2*) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, 6 розділів монографій (4 – у закордонних, із них – 2 літературні огляди належать до *Q1* SCImago та 2 – у вітчизняному виданні), 3 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Сумарний імпаکت фактор публікацій за темою дисертації – 90,82 свідчить, що **ступінь обґрунтування наукових положень, висновків та рекомендацій, наведених в дисертаційній роботі Н.Є Стасюк, є надзвичайно високим та надійним.**

Рукопис дисертації написано державною мовою з використанням фахової наукової термінології. Стиль викладу матеріалів досліджень, наукових положень, висновків та рекомендацій забезпечує в цілому їх сприйняття. Структура Автореферату повністю відображає зміст дисертації.

Отже, дисертаційна робота Стасюк Н.Є. «Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів **відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" і наказу Міністерства освіти і науки України від 23.09.2019 № 1220 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук».

- Завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, д.б.н., член-кор. НАН України, проф. **Стойка Р.С.**, який зазначив наступне:

Ознайомившись із дисертаційною роботою Стасюк Наталії Євгенівни вважаю, що відповідна праця є **сучасним науковим дослідженням в галузі мікробіології**, що ставить за мету всебічне вивчення структурних, фізико-хімічних і каталітичних властивостей штучних ензимів – нанозимів та їх поєднання з мікробними ензимами і створення на їхній основі нових діагностичних методів, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях, а також вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини

(зокрема, на моделі дріжджів).

Актуальність теми дослідження: Сучасна медична діагностика, дослідження в галузі екологічної безпеки навколишнього середовища та безпеки харчових продуктів значною мірою базуються на використанні компонентів та властивостей молекулярного рівня організації живого. Адже це не тільки підвищує якість самої діагностики, а й дозволяє з'ясувати першопричини порушень на рівні функціонування генетичного апарату окремо взятого пацієнта, відкриваючи значно ширші можливості для більш ефективного лікування захворювання чи розробки технологій аналізу певних сполук. Біосенсиори є найновішим досягненням аналітичної біотехнології, вони містять у своєму складі біологічно-чутливі компоненти поєднані з фізико-хімічним перетворювачем. Загальновідомо, що до складу біоселективного шару біосенсорів найчастіше входять ензими. Вони прискорюють проходження біохімічних реакцій і специфічно зв'язуються зі своїми субстратами. На сьогодні, найбільш перспективним підходом щодо розробки електрохімічних біосенсорів є встановлення прямої електронної комунікації між біомолекулами та поверхнею електрода. Вказаний підхід дозволяє створити біосенсиори «третього покоління» на основі ензимів або їх штучних аналогів – нанозимів (НЗ). Нанозими – це найновіший клас функціональних наноматеріалів, які мають ензимоподібну активність. Із відкриттям нанозимів як штучних ензимів, стало можливим використання явища прямого електронного перенесення при створенні нанозимних біосенсорів «третього покоління», а також для забезпечення вимог щодо їх високої каталітичної активності, хімічної та біологічної стабільності, розміру. Таким чином, прості методики синтезу НЗ, їхні унікальні каталітичні властивості, а також здатність до специфічного зв'язування з багатьма біологічними молекулами, зокрема ензимами, робить їх привабливими кандидатами для досліджень у біосенсорних технологіях. Таким чином, завдання дисертаційної роботи Стасюк Наталії Євгенівни є без сумніву актуальними.

Структура та обсяг дисертації Дисертаційна робота є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей, викладена на 516 друкованих сторінках. Дисертація містить наступні розділи: «Анотація», "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати та їх обговорення", "Аналіз та узагальнення результатів", "Висновки", "Список використаних джерел" та додаток "Список опублікованих праць за темою дисертації".

Не викликають сумніву **наукова новизна** роботи та її важливе **теоретичне та практичне значення**.

Метою дослідження було вивчення структурних, фізико-хімічних і каталітичних властивостей штучних ензимів – нанозимів у поєднанні з мікробними

ензимами для створення на їхній основі нових діагностичних методів, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях, а також вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини (зокрема, на моделі дріжджів).

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше в науковій практиці показано можливість заміни природного ензиму – каталази штучними «катазимами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів рости на метанолі. Молекулярно-генетичний аналіз та секвенування локусу геному штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна С у 895 положенні кодуючої послідовності на Т та делеція С у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у клітинах штаму C-105 продукцію нефункціонального, неповного протеїну. Уперше показано різну цитотоксичну дію синтезованих нанозимів (НЗ) на клітини дріжджів *O. polymorpha*. На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази І вперше отримано препарати апоензиму, позбавленого металу, та здійснено реконструкцію холоензиму. Уперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази І та 2,3-бутандіонмонооксиму для селективного та ультрачутливого визначення вмісту іонів Mn^{2+} та Co^{2+} (на рівні 1 пМ та 2,5 пМ для йонів Mn^{2+} та Co^{2+} , відповідно). Уперше опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції (амонію) за допомогою о-фталевого альдегіду та високоочищених препаратів аргінази І і уреазі або аргініндеїмінази. Уперше використано поєднання каталітичних наноматеріалів та високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази І, креатиніндеїмінази, аргініндеїмінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін. Уперше за використання наноміметиків пероксидази і алкогольоксидази створено нові ензимо-нанозимні методи аналізу етанолу.

Слід відзначити **високий методичний рівень роботи**. У роботі використано різноманітні мікробіологічні, генно-інженерні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження. При аналізі активності ензимів та чистоти ензимних препаратів використано методи спектрофотометричного аналізу, електрофорезу білків за нативних та денатуруючих умов, іонообмінна та афінна хроматографія. Для фізико-хімічного та структурного аналізу наноматеріалів використано методи сканувальної електронної мікроскопії, флуоресцентної мікроскопії, рентгеноспектрального та рентгеноструктурного аналізу, атомно-силової мікроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії,

динамічного світлорозсіювання, Раман-спектроскопії, спектроскопії ядерного магнітного резонансу, а також метод математичного моделювання фізичної сорбції (БЕТ). При конструюванні амперометричних біосенсорів використано циклічну вольтамперометрію, хроноамперометрію та статистичний аналіз.

Практичне значення наукових результатів роботи. Отримано нові нанозимні композити, придатні для біоаналітичного використання. Опрацьовано нові ензиматичні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L-аргініну та креатиніну, а також створено прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ензимів класу гідролаз, клітин надпродуцентних штамів дріжджів та метал-гібридних наночастинок. Опрацьовано нові методи ензиматичного та біосенсорного моніторингу етанолу, L-аргініну, глюкози та метиламіну на основі L-селективних оксидоредуктаз та наноміметиків пероксидази. За результатами виконання дисертаційної роботи одержано три патенти України на корисну модель (№142490 від 10.06.2020 р.; №107543 від 10.06.2016 р.; №108773 від 25.07.2016 р.), що стосуються розробки ензиматичних методів для кількісного визначення L-аргініну, креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини, в харчових продуктах та алкогольних напоях за використання високоочищених препаратів аргінази I, кртиніндеїмінази та аргініндеїмінази, відповідно.

Особиста участь автора в отриманні та обґрунтуванні наукових та практичних результатів, що викладені в дисертаційній роботі, не викликає сумніву. Дисертантка брала безпосередню участь у плануванні, підготовці, та виконанні поставлених експериментальних задач, а також у підготовці публікацій за темою дисертації. У роботі наводяться необхідні посилання на вклад інших співавторів публікацій

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей наукових конференцій. Загалом за темою дисертації опубліковано 59 наукових праць, включаючи 24 статті у фахових виданнях (20 – у закордонних та 4 – у вітчизняних виданнях), з них 16 статей у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (*Q1* і *Q2*) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, 6 розділів монографій (4 – у закордонних, із них – 2 літературні огляди належать до *Q1* SCImago та 2 – у вітчизняному виданні), 3 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Сумарний імпаکت фактор публікацій за темою дисертації – 90,82.

