

Отзыв официального оппонента

кандидата физико-математических наук **Гущина Ивана Юрьевича**

на диссертационную работу **Гильванова Айдара Римовича**

«Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Актуальность работы

Диссертационная работа посвящена изучению возможности применения различных комбинаций из вариантов флуороген-активирующего белка FAST и синтетических хромофоров для мультиплексной флуоресцентной микроскопии. В целом, флуоресцентная микроскопия переживает бурное развитие, с её помощью уже сделано большое число открытий, и количество ее применений в биологии с каждым годом растёт. Одним из интересных поднаправлений является флуоресцентная время-разрешенная микроскопия (FLIM), в рамках которой регистрируется временная задержка между возбуждающим импульсом и эмиссией детектируемых фотонов, что позволяет различить красители с быстро и медленно затухающей флуоресценцией. Тогда как для других флуоресцентных молекул FLIM ранее неоднократно демонстрировалась, белки FAST и связываемые ими арилиден-азолоновые красители оставались недоизученными, несмотря на интересные свойства и большой потенциал для различных применений. Соответственно, выбранная тематика несомненно является актуальной, а результаты могут быть применены для решения широкого спектра исследовательских и прикладных биологических задач.

Структура и общая характеристика работы

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 138 страницах, содержит 53 рисунка, 14 таблиц, 2 приложения, библиография содержит ссылки на 244 источника. Во введении проведено обоснование актуальности работы, поставлены цель и задачи, изложена новизна, теоретическая и практическая значимость, кратко описаны методы исследования, приведены положения, выносимые на защиту, а также данные об апробации и публикациях.

Глава 1 содержит подробный и аккуратный обзор литературы, дающий полноценное представление о современном состоянии области исследования. Перечислены основные классы белков, используемых в качестве флуоресцентных меток, и описаны их флуорофоры; рассмотрено само явление флуоресценции, флуоресцентная микроскопия, а также подходы к обработке результатов время-разрешенных экспериментов по регистрации флуоресценции.

Глава 2 описывает материалы и методы, применявшиеся в работе. Описана подготовка образцов – как белков, так и клеточных культур с органеллами, мечеными разными вариантами

химерных конструкций, включающих FAST. Приведены условия экспериментов по конфокальной FLIM-микроскопии и обработке полученных данных.

Глава 3 описывает новые результаты, полученные в ходе работы и состоит из 4-х основных частей, из которых в первой применяются красители без каких-либо белков, а в трех остальных изучаются различные комбинации вариантов FAST и красителей арилиден-азолонового ряда.

В разделе 3.1 определены времена жизни флуоресценции красителей Zs216, Al123, Al445 и SA440 в различных растворителях, после чего проведено окрашивание ими модельных клеток HeLa Kyoto; обнаружено, что три из них (Zs216, Al445 и SA440) дифференциально окрашивают клеточные органеллы – эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и адипосомы, ввиду чего в будущем могут быть использованы для окраски клеточных культур без необходимости генетических манипуляций.

В разделе 3.2 показано, что флуороген HBR2,5-DM может быть использован для мультиплексной FLIM-микроскопии: в комплексе с различными вариантами белка FAST его оптические свойства остаются практически неизменными в различных окружениях, тогда как время жизни флуоресценции различно для отобранных вариантов, что позволяет различать до трех различных внутриклеточных структур.

В разделе 3.3 выполнена аналогичная разделу 3.2 работа для красителя N871b, в комплексе с FAST обладающего эмиссией в оранжевой-красной области видимого спектра. Показано, что комплексами FAST с N871b можно производить высокоселективное мечение до трех внутриклеточных структур.

Наконец, в разделе 3.4 выполнено исследование возможности проведения FLIM с комплексами на основе флуорогена MMV32.4, обладающими эмиссией в дальне-красной области видимого спектра. Обнаружено, что различные варианты FAST имеют схожие времена жизни флуоресценции, из-за чего удалось успешно разделить лишь две внутриклеточные структуры.

