



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01
при ИБХ РАН

14 декабря 2016 года

Защита диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук **Кузьменкова Алексея Игоревича** на
тему:

«Токсины яда скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus
scrobiculosus*, действующие на калиевые каналы»

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Москва – 2016

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 14 декабря 2016 года.

Заместитель председателя
член-корр. РАН

В.М. Липкин

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
4. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
5. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
6. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
7. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
8. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
9. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
10. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
11. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
12. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
14. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
16. Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
17. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
18. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
19. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
20. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
21. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Защита: Кузьменков Алексей Игоревич «Токсины яда скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus*, действующие на калиевые каналы» по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия на соискание степени кандидата химических наук, научный руководитель – кандидат химических наук Василевский Александр Александрович. Официальные оппоненты: Семьянов Алексей Васильевич, доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, директор НИИ Нейронаук Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, руководитель лаборатории внесинаптической передачи, но он отсутствует, он в командировке: «Владимир Александрович, Вы, наверное, будете зачитывать отзывы?»

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Да.

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Никулин Алексей Донатович, кандидат химических наук, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук. Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. Владимир Александрович, Вам слово.

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК). Вопросы?

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Пожалуйста, Алексей Игоревич, Вам 20 минут.

Кузьменков А.И.:

(Излагает основные положения диссертационной работы.)

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Пожалуйста, у кого есть вопросы?

Уткин Ю.Н., д.х.н.:

Спасибо за прекрасный доклад. Скажите, пожалуйста, какие преимущества перед традиционными флуоресцентными метками у вашего химерного белка? Там добавляется очень большая, так сказать, добавка к токсину.

Кузьменков А.И.:

Да, спасибо за вопрос. Я сейчас, разрешите, перейду к этому слайду. Да действительно, вопреки ожиданиям, такой большой флуоресцентный белок, который добавляется к лиганду, в нашем случае никаким образом не повлиял на активность самого токсина. Что касается преимуществ перед традиционными флуоресцентными метками: во-первых, это легкость получения, сделав один раз такую плазмиду, Вы можете рекомбинантную молекулу получать в любых количествах, в которых Вам необходимо, и, я не сказал, выход у нее очень значительный. Это - во-первых, а во-вторых, это, собственно, дешевизна этого процесса. Химические флуоресцентные метки достаточно дорогие и в общем весь процесс трудоемкий. Чтобы получить классический токсин с какой-нибудь родаминовой меткой Вам нужно очень много трудозатрат и какие-то финансовые излишки.

Уткин Ю.Н., д.х.н.:

То есть, как бы сказать, никаких преимуществ при тестировании Ваша конструкция не дает, только легкость ее получения, так Вы считаете?

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Еще вопросы есть?

Козлов С.А., д.х.н.:

Спасибо за доклад. Скажите, пожалуйста, вот по поводу вытеснения этого белка на следующем слайде. Почему антитела к Kv1.3 при добавлении токсина перестали проявлять? Здесь как-то с механизмом работы или какие-то антитела, в принципе связывания с токсином не должно убить связывания антител с каналом?

Кузьменков А.И.:

Да, может быть я не очень четко объяснил. Это контрольный эксперимент. В этом эксперименте использовались только антитела к Kv1.3, здесь использовался только токсин, флуоресцентный токсин. Здесь происходило вытеснение «холодным» токсином флуоресцентного токсина. Соответственно, на этом слайде антитела добавлялись к не трансфицированным клеткам. Эксперимента, где антитела и флуоресцентный токсин присутствуют в одной системе мы не делали. Зачем?

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Так, еще вопросы, пожалуйста? Нет. Спасибо, отдохните немного.

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, отзыв положительный. *(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)* Замечания: Вместе с тем, текст диссертации не свободен от недостатков. Основным недостатком представляется не вполне удачная конструкция обзора литературы. Большое внимание уделено подробной классификации калиевых каналов и их лигандов. Такая конструкция была бы уместна для классической фармакологической работы. Однако в данном исследовании проблемы разнообразия каналов и селективность действия практически не затрагиваются. Напротив, проблемы, связанные с биоинформатикой, скрининговыми технологиями практически не рассматриваются. А ведь это существенная часть работы. В качестве второго замечания можно отметить, что разные части работы не всегда увязаны между собой в тексте диссертации. В результате общую логику работы, мотивацию конкретных исследований и выводы отслеживать довольно трудно. Данные замечания относятся к тексту диссертационной работы и не умаляют достоверности и значимости полученных результатов.

