

## **ВІДГУК**

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Кожешкурта Валентина Олександровича**

«Взаємозв'язок електропровідності біологічних середовищ

з функціональною активністю»,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук

за спеціальністю 03.00.02-біофізика

Дисертація Кожешкурта В.О. присвячена дослідженню цілого ряду актуальних завдань сучасної біофізики. В області медичних досліджень актуальним є пошук вимірних характеристик, які можуть служити індикатором фізіологічних та патологічних біологічних процесів або фармакологічних відповідей на терапевтичне втручання. В області харчової промисловості нагальною потребою є розробка методів швидкого і недорогого тестування продуктів харчування на якісний і кількісний склад, безпеку їх вживання. Незважаючи на наявність досліджень, спрямованих на вирішення цих завдань, багато питань залишаються не з'ясованими, тому вдосконалення методу імпедансної спектроскопії і застосування його як швидкого і надійного способу тестування суспензій наночастинок, біологічних рідин, клітин і тканин є актуальним і обґрунтованим.

Дисертаційна робота присвячена виявленню взаємозв'язку між фізичним параметром (електропровідність) і біологічною характеристикою (функціональна активність) на прикладі клітин кісткового мозку щурів залежно від віку тварин і наслідків інтоксикації організму іонами міді; можливості застосовувати метод широкосмугової імпедансної спектроскопії для дослідження і контролю якості біологічних рідин на прикладі молозива корів, для дослідження і контролю фізико-хімічних характеристик наночастинок.

Дисертаційна робота виконана відповідно до планів НДР в рамках держбюджетних тем кафедри фізичної та біомедичної електроніки та комплексних інформаційних технологій Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна «Розробка методу та експериментального зразка приладу для неруйнівного визначення електродинамічних параметрів фізичних тіл» (номер держреєстрації 0111U002460); «Розробка апаратно-програмного комплексу для широкосмугової імпедансометрії розчинів, суспензій, біологічних тканин і рідин» (номер держреєстрації 0117U004963). За тематикою дисертації проведено наукові дослідження «Розробка ефективного методу отримання магнітних наночастинок на основі лазерної абляції» у ФРН на базі Ганноверського лазерного центру при університеті імені Готфріда Вільгельма Лейбніца.

Дисертацію оформлено згідно з діючими вимогами і складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку літератури та одного додатка.

У вступі обґрунтовано актуальність тематики досліджень, сформульовано мету роботи, основні завдання, зазначено новизну отриманих результатів та їх практичне значення, описано внесок здобувача в опублікованих зі співавторами роботах.

У першому розділі, який є оглядом літератури, описано можливості вивчення біологічних рідин, культур клітин і тканин методом імпедансної спектроскопії, розкрито поняття імпеданс, надано загальні уявлення про електричну модель біологічної рідини і тканини. Наведено приклади практичного застосування імпедансного методу для дослідження якості поживних середовищ і харчових продуктів, вивчення впливу захворювань тварин і домішок на якість молока. Проведено огляд робіт, присвячених дослідженню взаємозв'язку електропровідності грибів, бактерій, культури дріжджових клітин з їх метаболічною активністю, наприклад, ферментативною і проліферативною. На основі аналізу літературних даних зроблено висновок про принципову можливість інтерпретації результатів вимірювання електропровідності як індикаторів біофізичних та фізіологічних процесів, недостатню вивченість і актуальність цієї теми.

У другому розділі дисертації наведено схеми проведення експериментів з тваринами, описано процедури отримання зразків для дослідження, метод культивування культури клітин. Об'єктами дослідження були клітини кісткового мозку щурів, молозиво корів і його фракції, наночастинки заліза і платини. Для їх аналізу автор використовував широкий набір сучасних біохімічних і фізичних методів: мас-спектрометрія, адсорбційна спектрофотометрія, конфокальна мікроскопія, оптична мікроскопія. Основним методом досліджень був метод імпедансної спектроскопії. Безсумнівною перевагою роботи є проведення експериментальних досліджень не тільки за допомогою сучасних вимірювальних приладів, але і за допомогою нових технічних засобів вимірювань для систем діелектрометрії і імпедансної спектроскопії: мініатюрного мікрополоскового резонатора оригінальної конструкції і амплітудно-фазового детектора.

