

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу ФАНЬ Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия

### **1. Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите**

Диссертационная работа ФАНЬ Фань посвящена разработке методов синтеза производных ксантеновых и цианиновых красителей, которые могут использоваться в качестве флуоресцентных меток для маркирования флуоресцентного детектирования белков и олигонуклеотидов; исследование влияния окружающей среды и процессов взаимодействия молекул красителей с белками и олигонуклеотидами на их структурные превращения и связанные с этим изменения оптических характеристик флуорофоров.

По своему содержанию, целям, объектам исследования, решаемым задачам и применяемым методам исследования диссертационная работа Фань Фань соответствует отрасли «химические науки» и специальности 02.00.04 – физическая химия (разделы 3 - Химические равновесия; теория растворов, ионные равновесия; межмолекулярные и межчастичные взаимодействия; 5 - Строение молекул, теория химических связей и межмолекулярных взаимодействий, молекулярное моделирование - паспорта специальности).

### **2. Актуальность темы диссертации**

Актуальность диссертационной работы Фань Фань связана с синтезом новых молекулярных флуоресцентных маркеров и индикаторов, которые могут использоваться на практике для визуализации и количественного анализа содержания белков и олигонуклеотидов особенно в условиях, когда различные свойства реакционной среды могут оказывать существенное влияние на спектральные свойства и квантовый выход фотолюминесценции молекулярных флуорофоров. Синтез новых типов флуорофоров семейства карбоксифлуоресцеина и цианинового ряда представляет особый интерес ввиду широкого практического применения их базовых гомологов. Исследование физико-химических и оптических свойств конъюгатов молекулярных флуорофоров с белками и олигонуклеотидами позволяет определить степень изменения оптических характеристик флуорофоров в составе конъюгатов по сравнению с их мономолекулярными формами в растворах, что также важно для практики.

### **3. Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту**

Уровень новизны результатов, полученных в диссертационной работе Фань Фань является весьма высоким, а некоторые результаты имеют мировой научный приоритет. Полученные результаты опубликованы в рецензируемых научных журналах, соответствующих Перечню ВАК Беларуси, включая международные научные журналы на английском языке. К новым и наиболее важным результатам, а также положениям, выносимым на защиту, относятся:

1) Получены новые бифлуорофоры (5-FAM)<sub>2</sub> и (6-FAM)<sub>2</sub> на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, с двумя пространственно-разделенными флуорофорными ядрами, что позволило варьировать их люминесцентные свойства за счет влияния среды (вязкость, состав буфера и pH, температура раствора, содержание двухвалентных катионов металлов) на такие стерические факторы, как взаимное пространственное расположение оптических диполей пространственно-разделенных флуорофорных ядер;

2) Разработана методика сайт-специфичного азид-алкинового циклоприсоединения (5-FAM)<sub>2</sub> и (6-FAM)<sub>2</sub> бифлуорофоров к белкам – бычьему сывороточному альбумину (БСА) и иммуноглобулину человека (IgG), позволившая оценить чувствительность флуоресцентного отклика ряда молекулярных флуорофоров на основе карбоксифлуоресцеина к процессам переноса заряда на ароматические аминокислоты белка и конформационную подвижность молекулы флуорофора;

3) Синтезированы производные флуоресцентных цианиновых красителей Cy5 и Cy7 с различными линкерами, получены конъюгаты указанных красителей с ДНК, проведен сравнительный анализ влияния структуры линкера на люминесцентные характеристики флуорофоров в конъюгатах в зависимости от структуры ДНК (одна- и двухцепочечная) и сделан вывод о наиболее перспективном типе линкера для сохранения высокого квантового выхода люминесценции флуорофора в практических задачах по флуоресцентному мечению ДНК;

4) Проведен анализ влияния степени интеркалирования флуорофора цианинового ряда SYBR Green I в комплексах с двухцепочечной ДНК на анизотропию, квантовый выход и время затухания флуоресценции, с целью установления возможности влияния на эффективность гомогенного резонансного переноса энергии между молекулярными роторами донорного и акцепторного флуорофорного ядра красителя SYBR Green I.