Кузьменков А.И.:

(Отвечает на замечания, содержащиеся в отзыве ведущей организации).

Уважаемые коллеги, разрешите мне не согласиться с первым тезисом ведущей организации, с первым вопросом. На мой взгляд обзор литературы – удачный. Почему? Потому что я описываю в нем разнообразие ионных каналов, разнообразие калиевых каналов, извините, описываю, где они встречаются и какие у них функции. Дальше подробное внимание уделяется, как раз-таки, лигандам калиевых каналов и самое подробное внимание уделяется токсинам скорпионов. Кроме того, есть глава, где подробно рассматриваются способы использования этих молекул, в том числе флуоресцентные различные аналоги и так далее, и применение в медицинских каких-то практиках. Что касается скрининговых технологий и биоинформатики в данной работе, можно сказать, это небольшая часть, какие-то методологические аспекты лишь и далеко не самая большая часть. Что касается второго комментария, возможно, работа получилась большая и сложно ее уложить в одно русло. Здесь, как я уже говорил несколько этапов: обзор литературы и создание базы данных, работа непосредственно с ядами и транскриптомами и наконец, что-то из биотехнологии. Поэтому, возможно, у уважаемой ведущей организации сложилось впечатление, что эти части как-то разрознены. Спасибо!

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Александр Александрович, Вам слово.

Василевский А.А., к. х. н.:

Уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги, дорогие друзья, позвольте

мне отозваться о диссертанте. Так получилось, что в Брянске я не был, но это уже вторая диссертационная работа из нашей небольшой группы, автором которой является человек, который родился в этом городе. Если я правильно разобрался в ситуации, то есть знаменитая брянская школа, которая служит поставщиком, исправным, студентов в Московский университет и далее высококвалифицированных кадров в Российскую академию наук. С Алексеем Игоревичем мы прошли дорогу длиной в 8 лет: от его поступления в лабораторию, защита сначала курсовой работы, потом дипломной работы и вот сегодня на ваш суд выносятся результаты диссертационной работы. На этом пути нам, конечно, помогали многие люди, и я хотел бы особо подчеркнуть участие двух человек. Это Алексей Валерьевич Феофанов, он нас поддержал в важный момент на дипломе, и так сложилось, что Алексей Игоревич главный исполнитель по совместному гранту Российского научного фонда теперь. И, другой человек, это, разумеется, Евгений Васильевич Гришин, который достаточно долго присматривался к Алексею Игоревичу Кузьменкову, а потом что-то такое в нем разглядел и отношение у него было к нему, в некотором смысле, отеческое. Разумеется, мы бы не смогли бы заниматься этими интересными вещами без ключевой роли Евгения Васильевича Гришина. Если говорить о человеческих качествах Алексея Игоревича Кузьменкова, то я бы выделил два, которыми я хотел бы с вами поделиться. Первое, это ему свойственно проектное мышление, то есть ему удобно и приятно находиться в условиях четко сформулированной цели и рамок временных: к такому-то времени должны быть получены какие-то результаты. Это свойство редкое, как мне кажется, в академической среде в нашей стране, но зато очень удобное с точки зрения грантовой политики в нашей стране. Второе качество – это веселый нрав, я бы даже сказал неуёмный нрав. Я уверен, что это качество замечают и ценят его друзья, оно же позволяет создать, ну такую, бодрую и приятную атмосферу у нас на этаже. Наконец, завершить свое короткое выступление, я хотел бы тезисом, что с моей точки зрения Алексей Игоревич – это сформировавшийся специалист в области биоорганической химии. Им выпущено 7 статей, достаточно приличных на наш взгляд, в 6 он является первым автором, только 5 из них вошли в данную диссертационную работу: он занимается еще и другими интересными проектами. Он лауреат стипендии Президента Российской Федерации и руководитель гранта РФФИ, я бы сказал успешный руководитель гранта РФФИ. Я говорил, что мы прошли с Алексеем Игоревичем долгую дорогу, но я уверен, что самое интересное у нас впереди. Спасибо!

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Владимир Александрович, есть отзывы на автореферат?