Відзначаючи серйозний науковий та методологічний рівень роботи, а також її загалом належне, згідно діючих вимог, оформлення, **до роботи виник ряд зауваг**

та запитань:

1. Надто довга актуальність у Вступі, яка далі частково повторюється (стор. 30, 506).
2. Стор. 521 – покращити якість рисунка 9.1. «Загальний вигляд портативного креатинінового аналізатора, сумісного із планшетом Microsoft Lenovo Mix 320».
3. Доповнити розділ 9 підрозділ «Вивчення біологічної та можливої токсичної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини дріжджів *Ogataea polymorpha*», рисунками або таблицями, які б підсумовували отримані результати досліджень.
4. Авторів варто більше звернути увагу на обговорення отриманих результатів. Здобувачем створено дуже багато прототипів сенсорів, але немає його власної узагальнюючої оцінки того, котрий підхід, наприклад, найкращий для певного напрямку застосування.
5. В роботі зустрічається низка опечаток і не дуже вдалих термінів (напр., «половина життя» - існує усталений термін «півжиття»).

Зазначені недоліки стосуються головно оформлення дисертації, не впливають на висновки роботи та не знижують її загальної високої позитивної оцінки. Наведені зауваження несуть переважно редакційний характер та не є такими, що знижують загальну високу оцінку дисертації, яка є завершеною самостійною науковою працею. Оцінюючи дисертаційну роботу Стасюк Наталії Євгенівни в цілому, слід зазначити, що нею отримано результати, які мають важливе практичне значення в медицині, харчовій промисловості та екології для визначення вмісту практично важливих аналітів, зокрема, L-аргініну, креатиніну, L-лактату, метиламіну та етанолу. Слід зазначити, що важливим фундаментальним здобутком дисертаційної роботи є перший у світовій науковій практиці експериментальний доказ, що штучно синтезовані нанозими ("катазими") можуть повноцінно замінити *in vivo* природний ензим – каталазу, відновивши здатність рости на метанолі мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів.

Дисертація виконана на високому методичному рівні і є завершеним науковим дослідженням. Сукупність отриманих у дисертації результатів являє практичний інтерес для мікробіологів та біотехнологів, що займаються створенням принципово нових біосенсорів та ензиматичних методів на основі мікробних ензимів.

Отже, дисертаційна робота Стасюк Н.Є. «Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним

значенням одержаних результатів відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" і наказу Міністерства освіти і науки України від 23.09.2019 № 1220 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук».

Здобувач відповіла правильно та ґрунтовно на усі зауваження та запитання рецензентів.

2. Присутні на засіданні виступили в обговоренні:

д.б.н., проф., зав. кафедри генетики та біотехнології ЛНУ ім. І. Франка Федоренко В.О.

Я можу сказати одне, що робота дуже хороша, я б сказав навіть прекрасна, в нас рідко бувають такі хороші роботи, адже дуже великий об'єм дослідження та дуже гарні публікації в журналах з високим імпаکت-фактором, хороша доповідь, всі роботи пройшли хороше рецензування і це говорить про те, що прийшли такі часи, коли можна захистити дисертацію маючи відповідні публікації, адже не треба писати, переписувати все, що було в статтях написано знову по новому і добре, що дисертації такі є і я можу привітати і відділ аналітичної біотехнології і проф. Гончара М.В. з такою успішною роботою. Ну зрозуміло, що я як біолог, мені трудно зрозуміти, як метал може замінити природний ензим як це відбувається? Ну можливо, це якийсь мутант, який попав в стресові умови, але хіба це можливо функціонувати? Це клітини-кіборги. Це фундаментальне завдання, яке потрібно з'ясувати в подальшому. Рекомендую на основі отриманих результатів підготувати патент на винахід. Я думаю, тут є справжнє відкриття. Це дуже важливо не лише для Інституту, але і для наукової спільноти загалом. Я вітаю Вас та бажаю успішного захисту.

Завідувач відділу аналітичної біотехнології, д.б.н., проф. Гончар М.В.

Хочу сказати, що деколи складається враження, що ми дуже добре знаємо механізм дії ферментів, але якщо подивитись на роботи з теоретичної хімії і в тому числі біонеорганічної, то 70% усіх ензимів – це метало-ензими. І виявляється, що досі статей, які вивчають цей механізм немає. Що стосується даної роботи, то відомо платиновий каталізатор, його основний механізм вивчався довгі роки і з'ясувалось, що основний механізм – це є сорбція молекул з частинками платини, зміна її

конфігурації та полегшення розриву окремих зв'язків, що приводить в подальшому до перетворення продукту. Що стосується нанозимів, тут безперечно ці нанозими стабілізовані певними лігандами, і їх називають міметиками тому, що їх структура за мільярди років відібрала комплекси металів з пептидами і білками. Я згоден, що для встановлення механізму потрібна співпраця з людьми, які мають досвід в цьому і це дуже складна робота і потрібно сфокусуватись на дослідженні цього питання.

д.б.н., проф. Сибірний А.А., зав. відділу молекулярної генетики і біотехнології

Я можу сказати про Наталю Євгенівну Стасюк, чув часто її доповідь, не лише сьогодні, але і на конференціях молодих вчених, де вона була призером. Вона є лідером серед молоді в нашому Інституті. Маю приємність бути разом з нею співавтором з нею кількох спільних публікацій. Це хороший приклад співпраці. Вона сама за освітою хімік, а зараз займається біологічними дисциплінами. І виявляється, що така така співпраця є дуже плідною, а також її широкі знання з кількох галузей. Використання знань та ерудиції хімічної освіти і дослідження біологічних систем. Хочу сказати, що Наталя Євгенівна може бути також керівником відділу. Вона була обрана керівником профспілки нашого Інституту і дуже добре справляється з цим. Тому успіху у захисті докторської дисертації! Ми найближчим часом доведемо Вас до захисту докторської дисертації. Успіху!

д.б.н., зав. відділу сигнальних механізмів клітини, ст.н.с. Стасик О.В.

На мій погляд робота є цілком достойною, відповідає усім вимогам. Хочу сказати, що свідченням якості цієї роботи є те, що вперше в нашому Інституті вона буде захищена за підсумком наукових праць. Я хочу привітати Наталю Євгенівну і завідувача відділу Гончара М.В. з такою чудовою роботою. Ще одна річ, яку хочу відзначити, на мій погляд, робота є дуже об'ємна і складна, і водночас зроблена дуже швидко, що свідчить про трудолюбивість дисертантки. Щодо виступу, то він був добрий, проте Наталії Євгенівні ще слід попрацювати над дисертацією, над кольором слайдів, потрібно повіділяти кольором деякі речі, збільшити риси і рисунки. На завершення хочу сказати, що в роботі є декілька вражаючих речей, це перше заміна каталази на катазим і друге, це селективність апоензиму аргінази, щодо іонів, яка залежить від рН. Я дуже хочу, щоб ця робота захистилась найближчим часом. Рекомендую її до захисту. Хочу, щоб Наталя розробила метод аналізу аргініну у планшеті, щоб не потрібно було використовувати великий об'єм зразка.

д.б.н., член-кор. НАНУ Стойка Р.С.;

Робота чудова, рекомендую її до офіційного захисту. Бажаю успіху.

Заслухавши та обговоривши доповідь Стасюк Наталії Євгенівни, прийнято рішення рекомендувати роботу до захисту та прийнято висновок щодо дисертації «Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів»:

Голосували: «за» – 22 (одноголосно),

«проти» – 0,

«утрималися» – 0.

ВИСНОВОК

1. Ким і коли затверджена тема дисертації.

Тема дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук **«Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів»** затверджена на засіданні Вченої ради Інституту біології клітини Національної академії наук України від “4” травня 2023 р. (протокол №5). Робота виконана у відділі аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України.

2. Відомості щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційного дослідження. Антиплагіатна перевірка.

Керуючись документами: "Рекомендації комітетам з етики, що проводять експертизу біомедичних досліджень" (ВООЗ, 2000), наказу АМН України №50 від 06.07.2001 "Про створення комітетів із медичної етики у наукових установах АМН України", "Загальні етичні принципи експериментів на тваринах" (1 Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001), Постанови Президії НАН України № 303 від 3.11.2004 р. "Про результати Другого національного конгресу з біоетики", Методичних рекомендацій з біоетичної експертизи наукових досліджень, що проводяться на тваринах (Національний Комітет з питань біоетики при Президії НАН України, 2006), Етичного кодексу ученого України, 2009, "Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах" (Наказ МОН № 249 від 01.03.2012 р.), Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (3447-IV редакція від 04.08.2017 р.),

Комісія з біоетики Інституту біології клітини НАН України розглянула матеріали дисертації на здобуття ступеня доктора біологічних наук, подані від к.х.н, наукового співробітника відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України, Стасюк Н.Є. за темою «Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту

практично важливих аналітів» на засіданні 26 вересня 2023 року, протокол №2023-2.