У третьому розділі викладено результативну частину дисертації, вона містить цілий ряд нових і важливих результатів.

У підрозділі 3.1. представлено результати експериментального дослідження електрофізичних параметрів одно- та двокомпонентних модельних середовищ. Автором був запропонований новий і простий метод синтезу наночастинок заліза в магнетитовій оболонці, заснований на реакції контрольованого озоном окислення заліза, і вдосконалений технологічний процес отримання наночастинок металів методом лазерної абляції. Експериментально доведено можливість використання мікрополоскового резонатора для визначення фізіологічних концентрацій глюкози і хлориду натрію у водних розчинах. Проведено моделювання імпедансу вимірювальної комірки, що містить водну суспензію наночастинок металу. Вивчено вплив розподілу металевих включень в об'ємі вимірювальної комірки на її опір. Вперше показано, що на основі даних імпедансу можна визначити розмір включень при постійній концентрації або концентрацію при постійному розмірі наночастинок. Вперше показано, що метод

імпедансної спектроскопії може бути використано в якості непрямого методу визначення масової частки металу в суспензії в режимі реального часу, запропоновано емпіричну формулу.

У підрозділі 3.2. дисертаційної роботи представлено результати дослідження електрофізичних характеристик біологічних тканин. Автор визначив можливості та межі застосування методу відкритого кінця коаксіального хвилеводу для вивчення дисперсії діелектричної проникності біологічних тканин і рідин. Було отримано дисперсійні криві дійсної і уявної частин діелектричної проникності і електропровідності в діапазоні частот 0,1-10,5 ГГц для м'язової, з'єднувальної та епітеліальної тканини. Однак далі, на жаль, експериментальні дослідження на цих об'єктах продовжені не були через складність фізіологічних процесів, що в них відбуваються. Але було показано, що отримані значення діелектричної проникності біологічних тканин можуть бути використані для розрахунків систем радіотермометрії. Розглянуто математичну модель розподілу теплових полів всередині біологічного об'єкта за наявності в ньому зон зі зниженою температурою. Теоретично показана можливість визначення глибини залягання і розміру зони аномальної температури при використанні двохвильової радіотермометрії.

Головне завдання, яке автор поставив перед собою в наступних підрозділах дисертації – це довести принципову можливість інтерпретації результату вимірювання електропровідності суспензій культур клітин і біологічних рідин як індикатора метаболічних процесів. На справедливу думку автора, ця можливість впливає з того факту, що метаболізм супроводжується рухом і перерозподілом зарядів у внутрішньоклітинній і міжклітинній рідині, зміною іонного складу, зміною рухливості вільних носіїв заряду, тобто зміною питомої електропровідності, яка є інтегральною характеристикою цих процесів.

Підрозділ 3.3. присвячено експериментальній перевірці гіпотези, згідно з якою функціональна активність клітин кісткового мозку (спрямованість диференціювання, швидкість проліферації) змінюється у відповідь на патологічні адаптивні зрушення інших систем організму, які проявляються в зміні характеристик мікрооточення цих клітин. Використовували два способи зміни мікрооточення: індукція фіброзу печінки у молодих і старих щурів лінії Wistar і переведення клітин в однакову стандартну систему культивування.

