



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
04 октября 2017 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Злобовской Ольги Анатольевны

**Методы светозависимой активации и детекции клеточной гибели
с помощью флуоресцентных белков**

специальность 03.01.03 – молекулярная биология

Москва 2017

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 04 октября 2017 года.

Председатель диссертационного совета академик РАН **Иванов В.Т.**
Ученый секретарь диссертационного совета д. физ.-мат. н. **Олейников В.А.**

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов наук по профилю диссертации - 7.

1.	Иванов Вадим Тихонович	академик РАН, д.х.н.	02.00.10
2.	Ефремов Роман Гербертович	д.физ.-мат.н., проф.	02.00.10
3.	Олейников Владимир Александрович	д.физ.-мат.н.	03.01.06
4.	Арсеньев Александр Сергеевич	д.х.н., проф.	02.00.10
5.	Бовин Николай Владимирович	д.х.н., проф.	03.01.06
6.	Габибов Александр Габибович	академик РАН, д.х.н.	03.01.06
7.	Деев Сергей Михайлович	чл.-корр. РАН, д.б.н.	03.01.03
8.	Дзантиев Борис Борисович	д.х.н., проф.	02.00.10
9.	Долгих Дмитрий Александрович	д.б.н., проф.	03.01.03
10.	Завриев Сергей Кириакович	чл.-корр. РАН, д.б.н.	03.01.06
11.	Зарайский Андрей Георгиевич	д.б.н., проф.	03.01.03
12.	Зубов Виталий Павлович	д.х.н., проф.	03.01.06
13.	Лукьянов Сергей Анатольевич	академик РАН, д.б.н.	03.01.03
14.	Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, д.х.н.	03.01.06
15.	Мурашев Аркадий Николаевич	д.б.н., проф.	03.01.06
16.	Патрушев Лев Иванович	д.б.н., проф.	03.01.06
17.	Сапожников Александр Михайлович	д.б.н., проф.	03.01.03
18.	Свердлов Евгений Давидович	академик РАН, д.х.н.	03.01.03
19.	Уткин Юрий Николаевич	д.х.н., проф.	02.00.10
20.	Формановский Андрей Альфредович	д.х.н.	02.00.10
21.	Шахпаронов Михаил Иванович	д.х.н.	02.00.10
22.	Шпаковский Георгий Вячеславович	д.б.н.	03.01.03

В.Т. Иванов: И так, у нас сегодня на повестке дня две защиты. Обе готовили через господина Лукьянова Константина Анатольевича. И все, значит, вполне, такая, традиционная повестка дня. Есть какие-то соображения по поводу повестки дня у членов диссертационного совета? Принимаем. Видимо, добавлять нечего. Действуем. Первая защита – Ольга Анатольевна Злобовская. Материалы дела нам доложит ученый секретарь.

В.А. Олейников:

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

В.Т. Иванов: Есть ли вопросы, замечания, исправления? Как правило, не бывает. Данный случай не исключение. Даю слово диссертанту: Ольга Анатольевна, двадцать минут на доклад.

Злобовская О.А.: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

В.Т. Иванов: Спасибо за доклад. У кого есть вопросы?

Ф.В. Субач: Спасибо большое за доклад. У меня вопрос по первой части работы. Непонятно, почему вы варьируете только донор, а акцептор не варьируете. Пробовали ли вы вообще какие-то другие инфракрасные белки?

В.Т. Иванов: Вы повторите вопрос, чтобы все слышали, я уверен, что не все слышали. Нет, я не вас прошу, я диссертанта, у нее микрофон.

Ф.В. Субач: А еще варьировали ли вы линкер между донором и акцептором? Спасибо.

О.А. Злобовская: Я повторю вопрос. Первая часть вопроса. Варьировали ли мы акцепторы при разработке сенсора на активность каспазы? Второй вопрос, варьировали ли мы линкер между донором и акцептором?

Начну с ответа на второй вопрос. Нет. Мы линкер не варьировали. Мы взяли линкер, который был успешно применен для создания другого сенсора на активность каспазы-3. И оказалось, что сенсор получился вполне успешным, продемонстрировал 50% рост сигнала в клетках млекопитающих.