#### **4. Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В данной диссертационной работе автор использовал современный научный инструментарий для синтеза и структурного анализа молекулярных флуорофоров карбоксифлуоресцеинового и цианинового рядов (ЯМР и масс-спектрологии), а также их конъюгатов с биомолекулами (белки ДНК),

изучения физико-химических и оптических свойств как самих красителей в молекулярной форме, так и их конъюгатов в растворах (флуоресцентная и абсорбционная спектроскопии). Полученные экспериментальные результаты имеют достаточную воспроизводимость, а заключения, сделанные на основании анализа полученных данных, являются логичными, достоверными и непротиворечивыми относительно современного уровня научных знаний в данной области.

#### **5. Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию**

Научная значимость результатов диссертационной работы заключается в разработке методик получения новых бифлуорофоров карбоксифлуоресцеинового ряда, анализ влияния параметров внешней среды и формирования конъюгатов флуорофоров карбоксифлуоресцеинового и цианинового рядов с биомолекулами на оптические свойства флуорофоров, что позволило предложить более эффективные метки на основе (5-ФАМ)<sub>2</sub> красителя и цианиновых красителей Cy5 и Cy7 со специфическими линкерными мостиками для флуоресцентного маркирования белков и олигонуклеотидов, малочувствительные к влиянию окружающей среды и процессов конъюгации. Флуоресцентные нанозонды на основе (6-ФАМ)<sub>2</sub> демонстрируют специфический флуоресцентный отклик на изменение pH в растворе (наличие изобестической точки в спектрах люминесценции), что может быть использовано для корректного определения концентрации люминофора в среде с переменным pH.

С практической точки зрения, флуоресцентные метки на основе (5-ФАМ)<sub>2</sub> красителя, методика получения которых была разработана при выполнении данного диссертационного исследования нашли применения в флуоресцентном мечении синтетических олигонуклеотидов. Имеется акт о практическом использовании (внедрении) результатов исследования Фань Фань по выпуску мелкотоварной партии флуоресцентных меток на базе ОДО «Праймтех».

#### **6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати**

Основные результаты диссертационного исследования Фань Фань опубликованы в 8 научных работах, в том числе в 6 статей в научных изданиях, включенных в перечень ВАК Беларуси и соответствующих отрасли «химические науки», и зарубежных рецензируемых научных журналах, соответствующих п. 19 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий», общим объемом 5,8 авторских листа; 2 тезисов докладов.

#### **7. Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК**

Оформление, стиль изложения и объем диссертационной работы Фань Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов»

соответствует требованиям ВАК. Диссертация состоит из введения, перечня условных обозначений, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, библиографического списка и приложения. В работе проведен достаточный аналитический обзор современной литературы по теме исследований и подробно описана методика эксперимента. Полученные результаты представлены надлежащим образом в виде 67 рисунков, 5 таблиц и 1 приложения. Положения, выносимые на защиту, сформулированы четко и аргументированно и являются обоснованными с точки зрения целей и задач работы. Выводы, сделанные к главам, и общее заключение являются логичными и корректными. Автореферат отвечает текущим требованиям ВАК, полностью и надлежащим образом отражает содержание диссертационной работы и выносимых на защиту положений.

#### **8. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует**

Содержание диссертационной работы, качество изложения научного материала, использованные в работе методы и методики исследования физико-химических свойств полученных люминесцентных красителей и их конъюгатов с биомолекулами выполнены на высоком научном уровне с привлечением современного оборудования. Всесторонний анализ полученных в диссертационной работе результатов, сделанные на их основе выводы и заключения, предложения по практической реализации полученных результатов, позволяют сделать вывод о том, что диссертация Фань Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов» является законченной квалификационной научной работой. Достоверность полученных результатов верифицирована публикациями в рейтинговых научных изданиях, представлением на международных научных конференциях, а результаты исследований использовались или были получены при выполнении ряда заданий и мероприятий научно-технических госпрограмм и хоздоговоров. Все это свидетельствует о том, что ФАНЬ Фань является сложившимся высококвалифицированным специалистом-химиком, который в состоянии ставить и решать актуальные научные задачи в своей области и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к соискателям учёной степени кандидата наук по специальности 02.00.04 – физическая химия.

