

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Мацишина Миколи Йосиповича «Розробка афінних біосенсорних систем для детектування мутацій, пов'язаних з Rh'-позитивною лейкемією та резистентними формами туберкульозу»**, представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Дисертаційна робота присвячена розробці гібридизаційних ДНК біосенсорних систем на основі поверхневого плазмонного резонансу і електрохімічної імпедансної спектроскопії для детектування мутацій ДНК, пов'язаних з Rh'-позитивною лейкемією і резистентними формами туберкульозу. В останні два десятиріччя значно зріс інтерес до ДНК-сенсорів, що підтверджується зростанням майже на порядок кількості публікацій за цей період. Вважається, що ДНК-біосенсори завдяки простоті використання, надійності, експресності з часом можуть стати ефективним рутинним методом молекулярної діагностики порушень послідовності нуклеїнових кислот на генному і транскрипційному рівні, які викликають різноманітні патології в організмі людини. Тому розробка біосенсорних систем для ранньої діагностики Rh'-позитивною лейкемії та мультирезистентних форм туберкульозу, результати якої представлено в дисертаційній роботі, є актуальним біотехнологічним дослідженням.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності з планами наукових досліджень кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної теми № 11БФ07-03 «Фізико-хімічні механізми функціонування живого на різних рівнях організації» (№ держ. реєстрації 0111U007663, 2011-2015 рр.), бюджетної теми лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України № 2.2.4.22 «Розробка наукових засад створення афінних біосенсорів на основі біологічних молекул та біоміметиків» за 2013-2017рр., теми № 99-Н «Дослідження взаємодії нуклеїнових кислот з нанокристалічними напівпровідниками для створення нових біонаноструктурованих матеріалів, здатних розпізнавати біологічно важливі маркери спадкових захворювань», що виконувалась в рамках проекту цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій» (№ держ. реєстрації 0110U006055 на 2010-2014 рр.).

Результати роботи були використані для реалізації проекту № 20/2 «Розробка, експериментальна апробація та метрологічна атестація приладу-сенсора на основі ефекту локалізованого поверхневого плазмонного резонансу у масивах наноструктур золота та срібла. Дослідна експлуатація та метрологічне забезпечення комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002508, 2013-2017 рр.). Частина роботи була також виконана в рамках міжнародного проекту «Integrated nanodevices» 7-ї рамкової програми ЄС (2013-2015 рр., номер PIRSES-GA-2012-318524). Крім того, частину роботи було виконано в рамках проекту НТЦУ (№6044, 2015-2017рр.) «Розробка «розумних наноносіїв» на ефекті фототеплового плазмонного підсилення для цільової доставки ліків в організмі людини».

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Робота є важливим молекулярно - біотехнологічним дослідженням, що ґрунтується на молекулярно-біологічному аналізі механізму патологій (Ph'-позитивної лейкемії та мультирезистентних форм туберкульозу), глибокому фізичному, фізико-хімічному і хімічному аналізі процесів в біосенсорі, інформаційному забезпеченні обробки результатів. В роботі автор розробив і використав олігонуклеотиди з унікальними послідовностями, що характеризують мутації в генах людини і мікробів при цих захворюваннях, широкий спектр фізичних, фізико-хімічних, спектрофото- та флюорометричних методів дослідження, виконав великий обсяг експериментальної роботи. Вперше розроблено імпедіометричний біосенсор для детектування точкової мутації в 531 кодоні *rproB* гена *M. tuberculosis*, яка обумовлює резистентність бактерії до рифампіцину; з використанням ППР біосенсора та написаної комп'ютерної програми розраховано рівноважні константи реакцій зв'язування олігонуклеотидів-проб та фрагментів нормального і мутованого в одній основі гена *M. tuberculosis*. Розраховано енергію взаємодії цих олігомерів. Розроблено на основі спектроскопії ППР біосенсор для детектування послідовності гібридного гена *bcg-abl*, з застосуванням цього біосенсора було розроблено метод термодискримінації повністю і частково (з заміною одного нуклеотида) комплементарних олігонуклеотидів, розроблено метод значного підсилення біосенсорного сигналу ППР за допомогою модифікованих олігонуклеотидами-мішенями наночастинок золота.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено лабораторний прототип імпедіометричного біосенсора для селективного розпізнавання послідовностей ДНК

може основою для створення комерційного біосенсора для виявлення мутацій в гені *proB* *M. tuberculosis*. Запропоновано метод кількісної оцінки рівня імобілізації олігонуклеотидів, мічених флуорофором Су3, на поверхні наночастинок золота, який захищено патентом України на корисну модель №93555. У співпраці з співробітниками Інституту напівпровідників НАН України ім. В.Є. Лашкарьова створено і випробувано на модельних системах ППР спектрометр з системою контролю і регулювання температури для селективного розпізнавання повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів, що дозволяє виявити характерні для мієлоїдної лейкемії порушення в послідовності ДНК

Особистий внесок здобувача. Автором особисто розроблено лабораторний прототип імпедіометричного сенсора для селективного розпізнавання послідовностей ДНК, особисто виконана основна частина експериментальної роботи, написано комп'ютерні програми для забезпечення вимірювального процесу з використанням розроблених біосенсорів. Написання всіх опублікованих статей було здійснено за безпосередньої участі дисертанта.