На основі всіх розглянутих матеріалів Комісія біоетичної експертизи Інституту біології клітини НАН України дає дозвіл на захист дисертації на здобуття ступеня доктора біологічних наук.

Дані перевірки антиплагіату: 7.02% за даними перевірки у застосунку Unicheck. Схожість Найбільша схожість: 0.84% з Інтернет-джерелом (http://scinn.org.ua/sites/default/files/pdf/2017/N4/STASUK_4_2017_ukr...).

3. Актуальність теми дисертації та її зв'язок з державними програмами, науковими напрямками університету та кафедри Дисертаційна робота є результатом досліджень, які проведено автором на базі відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України, в якому одним із напрямків досліджень є розробка ензиматичних та біосенсорних методів аналізу практично важливих аналітів у біологічних рідинах, харчових продуктах та середовищах довкілля. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу і виконувалась в рамках бюджетних тем: “Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу” (№ держреєстрації 0113U000142, 2013-2015 рр.), “Створення нових біосенсорних та ензиматичних методів визначення вмісту креатиніну як біомаркера функціонального стану нирок та контролю процесу гемодіалізу” (№ держреєстрації 0116U002208, 2016-2018 рр.), «Нанозими і наномедіатори: пошук, синтез, характеристика та використання для біосенсорного та ензиматичного аналізу на основі мікробних оксидоредуктаз» (№ держреєстрації 0119U001418, 2019-2021 рр.), комплексної науково-технічної програми фундаментальних досліджень НАН України у 2015 р. «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору “Аргітест” для аналізу аргініну в клінічних зразках. Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації» (проєкт 29-2015), цільової програми наукових досліджень НАН України у 2013-2017 рр. “Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація” (№ держреєстрації 0112U002963, 2013-2016 рр.), науково-технічної програми «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» в межах наукового проєкту «Створення смарт-сенсорних приладів для аналізу креатиніну та йонів амонію на основі нових нанокмпозитних плівок. Розділ 1. Розробка амперометричного портативного

аналізатора, сумісного із сучасними гаджетами, для визначення креатиніну та йонів амонію» (№ держреєстрації 0118U006259, 2018-2022 рр.) та в рамках конкурсів НФД України "Підтримка досліджень провідних та молодих вчених" (грант 2020.02/0100 «Створення нових нанозимів як каталітичних елементів для ензиматичних наборів та хемо/біосенсорів», № держреєстрації 0120U104115, 2020-2022 рр.) та «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (грант 2021.01/0010 «Створення ензиматичного набору та портативних біосенсорів для експрес-аналізу креатиніну – маркера гострих функціональних порушень нирок», № держреєстрації 0123U102859, 2023-2025 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень. Робота виконувалась також у рамках міжнародного наукового гранту НАТО в рамках програми «Наука заради миру»: «Сучасні електрохімічні наносенсиори для виявлення токсичних йонів» (SPS(NUKR)SFPP 984173, 2012 – 2016 рр.) та міжнародних індивідуальних проєктів: FEMS-2013 (UA-SMU2013-1Stasyuk) «The development of the new bioanalytical approaches for L-arginine assay by the use recombinant human liver arginase I and the yeast cells, over-producers of the target enzyme»; FEBS-2022 “Enzymatic biofuel cells and bionanosensors for monitoring of creatinine, a marker of acute functional disorders of the kidneys”, гранту для підтримки молодих вчених провідних вищих навчальних закладів та наукових установ від компанії «ОПТЕК» для проведення наукового дослідження: «The development of the new bioanalytical approaches for L-arginine assay by the use of recombinant human liver arginase I conjugated with nanocarriers» (2014 р.) та стипендії президента України для молодих вчених у 2016-2017 р.

Формулювання наукової проблеми, нове розв’язання які отримано в дисертації. Важливим фундаментальним здобутком дисертаційної роботи є перший у світовій науковій практиці експериментальний доказ, що штучно синтезовані нанозими ("катазими") можуть повноцінно замінити *in vivo* природний ензим – каталазу, відновивши здатність рости на метанолі мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів.

4. Наукові положення, розроблені особисто дисертантом та їх новизна, особистий внесок здобувача в отримання наукових результатів Уперше в науковій практиці показано можливість заміни природного ензиму – каталази штучними «катазимами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів рости на метанолі. Молекулярно-генетичний аналіз та секвенування локусу геному штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна С у 895 положенні кодууючої послідовності на Т та делеція С у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у клітинах

штаму C-105 продукцію нефункціонального, неповного протеїну. Уперше показано різну цитотоксичну дію синтезованих нанозимів (НЗ) на клітини дріжджів *O. polymorpha*. На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази I вперше отримано препарати апоензиму, позбавленого металу, та здійснено реконструкцію холоензиму. Уперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму для селективного та ультрачутливого визначення вмісту іонів Mn^{2+} та Co^{2+} (на рівні 1 пМ та 2,5 пМ для йонів Mn^{2+} та Co^{2+} , відповідно). Уперше опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції (амонію) за допомогою *o*-фталевого альдегіду та високоочищених препаратів аргінази I і уреазі або аргініндеїмінази. Уперше використано поєднання каталітичних наноматеріалів та високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази I, креатиніндеїмінази, аргініндеїмінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін. Уперше за використання наноміметиків пероксидази і алкогольоксидази створено нові ензімо-нанозимні методи аналізу етанолу.

5. Обґрунтованість та достовірність наукових положень, отриманих результатів та запропонованих автором рішень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації

Проведено верифікацію створених біосенсорних та ензиматичних підходів у порівнянні з традиційними методами аналізу та показано високий рівень кореляції аналітичних результатів ($R=0.999$). Виявлено високу кореляцію між отриманими аналітичними результатами та референтними методами. Таким чином, створені лабораторні прототипи біосенсорів та ензиматичних методів є перспективним для рутинного клінічного аналізу.

Ступінь новизни основних результатів дисертації порівняно з відомими дослідженнями аналогічного характеру Отримано нові нанозимні композити, придатні для біоаналітичного використання. Опрацьовано нові ензиматичні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L-аргініну та креатиніну, а також створено прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ензимів класу гідролаз, клітин надпродуцентних штамів дріжджів та метал-гібридних наночастинок.

Опрацьовано нові методи ензиматичного та біосенсорного моніторингу етанолу, L-аргініну, глюкози та метиламіну на основі L-селективних оксидоредуктаз та наноміметиків пероксидази.

6. Використання результатів роботи

За результатами виконання дисертаційної роботи одержано три патенти України на корисну модель (№142490 від 10.06.2020 р.; №107543 від 10.06.2016 р.; №108773 від 25.07.2016 р.), що стосуються розробки ензиматичних методів для кількісного визначення L-аргініну, креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини, в харчових продуктах та алкогольних напоях за використання високоочищених препаратів аргінази I, крeатиніндеімінази та аргініндеімінази, відповідно.

Розроблений лабораторний прототип креатинінового біосенсора адаптовано для використання у складі дослідного зразка амперометричного аналізатора, сумісного з планшетом (розробленого у співпраці із ТзОВ «Науково-виробнича фірма «Інженерна Лабораторія» (Львів, Україна) в особі директора к.т.н. Вуса Б.С. в рамках комплексної науково-технічної програми: «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій». Тестування біосенсорної системи проводили на зразках біологічних рідин людини (сироватки крові та поту). Дані дослідження проводили на базі відділу біохімії крові ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України».

Практична цінність отриманих результатів підтверджується їхнім використанням у навчальному процесі – при викладанні дисциплін вільного вибору Біохімія мікроорганізмів», «Хемо- та біосенсорика» і «Молекулярно організовані структури на твердій поверхні» для студентів біологічного та хімічного факультету ЛНУ ім. І. Франка.

