

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента – кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника, завідувачки лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Скрипкіної Інесси Яківни 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 дисертаційної роботи визначається потребою у створенні нових високоефективних флуоресцентних барвників для молекулярної діагностики, насамперед для полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Незважаючи на широке використання комерційних барвників, вони мають низку суттєвих обмежень, що стимулює пошук нових сполук із покращеними спектральними та функціональними характеристиками. Особливий інтерес становлять ціанінові барвники, які завдяки високій чутливості до зв'язування з нуклеїновими кислотами є перспективними флуоресцентними репортерами, однак вплив їхньої хімічної структури на ефективність застосування в ПЛР досліджений недостатньо. У зв'язку з цим дослідження спектрально-люмінесцентних властивостей нових ціанінових барвників і встановлення взаємозв'язку між їхньою структурою та функціональними характеристиками, що представлені в дисертаційній роботі роботи Казакова-Кравченка, є своєчасним, науково обґрунтованим і має вагоме практичне значення для розвитку сучасної молекулярної біології, біотехнології та медичної діагностики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами Дисертаційна робота виконувалась у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та 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 pp.).

Загальна характеристика дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Олександра Казакова-Кравченка викладена на 184 сторінках. Вона

складається з двомовної анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел, який налічує 119 найменувань та двох додатків. Матеріал роботи належним чином ілюстровано 59 рисунками та 10 таблицями.

У **вступі** автор аргументовано обґрунтовує актуальність обраної тематики, визначає зв'язок дослідження з науковими програмами та тематикою установи, формулює мету і завдання роботи. Також наведено характеристику наукової новизни, практичного значення отриманих результатів, інформацію про їх апробацію та публікації, у яких вони висвітлені.

Перший розділ присвячений аналізу сучасного стану досліджень фотофізичних і фотохімічних властивостей монометинціанінових барвників, їх взаємодії з білками та нуклеїновими кислотами, а також особливостям використання флуоресцентних репортерів у методах полімеразної ланцюгової реакції. У **другому розділі** детально описано використані матеріали, експериментальні підходи та методики дослідження.

Основні результати дисертаційної роботи представлені у **третьому розділі**, який складається з чотирьох логічно пов'язаних частин. У першій частині досліджено флуоресцентні властивості несиметричних монометинцианінових барвників у комплексах із нуклеїновими кислотами та альбумінами. Друга частина присвячена вивченню взаємодії діоксобононових барвників із цими біомолекулами. У третій частині проаналізовано спектральні характеристики симетричних триметинціанінових барвників під час взаємодії з нуклеїновими кислотами та альбумінами. У четвертій частині наведено результати дослідження барвників fb123 і fb128, оцінено їхні флуоресцентні властивості та перспективність використання як репортерів у ПЛР у реальному часі. Кожна із зазначених частин завершується стислими висновками, що узагальнюють отримані результати.

У **четвертому розділі** здійснено комплексний аналіз і узагальнення результатів дослідження, сформульовано їх наукове значення та практичну цінність. Загальні висновки логічно відображають виконання поставлених завдань і досягнення мети дисертаційної роботи.

Список **використаних джерел** охоплює сучасні праці вітчизняних і зарубіжних авторів, а також публікації здобувача, що відповідають тематиці виконаного дослідження.

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 результатів та положень. Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані у дисертаційній роботі, є достатньо обґрунтованими та достовірними. Вони базуються на значному обсязі експериментальних даних, отриманих із застосуванням сучасних методів дослідження, та підтверджені їх комплексним аналізом. Обрані методичні підходи є адекватними поставленим завданням і забезпечують достовірність одержаних результатів.

Дисертаційна робота має логічну структуру, матеріал викладено послідовно відповідно до сформульованої мети та завдань дослідження. Проведений автором ґрунтовний аналіз сучасних наукових джерел дозволив належним чином обґрунтувати актуальність дослідження та визначити його наукову новизну.

Висновки сформульовані у відповідності до поставлених завдань і базуються на достовірному фактичному матеріалі дослідження, дані яких в достатній мірі висвітлені в опублікованих наукових працях.

Загалом дисертація є завершеною кваліфікаційною науковою працею, у якій отримано нові результати, що мають теоретичне та практичне значення.

Наукова новизна роботи полягає у комплексному дослідженні спектрально-люмінесцентних властивостей серії флуоресцентних барвників різних класів та встановленні закономірностей впливу їхньої хімічної структури на взаємодію з нуклеїновими кислотами і білками. Вперше проведено системну оцінку придатності досліджених барвників для використання у ПЛР у реальному часі, визначено їх вплив на основні параметри ампліфікації та оптимальні умови застосування. Особливої уваги заслуговує вперше продемонстрована можливість використання монометинціанінового барвника **fb128** як ефективного флуоресцентного репортера для кількісної детекції ДНК, що відкриває перспективи

створення нових вітчизняних флуоресцентних систем для молекулярної діагностики.