Поварьировали ли мы акцептор. Нет, мы его не варьировали. На момент начала работы в ближне-инфракрасной области спектра был только один подходящий для клеток млекопитающих белок, это iRFP. Чуть в более позднее время из него была получена мономерная форма; вот эта – димерная, но мы уже начали работу с димерной и завершили весь цикл от начала до конца именно с ней.

В.Т. Иванов: Спасибо. Есть еще вопросы?

Д.А. Долгих: Вы говорили о таком эффекте, как образование фокусов. Правильно ли я понимаю, что какие-то агрегаты идут, да? Агрегаты белков. Но при этом, вы сказали, что это не мешало дальнейшей работе в данном случае. Обозначает ли это, что эти агрегаты так же эффективно расщеплялись? Или, может быть, эффект шел за счет тех белков, которые в агрегаты не шли?

О.А. Злобовская: Еще раз, да, повторить вопрос?

В.Т. Иванов: Желательно.

О.А. Злобовская: Вопрос был по поводу образования фокусов. По поводу их природы и на основании чего они не мешали дальнейшей работе.

Природа образования фокусов не до конца ясна. Можно сказать, что мы в самом начале пути изучения. Скорее всего, это действительно агрегаты сенсоров, поскольку при активации каспазы-3 их эффективно расщепляли. Надо сказать, что в областях этих фокусов эффект FRET был несколько более высокий, скорей всего из-за повышенной концентрации, из-за этого FRET усиливался. Таким образом, при расщеплении, интенсивность эмиссии донора еще более эффективно нарастала. А, собственно, здесь приведен график изменения сигнала и он, в общем, не отличается по своей высоте, от той, которую обычно получали для сенсора, в том числе, основанном на mKate2. Так что, да, скорей всего это агрегаты сенсора, поскольку в случае и донора FP650, и iRFP – это димерные белки. Когда в одном сенсоре получается целых два димерных белка, это возможно, действительно приводит к образованию агрегатов.

Н.В. Бовин: Как вы думаете, можно ли этот сенсор использовать в качестве рутинного инструмента для исследования апоптоза? Если да, то, какие это дает преимущества? Скажем, можно ли исследовать кинетику апоптоза, можно ли его зафиксировать на более ранних стадиях, чем при использовании других методов.

О.А. Злобовская: Я хотела уточнить, это было по поводу сенсора, основанного на FP650? Да? Тогда... Когда я впервые столкнулась с этим явлением - формированием фокусов, особенно когда обнаружилось, что они формируются при стрессе, я подумала, что может быть сенсор можно использовать в качестве сенсора на плохое самочувствие клетки. Но, к сожалению, эти явления образуются лишь в части клеток, а не во всех. То есть, примерно, 30% клеток образуют подобное скопление. И не все клетки, которые формировали фокусы, при этом уходили в последствие в апоптоз, за время съемки, по крайней мере, которая шла в течение 12 часов. Поэтому, боюсь, что пока природа этого явления не до конца ясна и пока она не унифицирована, не распространяется на все клетки, его нельзя так отдельно использовать.

В.Т. Иванов: Вопросы иссякли? Еще есть?

Ф.В. Субач: Во второй части вы сказали, что... в случае митохондриальной локализации у вас был более высокий фототоксический эффект, чем в мембранной. У вас есть какие-то идеи, почему?

В.Т. Иванов: Повторите, да!

О.А. Злобовская: Вопрос был о том, почему митохондрии привели к более активному фототоксическому эффекту, чем мембранная локализация фотосенсибилизатора.

Митохондрии – это, в принципе, излюбленная мишень для фотосенсибилизаторов. Более хрупкий инструмент, точнее, более хрупкая локализация. Если в клетке испорчено функционирование митохондрии, это достаточно быстро приводит к клеточной гибели. А в случае мембранной локализации требуется и большая мощность освещения, и зачастую более высокая экспрессия фотосенсибилизаторов. Это известные данные из литературы, поэтому обычно фотосенсибилизаторы нацеливают, чаще всего, на митохондрии, если хотят вызвать клеточную гибель.

В.Т. Иванов: Еще вопросы!

С.К. Завриев: Скажите, я вот просто не знаю, наверно Вы знаете. В чем заключается механизм действия фототоксичности? Какая цепочка там происходит, в результате чего происходит...?

