

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН),

по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 10.06.2026 № 11

О присуждении **Гильванову Айдару Римовичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите 11 марта 2026 г. (протокол заседания № 6) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Гильванов Айдар Римович, 15 февраля 1993 года рождения. В 2016 году соискатель окончил ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет» по специальности 19.04.01 «Биотехнология». В 2025 году окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) по направлению 1.5.3 – Молекулярная биология. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника Лаборатории химии гетероциклических соединений Отдела геномики и постгеномных технологий ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в Лаборатории химии гетероциклических соединений Отдела геномики и постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института

биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель – доктор химических наук Баранов Михаил Сергеевич, ведущий научный сотрудник Лаборатории химии гетероциклических соединений Отдела геномики и постгеномных технологий ГНЦ ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Ширманова Марина Вадимовна, доктор биологических наук, заместитель директора по науке НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» (ПИМУ) Минздрава России,

Гущин Иван Юрьевич, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией структурного анализа и инжиниринга мембранных систем Московского физико-технического института (национального исследовательского университета) (МФТИ, Физтех)

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта, доктором биологических наук Розенкранцем Андреем Александровичем, и утвержденном директором, академиком РАН, доктором биологических наук Георгиевым Павлом Георгиевичем, указала, что диссертационная работа Гильванова Айдара Римовича «Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 5 работ общим объемом 3,88 печ. л. Все работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Гильванов А.Р. внес основной либо существенный вклад включают:

1. **А.Р. Гильванов**, А.Ю. Смирнов, С.А. Краснова, И.Д. Соловьев, А.П. Савицкий, Ю.А. Богданова, М.С. Баранов. Использование флуоресцентной времязрешенной микроскопии для повышения селективности флуорогенных красителей ряда арилиденимидазолонов в отношении эндоплазматического ретикулаума // *Биоорганическая химия*. – 2024. – Т. 50. – №5. – с. 691-698.

2. Yu.A. Bogdanova, I.D. Solovyev, N.S. Baleeva, I.N. Myasnyanko, A.A. Gorshkova, D.A. Gorbachev, **A.R. Gilvanov**, S.A. Goncharuk, M.V. Goncharuk, K.S. Mineev, A.S. Arseniev, A.M. Bogdanov, A.P. Savitsky, M.S. Baranov. Fluorescence lifetime multiplexing with fluorogen activating protein FAST variants // *Communications Biology*. – 2024. – Vol. 7. – 799.

3. **A.R. Gilvanov**, I.N. Myasnyanko, S.A. Goncharuk, M.V. Goncharuk, V.S. Kublitski, D.V. Bodunova, S.V. Sidorenko, E.G. Maksimov, M.S. Baranov, Yu.A. Bogdanova. Fluorescence Lifetime Multiplexing with Fluorogen-Activating FAST Protein Variants and Red-Shifted Arylidene-Imidazolone Derivative as Fluorogen // *Biosensors*. – 2025. – Vol. 15. – № 5. – 274.

4. **A.R. Gilvanov**, I.D. Solovyev, A.P. Savitsky, M.S. Baranov, Yu. A. Bogdanova. Fluorescence Lifetime-Based Separation of FAST-Labeled Cellular Compartment // *Bio-Protocol*. – 2025. – Vol. 15. – № 19. – e5460.

5. **A.R. Gilvanov***, M.V. Molchanova*, S.A. Krasnova, A.V. Eshtukov-Shcheglov, A.A. Mikhaylov, S.A. Goncharuk, M.V. Goncharuk, S.V. Sidorenko, E.G. Maksimov, M.S. Baranov, Y.A. Bogdanova. Bathochromic Shift via C=O to C=S Substitution: A Far-Red Fluorogen for Multiplexed FLIM with FAST Fluorogen-Activating Protein // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2026. – Vol. 27. – № 1. – 23. (* - авторы внесли равный вклад).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. **Ширмановой Марины Вадимовны**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

1. В разделе 3.1.2 диссертации идет речь об окрашивании ЭПР и отдельных адипосом серией арилиден-имидазолоновых красителей. Однако не ясно, имеется ли подтверждение этих данных ко-локализацией со стандартными органелл-специфическими красителями. В таблице 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-имидазолоновых 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?

Отзыв официального оппонента к.ф.-м.н. **Гущина Ивана Юрьевича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

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 продемонстрировали для разделения лишь 3 клеточных структур, а каких-либо новых данных о процессах, протекающих в клетках, при помощи исследованных пар белок-хромофор не получено.

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания:

1. На странице 25 используется некорректное употребление термина пролиферация по отношению к репродукции вирусов.

