

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу 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”, подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

Актуальність теми дисертації. Пошук нових методів і знарядь, які дають змогу підвищити чутливість і/або селективність виявлення різноманітних аналітів – нагальне завдання сучасної аналітичної біотехнології, важливість якого тільки зростає з розвитком медицини, технологій харчової промисловості, потребою моніторингу щоразу більшої кількості потенційних забруднювачів води, шкідливих сполук в їжі, людському тілі тощо. У своїй роботі Наталія Євгенівна зосередилася як на добре відомих аналітах, як-от селеніт, йони амонію, метиламіну, етанол, L-аргінін, креатинін, так і менш розроблених – а саме йонах Mn^{2+} , Co^{2+} . Наявні методи – недосконалі: вони можуть бути чутливими, але недостатньо селективними чи з вузьким діапазоном лінійної відповіді; інші методи селективні однак матеріало- чи трудомісткі і недешеві тощо. Саме це спонукає до опрацювання нових біоаналітичних підходів. Отже, дисертаційне дослідження Стасюк Н.Є. безперечно актуальне.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисерантки є частиною держбюджетних і грантових досліджень відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами: “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» (проект 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 проекту «Створення смарт-сенсорних приладів для аналізу

креатиніну та йонів амонію на основі нових нанокомпозитних 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.). Робота виконувалась також у рамках міжнародного наукового гранту НАТО «Наука заради миру»: «Сучасні електрохімічні наносенсори для виявлення токсичних йонів» (SPS(NUKR)SFPP 984173, 2012 – 2016 рр.) та міжнародних індивідуальних проектів: 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. Авторка дисертаційної роботи є однією із виконавиць вищезгаданих досліджень (загалом 17 НДР).

Новизна дослідження. Дисертаційна робота Стасюк Н.Є. містить низку як нових фундаментальних наукових результатів, так і методологічних інновацій. Тут відзначу, на мій погляд, найважливіші. Вперше продемонстровано відновлення росту штаму дріжджів з втратою каталазної функції не за рахунок генетичної комплементації (уведення гена дикого типу), а унаслідок потрапляння в клітини неорганічного об'єкту, нанозиму, що розщеплював гідроген пероксид. Ідентифіковано генетичну основу безкаталазного фенотипу мутанта *Ogataea polymorpha*. Отримані нові наночастинки та нанозими з високим потенціалом для використання як нанозими та компоненти біосенсорів. За рахунок поєднання наноматеріалів та експресованих у дріжджах ферментів створено нові біосенсори для відомих аналітів, що перелічені вище. Тут слід виокремити нові ензиматичні способи детекції метиламіну та високочутливого (у пікомолярному діапазоні) визначення йонів мангану та кобальту (ІІ). Запропоновані методи апробовано на реальних зразках, як-от напої та харчові продукти.

Теоретичне значення результатів досліджень. Розвиток аналітичної біотехнології та нанотехнологій ведуть до дедалі глибшого взаємопроникнення біологічних, електрохімічних та матеріалознавчих концепцій. У цьому сенсі робота Стасюк Н.Є. становить значний теоретичний інтерес як спроба повному глянути на усталені біологічні концепції, такі як генетична

комплементація та еволюція метаболізму. Робота демонструє, що втрату клітинами високоефективного біологічного катализатора, пероксисомної каталази, що є продуктом сотень мільйонів років еволюції, можна компенсувати уведенням неорганічної наночасточки. Постає питання, наскільки широко така неорганічна комплементація може заміщувати інші ланки біохімічних мереж? Отже, робота Стасюк Н.Є. відкриває новий напрям вивчення молекулярних механізмів взаємодії між неорганічними поверхнями та усіма гравцями клітинного метаболізму.

