

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Говор Ірини Вікторівни

«Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до мікрооточення барвників для раціометричного визначення конформаційних змін протеїнів», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 — фізична хімія

1. Актуальність дисертаційної роботи та її зв'язок з державними чи галузевими науковими програмами.

Ферстерівський резонансний перенос енергії (FRET) є популярним інструментом для визначення відстаней між флуоресцентними молекулами донора та акцептора та використовується для вивчення конформацій протеїнів. Для вимірювання FRET застосовують нечутливі до оточення флуоресцентні барвники, які ковалентно зв'язують з аналітом. Такий підхід обмежує використання методу FRET у гетерогенних біологічних системах та може призводити до зниження його фактичної ефективності.

Актуальність теми визначається необхідністю одержання нових діагностичних матеріалів з поліпшеними експлуатаційними характеристиками, а саме, пар флуоресцентних барвників, дія яких основана на визначенні FRET. Наявність таких діагностичних матеріалів є підґрунтям для розробки та покращення флуоресцентних методів аналізу в медичній діагностиці та медико-біологічних дослідженнях.

Головна ідея дисертаційної роботи полягала в тому щоб покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, які основані на вимірюванні ефективності FRET.

Дисертаційна робота є складовою частиною планових наукових досліджень відділу люмінесцентних матеріалів та барвників ім. Б.М. Красовицького ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України і виконувалась у межах тем відомчого замовлення НАН України

"Флуоресцентний резонансний перенос енергії між сквараїновими барвниками в модельних біологічних системах" (2013 р., номер державної реєстрації 0113U003293) та "Перенос енергії, гасіння та посилення флуоресценції в мультифлуорофорних системах" (2016-2018 рр., номер державної реєстрації 0116U001210) та міжнародного проекту УНТЦ "Флуоресцентні зонди і мітчики для медико-біологічних застосувань" (№ P548).

2. Обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації, їх достовірність і новизна.

Дисертаційна робота Говор Ірини Вікторівни виконана на високому науковому рівні. Достовірність отриманих наукових результатів та висновків, що виносяться на захист, забезпечена коректним використанням сучасних експериментальних фізико-хімічних методів дослідження, в першу чергу методів електронної спектроскопії, а також співставленням одержаних результатів з літературними даними.

Наукові положення, висновки і рекомендації щодо використання флуоресцентних барвників в різних середовищах, в тому числі адсорбованих на сироватковому альбуміні та інших протеїнах, є добре обґрунтованими; представлені наукові дані є новими, отриманими вперше.

Результати пройшли апробацію на восьми національних і міжнародних наукових конференціях та опубліковані у шести фахових національних і міжнародних журналах, чотири з яких цитуються в базі даних Scopus.

3. Наукове і практичне значення отриманих результатів.

Головною ідеєю роботи було створення систем барвників з підвищеною чутливістю барвника-донора та/або барвника-акцептора до мікрооточення. Донорно-акцепторні FRET-пари, в яких один або обидва барвника були б чутливими до мікрооточення, раніше не вивчалися.

Враховуючи зазначені вище недоліки існуючих систем барвників,

аналітичний сигнал від яких базується на ефекті FRET, представлені в дисертаційній роботі нові дані мають велике як наукове, так і практичне значення.

Наукове значення роботи обумовлено отриманням даних щодо впливу полярності середовища та наявності протеїнів на спектрально-люмінесцентні властивості ряду норсквараїнових і сквараїнових барвників, а також встановленням залежності уявної ефективності переносу енергії в комплексах донорно-акцепторних пар барвників з протеїнами від структури та молекулярної маси цих протеїнів;

Практичне значення роботи полягає в

- розробці нового флуоресцентного підходу для визначення змін конформації протеїнів із застосуванням раціометричного детектування та визначення ферстерівського резонансного переносу енергії між барвниками, чутливими до мікрооточення та незв'язаних з аналітом ковалентним зв'язком;
- оцінці чутливості розробленого підходу виявлення конформаційних змін у протеїні, ініційованих розчинами сечовини різної концентрації (0–7 М);
- використанні нового підходу у системі гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини) для визначення змін, що викликані заморожуванням та довгостроковим низькотемпературним зберіганням.

4. Значущості висновків здобувача для науки і практики, можливі конкретні шляхи використання результатів дослідження.

Значущість висновків зроблених дисертанткою наочно демонструється результатами дисертаційної роботи в її практичній частині. Одержані Говор І.В. результати демонструють новий цікавий підхід до визначення конформації протеїнів. Проведені експерименти на біологічних зразках показали перспективність запропонованого підходу для оцінки результатів кріоконсервації плазми крові, а також для оцінки конформаційного стану білків в інших різноманітних біологічних об'єктах.

5. Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях із врахуванням встановлених вимог.

За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті в міжнародних виданнях, що індексуються наукометричною базою даних Scopus, а саме в журналах *Methods and Applications of Fluorescence, Dyes and Pigments* (що відносяться до першого квартилю). Три статті опубліковано у вітчизняних журналах, з яких *Functional Materials* також індексується в Scopus.

Отримані дисертанткою результати повністю викладено у вищезазначених джерелах.

Як напрям наукових досліджень, так і зміст дисертації відповідають вимогам щодо паспорту спеціальності 02.00.04 – фізична хімія.

