

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший заступник генерального директора
НТК «Інститут монокристалів» НАН України
чл.-кор. НАН України, д-р хім. наук, проф.

Валентин ЧЕБАНОВ



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

про виконану роботу в рамках реалізації проекту

із виконання наукових досліджень і розробок

Створення флуоресцентних діагностичних матеріалів для гібридизаційних аналізів та
досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції

Назва конкурсу: "Наука для безпеки людини та суспільства"

Реєстраційний номер Проекту: 2020.01/0516

Підстава для реалізації Проекту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проекту) 2020.01/0516 "Створення флуоресцентних діагностичних матеріалів для гібридизаційних аналізів та досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції"

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу "Наука для безпеки людини та суспільства".
протокол від «16-17» вересня 2020 року №21.

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проекту 2020 рік – 2021 рік

Початок – 29.10.2020 р.

Закінчення – 15.12.2021 р.

Загальна вартість Проекту, грн. 9 250 700,00

Вартість Проекту по роках, грн.:

1-й рік 3 000 000,00

2-й рік 6 250 700,00

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проекту залиучено 14 виконавців, з них:

доктори наук 0;

кандидати наук 8;

інші працівники 6.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Проект виконувався сумісними зусиллями двох установ: Державною науковою установою «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАНУ» (грантоотримувач) та Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (субвиконавець).

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Створення вітчизняних флуоресцентних матеріалів для гібридизаційного аналізу, проведення ПЛР-діагностики генетичних та інфекційних захворювань, визначення наявності ГМО та проведення інших досліджень нуклеїнових кислот.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

- Синтез мономерних та димерних барвників-інтеркаляторів, а також барвників з часом життя флуоресценції чутливим до середовища (FLT-чутливих);
- Дослідження фотофізичних властивостей одержаних барвників та оцінка придатності нових барвників для розробки методик для визначення ДНК;
- Створення ПЛР-тестів на основі барвників-інтеркаляторів та методів гібридизаційних аналізів на основі FLT-чутливих барвників.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків).

На даний час в Україні відсутні флуоресцентні барвники власного виробництва, придатні для детекції результатів ПЛР. Розробка власної діагностичної бази на основі вітчизняних тестів є актуальною проблемою сьогодення. Крім того, через недоліки існуючих аналогів, пошук нових більш чутливих флуоресцентних барвників-інтеркаляторів, а також розробка більш надійних та достовірних методів діагностичних досліджень залишаються актуальними.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Новизна проєкту полягає у синтезі нових флуоресцентних барвників з покращеними спектральними та інтеркалюючими властивостями шляхом модифікації (зокрема, димеризації) існуючих барвників. Низька фонова флуоресценція димерних барвників разом із високою чутливістю до присутності ДНК роблять ці барвники придатними для досліджень методом ПЛР. Інша інновація полягає у синтезі нових FLT-чутливих маркерів для розробки методів гібридизаційного аналізу.

- Методологія дослідження (до 400 знаків).

З використанням методів органічного синтезу одержано мономерні та димерні барвники-інтеркалятори. Розроблено мітчики з чутливими до навколошнього середовища часами життя флуоресценції (FLT). Фотофізичні властивості усіх сполук досліджено методами електронної спектроскопії. Вивчено придатність нових димерних барвників для ПЛР досліджень та розроблено метод гібридизаційного аналізу на основі FLT-мітчиків.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Загалом було досліджено спектральні властивості для більш ніж 100 сполук різних класів флуоресцентних барвників, зокрема похідних нафталіміду, оксазолу, антрацену, антрахілону, бензантрону, пірену, акридину, а також ксантенових, ціанінових та сквараїнових барвників. Серед досліджених барвників було обрано прототипи флуоресцентних барвників-інтеркаляторів,

чутливих до присутності дволанцюгової ДНК (длДНК), а також барвники, придатні для розробки медико-біологічних мітчиків з довгими та/або чутливими до навколошнього середовища часами життя флуоресценції.

У ході виконання проекту у 2020 р. було одержано мономерні реакційноздатні барвники-інтеркалятори на основі похідних акридину та несиметричних монометинових барвників, придатних для подальшого створення димерних барвників, та досліджено їх спектральні властивості у етанолі, Tris-буфері у вільному стані та при зв'язуванні з длДНК. Показано, що квантові виходи похідних акридинового оранжевого при зв'язуванні з длДНК збільшуються у два рази та більше, порівняно з квантовими виходами барвників у вільному стані. У випадку монометинціаніну, флуоресценція якого не детектується у водному буферному розчині та етанолі, при зв'язуванні з длДНК спостерігається збільшення квантового виходу до 32%.

Встановлено, що кватернізація атому азота в акридиновому циклі знижує квантові виходи флуоресценції барвника у водному середовищі та підвищує у комплексах з длДНК до 52% у порівнянні з вихідним барвником, акридиновим оранжевим.

Впродовж виконання проекту у 2021 р. було синтезовано та досліджено низку флуоресцентних сполук, зокрема похідних нафталевої кислоти, бензантрону, пірену, оксазинових і сквараїнових барвників, серед яких було обрано сполуки, придатні для подальшої розробки медико-біологічних мітчиків з довгими та/або чутливими до навколошнього середовища часами життя флуоресценції.

Серед досліджених барвників найбільш придатними як мітчики виявилися похідні сквараїнів, які не тільки мають довгі часи життя флуоресценції чутливі до середовища, але й поглинають у довгохвильовій спектральній області, що дозволяє проводити з їх допомогою медико-біологічні дослідження *in vivo*.