#### **9. Замечания по диссертации**

По тексту диссертации имеются следующие вопросы и замечания:

- 1) Стр. 39, рис. 1.28. Неправильно указана формула борогидрида.
- 2) Стр. 63, рис. 3.1. Необходимо вводить отдельную шкалу в единицах поглощения (оптической плотности) для отнесения к ней спектра поглощения, так как это сделано, например, на рис. 3.6.

3) На рис. 4.1, 4.2, 4.4 подписи на оси ординат должны быть “Normalized absorption” и “Normalized intensity”.

4) На стр. 82-83 указывается, что при конъюгации флуорофора Cy7 с ДНК длинноволновые сдвиги максимума люминесценции в 3-4 раза меньше, чем максимума поглощения. Это означает уменьшение стоксового сдвига, что указывает на существенные изменения структуры энергетических уровней молекулы Cy7. Это интересный факт и хотелось бы, чтобы диссертант обсудил этот момент более подробно с привлечением литературных данных.

5) В вводной части к главе 5 следовало бы более подробно обсудить эффект анизотропии флуоресценции, ее причины и как это помогает исследовать конформационные изменения в структуре молекулярных роторов.

6) Заключение, пункт 5: Homo-FRET неправильно интерпретирован как гомологический.

Указанные замечания носят уточняющий характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

## 10. Заключение

Диссертационная работа Фань Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов» представляет собой завершённую квалификационную научно-исследовательскую работу на актуальную тему, которая была выполнена на высоком научном уровне с применением современных методов исследования. Работа полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук (пп. 20, 21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий»), содержит достоверные научные результаты, имеющие высокую научную новизну и практическую значимость. Фань Фань заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия за новые научные результаты, включающие:

– синтез новых бифлуорофоров (5-FAM)<sub>2</sub> и (6-FAM)<sub>2</sub> на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, с двумя пространственно-разделенными флуорофорными ядрами, а также их конъюгатов с биомолекулами, установление влияния параметров внешней среды (вязкость, состав буфера и pH, температура раствора, содержание двухвалентных катионов металлов) на спектрально-люминесцентные свойства молекул и их конъюгатов, обнаружение эффекта самотушения, вызванного конформационной перестройкой и внутримолекулярными взаимодействиями между флуорофорными ядрами, что позволило предложить (5-FAM)<sub>2</sub> в качестве перспективной метки со стабильным люминесцентным откликом для флуоресцентного маркирования биомолекул, а (6-FAM)<sub>2</sub> в качестве флуоресцентного сенсора, чувствительного к pH, концентрации двухвалентных катионов и др. параметрам среды;

-синтез производных флуоресцентных красителей цианинового ряда Су5 и Су 7 с различными линкерными группами, получение конъюгатов красителей с олигонуклеотидами и установление влияния типа линкерной группы, параметров раствора и формирование конъюгата на спектрально-люминесцентные характеристики флуорофоров, что позволило определить оптимальную структуру молекулы красителя для флуоресцентного маркирования ДНК;

– установление закономерностей в изменении поляризационно-кинетических характеристик излучения молекулярных роторов в конъюгатах цианинового красителя SYBR Green I и олигонуклеотидов различной структуры, демонстрирующих влияние индуцированного резонансного переноса энергии на интенсивность люминесценции флуоресцентной метки на основе SYBR Green I.

Официальный оппонент  
заведующий лабораторией нанохимии  
Учреждения Белорусского государственного университета  
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»,

д.х.н., доц.

М.В. Артемьев



*учен. секретарь*  
*С.А. Трауцень*

*С отзывом ознакомлен.*

*Рань Рань*  
28.11.2025