

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

МАРИНЫ ВАДИМОВНЫ ШИРМАНОВОЙ

на диссертационную работу **Гильванова Айдара Римовича**

«Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Актуальность исследования

Флуоресцентная микроскопия является широко используемым инструментом в биологических и биомедицинских исследованиях. Особенно привлекательным выглядит флуоресцентное мечение одновременно нескольких клеточных структур в живых клетках с целью их динамического наблюдения. Однако в случае классической флуоресцентной микроскопии, построенной на интенсивности флуоресценции, многоцветное маркирование ограничено максимум 3-4 спектрально не перекрывающимися метками. В качестве альтернативы рассматривается применение нескольких меток со схожими спектральными свойствами, но различающимися временами жизни флуоресценции. Их наблюдение возможно с помощью флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM), которая получает все большую популярность. Актуальной задачей в данной области остается расширение спектральной палитры флуоресцентных меток для получения большего объема информации в рамках одного эксперимента.

Таким образом, диссертационная работа А.Р. Гильванова, посвященная изучению применения арилиден-азолоновых красителей во FLIM, в том числе в виде комплексов с вариантами флуороген-активирующего белка FAST, является **актуальной** и соответствует современным направлениям развития методов флуоресцентной микроскопии.

Структура диссертации

Диссертационная работа А.Р. Гильванова изложена на 138 страницах текста, содержит 53 рисунка, 14 таблиц, 244 источника литературы и 2 приложения. Работа построена по классическому плану и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключение, выводы, список цитируемой литературы.

В разделе «Введение» сформулированы цель и задачи работы, обоснованы ее актуальность, теоретическая и практическая значимость.

Раздел «Обзор литературы» отличается полнотой охвата и систематичностью изложения. Соискатель последовательно рассматривает явление флуоресценции, основные механизмы возникновения флуоресценции сольватохромных и флуорогенных красителей, свойства различных классов генетически кодируемых меток и особенности их применения во FLIM. Особое внимание уделяется белку FAST и его вариантам.

Раздел «Материалы и методы» изложен достаточно подробно и характеризуется разнообразием применяемых подходов. Данный раздел включает в себя протоколы сборки генетических конструкций, культивирования клеточных линий, а также описание применяемых методов оптической, в том числе время-разрешенной, спектроскопии. Стоит отметить детальное описание методов обработки данных FLIM, что гарантирует воспроизводимость результатов.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из четырех логически связанных частей, каждая из которых завершается кратким резюме. В первой части описаны результаты применения арилиден-имидазолоновых «сенсоров полярности» во FLIM живых клеток HeLa Kyoto. В данной части продемонстрирована возможность разделения сигналов от окрашенных «сенсорами полярности» ЭПР и адипосом с помощью FLIM. Три последующие части раздела посвящены разработке систем для мультиплексной FLIM с применением комплексов мутантных вариантов белка FAST с арилиден-азолоновыми флуорогенами, обладающих эмиссией в различных спектральных областях: 500-600 нм, 600-650 нм и 650-700 нм. Для каждой системы проводился *in vitro* скрининг вариантов FAST по временам жизни флуоресценции с последующим мечением внутриклеточных структур живых клеток HeLa Kyoto. Особого внимания заслуживает стабильность времен жизни флуоресценции большинства комплексов FAST:флуороген в различных клеточных локализациях.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». В разделе «Заключение» автор приводит краткое обобщение полученных результатов и дальнейшие перспективы направления исследований. Раздел «Выводы» содержит 5 утверждений, которые полностью согласуются с поставленными задачами.

Хочется отметить высокое качество иллюстраций, представленных в разделах «Обзор литературы» и «Результаты и обсуждение», которые дают исчерпывающую

информацию о теме работы и наглядно демонстрируют новые, собственные данные автора. Работа написана грамотным, научным языком, аккуратно оформлена.

Основные результаты работы автора опубликованы в 5 статьях в международных и российских журналах. Примечательно, что все статьи опубликованы в высокорейтинговых журналах, что подтверждает высокий уровень исследования.

