

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Кима Александра Леонидовича на тему:

«Разработка биосенсоров на основе фермент-содержащих полиэлектролитных микрокапсул» по специальности 1.5.6.

Биотехнология (биологические науки)

Актуальность

Определение концентрации мочевины, этанола и глюкозы является важным этапом в обеспечении качества пищевых продуктов, постановке точного диагноза и мониторинге состояния пациента. Существующие энзимологические методы анализа концентрации этих веществ имеют недостатки, такие как неоднозначность анализа в присутствии протеаз, ограниченное время хранения фермента в растворе и однократное использование фермента.

Применение методов иммобилизации ферментов при создании диагностических систем позволяет устранить недостатки, однако биосенсоры, полученные путем включения фермента в гель, имеют небольшой срок хранения из-за неустойчивости гелевой матрицы. Иммобилизация молекул фермента между полиэлектролитными мультислоями на поверхности твердых тел произвольной формы позволяет создавать биосенсоры с более длительным сроком хранения, но обладающие невысоким содержанием молекул иммобилизованного фермента на единицу площади покрытия. Инкапсуляция ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы с полупроницаемой оболочкой, состав и толщину которых можно контролировать, может решить эту проблему.

Возможность инкапсуляции ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы была продемонстрирована Львовым и соавторами в 2001 году. Эта идея получила продолжение в разработке диагностических систем на основе инкапсулированных ферментов, таких как уреазы, ЛДГ и других ферментов с различными системами регистрации. Использование инкапсулированных ферментов в диагностических системах имеет ряд преимуществ, таких как длительное сохранение активности фермента и возможность его повторного использования.

Создание диагностических систем на основе инкапсулированных ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы представляет перспективное направление исследований, т.к. подобные системы могут быть усовершенствованы путем расширения спектра инкапсулированных ферментов и использования различных способов регистрации аналитического

сигнала, что позволит создать диагностические системы с новыми уникальными характеристиками.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа А.Л. Кима построена по традиционному плану и включает: Введение, в котором обосновывается актуальность исследования, приведены цель и задачи, описаны объекты и предмет исследования, теоретическая и практическая значимость работы, приведены основные положения, выносимые на защиту, отражены степень достоверности и апробации полученных результатов; Обзор литературы (глава I), Материалы и методы (глава II), Результаты и обсуждения (глава III), состоящей из 5-ти разделов, Заключение (глава IV), Выводы (глава V), Список литературы (глава VI). Работа изложена на 109 страницах (с использованием шрифта Times New Roman, 14-ый кегль, с полуторным интервалом), содержит 32 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 175 источников, в том числе 147 иностранных.

В первой главе представлен Обзор литературы, состоящий из 4-х разделов и занимающий 27 страниц. Проведен углубленный анализ научной литературы по современному состоянию исследований биохимических методов анализа различных субстратов (таких как мочевины, этанол, глюкоза, сахароза, креатинин и других) в различных средах (таких как плазма крови, другие ткани человека и животных, продукты питания), особое внимание уделено ферментативным методам анализа. Изучена и проанализирована научная литература по разработке и исследованию функциональности полиэлектролитных микрокапсул и фундаментальным вопросам: механизмам образования полиэлектролит-белкового комплекса и термодинамике полиэлектролит-белковых взаимодействий. Обзор литературы оставляет хорошее впечатление детальностью и широтой освещенной в нем информации. Он полностью выполняет функцию введения читателя в проблематику настоящего исследования.

Во второй главе «Материалы и методы» (объемом 5 страниц) описаны объекты исследования, используемые в работе реактивы и материалы, экспериментальные методы, методы математической обработки полученных данных и методы конструирования биосенсоров. Работа выполнена на высоком методическом уровне, в работе используются методы из различных наук: физики, химии, биологии.

В экспериментальной третьей главе диссертационной работы (объемом 44 страницы) представлена доказательная база правомочности сделанных автором выводов и аргументирована новизна полученных результатов. Глава

состоит из 5-ти разделов. Результаты экспериментальной работы сопровождаются таблицами с большим объемом числовых данных, графиками, отражающими найденные в работе закономерности и механизмы, схемами, в которых объясняется строение биосенсоров и механизмы их работы, проведена статистическая обработка полученных данных.

В «Заключении» (на 3-х страницах) диссертант подводит итоги работы и дает оценку их фундаментального и прикладного значения.

Научная новизна

Научную новизну работы определяют следующие результаты диссертанта: «Разработана многоцветная диагностическая система для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации. Показано, что полиаллиламин ингибирует активность алкогольдегидрогеназы, однако сульфат аммония (5 mM) и высокая ионная сила (200 mM NaCl) снимают данное ингибирующее воздействие. Разработана диагностическая система многократного использования для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации. Разработан биосенсор на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью. Предложен способ повышения чувствительности разработанного биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью путем модификации многослойными углеродными нанотрубками».

Научная и практическая значимость

Результаты данной работы имеют важное теоретическое значение, расширяя знания о влиянии электролитов на биологические макромолекулы и механизмы ингибирования ферментов. Полученные данные могут быть использованы в медицинских и биотехнологических исследованиях, связанных с воздействием электролитов на биологические системы.

Применение разработанных диагностических систем для определения концентрации этанола, мочевины и глюкозы в растворах может иметь практическую значимость для медицинской диагностики, контроля качества продуктов питания и других областей. Разработанные системы обладают высокой чувствительностью и точностью определения, а также позволяют

множественно проводить анализы в широком диапазоне концентраций. Использование полиэлектролитных капсул для иммобилизации ферментов может увеличить срок службы биосенсоров, что делает их применение более экономически выгодным.

Результаты исследования

Все поставленные задачи исследования выполнены. В целом, работа обладает внутренней логикой, написана понятным научным языком и хорошо иллюстрирована. Выводы, сделанные в работе, соответствуют цели и задачам исследования. Положения, выносимые на защиту, подтверждены результатами диссертационного исследования. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, среди них 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, и 1 патент РФ.

В целом работа Кима А. Л. представляет собой законченное научное исследование, актуальность и новизна которого не вызывает сомнений. Однако к работе имеется ряд вопросов и замечаний.

Замечания и вопросы

1. Как влияет полиаллиламин и полистиролсульфонат на активность уреазы? В работе не приведены эти данные, хотя в следующей части об инкапсулировании алкогольдегидрогеназы в полиэлектролитные микрокапсулы, этому вопросу посвящено пристальное внимание.
2. Какое вещество наносят на электрод в качестве восстановителя пероксида водорода в коммерческих портативных глюкометрах и, особенно, устройствах длительного мониторинга концентрации глюкозы (например, Abbott FreeStyle Libre или Dexcom G4 Platinum). И чем применение берлинской лазури лучше?
3. Возможно ли создание многофункционального биосенсора, который определял бы одновременно и концентрацию глюкозы, и концентрацию этанола с использованием технологии инкапсулирования ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы?

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования Александра Леонидовича на тему: «Разработка биосенсоров на основе фермент-содержащих полиэлектролитных

микрокапсул». Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ким Александр Леонидович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Бонарцев Антон Павлович

подпись

10.10.2023

Контактные данные:

тел.: [REDACTED] e-mail: [REDACTED]

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет.

Подпись Бонарцева А.П. заверяю