

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента – доктора хімічних наук, завідувача відділу
синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України Дубея Ігоря Ярославовича

на дисертацію Казакова-Кравченка Олександра Сергійовича

*«Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу
нуклеїнових кислот методом ПЛР»*,

подану до захисту у разову спеціалізовану вчену раду в Інституті

молекулярної біології і генетики НАН України

на здобуття наукового ступеня доктора філософії

в галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

Актуальність теми дисертації

Дисертаційна робота О.С. Казакова-Кравченка присвячена пошуку й дослідженню нових флуоресцентних барвників як реагентів для візуалізації й аналізу нуклеїнових кислот (НК) методом полімеразної ланцюгової реакції.

Вибір теми дослідження обґрунтований, а її актуальність безсумнівна. Останні успіхи наук про життя, медицини та біотехнології значною мірою зумовлені розвитком флуоресцентних технологій. Одним із методів, що використовує такі технології, є метод ПЛР. Добре відомо, що без ПЛР сьогодні фактично не існує ні біологічної науки, ні медичної діагностики. Сам метод ґрунтується на використанні флуоресцентних барвників, що забезпечують інтенсивну емісію при зв'язуванні з НК. Комерційні барвники для ПЛР типу SYBR Green I та EvaGreen мають ряд недоліків, серед яких, зокрема, здатність інгібувати ПЛР у підвищених концентраціях, вплив на температуру плавлення ДНК та зниження точності аналізу кривих плавлення. Важливим фактором є і висока вартість комерційно доступних реагентів. Це спонукає до пошуку нових флуорофорів із покращеними характеристиками.

Робота присвячена дослідженню барвників класу ціанінів як чутливих флуорофорів для ПЛР, передусім ПЛР у реальному часі.

Зазначимо, що сфера ціанінових барвників продовжує інтенсивно розвиватися. Це можна сказати не про всі класи барвників. Так, постійний прогрес у сфері кумаринів та BODIPY очевидний, чого не скажеш, допустимо, про трифенілметанові барвники. Проте в ПЛР використовуються фактично тільки ціанінові барвники, для яких характерне ефективне зв'язування з НК та різке (на кілька порядків) зростання інтенсивності флуоресценції в комплексах. Такі властивості ціанінів зумовлюють їх широке використання і в інших сферах молекулярної біології та біомедичних досліджень.

Виходячи з цього, пошук і всебічне вивчення нових флуоресцентних реагентів родини ціанінів для аналізу НК методом ПЛР важливі як з наукового, так і з практичного погляду. Зокрема, необхідні дослідження маловивченого впливу структурних факторів барвників на параметри ампліфікації в ПЛР, що

створює основу для структурного дизайну більш ефективних та чутливих барвників для детекції НК, зокрема, для ПЛР у реальному часі. .

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконувалась у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу та проводилась у рамках бюджетної теми № 2.2.4.16 (№ держреєстрації 0122U201823), а також європейського гранту “Горизонт 2020” програми ім. Марії Склодовської-Кюрі “NoBiasFluors” №872331 (202–2024 рр.).

Загальна структура дисертації

Дисертація викладена на 184 сторінках і побудована за класичною схемою, Вона складається з анотації, вступу, 4-х розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає 119 посилання, а також 2-х додатків (список публікацій здобувача за темою дисертації та спектрально-флуоресцентні дані досліджених барвників). Робота містить 59 рисунків і 10 таблиць.

Аналіз основного змісту роботи

Метою дисертаційної роботи було вивчення спектрально-флуоресцентних характеристик серії ціанінових барвників у присутності нуклеїнових кислот та білків, аналіз впливу структури барвників на ці характеристики та оцінка перспектив застосування таких барвників як флуоресцентних репортерів у ПЛР в реальному часі. Мета й завдання дослідження чітко сформульовані.

В роботі розглянуто кілька класів ціанінових барвників – моно- та триметинціаніни й діоксаборинові барвники. При цьому вивчалися два основних аспекти цих сполук – спектрально-флуоресцентні властивості барвників у вільному стані та в комплексах з різними біомолекулами та їх використання як реагентів для ПЛР.

Перший розділ дисертації – літературний огляд, який присвячено фотофізичним властивостям монометинціанінових барвників (у т.ч. димерних, а також агрегатів) та особливостям їхньої взаємодії з біомолекулами – НК й білками. Правда, в роботі досліджували не тільки монометинціаніни. Також розглянуто різні аспекти використання флуоресцентних барвників у ПЛР у реальному часі. Огляд літератури актуальний, добре організований і справляє позитивне враження та свідчить про хороше володіння дисертантом темою свого дослідження.

В наступних розділах наведено результати власних досліджень автора.