2. На странице 71 отмечается, что «ЭПР представляет собой клеточную органеллу, состоящую из сети полостей и трубочек, отделенную липидной мембраной от цитоплазмы...». ЭПР представляет собой часть цитоплазмы, поэтому в данном случае правильно было бы указать вместо «цитоплазма» другой термин: «итозоль» или «гиалоплазма».

3. На странице 74 указанные в таблицах 3.3. и 3.4 квантовые выходы флуоресценции двух разных соединений A1445 и SA440 идентичны для каждого из всех приведенных растворителей, что, возможно, является опечаткой.

4. В таблице 3.5 при сравнении параметров затухания флуорофоров напрашивается статистическая оценка полученных данных. Это сделало бы последующие выводы более весомыми.

Отзыв на **автореферат** д.б.н., доцента кафедры биохимии и регенеративной биомедицины Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ им. М.В. Ломоносова, **Тюрина-Кузьмина Петра Алексеевича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания:

1. В тексте упоминается термин адипосомы. Судя по всему, Автор под этим термином имеет в виду липидные капли в комплексе с белками метаболизма липидов. При этом Автор работает с клетками HeLa-Kyoto, для которых образование запасных отложений жира, высланных перилипином, экспрессия ферментов метаболизма липидов (ТАГ-липоза, HSL и прочие) нехарактерно. Как Автор в своей работе подтвердил, что те структуры, которые он называет адипосомами, действительно ими являются? Судя по размерам представленных структур, это в большей степени напоминает эндосомы.

Отзыв на **автореферат** д.х.н., профессора, профессора Центра фотоники и фотонных технологий Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологии», **Горина Дмитрия Александровича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания:

1. В автореферате отсутствуют данные о квантовом выходе флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда, а также возможной фотодеградации.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы (модификация флуоресцентных белков для флуоресцентной микроскопии, применение флуоресцентной, в том числе время-разрешенной, микроскопии, применение синтетических флуоресцентных красителей в микроскопии клеток млекопитающих), которые подтверждены сериями их публикаций в российских и международных рецензируемых научных изданиях. Оппоненты и представители ведущей организации обладают высокой квалификацией и большим опытом исследовательской и экспертной работы, что позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые была наглядно продемонстрированы возможности применения флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда, в том числе на основе их комплексов с мутантными вариантами флуороген-активирующего белка FAST во время-разрешенной микроскопии живых клеток млекопитающих. Показано, что при использовании арилиден-имидазолонных «сенсоров полярности» в условиях время-разрешенной флуоресцентной микроскопии возможно разделение областей, соответствующих ЭПР и адипосомам. Также время жизни флуоресценции большинства изученных соискателем комплексов FAST:флуороген практически не изменяется в ряде внутриклеточных локализаций (ядро, виментин, межмембранное пространство митохондрий), что позволяет проводить разделение до трех локализаций внутри одной клетки.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что расширены представления о фотофизических свойствах арилиден-имидазолонных «сенсоров

полярности» в средах с различной полярностью, в том числе в биологических системах. Кроме того, изучены особенности флуоресценции комплексов FAST:флуороген при мечении различных внутриклеточных структур и показана стабильность их времени жизни флуоресценции в этих локализациях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что использованные в работе арилиден-имидазолоновые «сенсоры полярности» потенциально могут быть использованы для изучения таких динамических процессов в клетках, как образование адипосом и изменение полярности ЭПР в стрессе. Кроме того, комплексы FAST:флуороген, изученные соискателем, являются готовым инструментом для мультиплексных исследований с применением метода FLIM.

Оценка достоверности результатов исследования сомнений не вызывает. Исследования проводились с использованием современных методов и подходов физико-химической биологии (включая конструирование генетических векторов по технологии Golden Gate, TCSPC-спектроскопию и FLIM-микроскопию). Экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного оборудования, эксперименты выполнены в объеме, достаточном для получения достоверных и воспроизводимых результатов. Материалы, представленные в работе, опубликованы в российских и международных рецензируемых научных изданиях.

Личный вклад Гильванова А.Р. заключается в поиске и анализе литературы по теме исследования, в планировании и проведении экспериментов, анализе экспериментальных данных, интерпретации полученных результатов. Практически все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии, за исключением синтеза арилиден-азолонов, который выполнялся сотрудниками Лаборатории химии гетероциклических соединений Отдела геномики и постгеномных технологий ГНЦ ИБХ РАН (А.Ю. Смирнов, С.А. Краснова, М.В. Молчанова), а также анализа структур комплексов FAST:флуороген и их связи со временем жизни флуоресценции, который был выполнен сотрудниками Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии Отдела структурной биологии ГНЦ ИБХ РАН (С.А. Гончарук, М.В. Гончарук). Экспериментальные сессии FLIM-микроскопии проводились на оборудовании и совместно с сотрудниками Лаборатории физической биохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (А.П. Савицкий, И.Д. Соловьев) и с сотрудниками Лаборатории физико-химии биологических мембран Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Е.Г. Максимов, С.В. Сидоренко), при определяющем вкладе соискателя в подготовку образцов и проведение измерений.