Відповідність автореферата змісту дисертації. Автореферат в повній мірі відображає зміст дисертаційної роботи.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях. За темою дисертації опубліковано 7 статей у фахових наукових вітчизняних і міжнародних журналах, серед яких 5 англійських, отримано один патент України на корисну модель. Зроблено 7 доповідей на міжнародних наукових конференціях. Отримані в дисертації результати повністю представлені в публікаціях.

Оцінка мови і стилю дисертації. Дисертація написана літературною науковою мовою. Викладення матеріалу дисертації відзначається логікою, послідовністю і ясністю.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, експериментальної частини, що містить два розділи, аналізу і узагальненню результатів досліджень, висновків і списку використаних джерел, що включає 118 найменувань. Робота викладена на 120 сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дисертації представлено у вигляді 46-ти рисунків і 7-ми таблиць.

У вступі обґрунтовано актуальність теми досліджень, її зв'язок із планами, темами і програмами наукових досліджень, сформульовано мету і задачі роботи, визначено об'єкти і предмет дослідження, представлено наукову новизну і практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувача та вказано конференції, на яких було апробовано результати роботи.

В розділі “Огляд літератури”, проведено аналіз наукових публікацій, присвячених виявленню генетичних механізмів виникнення стійкості бактерій *M. tuberculosis* до рифампіцину та виникненню Ph⁺-позитивної лейкемії у людини. Було визначено ділянки генів, які важливі для розпізнавання резистентних форм туберкульозу та лейкемії: у випадку ХМЛ – це розриви в *M-bcr* ділянці при формування гібридного гену *bcr-abl*, що відповідає за формування патогенного білка *p210 Bcr-Abl*, який викликає злоякісну трансформацію клітин крові. У випадку резистентності бактерій до рифампіцину - це мутація в 531 або 526 кодони гену *rpoB M. tuberculosis*. Визначення цих порушень дозволяє діагностувати форму ХМЛ і резистентність штаму збудника туберкульозу, що забезпечує правильне і своєчасне лікування цих захворювань. На думку автора створення ДНК-біосенсорів, що використовують методів ППР та ЕІМ, відповідає цим завданням. Автор детально розглянув можливості та особливості їх застосування як ДНК-біосенсорів.

В розділі “Матеріали і методи” наведена структура використаних олігонуклеотидів, які є фрагментами нативного гену *bcr* і *abl*, гібридного гену *bcr – abl*; олігонуклеотидів до нормального і мutowаного в кодони 531 гену *rpoB M. Tuberculosis*. Описано методи імпедансної спектроскопії, поверхневого плазмонного резонансу, створення біоселективного шару геносенсора, синтезу наночастинок золота (НЧЗ) та приготування розчинів модифікованих наночастинок золота, метод контролю поверхневої густини ДНК-мішеней на поверхні НЧЗ. Також наведені комп’ютерні програми, розроблені автором для оптимізації процесу вимірювання і розрахунку кінетичних параметрів реакції гібридизації олігонуклеотидів

В розділі 3 експериментальної частини роботи представлені результати розробки імпедіометричного геносенсора для виявлення мутацій в гені *rpoB M. tuberculosis*. Створений електрохімічний ДНК-сенсор міг детектувати послідовності ДНК в наномольних концентраціях. Було визначено оптимальні умови його роботи і продемонстровано здатність дискримінувати олігонуклеотиди, що відрізняються тільки одним нуклеотидом. Біосенсор є перспективною розробкою для створення серійних компактних ДНК- біосенсорів.

В розділі 4 представлено результати розробки ППР біосенсора для визначення послідовності гібридного гену *bcr-abl*. Було визначено оптимальні умови роботи біосенсора і встановлено додатковий метод розпізнавання олігонуклеотидів, який полягає в тому, що при меншій концентрації робочого буфера відгук комплементарного олігонуклеотида статистично значимо перевищує відгук некомплементарного (з заміною

одного нуклеотида) олігонуклеотида. Вперше було реалізовано концепцію термодискримінації послідовностей ДНК з використанням спектрометра ППР. Також було розроблено метод значного підсилення сигналу з застосуванням наночастинок золота модифікованих олігонуклеотидами-мішенями, що дозволило отримати сенсорний відгук при концентрації олігонуклеотида 1 нМ.

В 5 розділі автор провів аналіз і узагальнення результатів проведених досліджень, порівняння можливостей розроблених ДНК біосенсорів для визначення стійкості бактерій *M. tuberculosis* до рифампіцину та виявлення Ph⁺-позитивної лейкемії у людини з іншими методами діагностики цих захворювань. Проаналізував переваги і недоліки розроблених біосенсорів та перспективи їх практичного застосування в медицині.

Висновки дисертаційної роботи повністю відповідають поставленій меті і завданням дослідження.

Окремі дискусійні питання та зауваження до дисертації. Дисертація виконана на високому теоретичному і методичному рівні, ретельно оформлена, зауважень до роботи немає.

Висновок. Враховуючи актуальність, високий методичний рівень, об'єм проведених досліджень, наукову новизну і важливість одержаних результатів та перспективи їх практичного застосування в медицині і молекулярній біотехнології, вважаю, що дисертаційна робота Мацишина Миколи Йосиповича «Розробка афінних біосенсорних систем для детектування мутацій, пов'язаних з Ph⁺-позитивною лейкемією та резистентними формами туберкульозу» повністю відповідає вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,

головний науковий співробітник
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
НАН України, д. б. н., с. н. с.



Є.М.Макогоненко

