

Голові спеціалізованої вченої ради
 ID PhD 15150 Інституту молекулярної
 біології і генетики НАН України
 Член-кореспонденту НАН України,
 старшому науковому співробітнику,
 доктору біологічних наук,
 провідному науковому співробітнику
 відділу біомолекулярної електроніки
 Інституту молекулярної
 біології і генетики НАН України
СЕРГЕЄВІЙ Тетяні

ВІДГУК

**офіційного опонента – доктора біологічних наук, старшого дослідника,
 провідного наукового співробітника відділу біохімії м'язів
 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
 Векліч Тетяни Олександрівни
 на дисертацію Казакова-Кравченка Олександра Сергійовича на тему
 «ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЦІАНІНОВІ БАРВНИКИ ДЛЯ АНАЛІЗУ
 НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ПЛР»
 подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії
 у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»**

Актуальність обраної теми дисертації. Стрімкий розвиток молекулярної біології та біотехнології вимагає вдосконалення методів виявлення й кількісного визначення нуклеїнових кислот. Одним із найважливіших методів молекулярної діагностики є полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, яка потребує використання флуоресцентних зондів. Флуоресцентні барвники, які зараз широко використовуються, мають ряд обмежень. Тому актуальним завданням є пошук нових барвників із кращими властивостями. Одними з найбільш перспективних кандидатів є ціанові барвники. Однак вплив особливостей їхньої будови на ефективність ПЛР досліджений недостатньо. Тому актуальним є дослідження флуоресцентних ціанінових барвників та оцінка їх придатності до використання в ПЛР у реальному часі.

Усе викладене і визначає актуальність теми дисертаційної роботи Казакова-Кравченка Олександра Сергійовича, присвяченої вивченню спектрально-люмінесцентних характеристик серії ціанінових барвників у присутності нуклеїнових кислот та білків, аналізу впливу хімічної структури барвників на ці характеристики та оцінці перспектив застосування таких барвників як флуоресцентних репортерів у ПЛР у реальному часі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Виконана в рамках гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Науково-інноваційної програми імені Марії Склодовської-Кюрі “NoBiasFluors”, №872331 (2020 – 2024 pp.).

Компоненти аналізу цієї дисертаційної роботи опонентом, які дозволили мені скласти враження щодо неї, є наступні:

- 1) звичайно, опонент читав дисертацію, розмірковував над науковими результатами, що були одержані дисертантом;
- 2) перед написанням цього «Відгуку» мною були проаналізовані головні публікації дисертанта;
- 3) опонент безпосередньо обговорював з дисертантом результати його експериментальних досліджень.

Таким чином, на підставі проведеного мною аналізу цієї дисертаційної роботи та відповідно до вимог ДАК МОН України формулюю свої уявлення щодо найбільш важливих науково-теоретичних та практичних аспектів дисертаційної роботи Казакова-Кравченко О.С.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Ступінь надійності одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є, на мій погляд, вельми високим. Результати дисертаційного дослідження Казакова-Кравченка О.С. є достовірними та об'єктивними.

Вступ до дисертації написано послідовно і лаконічно. У ньому автор розкрив суть проблеми, обґрунтував актуальність теми, окреслив мету і завдання дослідження, висвітлив наукову новизну і власний внесок, а також навів об'єкт, предмет і методи дослідження, вказав публікації та апробацію результатів дисертаційного дослідження.

Грунтовний аналіз сучасних даних літератури, представлений у першому розділі рукопису дисертаційної роботи, включає огляд фотофізичних та фотохімічних властивостей монометинціанінових барвників, опис взаємодії цих барвників з нуклеїновими кислотами, а також гарний аналіз практичного використання флуоресцентних барвників для ПЛР. Узагальнення даних літератури дало змогу автору виокремити недосліджені аспекти проблеми, що вивчалися, і сформулювати мету і завдання власного дослідження.

Другий розділ дисертаційної роботи містить опис методів дослідження. Обґрунтовано та коректно використано дисертантом необхідних як класичних, так і сучасних експериментальних методів: спектроскопії поглинання та флуоресценції у видимій області, ПЛР у реальному часі, аналіз кривих плавлення ДНК та гель-електрофорез. Статистична обробка та математичний аналіз отриманих результатів проведені з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням.