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Да, есть отзывы на автореферат, целых два. Значит интересно, что видно очень большой интерес вызывает эта работа, поскольку оба отзыва положительные, но в обоих указаны замечания. Я положительную часть опущу, так как это уже звучало. *(Зачитывает отзывы на автореферат, отзывы положительные, отзывы прилагаются.)* Замечания в отзыве на автореферат руководителя группы структурной биотехнологии кафедры биоинженерии, биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова, д.б.н., профессора РАН, доцента О.С. Соколовой: Автор слишком подробно описывает структуру базы данных и в частности специфические элементы управления, которые загромождают структуру автореферата. Эту часть можно было бы оставить в диссертации. Многие работы, упомянутые в диссертации, были проведены другими исследователями. Благодарности им присутствуют в конце автореферата. Однако, в процессе чтения текста трудно понять, какие конкретно исследования сделаны лично соискателем. Было бы логичнее упоминать соавторов в соответствующих разделах. Замечания в отзыве на автореферат руководителя отдела химии белка НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, д.х.н., профессора А.А. Байкова: Неспециалисту не очень понятно без объяснения, что такое CSaβ мотив. Значения

IC50 в таблице 3 следовало бы округлить до значащих цифр 2700+/-100. Выражение K⁺ каналы является калькой с английского и противоречит нормам русского языка. Статья в российском журнале почему-то приведена в английском варианте в списке публикаций.

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Пожалуйста, ответьте на замечания.

Кузьменков А.И.:

Уважаемые коллеги, что касается первого замечания, это по поводу загромождения автореферата структурными элементами базы данных Kalium. Все-таки нам кажется это уместным постольку, поскольку есть очень интересные моменты, в том числе данная база данных позволяет вам легко найти молекулу с изначально заданными свойствами. То есть по сути это некоторое достижение: вы можете найти все молекулы, действующие на те или иные калиевые каналы. Это очень важно на самом деле. Дальше, что касается благодарностей. В автореферате благодарности представлены, конечно же, всем участникам данного проекта и они выведены в конец. В основном тексте диссертации они есть и в конце, и в самом тексте. В автореферате это сделано умышленно, чтобы, в общем, сэкономить место, места не хватало. Переходя ко второму рецензенту, хочется сказать, что CS α/β , да действительно, забыли в автореферате расшифровать. В полном тексте диссертации все расшифровано, что это цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой. Что касается округления – абсолютно согласны. Что касается «калиевые каналы», буква K⁺, сейчас это общепринятый термин и в российской литературе, и кроме того я ввожу обозначение K⁺ вначале диссертации и автореферата и в общем-то это принято по нормам русского языка. И наконец, что касается иностранной статьи. Статья в Биохимия Biochemistry Moscow, она вышла лишь на английском языке: ее российская версия представлена в журнале Успехи биологической химии. Спасибо!

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Значит, переходим к выступлению официальных оппонентов. Слово предоставляется Никулину Алексею Донатовичу.

Никулин А.Д., к. х. н.:

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

Здравствуйте, дорогие члены диссертационного совета, все коллеги, я постараюсь быть кратким, поскольку время уже достаточно позднее, уже три часа мы тут с лишним располагаемся. Поэтому я бы хотел только на основных моментах диссертации остановиться вкратце, то есть я не буду рассказывать содержание, чем человек занимался. Скажу как бы свои впечатления о том, что там на самом деле самое интересное. Первое, вот о чем справедливо многие рецензенты говорили, что очень необычная структура обзора литературы. Действительно, мне на самом деле понравилось, это некая такая энциклопедическая часть, где в таком кратком сжатом виде представлены основные сведения, что из себя представляют калиевые каналы, какие есть токсины. То есть такое краткое интересное введение, но такое тезисное, своеобразное, но, тем не менее, полезное и приятное. Экспериментальная часть очень большая. Честно говоря, я не знаю, что было раньше курица или яйцо, то есть выделение токсинов из скорпионов, а потом все это организовать в базу данных, потому что результатов много в литературе, много получилось экспериментальных данных и у Алексея Игоревича, либо наоборот создание базы данных, которая подтолкнула дополнить ее из различных видов скорпионов. Это в общем-то такие достаточно пересекающиеся и параллельные вещи. Поэтому, на мой взгляд, и то, и другое очень заслуживает своего одобрения. База данных очень подробно описана в диссертации, а вот в автореферате опять-таки, как было первое замечание, по мне приведена такая подробная инструкция, как базой данных пользоваться. Поскольку диссертацию читают все-таки

