

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Говор Ірини Вікторівни** «**Флуоресцентні системи на основі комбінацій чутливих до мікрооточення барвників для раціометричного визначення конформаційних змін протенів**», подану на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 - фізична хімія.

Флуоресцентні барвники широко використовуються в біологічній і медичній науці. Їх в основному застосовують як в формі міток, так і в формі зондів: флуоресцентні мітки ковалентно приєднуються до біомолекул; флуоресцентні зонди нековалентно зв'язуються з біомолекулами. Використання флуоресцентних барвників, спектральні властивості яких залежать від властивостей їх середовища, відкриває можливість вимірювань флуоресценції за умов нековалентної взаємодії цих барвників з біомолекулами, наприклад – з протеїнами. Можливість нековалентного зв'язування флуоресцентних барвників з протеїнами може бути корисною для виявлення змін конформації нативних протеїнів (або їх сумішей) у випадку коли ковалентне маркування яких є недоречним (наприклад, у ході досліджень біологічних рідин, сировини та продуктів виробництва: ферментів, протеїнової маси, екстрактів рослин). Також, застосування флуоресцентних барвників з нековалентним зв'язуванням з протеїнами може бути комплементарним методом виявлення змін конформації протеїнів у випадку, коли складно безпомилково вибрати фрагменти для ковалентного маркування і складно передбачити заздалегідь результат при використанні барвників, ковалентно зв'язаних з білком.

З огляду на згадане вище, висока актуальність наукової тематики дисертаційної роботи **Ірини Вікторівни Говор** жодного сумніву не викликає, адже в ній встановлено закономірності щодо зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями чутливих до мікрооточення барвників для створення систем з раціометричним детектуванням для розробки нового способу визначення конформаційних змін у протеїнах.

Достовірність даних, отриманих **І. В. Говор**, беззаперечно є дуже високою, адже автор використовує низку сучасних експериментальних методів дослідження, серед яких: електронна абсорбційна і флуоресцентна спектроскопія, рефрактометрія, гель-хроматографія.

Обґрунтованість висновків й інших положень дисертації забезпечена старанним і всебічним обговоренням отриманих результатів з широким залученням літературних даних.

Наукові результати, що складають основу кандидатської дисертації **Ірини Вікторівни Говор**, достатньо повно опубліковані у 6 статтях у спеціалізованих фахових виданнях (3 – у наукових фахових виданнях України, 3 – у зарубіжних періодичних виданнях інших держав): 4 статті опубліковано в журналах, що реєструються в міжнародній базі Scopus («Dyes and Pigments», «Methods Appl. Fluoresc.» та «Functional materials»), та 2 статті – у «Віснику одеського національного університету, Серія: Хімія». За матеріалами дисертації також опубліковано 8 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних фахових наукових конференціях ви-



сокого рівня. Таким чином, ступінь апробації роботи, що рецензується, також є достатньо високою.

Робота виконана згідно планових досліджень, що проводились упродовж декількох років у відділі люмінесцентних матеріалів та барвників ім. Б.М. Красновицького 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., № держреєстрації 0113U003293) та "Перенос енергії, гасіння та посилення флуоресценції в мультифлуорофорних системах" (2016-2018 рр., № держреєстрації 0116U001210) та міжнародного проекту УНТЦ "Флуоресцентні зонди і мітчики для медико-біологічних застосувань" (№P548).

Дисертація викладена на 184 сторінках машинописного тексту, вміщує 3 схеми, 81 рисунок і 6 таблиць, складається зі вступу, 5 розділів, висновків, переліку літературних посилань з 209 першоджерел. Обсяг основного тексту дисертації складає 130 сторінок.

