

УТВЕРЖДАЮ

Директор Государственного научного учреждения «Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси», академик



А.И.Кулак

ноября 2025 г.

### ОТЗЫВ

оппонирующей организации 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

Экспертом по кандидатской диссертации на основании приказа директора ИОНХ НАН Беларуси от 05.11.2025 г. № 21 назначена кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник ИОНХ НАН Беларуси Лаевская Елена Васильевна.

***Соответствие содержания диссертации заявленной специальности и отрасли науки***

Диссертационная работа Фань Фань соответствует отрасли «химические науки» и специальности 02.00.04 – физическая химия (пп. 5. Строение молекул, теория химических связей и межмолекулярных взаимодействий, молекулярное моделирование. 7. Закономерности изменения структуры и состава химических систем в условиях внешних полей, высоких и экстремально высоких температур и давлений, низких и сверхнизких температур, комбинированных физических и физико-химических воздействий; гетерогенные и гомогенные фотокаталитические и сонохимические процессы, электрохимические и фотоэлектрохимические процессы на полупроводниках, гетерогенный катализ; хемилюминесценция, фото-, электро- и сонолюминесценция в ходе химических превращений; химические источники тока).

Тема диссертационной работы, положения, выносимые на защиту, и основные научные результаты соответствуют паспорту специальности 02.00.04 – физическая химия: работа посвящена созданию и исследованию новых и усовершенствованных флуорофоров с высокой чувствительностью и стабильно-

стью, пригодных для мечения белков и ДНК. Диссертационная работа направлена на установление закономерностей изменения конформационной структуры, состава, физико-химических свойств систем на основе флуоресцентных красителей и их конъюгатов с белками и синтетическими ДНК-олигонуклеотидами в условиях комбинированных физических и физико-химических воздействий (изменение вязкости растворов, ионная сила, температура, наличие добавок катионов и др.).

***Научный вклад соискателя в решение научной задачи с оценкой его значимости***

Диссертационная работа соискателя ученой степени Фань Фань посвящена созданию эффективных флуоресцентных красителей нового поколения, установлению свойств и характеристик красителей, как в свободном виде, так и в составе биоконъюгатов, предназначенных для высокочувствительного мечения биомолекул. Установлена взаимосвязь флуоресцентных свойств исследуемых красителей, их структуры, физико-химических свойств, природы и конформации биомолекул, что позволило предложить принципы создания стабильных и эффективных биоконъюгатов.

Полученные результаты диссертационных исследований имеют научную значимость, поскольку вносят вклад в формирование фундаментальных основ получения флуоресцентных красителей заданной структуры с высокой чувствительностью и селективностью детекции целевых биомолекул (ДНК, белков) в сложных биологических образцах, что позволит уйти от использования радиоактивных красителей и расширить возможности ранней клинической диагностики и генетических исследований.

***Конкретные научные результаты, за которые соискателю может быть присуждена искомая ученая степень***

Разработан и синтезирован новый тип карбоксифлуоресцеиновых бифлуорофоров – (5-FAM)<sub>2</sub> и (6-FAM)<sub>2</sub> – на основе 3,5-диаминобензойной кислоты. Установлено, что жесткая разветвлённая линкерная структура эффективно подавляет внутримолекулярный безызлучательный перенос энергии и минимизирует самотушение. Систематически изучено влияние pH, вязкости, ионной силы и температуры на спектральные параметры этих соединений, выявлены фундаментальные различия в устойчивости и чувствительности (5-FAM)<sub>2</sub> и (6-FAM)<sub>2</sub> к составу среды.

Показано, что при конъюгации с белками бифлуорофор (5-FAM)<sub>2</sub> сохраняет высокую эффективность флуоресценции: снижение квантового выхода компенсируется удвоенным коэффициентом экстинкции. Экспериментально подтверждена перспективность (5-FAM)<sub>2</sub> в качестве яркой метки для биомолекул, превосходящей мономерные аналоги и обеспечивающей более высокую чувствительность в биоаналитических системах, особенно, для мечения белковых молекул, обладающих жесткой структурой.