7. Повнота викладення матеріалів дисертації та особистий внесок здобувача до всіх наукових публікацій, опублікованих із співавторами та зарахованих за темою дисертації:

Наукові праці, що розкривають основні наукові результати дисертації:

- 1) **Stasyuk N**, Zakalskiy A, Nogala W, Gawinkowski S, Ratajczyk T, Bonarowska M, Demkiv O Zakalska O, Gonchar M (2023) A reagentless amperometric biosensor for creatinine assay based on recombinant creatinine deiminase and N-methylhydantoin-sensitive CoCu nanocomposite. Sensors and Actuators B: Chemical 393: 34276. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134276>. [IF 8,4; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку)
- 2) Prokopiv T, **Stasyuk N**, Gonchar M (2023) Nanozyme can substitute a natural *Ogataea polymorpha* catalase enzyme in vivo. Microchimica Acta 190(5): 174. doi:

10.1007/s00604-023-05753-8 [IF 5,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

3) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalska O, Nogala W, Gonchar M (2022) Amperometric biosensors based on alcohol oxidase and peroxidase-like nanozymes for ethanol assay. Microchimica Acta 189: 474. [IF 5,7; SCOPUS, WoS; SCImago –Q1] <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05568-z> (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, синтез та скринінг нанозимів на псевдопероксидазну активність і конструювання біосенсорів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

4) **Stasyuk N**, Gayda G, Kavetsky T, Gonchar M (2022) Nanozymes with reductase-like activities: electrochemical and antioxidant properties. RSC Advances 12: 2026 – 2035. doi: 10.1039/d1ra08127f [IF 4,04; SCOPUS, WoS; SCImago –Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

5) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalska O, Zakalskiy A, Serkiz R, Kavetsky T, Gonchar M (2022) Reusable alcohol oxidase-nPtCu/alginate beads for highly sensitive ethanol assay in beverages. RSC Advances 12: 21309 – 21317. doi: 10.1039/d2ra02106d [IF 4,04; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

6) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalskiy A, Klepach H, Bisko N, Gonchar M, Nisnevitch M (2022) Highly Porous 3D Gold Enhances Sensitivity of Amperometric Biosensors Based on Oxidases and CuCe Nanoparticles. Biosensors 12: 472. doi: 10.3390/bios12070472 [IF 5,4; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

7) **Stasyuk NYe**, Gayda GZ, Zakalskiy AE, Fayura LR, Zakalska OM, Sibirny AA, Nisnevitch M, Gonchar MV (2022) Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn(Hg)S nanoparticles. Talanta 238 (1): 122996, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122996> [IF 6,1; SCOPUS, WoS; SCImago– Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

8) **Stasyuk N**, Gayda G, Demkiv O, Darmohray L, Gonchar M, Nisnevitch M (2021) Amperometric biosensors for L-arginine determination based on L-arginine oxidase and peroxidase-like nanozymes. Applied Sciences 11(15): 7024. <https://doi.org/10.3390/app11157024> [IF 2,7; SCOPUS, WoS; SCImago –Q2] (*Дисертантка спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних,*

написанні та оформленні публікації).

9) Demkiv O, **Stasyuk N**, Serkiz R, Gayda G, Nisnevitch, M, Gonchar M (2021) Peroxidase-Like Metal-Based Nanozymes: Synthesis, Catalytic Properties, and Analytical Application. Applied Science 11: 777. <https://doi.org/10.3390/app11020777> [IF 2,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Дисертантка спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).

10) Zakalskiy A, **Stasyuk N**, Zakalska O, Boretsky Y, Gonchar M (2020) Overexpression and one-step renaturation-purification of the tagged creatinine deiminase of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* cells. Cell Biology International 44 (5), 1204–1211 [IF 3,612; SCOPUS, WoS; SCImago – Q3] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32039507/> (Дисертантка спільно із співавторами провела ензимологічні дослідження ензиму та статистичну обробку результатів, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

11) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Serkiz R, Gonchar M (2019) Amperometric biosensors based on oxidases and PtRu nanoparticles as artificial peroxidase. Food Chemistry 285: 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.117> [IF 6,306; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку)

12) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Errachid A, Gonchar M (2018) Highly selective apo-arginase based method for sensitive enzymatic assay of manganese (II) and cobalt (II) ions. Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 193, 349 – 356. doi: 10.1016/j.saa.2017.12.031. [IF 2,931; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертанткою підготовлено дизайн дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів та написано статтю).

13) **Stasyuk N**, Gayda G, Yepremyan H, Stepien A, Gonchar M (2017) Fluorometric enzymatic assay of L-arginine. Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 193 170: 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.07.019> [IF 2,931; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

14) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Fayura L, Vovk O, Stasyk O, Sibirny A, Gonchar M (2017) Recombinant Forms of Arginase and Arginine Deiminase as Catalytic Components of Argitest Enzymatic Kit. Science and Innovation 13(4): 56—63. [фахове видання України] [http://scinn-eng.org.ua/archive/13\(4\)/13\(4\)06](http://scinn-eng.org.ua/archive/13(4)/13(4)06) (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

- 15) **Stasyuk N**, Gayda G, Klepach H, Semashko T, Gonchar M (2017) Nanoparticles of Noble Metals for Enzymatic Sensors: An Amperometric Glucose Biosensor for Wine Analysis. *Sensors Letters* 15(8), 647 – 654. <https://doi.org/10.1166/sl.2017.3862> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
- 16) **Stasyuk N**, Gayda G, Fayura L, Boretsky Y, Gonchar M, Sibirny A (2016) Novel arginine deiminase-based method to assay L-Arginine in beverages. *Food Chemistry* 201: 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.093> [IF 4,529; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
- 17) **Stasyuk N**, Gayda G, Serkiz RJa, Gonchar M (2016) The “green” synthesis of gold nanoparticles by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 73: 96 – 102. [фахове видання України] http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_73_18 (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
- 18) **Stasyuk N**, Gayda G, Klepach H, Gonchar M (2016) Nanoparticles of noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensor on hydrogen peroxide. *Sensors Letters* 14: 1169 – 1179 <https://doi.org/10.1166/sl.2016.3748>. (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
- 19) Karkovska M, Smutok O, **Stasyuk N**, Gonchar M (2015) L-Lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b₂-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches, *Talanta* 144, 1195–1200. [IF 4,035; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертанткою проведено синтез наночастинок та проведено іммобілізацію ФЦ b₂ на поверхні наноматеріалів, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків, написання статті).
- 20) **Stasyuk NYe**, Bass S. R., Gayda G. Z., Yepremyan H. S., Gonchar MV (2015) New enzymatic method for L-arginine assay based on human arginase I and urease. *ScienceRise* 6 (1), 43-48. [фахове видання України] <https://journals.uran.ua/sciencerise/article/view/45126> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).
- 21) **Stasyuk NYe**, Gayda GZ, Serkiz RJa, Gonchar MV (2015) Cell Imaging with Fluorescent Bi-Metallic Nanoparticles. *Journal of Advances in Chemistry* 11 (4): 3499 – 3511. <https://rajpub.com/index.php/jac/article/view/6694> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання

висновків та написання статті).

22) **Stasyuk N**, Gayda G, Gonchar M (2014) L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cell over-producing human liver arginase I. Sensors and Actuators B: Chemical 204: 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.112> [IF 4,589; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті)

23) **Stasyuk NYe**, Smutok OV, Zakalskiy AE, Zakalska OM, Gonchar MV (2014) Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)₆-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles. BioMed Research International 2014: 1-8. doi: 10.1155/2014/480498 [IF 2,239; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертанткою проведено конструювання амперометричних біосенсорів на основі метиламінооксидази та апробація отриманих сенсорів на реальних зразках, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків, написання статті).

24) Synenka MM, **Stasyuk NYe**, Semashko TV, Gayda GZ, Mikhailova RV, Gonchar MV (2014) Immobilization of oxidoreductases at/on gold and silver nanoparticles. Studia Biologica 8 (3-4): 5–12. [фахове видання України] <http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/192> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

Патенти:

1. Патент України на корисну модель №142490 Україна, МПК G01N21/64 Моноензиматичний спосіб визначення вмісту креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини / Гончар М.В., Закальський А.Є., Закальська О.М., Стасюк Н.Є., Прокопів Т.М., Борецький Ю.Р., Демків О.М.; заявник і власник [Інститут біології клітини НАН України](#), [Львівський державний університет фізичної культури імені Івана Боберського](#) – № u201911544, заявл. 29.11.2019, опубл. 10.06.2020, Бюл. №11. – 8 с. [патент України на корисну модель] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту).

2. Патент України на корисну модель №107543 Україна, МПК G01N 21/64 Ензиматичний метод визначення L-аргініну в крові людини / Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Закальський А.Є., Закальська О.М., Гончар М.В.; заявник і власник [Інститут біології клітини НАН України](#) – № u201512716, заявл. 22.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. №11. – 5 с. [патент України на корисну модель] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту).