меньше, чем автореферат, может это даже и удобнее. То есть получилась такая краткая инструкция пользования этой базой данных. И особым таким замечательным бантиком на фоне общей диссертации являлась, конечно, вот эта последняя, третья часть, которая представляет собой конструирование некоего такого флуоресцентного маркера калиевых каналов. Это в любом случае интересно как и с точки зрения молекулярной биологии, так и с точки зрения исследования самой природы калиевых каналов. Действительно, здесь можно исследовать, как вот Алексей Игоревич показывал, возможности конкурентного связывания, определение конкуренции различными лигандами или тем маркером, который использовался, или для того, чтобы эти калиевые каналы можно было получать в клетках или каких-то других исследуемых объектах. Вот, кстати говоря, отвечая на вопрос в чем преимущества GFP перед такими химическими маркерами, в институте биоорганической химии, насколько я знаю, вариантов GFP неимоверное количество и спектры, практически, от красного до фиолетового, поэтому, в общем-то, не очень особо сложно с точки зрения молекулярной биологии и генной инженерии создать маркеры на любой цвет. На вкус не знаю, на цвет можно точно. Таким образом, можно получить широкий спектр различных биомаркеров и использовать на одном и том же объекте различные маркеры, используя различные GFP и пришить такие различные, допустим, лиганды каналов. То есть, таким образом можно на одной клетке исследовать распределение различных каналов или, возможно, даже влияние лигандов на эти каналы. Таким образом, с моей точки зрения, диссертация очень интересная, очень полезная как в фундаментальном смысле исследования каналов, так и в прикладном значении, что не может не радовать. Сейчас это требуется все сильнее и сильнее, да вот в последнем отчете РФФИ нужно было привести значение для экономической и социальной жизни, но вот я надеюсь, что Алексей Игоревич, по крайней мере этот объект исследования поднял экономическую и социальную составляющую и в будущем тоже. Поэтому диссертация, на мой взгляд, заслуживает самой высокой оценки, и, безусловно, Алексей Игоревич достоин присуждения степени кандидата химических наук по специальности биоорганическая химия. Но, к сожалению, пункты постановления я не помню, уж извините. Спасибо!

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Спасибо, пожалуйста, ответьте на замечания.

Кузьменков А.И.:

Спасибо, уважаемому оппоненту. Да, принимая во внимание вышесказанное, можно заключить, что, конечно же, элементы управления базы данных как-то можно воспринимать по-разному, но вот нам казалось, что их включение в автореферат, все-таки, нужный момент. Я помню замечание оппонента, которое он представил в своем письменном отзыве, но сейчас, может быть, забыл о нем сказать: это по поводу участия, в общем, в создании базы данных, моего конкретно и международного участия, потому что мы ее заявляем все-таки, как некую, так скажем, международную базу данных. Почему так? Потому что в ее создании, а именно в оценке ее, не в создании, а в оценке принимали участие эксперты из различных стран: Мексика, Франция, Швейцария, что-то еще забыл, а Китай. Когда мы создали базу данных, мы показали им, они высказали свое экспертное мнение, какое-то дополнение, мы согласно этому мнению и дополнению немного адаптировали базу данных. Спасибо!

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Спасибо.

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Так у нас отсутствует второй оппонент. Но в совет поступил отзыв этого оппонента. Это директор НИИ Нейронаук Нижегородского государственного университета им. Н.И.