О.А. Злобовская: Существует два типа фотосенсибилизаторов. Те, которые приводят к образованию синглетного кислорода, но это не данный случай, это фотосенсибилизатор miniSOG; и те, кто приводят к образованию различных радикалов и гидроперекисей. Считается, что KillerRed приводит к образованию пероксида водорода и супероксид анион-радикала, и дальше они запускают цепь окислительных реакций в клетке. Причем в зависимости от локализации действуют на различные мишени: и перекисное окисление липидов может быть, и окисление ДНК, если направить его в ядро. И на белки, естественно тоже, это действует, поскольку существует метод инактивации белков-мишеней. Такой окислительный каскад выводит из строя как белки домашнего хозяйства, так и мембранные. И мне кажется, что в случае митохондрии чаще всего повреждения настолько разрушительны именно из-за изменения проницаемости мембраны. Вот.

В.Т. Иванов: Больше вопросов не вижу. Спасибо! Можете отдохнуть ненадолго. Переходим к зачитыванию отзыва ведущей организации.

В.А. Олейников: Ведущая организация здесь у нас - Институт белка, Российская академия наук. Отзыв ведущей организации положительный полностью. Я постараюсь как-то суммировать, что он отражает.

(Зачитывает отзыв, отзыв прилагается).

Вначале общее. Что «понятно, что технологии, связанные с флуоресцентными белками, сулят революционные изменения и стратегии, и как следствие, революционные же результаты. И рассматриваемая диссертационная работа Злобовской служит ярким примером исследований, использующих возможности флуоресцентных белков, как для направленного воздействия на избранные клетки фототоксичными белками, так и для определения путей клеточной гибели, воздействием, вызванным соответствующими

белками. Работа Злобовской без преувеличения находится в авангарде разработок исследовательских технологий. Результаты могут оказаться чрезвычайно полезными для развития методов фотодинамической терапии онкологических заболеваний. И очевидно, что это аспект работы диссертанта чрезвычайно важен, и со своей стороны добавляет полученным результатом актуальности.

Диссертация четко разделена на две части, посвященные разным, но логически тесно связанным задачам. В первой части разработан метод активации клеточной гибели, а вторая часть посвящена обнаружению апоптоза как способа клеточной гибели, с помощью сенсора на активность каспазы-3. Интересно, что Злобовской и соавторами действительно впервые был создан сенсор активности каспазы-3, работающий в дальнекрасной-ближнеинфракрасной области спектра, благодаря входящему в состав сенсора белка iRFP.

Надо отметить, что начало работы посвящено созданию оружия для умерщвления клеток с помощью белков-генераторов активных форм кислорода. А ее завершение – конструированию инструмента для определения, каким путем клетки погибали: апоптоз или некроз. Этот инструмент пригоден, разумеется, для детекции апоптоза и в случае других способах активации клеточной гибели.

Результаты этой работы выявили неожиданный эффект. Наличие результатов, отличающихся от ожидаемых авторами, это верный признак настоящей научной работы, чреватой открытиями. То, что всеми ожидается и следует из логики, открытием не может быть по определению. Обнаружение Злобовской и соавторами асинхронности в процессе миграции протоапоптотического белка Вах в митохондрии и начала работы каспазы-3 указывает на возможность прямой активации каспазы-9 стауроспорином. Кроме этого, окисление цитоплазмы при использовании разных реагентов, вызывающих клеточную гибель, не коррелирует по времени с активацией каспазы-3.

Эти неожиданные находки автора диссертации предполагают возможно неточное или ошибочное представление современными исследователями о событийных реалиях в процессе апоптотической гибели клетки. Вполне вероятно, что применение созданного Злобовской и соавторами сенсора каспазной активности может в дальнейшем привести к смене парадигмы в этом чрезвычайно важном разделе молекулярной биологии.

Переходя к анализу текста диссертации, можно утверждать, что она построена в соответствии с традициями (и дальше перечисляются разделы текста). Всяческих похвал достойны главы введения, обзор литературы. Первый из упомянутых полностью отвечает названию диссертации, в ней даны четкие определения, ясно сформулирована постановка проблемы. Обзор литературы написан кратко, ясно, глубоко. Раздел материалы и методы

написан кратко, но тщательно, с упоминанием всех необходимых деталей экспериментов и методик. Примененные автором диссертации методы всегда полностью соответствовали решаемой задаче и приводили к ее эффективному решению. Кроме того, как следует из приведенного иллюстративного материала, техническое качество результатов диссертации довольно высокое, что говорит об экспериментальном мастерстве автора. Изложение результатов читается с большим интересом, воспринимается легко.