У *другому розділі* (“Матеріали і методи”) описано основні методи, що використовувались при проведенні досліджень. Зокрема, наведено детальні методики спектрально-флуоресцентних досліджень, електрофоретичного аналізу ПЛР-продуктів, проведення ПЛР у реальному часі, аналізу кривих плавлення, а також статистичної обробки даних.

Третій розділ роботи є основним і присвячений власне результатам

експериментальних досліджень та їх обговоренню. Тематика цього розділу включає два основних кластери:

(1) Вивчення спектрально-флуоресцентних властивостей серії моно- і триметинціанінів та діоксаборинових барвників у вільному стані та при взаємодії з білками (альбумінами) й нуклеїновими кислотами (ДНК та РНК). Проаналізовано вплив різних структурних факторів (замісники, будова поліметинового лінкера тощо) на ці властивості барвників та їх взаємодію з біомолекулами. Виявлено барвники, що ефективно зв'язуються з НК, і такі, що більш селективні до білків.

(2) Відбір перспективних барвників та їх дослідження в умовах ПЛР, передусім ПЛР у реальному часі. Основна увага тут приділена вивченню найефективнішого ціанінового барвника **fb128**. Визначено його важливі характеристики – концентраційно-залежний вплив на інгібування реакції, параметри ампліфікації, проаналізовано криві плавлення продуктів ПЛР. Зроблено висновок про придатність **fb128** для практичного використання як флуорофора для ПЛР у реальному часі.

Заключний *четвертий розділ* дисертації присвячено узагальненню й аналізу отриманих результатів. Цей прикінцевий розділ можна назвати концептуальним. Зазначимо, що подібне важливе узагальнення в дисертаціях зустрічається далеко не завжди.

Послідовність досліджень побудована дуже логічно. Загальний підхід – класична “воронка скринінгу”. На перших етапах дослідження структуровані за класами барвників. Вивчено серію ціанінових барвників різних класів.. Проведено спектральні дослідження серій у різних умовах – від вільного стану до комплексів з НК й білками. Здійснено хороший аналіз залежності спектральних характеристик від структури барвників. Після першого етапу відібрано невелику групу барвників, ефективних щодо НК, які дослідили й порівняли більш глибоко.

В результаті ідентифіковано барвник **fb128**, який за сумою параметрів виявився оптимальним для детекції НК в умовах ПЛР у реальному часі. Далі його було досліджено в усіх можливих аспектах.

Достовірність отриманих результатів

Достовірність результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів. Вона підтверджується використанням адекватних сучасних експериментальних методів досліджень. Вони включають спектроскопічні методи (адсорбційна та флуоресцентна спектроскопія), метод ПЛР у реальному часі з аналізом ампліфікаційних кривих і кривих плавлення, гель-електрофорез. Коректно проведена статистична обробка даних. Використані методи дозволили отримати достовірні результати, на яких ґрунтуються зроблені в роботі висновки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків дисертації

Матеріали дисертації викладено відповідно до мети завдань дослідження,

які чітко сформульовані. Автором проведений ґрунтовний аналіз літератури за темою роботи, що дало змогу виявити наукову новизну одержаних результатів. Застосування вказаних вище методів дозволило розв'язати проблеми, що лежали в основі дослідження. Висновки роботи чітко сформульовані та висвітлюють її основний зміст. Наукові положення та висновки дисертації обґрунтовані й відповідають отриманим результатам.

Наукова новизна роботи

Наукова новизна й теоретичне значення цієї дисертаційної роботи не викликають сумнівів. Перш за все, це комплексне дослідження спектральних характеристик серій флуоресцентних барвників кількох класів у різних умовах. Отримано нові дані, що стосуються їх використання для детекції біомолекул (білків та нуклеїнових кислот). Вперше здійснено системну оцінку серії барвників стосовно їх придатності для застосування у ПЛР у реальному часі. Оцінено ефективність барвників в умовах ПЛР, встановлено їх вплив на основні параметри ампліфікації, знайдено оптимальні умови реакції. При цьому продемонстровано, що барвники можуть по-різному впливати на перебіг ПЛР, що слід особливо враховувати в умовах кількісного аналізу НК.

Одним із фундаментальних результатів роботи є те, що проаналізовано вплив структурних факторів на спектрально-флуоресцентні властивості досліджених барвників, що важливо для конструювання нових ефективних флуоресцентних зондів.

Практичне значення отриманих результатів

Результати роботи мають і вагоме прикладне значення. Це передусім знайдений та всебічно охарактеризований, у т.ч. в реальних умовах, ціаніновий барвник **fb128**, перспективний для практичного застосування як реагент для детекції продуктів ампліфікації в ПЛР у реальному часі. Визначено умови його ефективного застосування, в яких він демонструє ефективність, порівнянну з комерційними стандартами. Отримані результати можуть бути використані при створенні нових тест-систем для молекулярної діагностики.