Лобачевского, руководитель лаборатории внесинаптической передачи Семьянов. Отзыв написан достаточно необычно, он провоцирует на то, чтобы зачитать его практически полностью, но, тем не менее, я опушу первую часть, где написано о структуре, об актуальности, потому что это звучало все уже. (*Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.*) Замечания из отзыва оппонента: Во ведении следовало бы больше внимания уделить роли трансмембранного градиента K^+ и его эволюционного происхождения. В частности, гипотеза академика Наточина Ю.В. предполагает, что протоклетки возникли в термальных источниках на суше, где концентрация K^+ высока, а уже потом вышли в океан богатый Na^+ . Клетки выработали механизмы поддержания K^+ градиента с помощью насосов, то есть с затратой энергии АТФ. Высокая внутриклеточная K^+ концентрация необходима для белкового синтеза. При этом, активация калиевых каналов приводит к выходу K^+ из клетки. Уже прокариоты научились использовать выход K^+ для передачи сигналов. В частности, K^+ сигнализация была описана в бактериальных пленках. Внутри такой пленки выход K^+ из одной бактерии приводит к деполяризации соседней и активации в ней потенциал-зависимых K^+ каналов. Роль K^+ каналов в физиологии возбудимых мембран существенно шире, чем участие в формировании потенциалов действия. Например, А-тип K^+ каналов в совокупности с спонтанно активными Na^+ каналами вовлекаются в подпороговые флуктуации мембранного потенциала интернейронов. Таким образом, у этих клеток нет стабильного потенциала покоя. Небольшой постоянный ток в данном случае приводит к большим изменениям амплитуды флуктуаций потенциала на мембране. Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы открываются при повышенной активности нейронов, в частности при эпилептиформных разрядах, таким образом, их подавляя. Стимуляция данных каналов или их избыточная экспрессия могут быть подходом к лечению эпилепсии. Однако, увеличенный выход K^+ при повышенной активности калиевых каналов способен приводить к накоплению K^+ во внеклеточной среде, развитию распространяющейся депрессии (возникает при мигрени) и судорогам. Из этого следует, что экспрессия K^+ каналов в разных типах клеток должна быть четко сбалансирована. Статистические данные представлены не в соответствии с общепризнанными нормами. В подписях к рисункам не указано, что обозначают разбросы (стандартная ошибка среднего или что-то еще). Не указано какой использовался статистический тест для оценки достоверности различий. Так же, наличие достоверных различий не обозначено. Обычно, используются звездочки: $*p < 0.05$. То же самое касается таблиц. Что за значения стоят после «±»? Диссертант пишет, что в яде пауков *Roeciliotheria fasciata* и *Pterinochilus murinus*, не было обнаружено лигандов к Kv1.3 поскольку цельные яды этих пауков не вытесняли eGFP-OSK1. Потенциально этот эффект может быть также объяснен либо более высокой константой диссоциации токсинов из яда пауков, либо очень низкой концентрацией лигандов Kv1.3 в яде пауков. При этом в работе не указано в какой концентрации добавлялся цельный яд. Отсутствует положительный контроль, показывающий действие яда пауков в данной концентрации на других системах. На рисунке 48 в названии оси Y используется сокращение, которое не было расшифровано CD8-PerCP-Cy5.5. В качестве первой причины выбора блокатора калиевых каналов OSK1 из яда скорпиона *O. scrobiculosus* указано то, что он действует на несколько изоформ Kv каналов и KCa3.1. Обычно неспецифичность лиганда рассматривается как недостаток. Почему диссертант считает это достоинством в данном случае? Почему средняя интенсивность флуоресценции обозначена Icp? Буква I обычно используется для обозначения силы тока, тогда как для обозначения интенсивности флуоресценции используется F. Так же необходимо в подписях под рисунками объяснить, что Icp обозначает флуоресценцию. С чем может быть связано отсутствие eGFP-OSK1 эффекта на Kv 1.2, который есть у OSK1? Почему изменения свойств токсина в составе химерной молекулы произошло только в отношении одного типа каналов? Ответ может быть важен для понимания работы канала. На рисунках 46 (Визуализация Kv1.3 на поверхности клеток НЕК293Т) и 47 (Локализация Kv каналов с помощью eGFP-OSK1 на вибраторных срезах мозжечка крысы) видна слабая флуоресценция

и на контрольных изображениях. С чем это связано? Нужно указать, что все изображения получены при одинаковых условиях (параметрах оптической системы). Локализация Kv каналов с помощью eGFP-OSK1 в мозжечке является очень интересным практическим результатом. К сожалению, диссертант никак не обсуждает смысл данного результата. Хотелось бы услышать интерпретацию данного результата и возможную физиологическую значимость. Еще мне непонятно как идентифицировались *pinso terminale*. Можно ли на основе eGFP-OSK1 сделать сенсор активности Kv каналов? Например, добиться того, чтобы токсин связывался с каналом только в открытом состоянии. Это бы позволило существенно расширить область применения конструкции.