У переліку умовних позначень наведено символи та абрєвіатури, які були використані у тексті дисертаційної роботи. У вступі розкрито актуальність вибраної тематики наукових досліджень, показано їх зв'язок з науковими програмами, планами та темами, сформульовано мету і задачі дослідження, які необхідно було вирішити для її досягнення, подано відомості про об'єкт, предмет та методи досліджень, представлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, внесок в дисертаційну роботу особисто здобувача та основних співавторів її публікацій, апробація роботи, відомості про публікації за результатами наукових досліджень, структуру і об'єм дисертаційної роботи. У першому розділі наведено огляд літератури, у якому розглянуто відомі флуоресцентні методи та барвники, що використовуються для визначення конформації протеїнів, а саме за зміною власної флуоресценції протеїнів, за методом одного флуоресцентного зонду, флуоресценція якого є чутливою до зміни конформації протеїну, та метод FRET між двома нечутливими до оточення барвниками, такими як ціаніни, що зв'язані з протеїном ковалентно. Другий розділ містить інформацію щодо схеми відбору барвників, яка включає оцінку розчинності та схильності до агрегації, спектральних та фотофізичних властивостей барвника у полярному розчиннику (водному фосфатному буфері з рН 7.4) та неполярному розчиннику (хлороформ). У третьому розділі представлено результати дослідження спектральних властивостей барвників в їх комплексах з протеїнами та вплив денатурації протеїну на властивості барвників у таких комплексах. У четвертому розділі описано результати використання систем барвників для визначення конформаційних змін модельних протеїнів: зокрема, з'ясовано ефективність переносу енергії між барвниками, у випадках їх ковалентного або нековалентного зв'язування з модельними протеїнами. Також наведено відомості щодо вивчення можливості практичного застосування розробленого підходу у випадку системи гетерогенного протеїнового складу (плазма крові людини). П'ятий розділ містить інформацію про використані матеріали (барвники-флуорофори, протеїни) та розчинники. Описано методику проведення експерименту, зокрема основні методики вимірювань за допо-



суттєвими для визначення зв'язку між структурою та спектрально-люмінесцентними і фотофізичними властивостями барвників у розчинах та при комплексоутворенні з протеїнами.

У цілому, кандидатська дисертація **Ірини Вікторівни Говор** за своєю актуальністю, науковою новизною, практичним значенням, обсягом отриманих здобувачем нових даних заслуговує високої позитивної оцінки.

Разом із цим, до матеріалу, що викладено в роботі, можуть бути висловлені декілька зауважень та побажань:

1. *Розділ 2.* На основі отриманих даних щодо квантових виходів сквараїнів (сторінки 47, 49, 52) та норсквараїнів (сторінки 48, 50) у висновках до розділу 2 (на сторінці 55) автор робить висновок про те, що сквараїни більш чутливі до полярності оточення, що виявляється у зниженні їх квантового виходу у 3.2-6.3 разів при переході від розчину у неполярному розчиннику (хлороформі) до полярного середовища (метанолу), в той час як квантовий вихід норсквараїнів майже не залежить від полярності середовища. Доцільно було б пояснити – чому?

2. *Розділ 3.* На сторінці 69 наведено таблицю 3.1. (Спектральні та фотофізичні характеристики барвників у комплексах з бичачим сироватковим альбуміном) та на сторінці 72, наведено таблицю 3.2. (Спектральні та фотофізичні характеристики комплексів барвників з протеїнами у фосфатному буфері), з яких випливає, що деякі барвники (а особливо, **SqO3** та **SqCN3**) мають помітний (23 та 36 нм для **SqO3** та **SqCN3**, відповідно) зсув полоси флуоресценції при зв'язуванні з протеїнами. Це відкриває можливість вимірів змін конформації протеїнів за допомогою зсувів флуоресценції таких барвників. За умов таких простих вимірів зникає необхідність детекції інтенсивності флуоресценції (адже, відомо, що виміри інтенсивності флуоресценції можуть мати значну похибку в залежності від вимірюваного біологічного зразка) і, таким чином, зникає необхідність додаткового використання раціометрії. Чи було прийнято до уваги можливість використання зсувів флуоресценції барвників для детекції змін конформації протеїнів?

3. *Розділ 3.4* На сторінках 70-77 обговорюється залежність спектральних властивостей та квантових виходів барвників від типу протеїну, з яким утворюють комплекс: у тому числі, у випадках протеїнів, що значно різняться за молекулярною масою (наприклад, бичачий сироватковий альбумін та лізоцим). Доцільно було б пояснити, чому саме молекулярна маса протеїнів була критерієм під час вибору протеїнів для дослідження?

4. *Розділ 4.* На сторінці 113 наводяться дані щодо відсутності переносу енергії між барвниками для пари **SqO3–SqCN3** в хлороформі за відсутності протеїну. Проте, в цьому розділі не наводяться дані щодо переносу енергії за відсутності протеїну для інших пар донор флуоресценції – акцептор флуоресценції, тобто для: **Styryl–SqO3**, **SqO1–SqCN3** та **nor-SqO1–SqCN3**. Варто було б пояснити, чому ці дані не наведено?