3. Патент на корисну модель №108773 Україна, МПК [G01N 33/52](#), [G01N 21/64](#) Ензиматично-хімічний метод визначення вмісту L-аргініну в харчових продуктах та алкогольних напоях / **Стасюк Н.Є.**, Гайда Г.З., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Сибірний А.А., Гончар М.В.; заявник і власник [Інститут біології клітини НАН України](#) – № u201601804, заявл. 25.02.2016, опубл. 25.07.2016, Бюл. №14. – 7 с. [патент України на корисну модель] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту*).

Розділи монографій:

1. Gayda G, **Stasyuk N**, Zakalskiy A, Gonchar M, Katz E (2022) Arginine-hydrolyzing enzymes for electrochemical biosensors. Current Opin Electrochem. 33: 100941 [**IF 8,5; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1**] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2451910322000060> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано частину розділу «Електрохімічні біосенсиори для аналізу L-аргініну»*).

2. **Stasyuk N**, Smutok O, Demkiv O, Prokopiv T, Gayda G, Nisnevitch M, Gonchar M. (2020) Synthesis, Catalytic Properties and Application in Biosensorics of Nanozymes and Electronanocatalysts: A Review. Sensors, 20 (16): 4509 [**IF 3,847; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1**] <https://www.mdpi.com/1424-8220/20/16/4509> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 2 «Методи синтезу каталітичних наноматеріалів» і розділ 3 «Каталітичні властивості нанозимів»*).

3. Zakalskiy A., **Stasyuk N.**, Gonchar M. (2019) Creatinine Deiminase: Characterization, Using in Enzymatic Creatinine Assay, and Production of the Enzyme. Curr Protein Pept Sci. 20: 465-470 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30426898/> [**IF 2,52; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2**] (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 3 «Хімічні та фізико-хімічні методи для аналізу креатиніну»*).

4. Gayda G, **Stasyuk N**, Serkiz R, Gonchar M. Fluorescent nanoparticles of noble metals for cell imaging (ред. Н.А.Серебрякова). Київ: НВП «Видавництво «Проект наукова книга»; 2017. С. 156 – 165. <http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/7658> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано частину розділу 4.3 «Дослідження цитотоксичності наноматеріалів на клітини дріжджів»*).

5. Карковська М, **Стасюк Н.**, Гайда Г., Смуток О., Гончар М. Наноматеріали у конструюванні біосенсорів медичного призначення (ред. Н.А.Серебрякова). Київ: НВП «Видавництво «Проект наукова книга»; 2017. С. 165 – 177. <http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/7658> (*Особисто дисертанткою проведено*

аналізування даних літературних джерел та написано розділ 4.4 «Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення»).

6. Gonchar M, Smutok O, Karkovska M, **Stasyuk N**, Gayda G. Yeast-based biosensors for clinical diagnostics and food control (Ed. A.A. Sibirny). Springer International Publishing AG "Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi"; 2017. P. 392 – 400. <https://dokumen.pub/non-conventional-yeasts-from-basic-research-to-application-1st-ed-2019-978-3-030-21109-7-978-3-030-21110-3.html> (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 14.3.2 «Аналіз амінокислот»).

Список тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких апробовано результати дисертації

1. Gayda G., Klepach H., **Stasyuk N**., Ivash N., Bilek M., Broda D., Gonchar M. Application of recombinant glycerol dehydrogenase for glycerol assay in wines. 5 th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology: abstracts, Chernivtsi, 23-25 May, 2013. Chernivtsi, Ukraine, 2013. P. 72.

2. Gonchar M., **Stasyuk N**., Zakalskiy A., Smutok O., Zakalska A., Gaida G. Assay of arginine and manganese by amperometric biosensors based on the recombinant human arginase and its apo-enzyme. IX Jakub K. Parnas Conference “Proteins from Birth to Death”: abstracts, Jerusalem, Israel, 29 September – 2 October, 2013. Jerusalem, Israel, 2013. P. 97.

3. Zakalskiy A., Gayda G., **Stasyuk N**., Zakalska O., Smutok O., Gonchar M. Biosensor for assay of manganese ions using apoenzyme of Mn^{2+} -dependent recombinant arginase I. International Workshop “Recent advances in Micro/Nano Sensors for Mono- and Multi-Target assays”: abstracts, Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. Kyiv, Ukraine, 2013. P. 71-72.

4. **Stasyuk N**., Gayda G., Gonchar M. L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cell over-producing human liver arginase I. International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress for Cell Biology: abstracts, Uzhhorod, Ukraine, 17 – 20 September, 2014. Uzhhorod, Ukraine, 2014. P. 19.

5. **Stasyuk N**., Gayda G., Gonchar M. New bioanalytical methods based on arginase I for L-arginine assay. 5th International Young Scientists Conference “Human-Nutrition-Environment” “Biotechnology for sustainable development”: abstracts, Rzeszow, Poland. 24 – 25 April, 2014. Rzeszow, Poland. P. 78.

6. **Stasyuk N**., Gayda G., Gonchar M. Arginase-based bioanalytical approaches to L-arginine assay for prediction of urethane formation in fermented foods. International Scientific Conference "Microorganisms in detoxification of heavy metals and

xenobiotics": abstracts, Krasieczyn, Poland. 28 September – 1 October 2014. Krasieczyn, Poland. P. 15.

7. Gonchar M., Karkovska M., **Stasyuk N.**, Smutok O. Gene and Protein Engineering in Production of the Enzymes of Analytical Importance. 27th International conference on yeast genetics and molecular biology: abstracts, Levico Terme, Italy, 6–12 September 2015. Levico Terme, Italy. P. 153.

8. Karkovska M., Smutok O., **Stasyuk N.**, Gonchar M. L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome *b*₂-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches. International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 11–13 October, 2015. Lviv, Ukraine. P. 69.

9. **Stasyuk N.**, Gayda G., Klepach H., Gonchar M. Nanoparticles of Noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensors on hydrogen peroxide. International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology: abstracts, Odesa, Ukraine, 2–6 October, 2016. Odesa, Ukraine. P. 19.

10. Gayda G., **Stasyuk N.**, Fayura L., Gonchar M., Sibirny A. Application of arginine-hydrolyzing enzymes in bioanalytics. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доповідей, Одеса, Україна, 11-15 вересня 2017, Одеса, Україна, P. 239.

11. Gayda G., **Stasyuk N.**, Klepach H., Zakalskiy A., Zakalska O., Semashko T., Gonchar M. Peroxidase-like nanozymes as efficient platforms for oxidase-based amperometric biosensors. 7th International Weigl Conference: abstracts, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017. Lviv, Ukraine. P. 100.

12. **Stasyuk N.**, Zakalskyi A., Zakalska O., Gonchar M. (His)₆-tagged *Corynebacterium glutamicum* creatinine deiminase as a biosensing element for creatinine assay. 7th International Weigl Conference: abstracts, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017. Lviv, Ukraine. P. 34.

13. Гончар М.В., **Стасюк Н.Є.**, Закальський А.Є., Закальська О.М. Рекомбінантна (His)₆-тагована креатиніндеіміназа *Corynebacterium glutamicum* як біосенсорний елемент для аналізу креатиніну. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доповідей, Одеса, Україна, 11-15 вересня 2017. Одеса, Україна. С.256.

14. Gayda G., Smutok O., Klepach H., **Stasyuk N.**, Gonchar M. Microbial enzymes as the effective analytical tools for wine analysis. III International Scientific Conference "Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century: abstracts, Kyiv, Ukraine, 19-20 April, 2018. Kyiv, Ukraine. P.42.

15. Gayda G., Demkiv O., Klepach H., **Stasyuk N.**, Ivash M., Zakalska O., Gonchar M. The development of cost-effective technology for purification of some enzymes from the yeast *Ogataea polymorpha* and their bioanalytical application. International

Conference “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application”: abstracts, Rzeszow, Poland, 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. P. 92.

16. Gayda G., **Stasyuk N.**, Demkiv O., Klepach H., Koretskiy S., Ivash M., Lootsik M., Stolyarchuk I., Gonchar M. Synthesis and characterization of nanomaterials promising for medicine and bioanalytics. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.71.