Замеченные мной недостатки диссертации Злобовской вряд ли достойны упоминания, они малозначительны, легко поправимы с помощью редакторской правки. Так, в русском отсутствует глагол «мониторить», его употребления следовало бы избегать, так же глагол «разводить» не полностью синонимичен глаголу «разбавлять», особенно в современном русском. И автору следовало бы использовать именно второй вариант этого слова. Также в тексте Злобовской нашлась терминологическая вольность, клеточные тельца, использованные вместо телец включения. Вообще же в тексте совсем немного опечаток, нет грамматических ошибок, хотя стилистические изредка встречаются. Чуть более существенным недостатком представляется запаздывание с расшифровкой аббревиатур. Появившаяся на пятой странице аббревиатура CALI расшифровывается только на 28 странице. Разумеется, это небольшие огрехи, которые не мешают восприятию текста и совершенно не снижают качество полученных результатов.

Несколько разочаровывает неупоминание в выводах диссертации обнаруженного отсутствия корреляции по времени между активацией каспазы и миграции белка Вах, а также окисления цитоплазмы. Это немного обедняет выводы; вероятно, осторожность и требовательность автора диссертации к всесторонним контролям помешали включить обнаруженные явления в выводы работы.

Подводя итог, следует признать, что к защите представлено хорошо продуманное и удачно спланированное, отлично выполненное и хорошо изложенное исследование. Выводы хорошо сформулированы, обоснованы, корректно отражают полученные результаты.

Результаты диссертации могут быть использованы...» (и перечислена целая серия зарегистрированных учреждений), концовка нравится, «и в других профильных институтах России и мира. Актуальность и новизна полученных данных, передовой методический уровень исследования позволяют прийти к заключению о том, что диссертационная работа Злобовской Ольги Анатольевны соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней. Обзор обсужден, а сама диссертантка, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 молекулярной биологии. Отзыв обсужден

и одобрен на семинаре в лаборатории механизмов биосинтеза института белка Российской академии наук». Вот еще интересно, подписано: доктор биологических наук, директор института белка РАН; утверждено заместителем директора института белка, Никулиным.

В.Т. Иванов: Спасибо. Там были замечания, мониторить, разводить. Соглашаемся либо же оспорим?

О.А. Злобовская: Да, я согласна с замечаниями по поводу терминологических вольностей, в дальнейшем постараюсь их избегать; равно как и своевременно расшифровывать аббревиатуры. А по поводу не упоминания в выводах некоторых обнаруженных явлений, связанных с порядком апоптотических событий: действительно, мы находимся лишь в начале пути изучения. То есть, какие-то интересные несостыковки обнаружены, но требуется проверить это более тщательно для уверенного утверждения на эту тему. Спасибо.

В.Т. Иванов: Спасибо. Далее по процедуре у нас руководитель научный имеет право охарактеризовать диссертанта. Константин Анатольевич?

К.А. Лукьянов: Дорогие коллеги, Оля пришла к нам очень давно, я уже не могу вспомнить, когда. Она как будто всю жизнь у нас работает.

В.Т. Иванов: Было сказано.

К.А. Лукьянов: Да, да. Я боюсь, даже до того было. Не отмечено официально, но она еще студенткой ходила к нам. И у нас на глазах она выросла очень сильно, что хочется отметить. Она пришла с таким задором и блеском в глазах. И этот блеск до сих пор есть, но она из такой студентки-девочки превратилась в исследователя, совершенно готова к самостоятельной работе, но все равно горит интересом. Очень нравится это все, я прошу вас поддержать эту работу.

В.Т. Иванов: Спасибо. Реферат не вызвал дискуссий. Тогда переходим к официальным оппонентам. Омар Леванович Кантидзе, Институт биологии гена.

О.Л. Кантидзе: Добрый день, уважаемые коллеги. Обычно я выступаю вторым оппонентом и сразу перехожу к замечаниям, но придется сказать и что-то хорошее; действительно можно говорить об этой работе, много чего хорошего сказать.