Кузьменков А.И.:

Уважаемые коллеги, разрешите, я быстро отвечу на дополнения, замечания, вопросы. Что касается происхождения калиевого тока и, в общем, происхождения живых организмов, на мой взгляд, это, конечно, чрезвычайно интересный вопрос, но умышленно был оставлен за рамками данной работы: все-таки она касается скорее биоорганической химии и каких-то таких интересных аспектов. Однако, стоит отметить, что происхождение калиевых каналов до сих пор остается загадкой. Согласно современным данным первые организмы произошли в термальных источниках, где они находились на берегу в пресных условиях, скажем так или в соленых до конца не известно. И наконец, термальные источники наподобие черных курильщиков современных имеет такой широкий спектр веществ и интересный состав, что там возникают вопросы даже о различных аппаратах самих этих первых организмов, синтетических, в том числе, и других. Далее, второе дополнение, это по поводу, где калиевые каналы участвуют, это тоже очень интересный вопрос. Кажется, что калиевые каналы не необходимы для жизни, по крайней мере, одноклеточных некоторых форм: некоторые мутантные бактерии могут жить, хорошо размножаться и так далее без калиевых каналов. У некоторых в геноме их собственно и не обнаружено. Однако, существуют, например, некоторые инфузории, у которых в одной клетке, представляете, идентифицировано 300 изоформ калиевых каналов. Зачем ей нужно столько много? – Не понятно. Поэтому они (калиевые каналы) очень широко распространены и принимают участие в различных процессах многоклеточных организмов – это формирование потенциала покоя, формирование потенциала действия, это частота потенциала действия, пейсмейкерная активность в сердце и так далее. То есть, они чрезвычайно разнообразны и встречаются в очень многих биологических процессах. Далее замечания. Статистические данные, да, действительно, согласны. Использовался двухвыборочный t-критерий независимых выборок. Забыли указать интервал, забыли указать p, в общем, понятно. Дальше, что касается пауков. Это вопросу к этому слайду: мы использовали скрининговую система для того, чтобы как раз-таки показать, что в ядах пауков нет поровых блокаторов, вот яды скорпионов содержат поровые блокаторы, которые можно идентифицировать с помощью этой системы, а яды пауков, как правило, их лишены. Есть примеры, но они очень редкие. Поэтому, это своего рода, отрицательный контроль. Дальше, на рисунке 48, в общем, там используется CD8 обозначение. Это антитела к кластеру дифференцировки 8 с цианиновой меткой, краситель в дальне-красной области. И по Y-оси там интенсивность. Значит, что касается вопросов. Почему мы выбрали именно OSK, зная, что он обладает широким спектром действия. Мы сделали это умышленно, вот если вы помните, я как раз говорил о том, что молекула потеряла активность на Kv1.2 каналы, если бы мы взяли молекулу изначально селективную только лишь к Kv1.2 каналу, мы бы получили отрицательный результат – неактивную молекулу. Это первый момент. Второй момент, мы использовали молекулу с разной активностью, чтобы потом это продемонстрировать на различных образцах. Давайте дальше. Isr – ну в общем-то это достаточно общепринятое обозначение интенсивности. Почему отсутствует эффект химеры на Kv1.2? До этого встречались в литературе данные, что N-конец токсина, к которому присоединен, собственно, флуоресцентный белок, все-таки принимает участие конкретно во взаимодействии с

изоформой Kv1.2. Поэтому здесь, наверное, есть такой эффект: внесение изменений в этот конец приводит к тому, что он теряет активность. Локализация. Все эти эксперименты выполнены в одних условиях, с применением одного времени инкубации и с использованием одной и той же оптической системы и выдержек. К сожалению, забыли это указать. Что касается кластеризации калиевых каналов вдоль нервного волокна, то подобные эксперименты были проведены ранее, но с использованием антител. Здесь представлено миелинизированное нервное волокно, и здесь, вы видите, такими стрелочками обозначены кластеры расположения калиевых каналов. Собственно говоря, такое же мы видим с помощью нашего флуоресцентного инструмента. На следующем этапе, как мы идентифицировали *ripseau terminale*, так называемые, или кистевидные окончания. Это морфологическая структура, которая идентифицируется на срезах на границе двух слоев мозжечка. И здесь представлены данные визуализации *ripseau terminale* с помощью антител, а здесь с помощью нашей химеры. И наконец, можно ли сделать сенсор активности. Я приведу в качестве примера данный слайд. Здесь представлены 4 формы канала, то есть открытая, закрытая и два вида инактивированного состояния калиевого канала. Так вот химера флуоресцентного токсина, да и сами токсины, связываются с тремя вот этими состояниями и не связывается с каналами, инактивированными по С-типу. Поэтому, наверное, я ответил на все вопросы, спасибо за внимание.

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Спасибо. Диссертация открыта для обсуждения, кто хотел бы выступить в дискуссии?