Научная новизна и практическая значимость

Научная новизна диссертационной работы А.Р. Гильванова заключается в комплексном применении арилиден-азолоновых флуорогенных красителей во FLIM-микроскопии живых клеток как в виде самостоятельных меток, так и в виде комплексов с вариантами флуороген-активирующего белка FAST.

Показано, что арилиден-азолоновые красители по-разному ведут себя в разном клеточном микроокружении, демонстрируя, в частности, различные времена жизни флуоресценции в ЭПР и адипосомах.

Разработаны системы для мультиплексного мечения во FLIM живых клеток HeLa Kyoto на основе комплексов мутантных вариантов белка FAST и арилиден-азолоновых флуорогенов для трех спектральных областей, обозначаемых автором как зелено-оранжевая, оранжево-красная и дальне-красная, охватывающие диапазон 500-700 нм, и позволяющие одновременное мечение до трех внутриклеточных структур. Таким образом, описанные в работе результаты могут быть непосредственно использованы для одновременной визуализации нескольких внутриклеточных структур в клетках млекопитающих с применением FLIM.

В целом, диссертация производит крайне **положительное** впечатление, а изложенные в ней результаты кажутся интересными для развития целого ряда биологических приложений FLIM-микроскопии. После прочтения диссертации не остается сомнений в научной значимости, новизне, достоверности полученных результатов, а также в потенциальной пользе данной работы для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям. Содержание автореферата лаконично отражает основные положения диссертации.

Замечания к диссертационной работе

1. В разделе 3.1.2 диссертации идет речь об окрашивании ЭПР и отдельных адипосом серией арилиден-имидазолонных красителей. Однако не ясно, имеется ли подтверждение этих данных ко-локализацией со стандартными органелл-специфическими красителями. В таблица 3.5 приведены значения времен жизни флуоресценции исследуемых красителей в ЭПР и адипосомах живых клеток HeLa, но отсутствуют результаты оценки статистической значимости отличий, что требует уточнения.

2. В работе автор использует термин «сенсоры полярности» в отношении серии арилиден-имидазолонных флуорогенных красителей. В традиционном понимании «сенсинг» предполагает количественное измерение какого-либо параметра. Результаты исследования не выявили существенной корреляции между временами жизни флуоресценции красителей и полярностью среды. Необходимо пояснить, что подразумевается под этим термином? Можно ли применять красители, исследуемые в работе, в качестве сенсоров полярности? Для лучшего понимания различий в полярности растворителей, было бы хорошо в таблице 1 в автореферате и в таблицах 3.1-3.4 в диссертации дать характеристику (значения) полярности используемых растворителей.

3. Важным результатом работы является демонстрация применимости комплексов FAST:флуороген на живых клетках. Хотелось бы получить комментарии от автора относительно стабильности комплексов в клетках, их фотовыгорания в процессе съемки FLIM изображений и возможности проводить повторные, динамические наблюдения с одних и тех же клеток.

4. Время сбора сигнала для комплексов FAST:флуороген составляло 120 с и более, что позволяло собрать около 1000 фотонов на кривую затухания при биннинге 3-6. Подобные условия съемки говорят о низкой интенсивности сигнала комплексов в клетках. Каковы возможные пути для повышения эффективности окраски?

Указанные замечания носят исключительно формальный характер и ни коим образом не снижают общей положительной оценки диссертационной работы А.Р. Гильванова.

Заключение

Диссертационная работа **Гильванова Айдара Римовича** полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в соответствии с пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (со всеми изменениями Постановления Правительства Российской Федерации), а сам диссертант **Гильванов Айдар Римович** заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор Биологических наук,
заместитель директора по науке

НИИ экспериментальной онкологии
и биомедицинских технологий

ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России  Ширманова Марина Вадимовна

«27» апреля 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 603950, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

Тел.: 8(831)4655672; e-mail: shirmanova_m@pimunn.net

Подпись доктора биологических наук

М.В. Ширмановой заверяю:

Ученый секретарь университета,

кандидат биологических наук, доцент



Ю.А. Сорокина