Практичне значення результатів досліджень. Результати

дисертаційного дослідження важливі для низки галузей, де потрібно визначати рівень аналітів. Опрацьовано як нові методи біосенсорного виявлення цих речовин, так і відповідні ензиматичні набори. Про практичну цінність свідчить те, що здобувачка є співавтором трьох патентів на корисну модель, де описано набори для визначення L-аргініну, креатиніну та амонію у різних біологічних зразках

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація є цілісним дослідженням, що охоплює широкий спектр методів аналітичної біотехнології – від синтезу наночастинок і їхнього докладного опису, через клонування генів, очищення й тестування ферментів, дальнє конструювання різних сенсорів і тестування на реальних зразках, а також створення пристройів (потенціометру). Мета і завдання дисертації чітко сформульовано. В огляді літератури (поданий як сукупність оглядів у міжнародних виданнях) докладно розглянуто концепції нанозимів та біосенсорів на основі ферментів бактерій, дріжджів та людини, на основі найсучасніших джерел. Стасюк Н. Є. застосувала у своїй роботі сучасні методи мікробіології, мікроскопії, генетики, аналітичної біохімії та електрохімії. Для досягнення завдань і мети роботи використано 8 основних штамів мікроорганізмів; синтезовано (як хімічно так і на основі культуральної рідини дріжджів) та схарактеризовано низку (блізько трьох десятків) наночастинок, клоновано гени деяких ферментів, очищено низку ферментів за різних експериментальних умов, створено біонаносенсорні системи. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю таблиць і рисунків. Список літератури оглядової частини охоплює близько півтисячі посилань. Результати опрацьовано статистично та обговорено з урахуванням сучасної наукової літератури. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Зміст автореферату та основні положення самої дисертації – ідентичні. Висновки, зроблені здобувачкою, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертації сповна відображені у публікаціях та в авторефераті. За темою дисертації опубліковано 59 наукових праць, що включають 24 статті у фахових виданнях (20 – у закордонних та 4 – у вітчизняних виданнях), з них 16 у виданнях, що належать до першого і другого

квартилів за класифікацією SCImago Journal and Country Rank, 6 розділів монографій (4 – у закордонних, із них – 2 огляди належать до першого квартиля SCImago та 2 – у вітчизняному виданні), 3 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Здобувачка доповідали матеріали дисертаційної роботи на багатьох міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах і симпозіумах.

Зауваження щодо дисертації:

1. В роботі з комплементації безкatalазного мутанта нанозимами здобувачка відзначає важливий факт локалізації нанозимів усередині клітини. Ендоцитоз або дифузія – імовірні механізми проникнення у клітини, на думку здобувачки, і це припущення підтверго посиланням на один огляд (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593313/>). Втім, це джерело описує результати експериментів головно на клітинах ссавців, і незрозуміло, наскільки наявні результати можна екстраполювати на клітини дріжджів.
2. Робота здобувачки спровокає враження методичної – як і належить, відповідно до її назви. Незважаючи на це, авторці, мабуть, не зашкодило б більше звернути увагу на обговорення отриманих результатів. Розділ обговорення більше виглядає як розширені висновки, а не обговорення. Фактично немає обговорення науково цікавих питань. Так, в який спосіб нанозими чи ензими кон'юговані з наночасточками потрапляють в клітини – не висвітлено ні у відповідних статтях, ні в обговоренні усіх результатів (див. вище). Здобувачкою створено дуже багато прототипів сенсорів, електродів, пристройів і в обговоренні подекуди бракує порівняння з відомими аналогами. Не обговорено фундаментально цікаве явище неорганічної комплементації.
3. В роботі зустрічається низка одруків чи пропущених слів і не дуже вдалих виразів (напр., «...шляхом...» – краще «за допомогою»; «...у поточному дослідженні...» – краще «...у цьому дослідженні...»).

Зазначені недоліки стосуються головно оформлення дисертації, не впливають на висновки роботи та не знижують її загальної високої позитивної оцінки.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані на підприємствах біотехнологічного профілю, що виробляють біосенсори різного типу; у навчальних закладах України різного профілю під час підготовки фахівців з мікробіології, біотехнології та генетики.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника Виходячи з вищепереданої оцінки дисертації, вважаю, що за актуальністю теми, науковою новизною, важливістю і значенням отриманих результатів для теорії й практики, високим методичним рівнем проведених фундаментальних досліджень, широким висвітленням їх у фахових виданнях та матеріалах наукових конференцій, зв'язком з державними

програмами та іншими позитивними якостями вона відповідає вимогам пунктів 7-9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., а її автор Стасюк Наталія Євгенівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія.

27 грудня 2023 р.

Доктор біологічних наук,
професор кафедри генетики та біотехнології
Львівського національного університету
імені Івана Франка

Богдан ОСТАШ

Підпис Б. Осташа засвідчує:
вчений секретар ЛНУ імені І. Франка, доц.

Ольга ГРАБОВЕЦЬКА