Повнота викладу результатів роботи в опублікованих працях

Основні результати роботи повністю опубліковані. За її матеріалами вийшло друком 6 наукових праць, у т.ч. 4 статті та тези 2 доповідей на наукових конференціях. Всі статті опубліковано в фаховому журналі *Biopolymers and Cell*, що є фаховим виданням категорії А та індексується в наукометричних базах Scopus, Web of Science та CrossRef. Публікації свідчать про високий рівень досліджень, наукову новизну й вагомість отриманих результатів.

Загальна оцінка змісту дисертаційної роботи

Робота справляє дуже позитивне враження. Дисертантом виконаний великий обсяг досліджень, що дозволило знайти нові реагенти для розв'язання ряду біохімічних та біомедичних задач. Результати мають як фундаментальну

наукову, так і практичну цінність. Вони зможуть знайти застосування в наукових дослідженнях у науках про життя та в медичній діагностиці. Сформульовані автором мета і завдання роботи успішно реалізовані. Дисертація добре організована. До кожного розділу є свій висновок. Загальні висновки роботи добре сформульовані й відповідають отриманим результатам та основним положенням дисертації.

В цілому, дисертація є серйозною науковою працею на актуальну тему, виконаною на сучасному експериментальному й теоретичному рівні, в якій отримано нові результати, важливі для розвитку біології та медицини.

Дискусійні положення та зауваження до дисертації

Робота за своїм змістом, отриманими результатами і глибиною їх аналізу є дослідженням високого рівня. Принципових зауважень до неї немає, а серед окремих зауважень можна навести наступні.

1. У розділі “Наукова новизна” не згадується про аналіз впливу структури барвників на їхні спектрально-флуоресцентні властивості, а це має вадливе теоретичне значення. Разом з тим, цьому присвячено Висновок 1.

2. Методики спектроскопічних досліджень описані не надто детально. Так, у “Матеріалах і методах” не вказані концентрації розчинів барвників, з якими проводили запис спектрів у вільному стані та в комплексах з НК й білками. Не наведені вони і в розділі 3 й додатку Б. В результаті представлені в роботі дані збіднені з погляду спектроскопії.

3. Робочі концентрації розчинів біомолекул (але не барвників) наведені в експериментальній частині, проте не вказані молярні співвідношення барвник-біомолекула, використані при вивченні їх комплексів. Зазначимо, що такі дані для зручності варто вказувати і в підписах до спектрів і таблиць..

4. В багатьох таблицях наведені значення оптичної густини (D) розчинів, проте не вказані концентрації. Це недостатньо інформативно (хоча й достатньо для кількісної оцінки змін поглинання за різних умов). Доречно було би вказати й коефіцієнти екстинкції барвників.

5. У Висновку 2 роботи сказано, що для барвника **fb128** інтенсивність флуоресценції $I \approx 2000$ в.о. (відносних одиниць). Ця величина сама по собі не має особливого сенсу, оскільки не зазначена концентрація барвника.

6. Розділ 3 дуже об’ємний і поєднує два окремі напрямки – спектрально-люмінесцентні дослідження барвників та їх вивчення в ПЛР. Рационально було б розбити його на два окремих розділи, об’єднані кожен своєю темою.

7. Список скорочень слід наводити в алфавітному порядку.

8. Робота написана правильною літературною мовою, хоча в тексті зрідка зустрічаються й описки, на яких не варто зупинятися. Часом бачимо не зовсім строгі терміни, такі як “ультрафіолетова та видима спектроскопія” (правильно “спектроскопія в ультрафіолетовій та видимій області”).

Ці зауваження не стосуються суті роботи та жодним чином не впливають на її загальну високу оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертація є самостійною завершеною науковою працею, що становить вагомий внесок як у галузь флуоресцентних барвників, так і в науки про життя. Актуальність теми роботи, достовірність, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, повнота їх викладу в опублікованих працях, обґрунтованість положень і висновків свідчать про високий науковий рівень роботи. Її результати забезпечують вирішення актуальних наукових завдань у галузі знань 09–“Біологія”. Робота оформлена відповідно до вимог наказу МОН України №40 від 12 січня 2017 р. “Про затвердження вимог до оформлення дисертації”.

У підсумку, робота Олександра Сергійовича Казакова-Кравченка на тему “Флуоресцентні ціанінові барвники для аналізу нуклеїнових кислот методом ПЛР” відповідає спеціальності 091–“Біологія” і вимогам “Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах)”, що затверджений постановою Кабінету міністрів України №261 від 23 березня 2016 р. (зі змінами й доповненнями №283 від 3 квітня 2019 р.) 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. (зі змінами, внесеними постановами Кабінету міністрів України №341 від 21 березня 2022 р. і №502 від 19 травня 2023 р.), а її автор повністю заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091–“Біологія”.

Офіційний рецензент:

завідувач відділу синтетичних біорегуляторів
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України, д.х.н., ст.н.с.



Ігор ДУБЕЙ