17. Gayda G., **Stasyuk N.**, Fayura L., Zakalskiy A., Zakalska O., Vovk O., Stasyk O., Gonchar M., Sibirny A. Enzymatic methods based on recombinant forms of arginase and arginine deiminase for arginine analysis. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.97.

18. Gayda G., Demkiv O., **Stasyuk N.**, Klepach H., Lootsik M., Ivash M., Gonchar M. Amperometric biosensors based on glycerol oxidase and nanoparticles of noble metals as artificial peroxidase. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.114.

19. Gonchar M., **Stasyuk N.**, Gayda. G., Zakalskiy A., Zakalska O. Alcohol oxidase from the yeast *Ogataea polymorpha* coupled with an artificial peroxidase, Pt/Ru nanoparticles, as a biosensing element. International Conference “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application”: abstracts, Rzeszow, Poland, 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. P. 151.

20. Gonchar M., Zakalskiy A., Smutok O., **Stasyuk N.**, Demkiv O., Prokopiv T., Zakalska O. Engineered microorganisms for analytical purposes. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.55.

21. Smutok O., Karkovska M., **Stasyuk N.**, Gonchar M. Isolation, purification, stabilization and characterisation of flavocytochrome b_2 from overproducing cells of *Ogataea polymorpha* “tr1” (*gcr1 catx cyb2*). International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.122.

22. **Stasyuk N.**, Gayda G., Myronovskij S., Lukavetsky O., Kit Y., Gonchar M. Simultaneous enzymatic assay of l-arginine and l-citrulline in serum of patients with dysfunction of thyroid gland. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.123.

23. **Stasyuk N.**, Kukhazh Y., Hoivanovych N., Smutok O., Demkiv O., Kavetsky T., Gonchar M. Improvement of amperometric laccase biosensor using gold nanoparticles coupling with ureasil polymer as a host matrix. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.113.

24. Zakalskiy A., **Stasyuk N.**, Zakalska O., Gonchar M. Recombinant (His)₆-tagged creatininedeiminase of *Corynebacterium glutamicum*: purification and enzymological characterization. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October 2018. Lviv, Ukraine. P.100.

25. Демків О., **Стасюк Н.**, Клепач Г., Гайда Г., Гончар М. Скринінг різних синтетичних нанокмпозитних матеріалів із потенційною пероксидазною активністю. Збірник матеріалів IV Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 80-річчю Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку»: тези доповідей, м. Дрогобич, 27-28 жовтня 2020 р. Дрогобич, Україна. С. 129-133.

26. **Стасюк Н.**, Фаюра Л., Демків О., Клепач Г., Гайда Г. Флуорометричний ензиматично-хімічний метод одночасного визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові. IV Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 80-річчю Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку»: тези доповідей, 27-28 жовтня 2020 р. Дрогобич, Україна. С. 140-143.

9. Відповідність дисертації вимогам

Дисертаційна робота Стасюк Н.Є. «Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів», представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів **відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації" і наказу Міністерства освіти і науки України від 23.09.2019 № 1220 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук».

10.Список публікацій за темою дисертації:

1) **Stasyuk N.**, Zakalskiy A, Nogala W, Gawinkowski S, Ratajczyk T, Bonarowska M, Demkiv O Zakalska O, Gonchar M (2023) A reagentless amperometric biosensor for creatinine assay based on recombinant creatinine deiminase and N-methylhydantoin-

sensitive CoCu nanocomposite. Sensors and Actuators B: Chemical 393: 34276. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134276>. [IF 8,4; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

2) Prokopiv T, **Stasyuk N**, Gonchar M (2023) Nanozyme can substitute a natural *Ogataea polymorpha* catalase enzyme in vivo. Microchimica Acta 190(5): 174. doi: 10.1007/s00604-023-05753-8 [IF 5,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

3) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalska O, Nogala W, Gonchar M (2022) Amperometric biosensors based on alcohol oxidase and peroxidase-like nanozymes for ethanol assay. Microchimica Acta 189: 474. [IF 5,7; SCOPUS, WoS; SCImago –Q1] <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05568-z> (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, синтез та скринінг нанозимів на псевдопероксидазну активність і конструювання біосенсорів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

4) **Stasyuk N**, Gayda G, Kavetsky T, Gonchar M (2022) Nanozymes with reductase-like activities: electrochemical and antioxidant properties. RSC Advances 12: 2026 – 2035. doi: 10.1039/d1ra08127f [IF 4,04; SCOPUS, WoS; SCImago –Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)

5) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalska O, Zakalskiy A, Serkiz R, Kavetsky T, Gonchar M (2022) Reusable alcohol oxidase-nPtCu/alginate beads for highly sensitive ethanol assay in beverages. RSC Advances 12: 21309 – 21317. doi: 10.1039/d2ra02106d [IF 4,04; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

6) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalskiy A, Klepach H, Bisko N, Gonchar M, Nisnevitch M (2022) Highly Porous 3D Gold Enhances Sensitivity of Amperometric Biosensors Based on Oxidases and CuCe Nanoparticles. Biosensors 12: 472. doi: 10.3390/bios12070472 [IF 5,4; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).

7) **Stasyuk NYe**, Gayda GZ, Zakalskiy AE, Fayura LR, Zakalska OM, Sibirny AA, Nisnevitch M, Gonchar MV (2022) Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn(Hg)S nanoparticles. Talanta 238 (1): 122996, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122996> [IF 6,1; SCOPUS, WoS; SCImago– Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та*

підготовка статті до друку).

8) **Stasyuk N**, Gayda G, Demkiv O, Darmohray L, Gonchar M, Nisnevitch M (2021) Amperometric biosensors for L-arginine determination based on L-arginine oxidase and peroxidase-like nanozymes. Applied Sciences 11(15): 7024. <https://doi.org/10.3390/app11157024> [IF 2,7; SCOPUS, WoS; SCImago –Q2] *(Дисертантка спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).*

9) Demkiv O, **Stasyuk N**, Serkiz R, Gayda G, Nisnevitch, M, Gonchar M (2021) Peroxidase-Like Metal-Based Nanozymes: Synthesis, Catalytic Properties, and Analytical Application. Applied Science 11: 777. <https://doi.org/10.3390/app11020777> [IF 2,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] *(Дисертантка спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).*

10) Zakalskiy A, **Stasyuk N**, Zakalska O, Boretsky Y, Gonchar M (2020) Overexpression and one-step renaturation-purification of the tagged creatinine deiminase of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* cells. Cell Biology International 44 (5), 1204–1211 [IF 3,612; SCOPUS, WoS; SCImago – Q3] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32039507/> *(Дисертантка спільно із співавторами провела ензимологічні дослідження ензиму та статистичну обробку результатів, взяла участь у написанні та оформленні публікації).*

11) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Serkiz R, Gonchar M (2019) Amperometric biosensors based on oxidases and PtRu nanoparticles as artificial peroxidase. Food Chemistry 285: 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.117> [IF 6,306; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] *(Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку)*

12) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Errachid A, Gonchar M (2018) Highly selective apo-arginase based method for sensitive enzymatic assay of manganese (II) and cobalt (II) ions. Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 193, 349 – 356. doi: 10.1016/j.saa.2017.12.031. [IF 2,931; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] *(Особисто дисертанткою підготовлено дизайн дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів та написано статтю).*

- 13) **Stasyuk N**, Gayda G, Yepremyan H, Stepien A, Gonchar M (2017) Fluorometric enzymatic assay of L-arginine. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 193 170: 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.07.019> [IF 2,931; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).
- 14) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Fayura L, Vovk O, Stasyk O, Sibirny A, Gonchar M (2017) Recombinant Forms of Arginase and Arginine Deiminase as Catalytic Components of Argitest Enzymatic Kit. *Science and Innovation* 13(4): 56—63. [фахове видання України] [http://scinn-eng.org.ua/archive/13\(4\)/13\(4\)06](http://scinn-eng.org.ua/archive/13(4)/13(4)06) (*Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).
- 15) **Stasyuk N**, Gayda G, Klepach H, Semashko T, Gonchar M (2017) Nanoparticles of Noble Metals for Enzymatic Sensors: An Amperometric Glucose Biosensor for Wine Analysis. *Sensors Letters* 15(8), 647 – 654. <https://doi.org/10.1166/sl.2017.3862> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).
- 16) **Stasyuk N**, Gayda G, Fayura L, Boretsky Y, Gonchar M, Sibirny A (2016) Novel arginine deiminase-based method to assay L-Arginine in beverages. *Food Chemistry* 201: 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.093> [IF 4,529; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).
- 17) **Stasyuk N**, Gayda G, Serkiz RJa, Gonchar M (2016) The “green” synthesis of gold nanoparticles by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 73: 96 – 102. [фахове видання України] http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_73_18 (*Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).
- 18) **Stasyuk N**, Gayda G, Klepach H, Gonchar M (2016) Nanoparticles of noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensor on hydrogen peroxide. *Sensors Letters* 14: 1169 – 1179 <https://doi.org/10.1166/sl.2016.3748>. (*Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).
- 19) Karkovska M, Smutok O, **Stasyuk N**, Gonchar M (2015) L-Lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b₂-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches, *Talanta* 144, 1195–1200. [IF 4,035; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особисто дисертанткою проведено синтез наночастинок та*

проведено іммобілізацію ФЦ b_2 на поверхні наноматеріалів, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків, написання статті).