Таким образом, Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Гильванова Айдара Римовича является законченной научно-квалификационной работой. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Таким образом, диссертационная работа Гильванова Айдара Римовича «Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия с применением флуорогенных красителей арилиден-азолонового ряда», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 со всеми последующими изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Какие преимущества имеют описанные в работе системы перед классической флуоресцентной микроскопией с использованием флуоресцентных белков?

2. 21 мутантный вариант FAST был получен лично соискателем? Структура белка FAST была определена ЯМР именно в ГНЦ ИБХ РАН? Какие варианты белка FAST были описаны другими исследовательскими группами. Как определялись замены в мутантных вариантах, использованных в работе?

3. Учитывая небольшие константы связывания флуорогенов белком FAST, ограничивает ли это описанные системы в применении?

4. Учитывая, что не было обнаружено корреляции между полярностью среды в органических растворителях и спектральными свойствами, но были обнаружены различия с белком FAST, что определяет спектральные характеристики флуорофоров в связанном белком состоянии? Как можно объяснить полученные результаты и как их использовать при разработке специфических молекул с заданными спектральными свойствами? Как определялись константы диссоциации комплексов FAST:флуороген?

5. Недавно было обнаружено, что адипосомы участвуют в антибактериальной и противовирусной защите у многих биологических видов и образуют комплексы с антибактериальными и противовирусными компонентами в клетке. Как можно использовать флуорофоры, использованные в работе, для выявления измененных адипосом при сравнении здоровых и инфицированных клеток?

Соискатель Гильванов А.Р. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1. FLIM позволяет разделять сигналы от нескольких спектрально схожих меток, используя один источник возбуждения, в то время как в классической конфокальной микроскопии, несколько меток покрыли бы весь видимый спектр. Что касается преимуществ белка FAST по сравнению с другими генетически кодируемыми метками, то это малый размер; флуороген связывается нековалентно и в рамках одного эксперимента один флуороген может быть заменен на другой путем отмывки; учитывая, что у FAST нет собственного хромофора, ему не требуется кислород для созревания, а флуороген вносится извне, что делает FAST удобной меткой для работы в анаэробных системах.

2. 21 вариант белка FAST, использованный в работе, был получен ранее в результате совместной работы Лаборатории химии гетероциклических соединений и Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ГНЦ ИБХ РАН. Группой Арно Готье с помощью случайного мутагенеза было получено большое количество вариантов FAST с разными свойствами. Замены в вариантах, использованных в работе, были ранее определены с помощью анализа данных ЯМР-спектроскопии, с целью улучшения оптических свойств комплекса с флуорогеном N871b.

3. Перед проведением экспериментов FLIM возможность неспецифического мечения каждого флуорогена для FAST оценивалась с помощью микроскопии на клетках экспрессирующих и не экспрессирующих FAST. Для работы во FLIM были отобраны только те флуорогены, которые связываются именно с FAST и не окрашивают другие внутриклеточные структуры.

4. «Сенсоры полярности», использованные в первой части работы являются самостоятельными метками и не образуют комплексов с FAST, тогда как остальные флуорогены в работе формируют только комплекс с FAST. Наличие определенных заместителей во флуорогене влияет на его положение в связывающем кармане белка, что может влиять на оптические свойства. Для проведения рационального дизайна молекул нужно собрать больше информации о флуорогенах, белке FAST и комплексах FAST:флуороген. Константы диссоциации комплексов FAST:флуороген определялись с помощью флуориметрического титрования.

5. Предположительно, при неких взаимодействиях адипосом с белками может изменяться состав самих адипосом, так как это сложная смесь липидов, и их вязкость ввиду изменения состава адипосом. Учитывая, что данные флуорогены относятся к так называемым «молекулярным роторам», которые используются для измерения вязкости во FLIM, данные красители могут обладать разным временем жизни флуоресценции при изменении вязкости. Также, учитывая, что данные красители – «сенсоры полярности», и их квантовый выход зависит от полярности среды, то уровень интенсивности также будет изменяться с изменением полярности.

На заседании 10 июня 2026 года диссертационный совет постановил за решение научной задачи по разработке новых методов мечения живых систем с использованием флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM) с применением красителей арилиден-азолонового ряда, в том числе на основе их комплексов с мутантными формами флуороген-активирующего белка FAST, присудить **Гильванову Айдару Римовичу** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 25 человек, из них 8 докторов наук по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – Молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 25, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Зам. председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

10 июня 2026 г.

