

ВІДГУК

офіційного опонента, професора кафедри органічної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка, доктора хімічних наук зі спеціальності 02.00.03 – органічна хімія, професора Василя ПИВОВАРЕНКА на дисертаційну роботу КАЗАКОВА-КРАВЧЕНКА Олександра Сергійовича «Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛР», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

1. Актуальність теми дисертації

Дисертаційна робота пана Олександра Казакова-Кравченка присвячена розробці та дослідженню нових флуоресцентних барвників для візуалізації малих кількостей білків та нуклеїнових кислот у водних розчинах, зокрема – для детекції ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР). Наявні проблеми та широке застосування найкращих комерційних зразків на практиці стимулюють науковців до пошуку і синтезу нових барвників та умов їх ефективного застосування, що безперечно підтверджує актуальність дисертаційної роботи Казакова-Кравченка.

2. Загальна характеристика дисертаційної роботи

Дисертаційна робота пана Казакова-Кравченка має об'єм 184 сторінки і містить двомовну анотацію, вступ, 4 розділи, висновки, два додатки та перелік використаних джерел (119 найменувань). Робота проілюстрована рисунками, схемами та таблицями.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, показано зв'язок роботи з науковими планами та темами, сформульовано мету і завдання дослідження. Тут перераховано здобуті наукові результати та вказано на їх практичне значення, охарактеризовано публікації, в яких вони викладені та їх апробацію. У **першому розділі** наведено огляд літератури щодо фотофізичних і фотохімічних властивостей монометинціанінових барвників у розчинах, а також зміни їх властивостей у присутності різних концентрацій білків або нуклеїнових кислот. Особливу увагу приділено флуоресцентним репортерним молекулам, що застосовуються у методах ПЛР. У **другому розділі** описано матеріали і методи, які застосовувались у дослідженнях.

У **третьому розділі** наведено результати та обговорення експериментальних досліджень, виконаних автором. Це – ключовий розділ

дисертації. Він містить чотири частини. У першій розглядаються флуоресцентні властивості несиметричних монометинових барвників у присутності нуклеїнових кислот та альбумінів. У другій наводяться результати дослідження флуоресцентних властивостей діоксоборонових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами. У третій частині обговорюються спектральні ефекти симетричних триметинціанінових барвників при взаємодії з нуклеїновими кислотами та альбумінами. Четверта частина присвячена розгляду флуоресцентних властивостей двох монометинціанінових барвників **fb123** і **fb128** та перспектив їх застосування у методі ПЛР у реальному часі. У кожній частині зроблено узагальнення отриманих результатів у вигляді висновків.

У **четвертому розділі** проведено аналіз та узагальнення результатів, отриманих у роботі. У **висновках** підкреслено ключові моменти, одержані у кваліфікаційній роботі дисертанта. Перелік використаних джерел містить посилання на свіжі публікації зарубіжних і вітчизняних авторів за темою дисертації, а також посилання на доробок дисертанта.

3. Найважливіші наукові результати дисертації

У роботі проведено комплексне дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей окремих серій ціанінових та діоксоборонових барвників у присутності нуклеїнових кислот і білків та визначено їх потенціал як флуоресцентних зондів. Вперше для досліджених серій барвників здійснено системну оцінку їх придатності для використання у методі ПЛР у реальному часі. Встановлено вплив окремих барвників на основні параметри ампліфікації, зокрема на значення порогового циклу (Ct), ефективність ампліфікації та характер кривих плавлення продуктів ПЛР. Знайдено два барвника, які за властивостями найкраще підходять для застосування в ПЛР як флуоресцентні зонди. Вперше продемонстровано можливість використання монометинціанінового барвника **fb128** як флуоресцентного зонда у ПЛР у реальному часі та визначено умови, за яких він забезпечує ефективну детекцію продуктів ампліфікації. Показано узгодженість отриманих результатів із даними, отриманими з використанням комерційних флуоресцентних систем.

4. Апробація результатів дисертації та публікації

Основні ідеї та положення представлені та апробовані як на національному, так і на міжнародному рівнях. Результати роботи оприлюднені та обговорені на двох міжнародних конференціях. Опубліковано чотири статті у національному виданні «Biopolymers and Cell».

5. Наукове, теоретичне та практичне значення результатів дисертації

Вперше для досліджених серій барвників здійснено системну оцінку їх придатності для використання у методі ПЛР у реальному часі. Знайдено два барвники, які за властивостями найкраще підходять для застосування у ПЛР як флуоресцентні зонди. Вперше продемонстровано можливість використання монометинціанінового барвника **fb128** як флуоресцентного зонда для ПЛР у реальному часі та визначено умови, за яких він забезпечує ефективну детекцію продуктів ампліфікації. Показано узгодженість отриманих результатів із даними, отриманими з використанням комерційних флуоресцентних систем. Встановлено вплив барвників на основні параметри ампліфікації, зокрема на значення порогового циклу (Ct), ефективність ампліфікації та характер кривих плавлення продуктів ПЛР.