20) **Stasyuk NYe**, Bass S. R., Gayda G. Z., Yepremyan H. S., Gonchar MV (2015) New enzymatic method for L-arginine assay based on human arginase I and urease. ScienceRise 6 (1), 43-48. [фахове видання України] <https://journals.urau.ua/sciencerrise/article/view/45126> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

21) **Stasyuk NYe**, Gayda GZ, Serkiz RJa, Gonchar MV (2015) Cell Imaging with Fluorescent Bi-Metallic Nanoparticles. Journal of Advances in Chemistry 11 (4): 3499 – 3511. <https://rajpub.com/index.php/jac/article/view/6694> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

22) **Stasyuk N**, Gayda G, Gonchar M (2014) L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cell over-producing human liver arginase I. Sensors and Actuators B: Chemical 204: 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.112> [IF 4,589; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті)

23) **Stasyuk NYe**, Smutok OV, Zakalskiy AE, Zakalska OM, Gonchar MV (2014) Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)₆-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles. BioMed Research International 2014: 1-8. doi: 10.1155/2014/480498 [IF 2,239; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертанткою проведено конструювання амперометричних біосенсорів на основі метиламінооксидази та апробація отриманих сенсорів на реальних зразках, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків, написання статті).

24) Synenka MM, **Stasyuk NYe**, Semashko TV, Gayda GZ, Mikhailova RV, Gonchar MV (2014) Immobilization of oxidoreductases at/on gold and silver nanoparticles. Studia Biologica 8 (3-4): 5–12. [фахове видання України] <http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/192> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

Патенти:

1. Патент України на корисну модель №142490 Україна, МПК G01N21/64 Моноензиматичний спосіб визначення вмісту креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини / Гончар М.В., Закальський А.Є., Закальська О.М., Стасюк Н.Є.,

Прокопів Т.М., Борецький Ю.Р., Демків О.М.; заявник і власник [Інститут біології клітини НАН України](#), [Львівський державний університет фізичної культури імені Івана Боберського](#) – № u201911544, заявл. 29.11.2019, опубл. 10.06.2020, Бюл. №11. – 8 с. [патент України на корисну модель] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту*).

2. Патент України на корисну модель №107543 Україна, МПК [G01N 21/64](#) Ензиматичний метод визначення L-аргініну в крові людини / **Стасюк Н.Є.**, Гайда Г.З., Закальський А.Є., Закальська О.М., Гончар М.В.; заявник і власник [Інститут біології клітини НАН України](#) – № u201512716, заявл. 22.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. №11. – 5 с. [патент України на корисну модель] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту*).

3. Патент на корисну модель №108773 Україна, МПК [G01N 33/52](#), [G01N 21/64](#) Ензиматично-хімічний метод визначення вмісту L-аргініну в харчових продуктах та алкогольних напоях / **Стасюк Н.Є.**, Гайда Г.З., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Сибірний А.А., Гончар М.В.; заявник і власник [Інститут біології клітини НАН України](#) – № u201601804, заявл. 25.02.2016, опубл. 25.07.2016, Бюл. №14. – 7 с. [патент України на корисну модель] (*Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту*).

Розділи монографій:

1. Gayda G, **Stasyuk N**, Zakalskiy A, Gonchar M, Katz E (2022) Arginine-hydrolyzing enzymes for electrochemical biosensors. Current Opin Electrochem. 33: 100941 [**IF 8,5; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1**] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2451910322000060> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано частину розділу «Електрохімічні біосенсиори для аналізу L-аргініну»*).

2. **Stasyuk N**, Smutok O, Demkiv O, Prokopiv T, Gayda G, Nisnevitch M, Gonchar M. (2020) Synthesis, Catalytic Properties and Application in Biosensorics of Nanozymes and Electronanocatalysts: A Review. Sensors, 20 (16): 4509 [**IF 3,847; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1**] <https://www.mdpi.com/1424-8220/20/16/4509> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 2 «Методи синтезу каталітичних наноматеріалів» і розділ 3 «Каталітичні властивості нанозимів»*).

3. Zakalskiy A., **Stasyuk N.**, Gonchar M. (2019) Creatinine Deiminase: Characterization, Using in Enzymatic Creatinine Assay, and Production of the Enzyme. Curr Protein Pept Sci. 20: 465-470 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30426898/> [**IF 2,52; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2**] (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 3 «Хімічні та фізико-хімічні методи для*

аналізу креатиніну»).

4. Gayda G, **Stasyuk N**, Serkiz R, Gonchar M. Fluorescent nanoparticles of noble metals for cell imaging (ред. Н.А.Серебрякова). Київ: НВП «Видавництво «Проект наукова книга»; 2017. С. 156 – 165. <http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/7658> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано частину розділу 4.3 «Дослідження цитотоксичності наноматеріалів на клітини дріжджів»*).

5. Карковська М, **Стасюк Н.**, Гайда Г., Смуток О., Гончар М. Наноматеріали у конструюванні біосенсорів медичного призначення (ред. Н.А.Серебрякова). Київ: НВП «Видавництво «Проект наукова книга»; 2017. С. 165 – 177. <http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/7658> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 4.4 «Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення»*).

6. Gonchar M, Smutok O, Karkovska M, **Stasyuk N**, Gayda G. Yeast-based biosensors for clinical diagnostics and food control (Ed. A.A. Sibirny). Springer International Publishing AG "Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi"; 2017. P. 392 – 400. <https://dokumen.pub/non-conventional-yeasts-from-basic-research-to-application-1st-ed-2019-978-3-030-21109-7-978-3-030-21110-3.html> (*Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 14.3.2 «Аналіз амінокислот»*).

Список тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких апробовано результати дисертації

1. Gayda G., Klepach H., **Stasyuk N.**, Ivash N., Bilek M., Broda D., Gonchar M. Application of recombinant glycerol dehydrogenase for glycerol assay in wines. 5 th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology: abstracts, Chernivtsi, 23-25 May, 2013. Chernivtsi, Ukraine, 2013. P. 72.

2. Gonchar M., **Stasyuk N.**, Zakalskiy A., Smutok O., Zakalska A., Gaida G. Assay of arginine and manganese by amperometric biosensors based on the recombinant human arginase and its apo-enzyme. IX Jakub K. Parnas Conference “Proteins from Birth to Death”: abstracts, Jerusalem, Israel, 29 September – 2 October, 2013. Jerusalem, Israel, 2013. P. 97.

3. Zakalskiy A., Gayda G., **Stasyuk N.**, Zakalska O., Smutok O., Gonchar M. Biosensor for assay of manganese ions using apoenzyme of Mn^{2+} -dependent recombinant arginase I. International Workshop “Recent advances in Micro/Nano Sensors for Mono- and Multi-Target assays”: abstracts, Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. Kyiv, Ukraine, 2013. P. 71-72.

4. **Stasyuk N.**, Gayda G., Gonchar M. L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cell over-producing human liver arginase I. International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress for Cell Biology: abstracts, Uzhhorod, Ukraine, 17 – 20 September, 2014. Uzhhorod, Ukraine, 2014. P. 19.

5. **Stasyuk N.**, Gayda G., Gonchar M. New bioanalytical methods based on arginase I for L-arginine assay. 5th International Young Scientists Conference “Human-Nutrition-Environment” “Biotechnology for sustainable development”: abstracts, Rzeszow, Poland. 24 – 25 April, 2014. Rzeszow, Poland. P. 78.