Основная часть диссертации завершается разделом «Заключение», в котором излагаются главные результаты работы, а также «Выводами». Далее приводятся список сокращений и список цитированной литературы. Основные результаты опубликованы и достаточно полно отражены в 5 статьях в рецензируемых научных журналах. Все приведенные результаты не вызывают сомнений, а выводы обоснованы и однозначны.

В целом, диссертация написана ясным и правильным языком с минимальным количеством опечаток и неточностей (стр. 11 "В последствии", стр. 13 "t – время в момент t" – тавтология, стр. 20 "Флуорогенные красителей", стр. 61 уравнение 2.1 вместо символа α «альфа» использован символ \propto «пропорционально», стр. 83 "В отсутствии", стр. 84 рис. 3.6 А, Б по оси ординат некорректный символ, стр. 109 "Анализ изображения, полученного в результате трех внутриклеточных структур комплексами вариантов FAST" - пропущено слово, стр. 116 "Выраженной корреляции между временами жизни в различных средах, адипосомах и ЭПР не

выявлено" - пропущено слово "флуоресценции"). Иллюстрации выполнены аккуратно и отражают ключевые результаты работы. Представление больших объемов данных в табличном виде, без упорядочения, в некоторых случаях (стр. 73, 74, 79, 104) не очень наглядно, но не сказывается на информативности работы.

Научная значимость и новизна работы

Научная ценность работы в первую очередь заключается в ее систематичности: получен действительно большой массив данных о белках FAST и различных красителях, в близких экспериментальных условиях; осмысление этих данных может помочь разработке усовершенствованных аналогов FAST, а также новых хромофоров арилиден-азолонового ряда. Помимо этого, идентифицированы оптимальные комбинации белков и красителей, которые теперь могут быть применены в экспериментах по флуоресцентной микроскопии для новых биологических объектов; благодаря всеобъемлющей характеристике трактовка их результатов будет облегчена.

Вопросы и замечания

1. Принимая во внимание отсутствие явных корреляций наблюдаемых свойств со структурами белков и красителей, все же было бы очень интересно увидеть в тексте диссертации какие-либо гипотезы о возможном дальнейшем усовершенствовании использованных систем: как они могут развиваться в будущем, какие новые модификации (белков и хромофоров) имеет смысл попробовать в первую очередь?

2. С точки зрения развития метода флуоресцентной микроскопии, во Введении в качестве аргумента в пользу FLIM автором приводится утверждение, что спектральное разделение «позволяет одновременное применение в большинстве случаев только 3-4 флуоресцентных меток»; при этом в самой работе FLIM с помощью FAST также продемонстрирован для разделения лишь 3 клеточных структур, а каких либо новых данных о процессах, протекающих в клетках, при помощи исследованных пар белок-хромофор не получено.

Данные аспекты нельзя отнести к значимым недостаткам работы, и они не уменьшают общее положительное впечатление. Результаты и выводы, представленные в диссертации, несомненно, способствуют развитию методов флуоресцентной микроскопии.

Заключение

Подводя итоги, можно заключить, что представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, выполненную на высоком научном уровне, и несомненно имеет научно-практическую значимость. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений ввиду аккуратного и систематического применения общепринятых методов, тщательно

проведенной обработки. Выносимые на защиту положения являются новыми, значимыми и основываются на собственных данных диссертанта.

Диссертационная работа Гильванова Айдара Римовича соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней", утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции, со всеми изменениями и дополнениями), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Сведения об официальном оппоненте:

Ф.И.О.: Гущин Иван Юрьевич

Учёная степень: кандидат физико-математических наук

Должность: старший научный сотрудник - заведующий лабораторией структурного анализа и инжиниринга мембранных систем

Место работы: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ, Физтех)

Адрес места работы:

141701, Московская область, г. Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 3

Тел.: +7-965-428-22-24

Электронная почта: ivan.gushchin@phystech.edu

Дата подписания отзыва:

12 мая 2026 г.

Гущин Иван Юрьевич

Подпись сотрудника удостоверяю:

Ученый секретарь ученого совета МФТИ



Евсеев Е.Г.