В результаті експерименту було встановлено, що клітини кісткового мозку старих тварин відрізняються від клітин молодих тварин за вмістом реакційно-здатних форм кисню, іонів міді і кальцію, проліферативною активності та питомою електропровідністю і що цю відмінність обумовлено станом прооксидантно-антиоксидантної системи організму. Показано, що інтоксикація організму іонами міді викликає зміну вмісту іонів, вмісту реакційно-здатних форм кисню, проліферативної активності, спрямованості диференціювання клітин кісткового мозку і це відбивається на електропровідності суспензії клітин. Однак чіткої кореляції параметра питомої електропровідності з іншими дослідженими параметрами, а також з набором цих параметрів виявлено не було.

У підрозділі 3.4 дисертаційної роботи представлено результати дослідження залежності електропровідності молозива і його компонентів від температури, концентрації білків і термінів зберігання. Хочу відзначити найбільш значущі нові наукові результати, які можуть мати практичне значення:

- показано, що до складу молозива входить до декількох сотень різних білків, причому якісний білковий склад молозива індивідуальний, тобто обумовлений унікальним метаболізмом продуцента;
- показано, що електропровідність молозива залежить від співвідношення в ньому іонного, ліпідного та білкового компонентів, тобто метод широкосмугової імпедансної спектроскопії є перспективним методом швидкої оцінки якості продукції, одержуваної з молозива на різних етапах виробництва і термінів її зберігання;
- показано, що низькомолекулярні компоненти молозива здатні усувати токсичну дію сірчанокислої міді на організм тварин, механізм якого пов'язаний з регуляцією окислювально-відновної системи, що відбивається в зміні електропровідності молозива. Тобто на основі низькомолекулярних компонентів молозива можуть бути розроблені медичні препарати, а метод імпедансної спектроскопії може бути використаний в якості методу їх стандартизації.

Характеризуючи роботу в цілому, необхідно відзначити, що експериментальні вимірювання виконано на високому науковому рівні з використанням сучасних приладів і методів, результати статистично оброблено й проаналізовано, тому достовірність і новизна наукових положень, сформульованих в дисертації не викликає сумніву. Дисертація написана ясною мовою, кожен розділ закінчується висновками, які акцентують увагу на найбільш суттєвих результатах. Зміст дисертації відповідає паспорту спеціальності 03.00.02-біофізика (фізико-математичні науки). Основні положення та висновки дисертації знайшли повне відображення в авторефераті дисертації. Основні результати дисертаційної роботи опубліковано в 6 статтях, з яких 3 опубліковано в наукових виданнях України та 3 – в зарубіжних спеціалізованих виданнях з високим рейтингом, а також апробовано на 4 конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів.

Позитивно оцінюючи матеріал дисертації в цілому, при аналізі цієї роботи у опонента виникли такі питання та зауваження:

1. На мій погляд, в назві дисертації є граматичне неузгодження і краще було виправити його на "Взаємозв'язок електропровідності біологічних середовищ з їх функціональною активністю", але навіть така назва не зовсім точно передає зміст дисертації.
2. Назва підрозділу 1.1. не відповідає його змісту, оскільки в ньому розглядається не імпеданс біологічних тканин і його інтерпретація, а всі питання, пов'язані з вивченням електропровідності рідких середовищ.

3. Оскільки в розділі 3 досліджені різні об'єкти: наночастинки, культури клітин і біологічні рідини і кожне дослідження є самостійним, то доцільно було б розбити цей розділ на три окремих.

4. Зауваження до другого абзацу на стор.65. Автор пише: "...між електропровідністю та *концентрацією іонів* є залежність ... Це, по-перше, вказує на можливість застосування розроблених сенсорів для дослідження *іонного складу* компонентів біологічних рідин.» На мій погляд, це вказує на можливість визначати кількісний *вміст* іонів, а не їх якісний *склад*.

5. За допомогою мікрополоскового резонатора було показано можливість визначення фізіологічних концентрацій глюкози і хлориду натрію у водних розчинах. Кров є багатокомпонентною рідиною і в ній одночасно присутні і молекули глюкози, і іони натрію і хлору, тому логічно було б визначити і концентраційну залежність глюкози у фізрозчині.