З використанням водорозчинного сквараїнового барвника розроблено модельний гібридизаційний аналіз, заснований на взаємодії між флуоресцентно-міченим олігонуклеотидом та комплементарною олігонуклеотидною послідовністю.

Крім того, відпрацьовані та вдосконалені способи одержання структурних аналогів закордонних комерційно доступних барвників-інтеркаляторів **SYBR Green I** та **YOYO-1**. Також було досліджено синтез та фотофізичні властивості димерних барвників-інтеркаляторів на основі мономерних барвників, одержаних впродовж виконання першого етапу проекту у 2020 р. Синтезовано десять нових димерних барвників-інтеркаляторів, придатних для детекції продуктів ампліфікації у ході ПЛР, та досліджено їх спектральні властивості у Tris-буфері у вільному, незв'язаному з длДНК, стані та при зв'язуванні з длДНК. На основі отриманих даних про спектральні та фотофізичні властивості димерних барвників встановлено кореляції між молекулярною структурою барвників та їх властивостями, а також розроблено рекомендації щодо шляхів їх подальшого вдосконалення.

Завдяки об'єднанню мономерних барвників у димерну структуру вдалося покращити чутливість барвників до присутності длДНК за рахунок утворення нефлуоресціюючих або малофлуоресціюючих асоціатів у незв'язаному з длДНК стані та суттєвому зростанню інтенсивності флуоресценції при інтеркаляції у длДНК.

Показано, що квантові виходи синтезованих гомодимерних барвників на основі акридинового оранжевого при зв'язуванні з длДНК збільшуються у 18–27 разів, порівняно з квантовими виходами цих барвників у вільному, незв'язаному з длДНК, стані. Ці барвники поглинають та випромінюють світло в областях, що добре співпадають з оптичними каналами ПЛР ампліфікаторів (збудження при 470 нм та детектування при 520 нм). Крім того, синтезовані барвники є термічно, гідролітично та фотолітично більш стійкими порівняно з ціаніновими барвниками в умовах, максимально наблизених до тих, в яких проводять ПЛР.

При проведенні кількісної ПЛР (кПЛР) у присутності нових димерних барвників-інтеркаляторів ступінь інгібування кПЛР у 2–4 рази нижчий у порівнянні зі ступенем інгібування кПЛР за участю відомого барвника **SYBR Green I**. До того ж, значення відносної інтенсивності флуоресценції у кінцевій точці ПЛР для одержаних барвників зростають пропорційно збільшенню концентрації, що, порівняно з **SYBR Green I**, забезпечує кращу чутливість аналізу та вищу достовірність результатів. Завдяки можливості використання порівняно високих концентрацій одержаних димерних барвників-інтеркаляторів при проведенні кПЛР усувається

проблема перерозподілу барвника в ході аналізу кривих температури плавлення з високою роздільною здатністю.

В результаті роботи отримано 2 патенти України на корисну модель та подано 5 заявок на патенти України. Частина результатів, отриманих у ході виконання проекту у 2021 р., були представлені на двох українських (XVIII Наукова конференція "Львівські хімічні читання – 2021", Всеукраїнська конференція наукових дослідників) та двох міжнародних (7th International Conference «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects» (NBP-2021), IX Міжнародна науково-практична конференція «Хімія, Біо- і Нанотехнології, Екологія та Економіка в Харчовій та Косметичній Промисловості) конференціях.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Синтезовано три реакційнозадатні мономерні барвники-інтеркалятори на основі похідних акридинового оранжевого та несиметричного монометинового барвника, які мають високу фотостабільність, та високу яскравість світіння при взаємодії з ДНК.

Одержано десять нових гомодимерних барвників-інтеркаляторів на основі акридинового оранжевого, які, порівняно з комерційно доступними ціаніновими барвниками, є більш фотолітично, термічно та гідролітично стабільними. Крім того, ці барвники здатні утворювати яскраво флуоресценціючі комплекси при зв'язуванні з ДНК, тоді як у вільному, незв'язаному з ДНК, стані власна флуоресценція відсутня або її рівень мінімальний. Показово, що ступінь інгібування кПЛР у присутності синтезованих барвників у 2–4 рази нижчий у порівнянні зі ступенем інгібування кПЛР за участю відомого барвника SYBR Green I. Усі ці переваги дозволяють розглядати одержані барвники як перспективні прототипи нових флуоресцентних матеріалів для проведення досліджень методом ПЛР.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проектів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Практична цінність результатів реалізації проекту є високою завдяки заміні дорогих імпортних діагностичних матеріалів більш дешевими та більш якісними вітчизняними, а також завдяки можливості налагодження експорту високотехнологічної продукції та технологій.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.

Виконання цього проекту дозволить:

- частково замінити існуючі на українському ринку імпортні люмінесцентні біомедичні діагностичні матеріали більш дешевими вітчизняними, що незважаючи на меншу вартість матимуть поліпшенні експлуатаційні характеристики;
- підвищити якість, чутливість та надійність люмінесцентних методів, зокрема на основі ПЛР досліджень, шляхом створення новітніх діагностичних матеріалів з поліпшеними характеристиками;
- збільшити експортний потенціал України у галузі новітніх люмінесцентних діагностичних матеріалів та технологій.

Ми впевнені, що медико-біологічні компанії, лабораторії з екологічного контролю, а також академічні науковці будуть зацікавлені у результатах цього дослідження.

Науковий керівник Проекту

Завідувач відділу люмінесцентних матеріалів
та барвників ДНУ "НТК "Інститут монокристалів"
НАН України", к.х.н., с.д.

Анатолій ТАТАРЕЦЬ

(підпись)