6. Зміст і оформлення дисертаційної роботи.

Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел (209 найменувань). Робота викладена на 184 сторінках і містить 81 рисунок, 3 схеми та 6 таблиць.

У **вступі** детально обґрунтовано актуальність теми дослідження, сформульовані мета і задачі роботи, надано відомості про наукову новизну і практичне значення одержаних результатів, а також про особистий внесок здобувача, апробацію результатів, публікації і структуру дисертації.

Перший розділ є літературним оглядом, що включає оцінку відомих на момент виконання досліджень флуоресцентних методів і барвників, що використовуються для визначення конформації протеїнів. Огляд добре збалансований, наглядний і логічно пов'язаний з наступними розділами дисертаційної роботи.

В другому розділі описано розроблену дисертанткою схему відбору чутливих до мікрооточення барвників придатних для використання у методах,

що базуються на ефекті FRET. Ця схема включає оцінку розчинності барвників, їх схильності до агрегації, спектральних та фотофізичних властивостей у водному фосфатному буфері з рН 7.4 (полярному розчиннику) та хлороформі (неполярному розчиннику). Наведено результати досліджень спектральних властивостей барвників у розчинах в присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА) як модельного протеїну.

У третьому розділі досліджено спектральні властивості барвників в комплексах з протеїнами, а також вплив денатурації протеїнів на властивості зв'язаних з ними барвників. В якості модельного протеїну був використаний бичачий сироватковий альбумін (БСА), але також були вивчені асоціати барвників з сироватковим альбуміном людини (САЛ), пероксидазою хрону (ПХ) та лізоцимом.

Показано, що денатурація протеїнів призводить до зменшення їх упорядкованої компактної структури та зростання сольватації їх неполярних областей, завдяки чому барвники стають доступними до впливу водного середовища. Через це форму та напівширину смуг в експериментальних спектрах поглинання протеїнових комплексів можна пояснити наявністю двох спектральних складових: барвника в комплексі з протеїном та барвника у водному розчині, співвідношення яких змінюється зі зміною ступеня денатурації протеїну.

Четвертий розділ присвячено дослідженню можливості використання донорно-акцепторних пар барвників для визначення конформаційних змін модельних протеїнів, з'ясуванню впливу способу зв'язування барвників з протеїном (ковалентно або нековалентно) на ефективність переносу енергії між барвниками, а також встановленню можливості практичного застосування розробленого методу у системі гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини).

П'ятий розділ є експериментальною частиною, де описано використані

методики спектральних, фотофізичних і біофізичних експериментів.

В дисертаційній роботі та авторефераті немає явних недоліків, разом с тим виникають деякі питання та зауваження.

- В роботі немає чітких пояснень щодо вибору барвників. Так, не зовсім ясно, чому саме сквараїни та норсквараїни були обрані для дослідження, а серед стирилових барвників досліджено лише одного представника.
- На стор. 67 вказано, що "Барвник nor-SqCN2 в комплексі з БСА переходить у депротоновану форму [125], через це його коефіцієнт екстинкції зменшується у 2.6 рази". Пояснення цього ефекту відсутнє в дисертаційній роботі, хоча воно було наведено у відповідній статті, де зміни екстинкції дисертантка пов'язувала з утворенням нової смуги поглинання в області 550 нм.
- Хоча у роботі зазначається, "що спектральні зміни, яких зазнають барвники у розчинах сечовини є набагато меншими, ніж, наприклад, при утворенні комплексів", з таблиці 3.2 (3.3) добре помітним є зростання квантових виходів барвників у розчинах сечовини у 2-3 рази. З чим це пов'язано?
- Не зрозуміло, як визначали квантовий вихід стирилу відносно Су5.
- Є описка у рівнянні для розрахунків коефіцієнтів екстинкції на сторінці 147. Також у розділі 5.4 концентрацію позначали у одиницях «мкм».

Зазначені зауваження не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи. В цілому слід зазначити, що дисертанткою виконаний великий об'єм фізико-хімічних досліджень. Достовірність експериментальних даних не викликає сумніву. Авторка демонструє знання сучасних методик і теоретичних уявлень, вміння аналізувати та зіставляти експериментальні данні.

Дисертаційна робота ГОВОР Ірини Вікторівни «Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до мікрооточення барвників для

раціометричного визначення конформаційних змін протеїнів» є завершеним і цілісним дослідженням. Можна впевнено заключити, що основний зміст дисертації повністю висвітлений в авторефераті, статтях, опублікованих у фахових виданнях та тезах доповідей. Мета роботи досягнута. Завдання виконані. Висновки повністю узгоджуються отриманими результатами.

За актуальністю теми, науковою новизною, достовірністю експериментальних даних, рівнем виконання, обсягом та практичною цінністю результатів і висновків дисертаційна робота ГОВОР Ірини Вікторівни «Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до мікрооточення барвників для раціометричного визначення конформаційних змін протеїнів», повністю відповідає вимогам до кандидатських дисертацій, викладених у «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 576 (зі змінами) та регламентуючим документам Міністерства освіти і науки України, а її авторка – **ГОВОР Ірина Вікторівна** заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 - фізична хімія.

В.о. директора НДІ хімії
Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна,
доктор хімічних наук, професор

Олександр РОШАЛЬ