Член-корр. РАН Цетлин В.И.:

Ну, для меня сегодняшняя защита – это просто абсолютно радостное событие. Потому что, во-первых, у меня есть возможность вспомнить, с чего это начиналось: работы, которые затеял Юрий Анатольевич и делал Евгений Васильевич, первичные структуры, давно-давно. Ну и может быть, не с такой позитивной ноткой вспомню, как молодежь развивалась в те годы, а сегодняшняя защита показывает новое время, новую жизнь института, новые возможности. И это во всем: это сначала было выступление диссертанта, который нам показал прекрасную работу, просто какое слово подобрать? – для меня это слово «восхитительно», просто работа восхитительна. Это самое правильное слово. Это раз. В ней все этапы, все уложено, виден громадный труд. Что еще? Это веяния сегодняшнего времени: то, в какой абсолютно свободной манере и как понятно он нам всем это все рассказал. Еще что мне понравилось в диссертанте: ну некая такая твердость, не каждый выходящий на эту трибуну в этот волнительный день будет выдвигать свои доводы весьма уважаемым оппонентам и очень обоснованные, очень справедливые, хорошим голосом. И что еще мне понравилось – это, действительно, часть времени. Руководитель вышел не из предыдущих эпох, такой вялый, грустный какой-то, а вышел фактически, я их бы так не различил, кто из них старше, кто моложе. И это все очень хорошее выступление Саши Василевского. Я не совсем соглашусь с его выступлением, значит, он похвалил нашего диссертанта за то, что он идеально работает, что дайте ему план, что к такому вот сроку надо сделать то-то. Ну, я думаю, что это легкое преувеличение, это то, что нравится ФАНО, не знаю, РАНО или кому еще-то: наш институт будет работать, дайте нам дату, скажете, что делать – мы сделаем. Значит, это не так, потому что такая работа такого не позволяет. Значит, я заканчиваю свое, может быть, чрезмерно эмоциональное выступление. Я очень рад сегодняшней защите, сегодняшнему дню, кстати, я уже говорил, что это отражение еще того, что институт наш молодеет. Совет молодых специалистов очень многое поменял. Завершаю. Конечно, я буду голосовать за то, чтобы присвоить вот эту степень, химических наук, да там? И очень призываю всех присутствующих в зале людей сделать то же самое.

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Спасибо. Еще есть желающие выступить? Нет. Тогда заключительное слово.

Кузьменков А.И.:

Уважаемые коллеги, опять же быстро. Я хотел бы поблагодарить всех людей, причастных к этой работе. Прежде всего, научного руководителя Василевского Александра Александровича за титаническое участие в этом проекте, также Гришина Евгения Васильевича и весь наш отдел, соответственно и лабораторию. Также моих оппонентов, которые заинтересовались, прочитали и задали соответствующие вопросы, людей, которые предоставили отзыв на автореферат, ведущую организацию, отдельно Тихонова Дениса Борисовича. Также отдельно хочу поблагодарить преподавателей Брянского городского лицея за их, в общем-то, фундаментальное участие, преподавателей МГУ и также преподавателей Учебно-научного центра за профессиональную ориентацию. Кроме того, неоценимую поддержку во всем этом проекте оказали мои родители, брат и многочисленные друзья, которые, в общем-то, серьезно поддерживали на протяжении всего этого времени. Спасибо!

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Спасибо. Сейчас мы переходим подсчету и голосованию, и просьба не расходиться.

(Проводится голосование.)

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Значит, у нас счетная комиссия закончила работу, Владимир Александрович сейчас нам доложит результаты.

Уч. секретарь, д. ф.-м. н. Олейников В.А.:

Заседание диссертационного совета по рассмотрению диссертации Кузьменкова Алексея Игоревича. Результаты работы счетной комиссии. Присутствовало на заседании 21 член совета, роздано бюллетеней - 21, оказалось в урне - 21, «За» - 21. «Против» - нет, недействительных - нет.

Зам. председателя, член-корр. РАН Липкин В.М.:

Предлагается утвердить решение по результатам счетной комиссии. Единогласно, спасибо. И опять же по заключению диссертационного совета, есть ли замечания по заключению? – Тоже нет. *(Замечаний по проекту заключения диссовета нет. Проект заключения принимается единогласно)*. Теперь поздравим наших диссертантов.

Зам. председателя
диссертационного совета
член-корр. РАН

Липкин Валерий Михайлович

Ученый секретарь
диссертационного совета
Доктор физ.-мат. наук



Олейников Владимир Александрович