Экспериментально подтверждена склонность  $Sy3$  и  $Sy5$  к агрегации в водных растворах и впервые количественно показано, что повышение растворимости увеличивает их флуоресценцию в 3–5 раз. Выявлено, что блокирование фотоиндуцированной цис-транс-изомеризации за счет увеличения вязкости раствора повышает квантовый выход в 3–7 раз. Установлено, что конъюгация цианиновых красителей с олигонуклеотидами индуцирует 4–10-кратное усиление флуоресценции, что является важным способом повышения чувствительности ДНК-зондов.

Показано, что введение длинных заместителей (фрагментов триэтиленгликоля) повышает флуоресценцию  $Sy5$  и  $Sy7$  в 1.2–2.0 раза за счет подавления агрегации гидрофобных молекул. Выявлено различное влияние положения заместителя на флуоресцентные свойства: для  $Sy5$  оно незначительно, тогда как в  $Sy7$  присоединение через атом серы снижает интенсивность флуоресценции. Установлен эффект усиления флуоресценции в конъюгатах  $Sy5/Sy7$ -ДНК, более выраженный для одноцепочечной ДНК.

Установлено, что по мере увеличения концентрации красителя Sybr Green I, интеркалированного в двухцепочечную ДНК, происходит неравномерное изменение интенсивности флуоресценции, обусловленное протеканием процессов концентрационного тушения и самотушения флуоресценции красителя Sybr Green I.

Полученные результаты соотнесены с данными литературы и грамотно интерпретированы, отличаются научной новизной и отражают практическую значимость работы. Достоверность и обоснованность результатов по представленному в диссертации материалу не вызывает сомнений, а научно-методический уровень работы отвечает методологическим требованиям современной науки.

По результатам диссертационных исследований опубликовано 8 научных работ, в том числе 6 статей в научных журналах, рецензируемых ВАК, 2 тезисов докладов. Объем публикаций в рецензируемых журналах составляет 5,8 авторских листа.

#### ***Рекомендации по практическому применению результатов***

Разработанный бифлуорофор флуоресцеина ( $5-FAM$ )<sub>2</sub> обладает более высокой интенсивностью флуоресценции в сравнении с мономерными красителями и может быть использован для флуоресцентного мечения биомолекул. Комплексный подход, заключающийся в исследовании влияния структуры красителя, свойств раствора и взаимодействия с белками на флуоресценцию, позволит целенаправленно выбирать краситель для определенной биологической среды.

Результаты исследования влияния свойств растворителя на проявление флуоресцентных свойств красителей могут стать основой для разработки методологии подбора красителей для мечения биомолекул.

Использование установленной зависимости флуоресцентных свойств кра-

сителей  $Cu3$  и  $Cu5$  от характеристик микроокружения поможет сократить ошибки при выборе доноров и акцепторов для FRET, в том числе в системах четырехцветного секвенирования ДНК.

***Замечания и вопросы по диссертационной работе***

При общей положительной оценке диссертационной работы по ней имеются следующие замечания и вопросы:

1. По тексту диссертации не понятно, азидсодержащие бифлуорофоры  $(5-FAM)_2$  и  $(6-FAM)_2$  были получены как отдельные вещества или в составе смеси, содержащей оба вида бифлуорофоров. Каким образом контролировали степень чистоты полученных бифлуорофоров?

2. Изучение спектров поглощения для синтезированных бифлуорофоров при различных значения рН среды позволило установить наличие изобестических точек при  $pH > 7$ , на основании которых рекомендуется рассчитывать концентрацию красителя. Рекомендованный интервал рН использования синтезированных бифлуорофоров 5,0-8,0. Каким образом рассчитывать концентрацию красителя в случаях, когда рН среды, в которой необходимо использовать метку, меньше 7, т.е. отсутствуют изобестические точки?