Викладення власних експериментальних результатів, отриманих за допомогою використаних методів, логічно пов'язано з метою та завданнями досліджень. Результати експериментальних досліджень представлені в чотирьох підрозділах третього розділу.

У підрозділі 3.1 наведені результати дослідження впливу ДНК, РНК та ЛСА на спектри поглинання та флуоресценції восьми монометинових ціанінових барвників різної структури. Показано, що як спектральні характеристики вільних барвників, так і їхня флуоресцентна відповідь у присутності біологічних макромолекул суттєво залежать від будови хромофорної системи, природи замісників та здатності барвників до самоасоціації у водному середовищі.

У підрозділі 3.2 описуються спектрально-люмінесцентні характеристики досліджених діоксобононових барвників у присутності трьох сироваткових альбумінів, ДНК та овальбуміну. Показано, що всі барвники демонструють значно сильнішу флуоресцентну реакцію на сироваткові альбуміни, ніж на ДНК або овальбумін.

У підрозділі 3.3 ґрунтовно вивчені спектрально-люмінесцентні властивості симетричних триметинціанінових барвників з нуклеїновими кислотами та альбумінами. Встановлені залежності між структурою барвників і їх спектрально-люмінесцентними властивостями дозволили визначити перспективні напрями подальшої модифікації тіакарбоціанінових флуоресцентних зондів для створення РНК-чутливих флуоресцентних зондів та флуоресцентних зондів для білкових систем.

У підрозділі 3.4 досліджено цілу низку характеристик монометинціанінового барвника **fb128** для його застосування у полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі. Показано, що **fb128** є перспективним флуоресцентним інтеркалюючим барвником для застосування у кількісній ПЛР та інших методах аналізу ДНК у реальному часі.

Хочу відмітити, що висновки зроблені у кожному підрозділі дуже добре узагальнюють отримані результати.

Висновки дисертаційної роботи відповідають її змісту та поставленій меті, ґрунтуються на значному фактичному матеріалі, комплексному статистичному аналізі отриманих даних і не викликають сумнівів.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій підтверджено їх обговоренням на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Дисертація Казакова-Кравченка О.С. «Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛ» є закінченою кваліфікаційною роботою, в якій отримано нові та доповнено існуючі наукові результати, що мають теоретичну і практичну цінність.

Достовірність і новизна основних наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки дисертаційної роботи Казакова-Кравченка О.С. побудовані на матеріалах власних досліджень з використанням традиційних і сучасних методів досліджень є цілком достовірними.

На основі одержаного експериментального матеріалу логічно сформульовані основні положення та висновки, новизна яких в наступному.

Олександр Сергійович вперше провів системну оцінку спектрально-люмінесцентних властивостей близько 80 флуоресцентних барвників у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот та білків.

Розглядаючи основні питання наукової новизни, представленої в дисертації, необхідно відзначити, що автор вперше показав, що барвник **fb128** є ефективним флуоресцентним репортером і забезпечує високу чутливість і точність кількісної детекції ДНК за допомогою ПЛР у реальному часі. Було встановлено оптимальний діапазон його концентрацій, показано високу ефективність ампліфікації та узгодженість результатів кількісного аналізу з комерційними системами детекції на основі SYBR Green та EvaGreen.

Дисертаційне дослідження Казакова-Кравченка О.С. «Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛ» має

також суттєвий прикладний аспект. Викладені в дисертаційній роботі результати досліджень свідчать про можливе використання досліджених барвників для створення нових ефективних флуоресцентних систем детекції нуклеїнових кислот, у тому числі для застосування в ПЛР, що сприятиме розвитку біотехнологічної галузі України та зменшенню імпортозалежності.

Практичне значення роботи.

Дисертаційна робота Казакова-Кравченка Олександра Сергійовича має важливе практичне значення, оскільки результати досліджень свідчать про можливість застосування вивчених барвників як альтернативних флуоресцентних зондів і демонструють їхню придатність для відбору та оптимізації умов проведення ПЛР. Отримані результати можуть бути використані при створенні нових тест-систем для молекулярної діагностики.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях.

Основні результати дисертаційної роботи достатньо повно викладено в 5 авторських публікаціях: 3 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Scopus; 2 тез наукових доповідей. Крім цього, основні наукові положення дисертаційної роботи апробовані на наукових конференціях.

Щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Казакова-Кравченка О.С. є завершеною науковою працею, і її оформлення відповідає встановленим вимогам. Зміст анотації відповідає основним положенням дисертації та не містить інформації, яка була б відсутня у рукописі дисертації. Анотація написана українською та англійською мовами та в повній мірі відображає основні

результати дисертації. Використанні у дисертації ідеї та результати інших авторів мають відповідні посилання на джерела літератури. Анотацію та текст рукопису дисертації оформлено відповідно до діючих вимог. Олександром Сергійовичем дотримано вимоги норм законодавства про авторське право.

Оцінка змісту дисертації.

Дисертаційна робота Казакова-Кравченка О.С. є фундаментальним науковим дослідженням. Обсяг дисертації 184 сторінки стандартного друкованого тексту. Робота добре оформлена і проілюстрована 10 таблицями та 59 рисунками. Структура дисертації повністю відповідає меті і завданням дослідження і складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних експериментальних досліджень з їх обговоренням, висновків, списку використаних літературних джерел (119 посилань) та додатку. У тексті дисертації відсутнє порушення вимог академічної доброчесності.

Висновки відображають основні одержані результати і базуються на аналізі експериментальних даних.

Запитання до дисертаційної роботи:

Слід зазначити, що дисертація написана дуже грамотно не лише з наукової, але й з орфографічної та стилістичної точки зору. Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому позитивно, хотілося б отримати відповіді на деякі запитання:

1. Ви показали, що наявність гідроксильних груп у бензенових фрагментах, порівняно з метоксильними замісниками, суттєво підвищує флуоресцентну відповідь при взаємодії з нуклеїновими кислотами ($\Delta Q \approx 280$ проти $\Delta Q \approx 71$). Які механізми пояснюють вплив гідроксильних груп на збільшення флуоресцентної відповіді?

2. В роботі встановлено, що оптимальний робочий діапазон концентрацій барвника **fb128** становить 0,2–2 μM . Як Ви вважаєте, що відбувається при концентраціях нижче 0,2 μM або вище 2 μM ?

3. Якщо потрібно було б покращити **fb128**, які структурні модифікації Ви б запропонували і чому?

4. Які фактори можуть обмежувати використання **fb128** у практичній лабораторній практиці?

5. Ви протестували **fb128** на двох ампліконах, чи вважаєте, що цього достатньо для узагальнення, що такий “мінімальний набір” буде достатнім для наступної валідації інших різних локусів – наприклад, з різним GC-вмістом, довжиною?

6. Чи розглядали Ви, що певні барвники можуть зв’язуватися не лише з ДНК, але й з компонентами реакційної суміші (Mg^{2+} , буфер, полімераза, солі) ?

7. Щодо практичної складової даного дослідження, а саме імпортозалежності, то чи оцінювали Ви вартість синтезу **fb128** щоб використовувати його замість комерційних аналогів?

Втім, вищезазначені запитання мають лише дискусійне значення і ніякою мірою не впливають на загальну надзвичайно високу оцінку дисертації в цілому, а також на викладені дисертантом основні наукові положення та висновки.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Казакова-Кравченко Олександра Сергійовича «Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛР» виконана у Інституті молекулярної біології і генетики НАН України і є самостійною завершеною дослідною роботою у галузі знань 09 Біологія (спеціальність 091 – “Біологія”), в якій отримані нові науково обґрунтовані експериментальні дані, що в сукупності є суттєвими для

розуміння спектрально-люмінесцентних характеристик серії ціанінових барвників у присутності нуклеїнових кислот та білків, аналізу впливу хімічної структури барвників на ці характеристики та оцінці перспектив застосування таких барвників як флуоресцентних репортерів у ПЛР у реальному часі.

Оформлення дисертації відповідає чинним нормативним документам. Отримані Олександром Сергійовичем результати мають як теоретичну, так і практичну цінність. Зроблені зауваження ні в якому разі не знижують значення отриманих результатів і не впливають на загальну високу оцінку роботи.

Отже, за актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску дослідника і зроблених висновків дисертаційна робота на тему: «Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛР» відповідає спеціальності 091 – Біологія та вимогам «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 12.01.2022 року, а її автор Казаков-Кравченко Олександр Сергійович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент:
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України,
доктор біологічних наук,
старший дослідник

Тетяна ВЕКЛІЧ

Підпис *Тетяна Веклич*
 ЗАСВІДЧУЮ
 Зав. канцелярією
 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
 національної академії наук України
 "20" 07 2020 р.