(Излагает отзыв; отзыв положительный, отзыв прилагается)

Ни для кого не секрет, что Институт биоорганической химии является одним из лидеров в области получения, изучения, использования и фототоксических белков флуоресцентных, и просто флуоресцентных белков. Конечно, если посмотреть сейчас на статьи, касающиеся KillerRed-а и других фототоксических белков, сразу бросается в глаза, что вариантов и их использования, по крайней мере, для исследования для изучения тех или иных процессов, протекающих в клетке, очень много и они все появляются новые и

новые. Не знаю, сможем ли и будем ли когда-нибудь лечить с использованием генетических фотосенсибилизаторов, но вот то, что мы сможем их использовать для фундаментальных исследований, это совершенно точно. И в данном аспекте, конечно, получение новых, более стабильных, более удобных и более ярких белков, и характеристика существующих, является, безусловно, очень актуальной и важной задачей. Вторая часть работы посвящена каспазе-3, созданию сенсоров на каспазу-3; и, в общем, эта область, наверное, является одной из самых конкурентных. Я даже, наверное, собьюсь, и пальцев двух рук не хватит, чтобы пересчитать все имеющиеся коммерчески доступные, сенсоры, именно работающие на изменение активности каспазы-3. Даже в России созданы, не только в вашем институте, такие сенсоры; и даже на таком фоне совершенно очевидно, почему надо было делать такой сенсор, чем он лучше и в каких случаях он действительно может спасти ситуацию исследователя в его работе. Поэтому, в общем, тут никаких проблем ни с актуальностью, ни с оригинальностью, ни с интересностью полученных данных у этой работы нет.

Мне бы хотелось отметить очень хороший обзор литературы, который состоит из двух частей, каждая из которых посвящена одной части работы: созданию сенсора, другая часть посвящена фототоксическим флуоресцентным белкам, и обе эти части очень грамотно подают материал, подводя читающего к проблеме, почему нужно было делать именно то, что сделал в данном случае диссертант. Из таких минимальных замечаний мне бы хотелось отметить, что можно было бы часть обзора, посвященного генетически кодируемым фотосенсибилизаторам дополнить и описанием различных применений не только производных KillerRed-a, но и другого генетически кодируемого фотосенсибилизатора miniSOG. Этих работ не очень много, и это бы расширило, показало бы спектр возможного использования всех генетически кодируемых фотосенсибилизаторов. Вторая часть работы, литобзора, где речь идет о создании сенсора, о существующих сенсорах и о том, как эти сенсоры можно использовать, в каких случаях какой из них лучше, также подводит читателя к постановке задачи и к проблеме, которая решается созданием именно такого ближнеинфракрасного сенсора на активность каспазы-3.

В материалах методов тоже все хорошо, там большое количество приводится методик, которые были использованы в ходе работы. Местами там не очень понятно иногда, каким образом происходил дизайн эксперимента. Не вполне, в некоторых пунктах, 2.2.3.7, не вполне понятно через какое время после светозависимой индукции фотосенсибилизаторам проводили цитофлуориметрический анализ, но, в общем, это становится более-менее ясно, когда читаешь результаты, подписи к картинкам и так далее.

Раздел «Результаты» также представлен в виде двух обособленных глав, и здесь все описано очень логично. Я не буду повторять результаты, потому что они были очень хорошо доложены, на мой взгляд, во время доклада.

Перейду к небольшим замечаниям, которые возникли у меня по дизайну экспериментов некоторых... и по представлению некоторых данных. Во-первых, вот, в части, касающейся фототоксичности, у меня возник вопрос по эксперименту в анализе токсичности белка KillerOrange. Дело в том, что для анализа цитотоксического действия автор использует цитофлуориметрический анализ клеток, подвергнутых действию активирующего света и затем проинкубированных в течение более чем 24 часов. В качестве внутреннего контроля, использует клетки, экспрессирующие EGFP. На мой взгляд, в таком случае, при такой постановке эксперимента, есть определенная вероятность, что разница, особенно небольшая в некоторых случаях, в количестве клеток, экспрессирующих фотосенсибилизаторы и не фототоксические флуоресцентные белки, может быть обусловлена не тем, что KillerOrange приводит к гибели клеток, а тем, что активация KillerOrange в этих клетках приводит к транзистентной... транзистентному аресту клеточного цикла.