6. **Stasyuk N.**, Gayda G., Gonchar M. Arginase-based bioanalytical approaches to L-arginine assay for prediction of urethane formation in fermented foods. International Scientific Conference "Microorganisms in detoxification of heavy metals and xenobiotics": abstracts, Krasiczyn, Poland. 28 September – 1 October 2014. Krasiczyn, Poland. P. 15.

7. Gonchar M., Karkovska M., **Stasyuk N.**, Smutok O. Gene and Protein Engineering in Production of the Enzymes of Analytical Importance. 27th International conference on yeast genetics and molecular biology: abstracts, Levico Terme, Italy, 6–12 September 2015. Levico Terme, Italy. P. 153.

8. Karkovska M., Smutok O., **Stasyuk N.**, Gonchar M. L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome *b₂*-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches. International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 11–13 October, 2015. Lviv, Ukraine. P. 69.

9. **Stasyuk N.**, Gayda G., Klepach H., Gonchar M. Nanoparticles of Noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensors on hydrogen peroxide. International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology: abstracts, Odesa, Ukraine, 2–6 October, 2016. Odesa, Ukraine. P. 19.

10. Gayda G., **Stasyuk N.**, Fayura L., Gonchar M., Sibirny A. Application of arginine-hydrolyzing enzymes in bioanalytics. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доповідей, Одеса, Україна, 11-15 вересня 2017, Одеса, Україна, P. 239.

11. Gayda G., **Stasyuk N.**, Klepach H., Zakalskiy A., Zakalska O., Semashko T., Gonchar M. Peroxidase-like nanozymes as efficient platforms for oxidase-based amperometric biosensors. 7th International Weigl Conference: abstracts, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017. Lviv, Ukraine. P. 100.

12. **Stasyuk N.**, Zakalskyi A., Zakalska O., Gonchar M. (His)₆-tagged *Corynebacterium glutamicum* creatinine deiminase as a biosensing element for creatinine assay. 7th International Weigl Conference: abstracts, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017. Lviv, Ukraine. P. 34.

13. Гончар М.В., **Стасюк Н.Є.**, Закальський А.Є., Закальська О.М. Рекомбінантна (His)₆-тагована креатиніндеїміназа *Corynebacterium glutamicum* як біосенсорний елемент для аналізу креатиніну. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доповідей, Одеса, Україна, 11-15 вересня 2017. Одеса, Україна. С.256.

14. Gayda G., Smutok O., Klepach H., **Stasyuk N.**, Gonchar M. Microbial enzymes as the effective analytical tools for wine analysis. III International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century: abstracts, Kyiv, Ukraine, 19-20 April, 2018. Kyiv, Ukraine. P.42.

15. Gayda G., Demkiv O., Klepach H., **Stasyuk N.**, Ivash M., Zakalska O., Gonchar M. The development of cost-effective technology for purification of some enzymes from the yeast *Ogataea polymorpha* and their bioanalytical application. International Conference “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application”: abstracts, Rzeszow, Poland, 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. P. 92.

16. Gayda G., **Stasyuk N.**, Demkiv O., Klepach H., Koretskiy S., Ivash M., Lootsik M., Stolyarchuk I., Gonchar M. Synthesis and characterization of nanomaterials promising for medicine and bioanalytics. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.71.

17. Gayda G., **Stasyuk N.**, Fayura L., Zakalskiy A., Zakalska O., Vovk O., Stasyk O., Gonchar M., Sibirny A. Enzymatic methods based on recombinant forms of arginase and arginine deiminase for arginine analysis. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.97.

18. Gayda G., Demkiv O., **Stasyuk N.**, Klepach H., Lootsik M., Ivash M., Gonchar M. Amperometric biosensors based on glycerol oxidase and nanoparticles of noble metals as artificial peroxidase. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.114.

19. Gonchar M., **Stasyuk N.**, Gayda. G., Zakalskiy A., Zakalska O. Alcohol oxidase from the yeast *Ogataea polymorpha* coupled with an artificial peroxidase, Pt/Ru nanoparticles, as a biosensing element. International Conference “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application”: abstracts, Rzeszow, Poland, 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. P. 151.

20. Gonchar M., Zakalskiy A., Smutok O., **Stasyuk N.**, Demkiv O., Prokopiv T., Zakalska O. Engineered microorganisms for analytical purposes. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.55.

21. Smutok O., Karkovska M., **Stasyuk N.**, Gonchar M. Isolation, purification, stabilization and characterisation of flavocytochrome *b₂* from overproducing cells of

Ogataea polymorpha “tr1” (*gcr1 catx cyb2*). International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.122.

22. **Stasyuk N.**, Gayda G., Myronovskij S., Lukavetsky O., Kit Y., Gonchar M. Simultaneous enzymatic assay of l-arginine and l-citrulline in serum of patients with dysfunction of thyroid gland. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.123.

23. **Stasyuk N.**, Kukhazh Y., Hoivanovych N., Smutok O., Demkiv O., Kavetsky T., Gonchar M. Improvement of amperometric laccase biosensor using gold nanoparticles coupling with ureasil polymer as a host matrix. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.113.

24. Zakalskiy A., **Stasyuk N.**, Zakalska O., Gonchar M. Recombinant (His)₆-tagged creatininedeiminase of *Corynebacterium glutamicum*: purification and enzymological characterization. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October 2018. Lviv, Ukraine. P.100.

25. Демків О., **Стасюк Н.**, Клепач Г., Гайда Г., Гончар М. Скринінг різних синтетичних наноконкомпозитних матеріалів із потенційною пероксидажною активністю. Збірник матеріалів IV Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 80-річчю Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку»: тези доповідей, м. Дрогобич, 27-28 жовтня 2020 р. Дрогобич, Україна. С. 129-133.

26. **Стасюк Н.**, Фаюра Л., Демків О., Клепач Г., Гайда Г. Флуорометричний ензиматично-хімічний метод одночасного визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові. IV Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 80-річчю Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку»: тези доповідей, 27-28 жовтня 2020 р. Дрогобич, Україна. С. 140-143.

11. Заслухавши та обговоривши доповідь Стасюк Наталії Євгенівни, прийнято висновок щодо дисертації «рекомендувати роботу до захисту».

1. Дисертація **Стасюк Наталії Євгенівни** є завершеною науковою працею, у якій розв’язано важлива наукова проблема заміни природного ензиму каталази штучним нанозимом, що має важливе загальнонаціональне значення для біології.

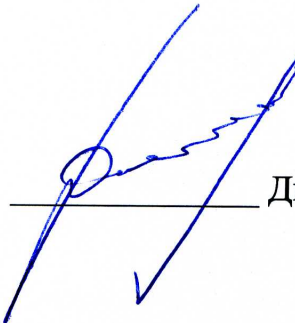
2. У 59 наукових публікаціях повністю відображені основні результати

дисертації, з них 24 статті у наукових фахових виданнях України; 16 статей у наукових періодичних виданнях проіндексованих у базах даних Scopus та/або Web of Science Core Collection).

3. Дисертація Стасюк Наталії Євгенівни «**Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів**» має наукову новизну, теоретичне та практичне значення і повністю відповідає вимогам п. 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197.

Рецензенти:

Провідний науковий співробітник відділу
молекулярної генетики і біотехнології
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник



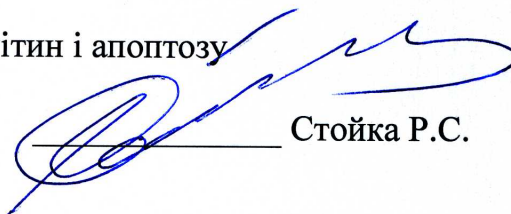
Дмитрук К.В.

Провідний науковий співробітник відділу
молекулярної генетики і біотехнології
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук, професор



Федорович Д.В.

Завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу
доктор біологічних наук, професор,
член-кор. НАН України



Стойка Р.С.

Секретар засідання,
молодший науковий співробітник відділу
регуляції проліферації клітин і апоптозу
Інституту біології клітини НАН України,
доктор філософії



Манько Н.О.

"20" жовтня 2023 р.

Власноручні підписи Дмитрука К.В., Федорович Д.В., Стойки Р.С.,
Манька Н.О. засвідчую

Учений секретар
Інституту біології клітини НАН України,
к.б.н.



Барська М.Л.