Практичне значення отриманих результатів полягає в обґрунтуванні можливості використання досліджених флуоресцентних барвників, насамперед ціанінового барвника fb128, як альтернативних флуоресцентних зондів для ПЛР у реальному часі. Визначено оптимальні умови їх застосування та підтверджено ефективність, порівнянну з комерційними аналогами. Отримані результати можуть бути використані при розробленні нових вітчизняних тест-систем для молекулярної діагностики та оптимізації методів детекції нуклеїнових кислот.

Повнота викладу результатів роботи в опублікованих працях. Ознайомлення з публікаціями О.С. Казакова-Кравченка свідчить про високий ступінь висвітлення матеріалів дисертації в наукових публікаціях. За результатами досліджень опубліковано у 4 статтях у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Scopus, Scopus та 2 тезах наукових доповідей на міжнародних конференціях, що свідчить про високий рівень досліджень, наукову новизну й вагомість отриманих результатів

Дотримання академічної доброчесності. Порушень принципів академічної доброчесності у тексті дисертаційної роботи здобувача не виявлено. Результати досліджень, на основі яких написана ця дисертаційна робота, опубліковані в фахових рецензованих журналах. Дисертація виконана з використанням власних ідей та результатів досліджень. Усі тексти чи результати інших авторів, що вказані в тексті дисертації, мають посилання на відповідні джерела.

Дискусійні питання, зауваження щодо оформлення та змісту дисертації

Принципових зауважень до дисертаційної роботи немає, а серед окремих зауважень можна навести наступні.

1. В Розділі 2 «Матеріали та методи», П. 2.7. Ампліфікація ДНК *in vitro*:

1) «*in vitro*» пишеться курсивом.

2) «Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі та зберігали при +40 °С.» - ймовірно описка і зразки зберігали при +4 °С.

В Розділі 3, п. 3.4.4:

1) Для розрахунку ефективності кПЛР у реальному часі для ампліфікації різних продуктів використовували різні стандарти розведення ДНК (PMP22 — в діапазоні (12,5–100 нг/мкл), SMN — в діапазоні (26,4–89 нг/мкл)), проте було б доцільніше використовувати однакові стандарти для всіх варіантів ампліфікації.

2) Оцінка концентрацій контрольних зразків ДНК для порівняння ефективності флуоресцентного барвника fb128 проводилася з використанням різних комерційних наборів (з концентрацією 50 нг/мкл тестувався набором EvaGreen, а з концентрацією ДНК 6,25 нг/мкл – набором SYBR Green I), проте доцільно було б стандартизувати методику оцінювання і використовувати в обох випадках як набір EvaGreen, так і набір SYBR Green I, або тільки один з них.

3) Також варто було б додати Таблицю щодо кількісного визначення методами кПЛР різними комерційними наборами фрагментів ДНК, що були взяті за стандарти, з показниками, подібної до Таблиць оцінки точності кількісного визначення ДНК за стандартною кривою кПЛР для фрагментів *PMP22* та *SMN1* у присутності барвника fb128.

4) Таблиці 3.9 та 3.10 – що мається на увазі під «Реальна концентрація (нг/мкл)» - концентрація? Невдалий вираз, можливо це концентрація стандартної ДНК?

Питання:

1) Є питання щодо практичного застосування барвника fb128:

- чи оцінювали Ви вартість набору для кПЛР, що буде включати барвник fb128, щоб він був конкурентноспроможним у порівнянні з існуючими на ринку комерційними наборами що включають SYBR Green I (наприклад Applied Biosystems, TaKaRa Bio) чи EvaGreen (Solis BioDyne, Bio-Rad)?

2) Щодо подальшого використання охарактеризованих Вами барвників:

- як Ви думаєте, чи є перспективи для використання досліджуваних Вами барвників (зокрема fb128) для швидкого визначення концентрацій білків, як, наприклад, з використанням розчину Bradford?

Вищенаведені зауваження та запитання не знижують наукову цінність дисертаційної роботи та мають лише дискусійне значення. Це не впливає на загальну високу оцінку дисертації в цілому, викладені дисертантом основні наукові положення та отримані висновки.

Загальний висновок щодо дисертаційної роботи

Вважаю, що 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”) за актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску дослідника і зроблених висновків 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 рецензент:

завідувачка лабораторії біосинтезу

нуклеїнових кислот

Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України

кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник

Інесса СКРИПКІНА