5. Оформлення роботи та літературний стиль дисертації справляють добре враження, проте:



а) В тексті дисертації є невдалі вирази:

– *Анотація. На сторінці 2* сказано, що «...чутливість барвника-донора та/або барвника-акцептора до мікрооточення може покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів...». Це не дуже вдалий вираз, оскільки більш точно було б сказати, що «...чутливість барвника-донора та/або барвника-акцептора до мікрооточення може розширити можливості детекції за допомогою флуоресцентних біоаналітичних методів...».

– *Анотація. На сторінці 3* є вираз «комбінація методу визначення FRET, але з використанням двох чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників-зондів у донорно-акцепторних парах, дозволить покращити чутливість флуоресцентних біоаналітичних методів, а саме визначення змін конформації протеїнів.» Більш точно було б написати «комбінація методу визначення FRET з використанням двох чутливих до мікрооточення флуоресцентних барвників-зондів у донорно-акцепторних парах дозволить розширити можливості флуоресцентних біоаналітичних методів, а саме - методу визначення змін конформації протеїнів.»

Подібна фраза, яка потребує вказаного уточнення зустрічається і у розділі 1 на сторінці 34.

– *Анотація. Сторінка 5.* Вираз «Денатурацію протеїнів ініціювали сечовиною в концентрації до 7 М, яка безпосередньо майже не впливає на властивості барвників.» Ліпше було б написати уточнення, «... не впливає на спектрально-люмінесцентні властивості барвників.»

– *Вступ. Сторінка 23.* Вираз «вивчити вплив способу з'єднання барвників з протеїном на чутливість раціометричного детектування...» точніше було б представити, як «вивчити вплив способу з'єднання барвників з протеїном на можливість раціометричного детектування...».

– *Висновки до розділу 4. Висновок 5. Сторінка 145.,* вираз «При ковалентному зв'язуванні з БСА як донора так і акцептора зміна ефективності FRET складає лише 10%.» можна доповнити «За умов сайт-неспецифічного ковалентного зв'язування з БСА як донора так і акцептора зміна ефективності FRET складає лише 10%.».

Також у висновках дисертації: *Висновок 5. Сторінка 156.* Вираз «...найвища чутливість (зміна параметра у 9 разів) досягається при використанні барвників, що не зв'язані з протеїном ковалентним зв'язком, а найменша (у 1.1 разів) — при кон'югації обох барвників з протеїном.» Більш точно було б написати, «...— при кон'югації обох барвників з протеїном в умовах експерименту.»

б) В тексті роботи зустрічаються друкарські помилки, незначні граматичні описки та пропущені розділові знаки (стор. 3, 6, 21, 22, 27, 28, 35, 38, 41, 50, 53, 69, 77, 136, 137, 148, 151).

6. Також є зауваження до автореферату дисертації. На сторінці 15 автореферату наводиться таблиця результатів вимірів уявної ефективності переносу енергії ( $E_{FRET}$ ) та співвідношення FRET (так зване FRET ratio) в зразках плазми крові людини. Однак, не вказано, які була похибки визначення цих параметрів. Варто було б навести похибки величин, що обговорюються.

Вказані зауваження, більшість з яких мають характер побажань, не впливають на основні положення і результати дисертаційної роботи, а також не знижують високу оцінку роботи.

Оцінюючи роботу в цілому можна констатувати, що дисертаційна робота **Говор Ірини Вікторівни**, є завершеним і цілісним дослідженням. За актуальністю, рівнем наукової новизни, обсягом виконаних досліджень, достовірністю одержаних висновків та практичною цінністю дисертаційна робота **Говор І. В.** «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» (Постанова Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року, зі змінами) та регламентуючим документам МОН України, а її авторка **Говор Ірина Вікторівна** заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія.

Старший викладач кафедри органічної хімії,  
біохімії, лакофарбових матеріалів та покриттів  
Національного технічного університету  
«Харківський політехнічний інститут»  
доктор хімічних наук



Євген ПОСОХОВ

Ідентичність підпису *Євгена Олександровича Посохова* засвідчую,  
Вчений секретар  
Національного технічного університету  
«Харківський політехнічний інститут»  
доктор технічних наук, професор



Олександр ЗАКОВОРОТНИЙ