Далее, в разделе 3.2.3.1 автор пишет, что FRET-сенсоры, созданные в этой работе, иногда склонны к формированию ярких фокусов; о них уже спрашивали и отмечали их образование. Действительно, не понятно, что они из себя представляют; и один из возможных вариантов, который можно было бы и проверить, это не так сложно, а с другой стороны, хотя бы можно было бы обсудить, это то, что такие фокусы могут являться признаком запускаемой аутофагии. Например, такого, достаточно... одного из субтипов аутофагии, агрефагии, когда белки агрегируются и непротеосомно от них клетка пытается избавиться. Может быть, это не так, потому что некоторые микрофотографии, на которых речь идет об фокусах, вообще-то фенотипически похожи на апоптоз, более-менее обычный, но поскольку всех эти фокусы интересуют, и О.А. Злобовская пишет, что можно было бы их использовать в качестве такого стресс-сенсора на просто плохое состояние клетки, действительно можно разобраться с этим вопросом и обсудить его более детально.

Есть небольшая проблема с представлением материалов, а именно с подписями к картинкам, крайне лаконичны и мало информативны. Мне кажется, что подписи к картинкам, это особый жанр, они должны быть абсолютно самодостаточны, а здесь это, к сожалению, в большинстве случаев не так. Например, на рисунке 35 и 38 не понятно, что из себя представляют подписи, что из себя представляют диаграммы. Не обозначены подписи на осях и из легенды так же это не очевидно. На рисунках 37, 42, 43, 46 и так далее не ясно, какие были условия микроскопирования, условия возбуждения

флуоресценции, это не сказать, что очень важно, но в случаях данных представленных на рисунках 42 и 43 это немного мешает самостоятельной интерпретации данных.

Кроме того, не всегда удачен выбор микрофотографий для представления данных, особенно, в случае с белком Вах, сегодня были фотографии лучше, те, которые были в диссертации по ним очень сложно понять, когда действительно происходит транслокация. И тут надо быть очень смелым экспериментатором, чтобы поставить силой воли точку, что она происходит вот здесь. По этим фотографиям, не взял бы на себя ответственность, выбирать точку транслокации. Вообще хорошо бы такие процессы как-то автоматизировать и доверять это машине, при обработке больших количеств изображений клеток, но пока – как есть.

Надо сказать, что мы с Ольгой Анатольевной подробнейшим образом обсудили все эти вопросы. И в общем, я получил все возможные ответы и можно сказать что тут нет никаких проблем с этим, и более того, все эти замечания, они нисколько не снижают высокого уровня этой работы и полученных данных. Поэтому, в заключение, я могу единственное сказать, что работа сделана на очень высоком уровне, действительно, и данные, полученные, будут востребованы потому, что наука сейчас активно развивается. Она всегда развивалась, с момента появления и сейчас темпы не снижаются. Сама О.А. Злобовская – высококвалифицированный исследователь, который заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. У меня все. Спасибо.

В.Т. Иванов: Спасибо.

О.А. Злобовская: Тут было высказано много замечаний. Начну с формулировки в материалах и методах. Фраза звучала так: на следующий день клеткам заменяли... через 24 часа заменяли среду на свежую, на следующий день проводили анализ с помощью проточного цитофлуориметра. Для меня это было достаточно очевидно, но видимо, следовало сформулировать несколько еще более точно и сказать точное количество часов, которое прошло между учением и анализом на цитофлуориметре.

По поводу фототоксического эффекта: действительно в данной постановке невозможно отделить гибель клеток от остановки клеточного цикла. Но это и не являлось задачей данной работы, поскольку и то, и другое является следствием фототоксического эффекта фотосенсибилизаторов.

По поводу фокусов: да, действительно, это очень интересное явление, и мне кажется, что все-таки это не аутофагосомы, потому что аутофагосомы окружены двойной мембраной, они бы тогда не выпускали добычу, и сенсоры... фокусы не исчезали бы при активации каспазы-3, потому что она не смогла бы проникнуть в органеллу. Также они бы

не рассасывались при переводе клеток из неоптимальной среды в оптимальную, потому что у аутофагосомы свой уровень pH.

По поводу подписи к рисункам, признаю, подписи были краткие. Они содержали название каналов флуоресценции, а при этом сами цифры касательно фильтров были приведены в материалах и методах. Стоило привести эту информацию непосредственно к подписям рисунков, и в дальнейшем я буду делать именно так, и уже исправилась на уровне этой презентации.