6. Для зручності порівняння експериментальних результатів слід було б привести графіки залежності питомої електропровідності і графіки проліферативної активності на одній сторінці альбомної орієнтації по чотирьох групах даних: інтактні «молоді–старі», молоді «інтактні–з фіброзом», старі «інтактні–з фіброзом», з фіброзом «молоді–старі».

7. У таблиці 3.2 в дисертації значення параметра GP / LHP вказано невірно, до того ж похибка не може на порядок перевищувати значення параметра.

8. При аналізі таблиці 3.3 в дисертації наведено невірні значення. Так, вміст іонів кальцію в клітинах старих тварин в порівнянні з молодими збільшився не на 73%, а на 37,7%; вміст іонів кальцію в клітинах молодих тварин з фіброзом зменшився в порівнянні з інтактними не на 57%, а на 43%; вміст активних форм кисню в клітинах молодих тварин з фіброзом в порівнянні з інтактними не збільшився, а зменшився на 27,3%, а в клітинах старих тварин не залишився незмінним, а збільшився на 7%.

9. У підписі до рис.3.28Б в дисертації і до рис.10Б в авторефераті, а також в підписі до рис.3.20А в дисертації і до рис.6 в авторефераті неправильно позначено криві, оскільки графіки не співпадають з описом поведінки кривих в тексті, або надано невірний аналіз графіків.

10. Зауваження до математичної моделі кількості носіїв зарядів у розчинах білків (пункт 3.4.4). На початку автор розглядає дві фракції білкових молекул: низькомолекулярну, з середньою молекулярною масою білків 6 кДа і високомолекулярну, з середньою молекулярною масою білків 18 кДа. Далі, не зрозуміло з яких міркувань, автор приймає середню молекулярну масу пептиду рівною 120 Да, але це невірно, оскільки 6 кДа і 18 кДа – це не молекулярні маси білкових фракцій, а середні молекулярні маси білків в цих фракціях. Звідси середня молекулярна маса білка двох фракцій буде 12 кДа, а не 120 Да. Кількість білків у кожній фракції (частку від загальної кількості) можна визначити за інтенсивністю спектра, отриманого методом мас-спектрометрії. Невірні вихідні посилки ведуть до невірних розрахунків.

Однак ці зауваження ніяк не впливають на загальну позитивну оцінку роботи, не знижують її наукового рівня і цінності.

Дисертаційна робота Кожешкурта В. О. є змістовною, завершеною науковою роботою з біофізики, в якій випробувані нові технічні засоби, які дозволяють, використовуючи метод широкосмугової імпедансної спектроскопії, проводити швидко оцінку фізико-хімічних характеристик наночастинок, біологічних середовищ (молозива, середовищ для культивування клітин кісткового мозку, сироватки крові) та тканин. Отримані в роботі нові науково обґрунтовані теоретичні та експериментальні результати в сукупності є суттєвими для вдосконалення методів діагностики та контролю в галузі нанотехнології, біотехнології, медицини та харчової промисловості.

Вважаю, що за актуальністю, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною отриманих результатів, логічністю та обґрунтованістю висновків дисертаційна робота «Взаємозв'язок електропровідності біологічних середовищ з функціональною активністю» відповідає вимогам пунктів 9, 11, 12, 13 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою КМУ №567 від 24.07.2013 р. до кандидатських дисертацій, а її автор, Валентин Олександрович Кожешкурт, заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

Науковий співробітник відділу біофізики  
Інституту радіофізики та електроніки  
ім. О. Я. Усикова НАН України, к. ф.-м. н.



О. В. Хорунжа

Підпис наукового співробітника, к. ф.-м. н.  
Хорунжей О. В. засвідчую:

Вчений секретар Інституту радіофізики  
та електроніки ім. О. Я. Усикова  
НАН України, к. ф. - м. н.



І. Є. Почаніна