3. Проводилось ли испытание синтезированных красителей в качестве метки на реальных объектах в реальных условиях?

***Заключение оппонирующей организации. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует***

Диссертационная работа Фань Фань «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов» по актуальности решаемых проблем, научной новизне, научной и практической значимости результатов соответствует требованиям пп. 19–26 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», является завершенной квалификационной работой и подтверждает высокую научную квалификацию автора.

Соискателю Фань Фань может быть присуждена ученая степень кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия за новые научно обоснованные результаты:

1. Разработку нового класса бифлуорофоров флуоресцеина на основе 3,5-диаминобензойной кислоты  $(5-FAM)_2$  и  $(6-FAM)_2$  и установление взаимосвязи их фундаментальных фотофизических свойств (квантовый выход, время жизни возбужденного состояния, интенсивность флуоресценции, поляризация флуоресценции) со свойствами раствора (вязкость, ионная сила, температура, наличие добавок, рН), влияющими на способность молекул к конформационной перестройке и внутримолекулярному взаимодействию.

2. Установленные закономерности изменения интенсивности флуоресценции цианиновых красителей  $Cu3$  и  $Cu5$  в зависимости от их растворимости и структуры, состоящие в увеличении флуоресценции с повышением раствори-

мости красителей и снижении их склонности к агрегации в водных растворах и повышении квантового выхода флуоресценции для цис-транс изомерной структуры и при конъюгации с биомолекулами, что позволило объяснить высокую яркость ДНК-конъюгатов.

3. Установленные закономерности влияния структуры на флуоресцентные свойства новых производных Су5 и Су7, заключающиеся в повышении интенсивности флуоресценции с ростом длины заместителей и при конъюгации с одно- и двуцепочечной ДНК.

4. Обнаруженный эффект зависимости анизотропии флуоресценции от соотношения концентрация интеркалированного красителя Sybr Green I в структуру двухцепочечной ДНК/концентрация двухцепочечной ДНК, проявляющийся в уменьшении анизотропии с увеличением концентрации с последующим выходом на плато, что вызвано безызлучательным переносом энергии между интеркалированными молекулами Sybr Green I по механизму гомологичного флуоресцентно-резонансного переноса энергии.

Соискатель Фань Фань выступил с докладом по диссертационной работе «Синтез и физико-химические свойства флуоресцентных биоконъюгатов».

Материалы диссертации Фань Фань и отзыв оппонировавшей организации – Государственного научного учреждения «Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси» рассмотрены и обсуждены на расширенном научном семинаре (протокол № 11 от 25.11.2025 г.) лаборатории физико-химии водных процессов в присутствии сотрудников института.

Присутствовало 11 человек, в том числе, д.х.н. Воробьева Е. В., к.х.н. Бондарева Г. В., к.х.н. Чередниченко Д. В., к.т.н. Лаевская Е. В., к.х.н. Воробьев П. Д., к.х.н. Крутько В. К., к.х.н. Мусская О. Н., к.х.н. Лукша О. А., б.с. Буча С. В., б.с. Алексеева А. В., б.с. Черникова А. Р.

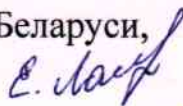
В голосовании приняли участие 8 человек, имеющих ученую степень.

Результаты голосования:

«ЗА» – 8, «ПРОТИВ» – нет, «ВОЗДЕРЖАЛИСЬ» – нет.

Эксперт по диссертации, подготовивший проект отзыва:

ведущий научный сотрудник ИОНХ НАН Беларуси,  
кандидат технических наук



Е. В. Лаевская

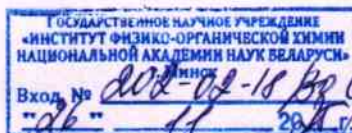
Председатель заседания  
кандидат химических наук



Д. В. Чередниченко

Секретарь семинара

С.В. Буча



умен. секретарь  
С. А. Струченко

Сотрудник организацион. отдела  
Фань Фань  
27.11.2025