Практичне значення отриманих результатів полягає у тому, що у досліджених серіях барвників знайдена сполука, щодо якої показано доцільність використання як альтернативи до сучасних комерційних флуоресцентних зондів для ПЛР. Отримані результати можуть бути використані при створенні нових тест-систем для молекулярної діагностики.

6. Дотримання академічної доброчесності

На підставі вивчення тексту дисертації здобувача і його наукових праць стверджую, що дана дисертаційна робота виконана самостійно, текст дисертації не містить плагіату, а дисертація відповідає вимогам академічної доброчесності. Дисертація містить результати власних досліджень її автора. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

7. Зауваження до змісту роботи та до її оформлення

1) Анотація, с. 2, написано: *«Встановлено, що взаємодія барвників з біополімерами супроводжується суттєвим приростом інтенсивності флуоресценції, що зумовлено обмеженням внутрішньомолекулярної рухливості хромофора»*. Наведене твердження є неповним і неправильно описує результати роботи. По-перше, це вже давно відомий факт, що взаємодія багатьох барвників з біополімерами супроводжується суттєвим приростом інтенсивності флуоресценції. Саме на цьому принципі оснований численні приклади детекції їх взаємодії з полімерами: білками, нуклеїновими кислотами тощо. По-друге, приріст інтенсивності флуоресценції пов'язаний не лише з обмеженням «внутрішньомолекулярної рухливості хромофора», але й зі зменшенням кількості молекул води в оточенні хромофора барвника. Вода часто вносить головний вклад у процеси безвипромінювальної дезактивації збудженого стану органічних барвників.

2) С. 3, написано: *«...тоді як при взаємодії з ДНК (діоксиборонових барвників) флуоресцентна відповідь виявилась суттєво нижчою ($\Delta Q \approx 0,8-3,2$), а в окремих сполук інтенсивність флуоресценції, навпаки, спадала, що, ймовірно, зумовлено посиленням агрегації барвників у присутності ДНК»* Таке пояснення є сумнівним, і тому вимагає додаткової аргументації. Тут більш імовірним є часткове гасіння флуоресценції нуклеїновими основами за механізмом фотоперенесення електрону.

3) Рис. 1.1. Не вказано структуру замісника R.

4) Розділ 1 має понижену наочність. Відсутність рисунків спектрів флуоресценції в окремих випадках ускладнює сприйняття матеріалу.

5) У Табл. 3.1 (с. 68) наведено відносні інтенсивності флуоресценції барвників за оптичної густини розчину 0.5 – 1.15. Виникають сумніви у точності цих вимірів, оскільки за таких умов флуоресценція на максимумі смуги поглинання збирається зі зменшеного у 2 – 5 разів об'єму аналітичної комірки в кюветі порівняно з оптичними густинами розчину <0.1 .

6) Написано: *«Довгохвильовий максимум у спектрах поглинання барвників fb123 та fb124 розташований приблизно на тих самих довжинах хвиль, що й максимум у ДМСО, і тому може бути віднесений до поглинання індивідуальних молекул барвника.»* Тут не врахована можливість

перпендикулярної орієнтації хромофорів у агрегаті, при якій теж не змінюється положення максимуму у спектрі поглинання.

7) Рис. 3.4 і 3.5, Таблиця 3.2. Не вказані концентрації барвників у дослідах. Як наслідок, неможливо зрозуміти, з чим спектральні ефекти (наприклад, різниця у оптичній густині розчину) пов'язані – з агрегацією чи різницею у концентраціях.

8) Рис. 3.4 і 3.5, Таблиця 3.1.2. ДНК у досліді одно- чи дволанцюгова?

9) У Табл. 3.3 (с. 89) і 3.4 (с. 93) наведено відносні інтенсивності флуоресценції барвників за оптичних густин розчинів 0.5 – 1.75. Виникають сумніви у точності цих вимірів, оскільки за таких умов флуоресценція на максимумі смуги поглинання збирається зі зменшеного у 2...5 разів об'єму аналітичної комірки в кюветі порівняно з оптичними густинами <0.1 .

8. Загальні висновки щодо дисертаційної роботи

Слід зазначити, що наведені зауваження, хоч і вказують на дещо знижений рівень виконання та подання результатів, проте в цілому несуттєво впливають на високий рівень отриманих у роботі наукових досягнень. Вважаю, що дисертація Казакова-Кравченка «Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛР» є повноцінною науковою роботою, яка відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій» (з наступними змінами) та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р. Її автор, Казаков-Кравченко заслуговує присудження йому ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» у галузі знань 09 «Біологія».

Офіційний опонент,
Професор кафедри органічної хімії
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка,
д.х.н., професор

Василь ПИВОВАРЕНКО

м. Київ, 17.07.2026