По поводу микрофотографий, действительно, качество немного пострадало, особенно при переводе в панель СМҮК. Но в данной презентации использованы те же самые фотографии, которые были использованы в диссертации в качестве рисунков, просто они были увеличены. И, видимо, в дальнейшем нужно помещать более крупные изображения и тщательнее следить за качеством печати. Вроде, на все ответила?

В.Т. Иванов: Все у вас? Спасибо. Второй оппонент сейчас не мог присутствовать, будучи в командировке, поэтому Владимир Александрович сейчас изложит суть отзыва.

В.А. Олейников: Значит, официальный оппонент – это заведующий лабораторией структурной динамики и стабильности фолдинга белков Института цитологии Российской академии наук Туроверов. И вот, значит, что он пишет. Сразу скажу, отзыв полностью положительный. *(Зачитывает отзыв; отзыв прилагается)*

Довольно большая часть посвящена рассказу, а что именно в диссертации. Ну, вот по сути следующее: «Объединены два направления исследования в диссертационной работе, о которых уже говорилось: изучение процесса клеточной гибели и общий инструмент исследования использования GFP-подобных флуоресцентных белков, как для активации процесса клеточной гибели, так и при создании сенсоров для регистрации этих процессов. Изучение свойств белков существенно...», тут перечислен KillerRed, KillerOrange, SuperNova, SuperNova-2... «существенно как для научных исследований процессов гибели клеток, так и в принципе в медицине для прицельного уничтожения клеточных популяций. Эти исследования в рамках диссертационной работы, несомненно, актуальны. Диссертационная работа построена по общепринятому плану...» Далее перечисляется, какие разделы есть, литературный обзор. «Представленный Ольгой Анатольевной Злобовской, хорошо написан, хорошо проиллюстрирован. Обзор несомненно имеет самостоятельную ценность и может быть рекомендован для студентов и молодых специалистов. Вторая глава посвящена описанию материалов и методов. Впечатляет обилие генно-инженерных и молекулярно-биологических методов, которые необходимо было освоить и использовать автору для выполнения работы.

«Глава третья. Основные результаты работы и их обсуждение». Здесь очень подробно рассмотрены аспекты этой работы, и вот на счет замечаний. «У меня нет серьезных замечаний по сути работы. Хотелось бы обсудить установленный автором факт неравномерного распределения сенсоров на каспазу-3»... названия этих сенсоров... «в цитоплазме клеток СТ26 и НЕК293. Автор сообщает, что в этих клетках могут формироваться яркие фокусы, распределенные по цитоплазме. Автор отмечает, что если клетка находится в питательной максимальной среде, то фокусы возникают редко, не более 0,5% клеток. Фокусы появляются при обрабатывании клеток стауроспорином или смене среды обитания на раствор с питательными веществами, а также, на раствор с рН, отличающимся от физиологического значения, как в меньшую, так и в большую сторону. В последних двух случаях фокусы исчезают, и сенсоры вновь распределяются равномерно по цитоплазме через несколько минут после возвращения клеток в питательную среду с рН 7.4. Автор сообщает, то природа формирования фокусов до конца не ясна и предполагает, что это агрегаты сенсора, поскольку оба белка и доноры акцепта в составе химерного являются димерными. Возможно, однако, что дело не в димерном характере донора и акцептора, а в том, что в условиях макромолекулярного краудинга в клетке при стрессе могут возникать немембранные образования, с гораздо большей концентрацией клеточных компонентов. Не обусловлены ли яркие образования, которые автор называет фокусами, неоднородностью внутриклеточной среды?»

К недостатку работы можно отнести не слишком хорошее изложение материалов, встречается много неудачных фраз, вот некоторые:

Страница 4: Постепенно флуоресцентная палитра пополняется белками из других семейств, требующими дополнительные кофакторы для образования функционального хромофора, но зато позволяющими приблизиться к инфракрасной области спектра. Страница 4: Дальнекрасная и инфракрасная области спектра флуоресценции особо актуальны для работы на уровне целых организмов, поскольку свет в данной области меньше всего поглощается и рассеивается тканями. Страница 4. ...текущие (вместо "существующие в настоящее время") фотосенсибилизаторы – в продолжении изучения и возможном улучшении их свойств. Страница 5. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи. Страница 84. При вызывании клеточной гибели с помощью фотосенсибилизатора необходимо не просто добиться смерти клетки, а вызвать определенный тип клеточной гибели. Страница 84. В значительном количестве клеточных культур... (вместо "для большинства клеточных культур"). Страница 105. Отслеживание изменения кислотности среды и активности каспазы-3 при активации апоптоза стауроспорином и цисплатином....

Конечно, во всех случаях можно понять, о чем идет речь, но лучше стараться излагать материал литературным русским языком. В прочем эти замечания касаются в основном оформления диссертации и изложения материала, и не ставят под сомнение научные результаты, полученные в работе.

Автореферат диссертации адекватно отражает содержание проделанной работы. Сделанные выводы достоверны, четко сформулированы, основные материалы диссертационной работы опубликованы в российских и международных научных журналах, и в целом диссертационная работа Злобовской полностью соответствует требованиям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата педагогических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология». Оппонент – зав. лабораторией из института цитологии Туроверов, доктор физ.-мат. наук.

В.Т. Иванов: Спасибо. Будут какие-то пожелания?

О.А. Злобовская: И снова по поводу образующихся фокусов: действительно возможно данное явление связано с неоднородностью клеточной среды, однако я думаю, что димерное состояние белка-донора и белка-акцептора определено в этом играет какую-то роль, потому что для сенсора, основанном на мономерном mKate2, подобных фокусов не образовывалось. По поводу замечаний в стилистических ошибках, признаю, были, постараюсь в дальнейшем избегать.

В.Т. Иванов: Спасибо. Мы прошли по заготовленной части введения. Кто хотел бы принять участие в общей дискуссии, добавить к тому, что вы слышали, пожелания по поводу голосованию? Или всем все ясно? Сергей Анатольевич, прошу.

С.А. Лукьянов: Я, поскольку в начале работы участвовал, то хочу сказать, что Оля характеризоваться может как очень собранный, очень такой человек волевой, целеустремленный, и меня только позитивные впечатления от работы ее, поэтому я призываю поддержать данную работу. Спасибо.

В.Т. Иванов: Понятно. Есть какие-то другие точки зрения? Мне кажется, ситуация ясна, и мы можем спокойно двигаться дальше. Отвечает самым современным высоким требованиям. Двигаемся дальше, нет возражений? Дальше надо было бы выбирать счетную комиссию, голосовать. А по поводу счетной комиссии, есть предложение, подготовленное, без имен, отчеств и регалий, Долгих, Шпаковский и Олейников. Есть ли отводы, самоотводы? Есть ли возражения по составу счетной комиссии? Считаю, счетная комиссия избрана. Перед тем, как объявлять перерыв, даю слово диссертанту для заключения, озвучить какие-то свои предложения, соображения.

О.А. Злобовская: Я хотела бы выразить благодарности. В первую очередь – научному руководителю Константину Анатольевичу Лукьянову, своим оппонентам Омару

Левановичу Кантидзе и Константину Константиновичу Туроверову, ведущей организации – Институту белка и особенно Вячеславу Адамовичу Колбу. Отдельно хотелось бы поблагодарить своих коллег, особенно Катю Серебровскую, Карена Саркисяна, Диму Горбачева, Сашу Мишина, Лешу Гаврикова, Лешу Котлобая. Спасибо всем, кто пришел меня послушать и поддержать, отдельное спасибо семье и... спасибо за внимание.

В.Т. Иванов: Спасибо. Есть предложение обсудить проект заключения по диссертации.

(Проходит обсуждение проекта заключения, вносят предложения С.К. Завриев и Н.В. Бовин)

В.Т. Иванов: Уважаемые коллеги, объявляется перерыв на голосование.

(Проводится тайное голосование)

В.Т. Иванов: Попрошу внимания, счетная комиссия отработала.

В.А.Олейников: Счетная комиссия отработала. И, значит, по поводу... Злобовская Ольга Анатольевна. На заседании присутствовали 22 члена диссертационного совета, роздано бюллетеней – 22, оказалось в урне бюллетеней – 22, за – 22, против – нет, недействительных – нет. Давайте утвердим вот это.

В.Т. Иванов: Хорошо, кто за то, чтобы утвердить результаты голосования? Есть ли возражения? Принято.

(Далее проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета. Проект заключения принимается единогласно).

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



(Handwritten signature of V.T. Ivanov)
академик РАН Иванов В.Т.

(Handwritten signature of V.A. Oleynikov)
д. физ.-мат. н. Олейников В.А.