

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН
29 июня 2022 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Горбачевым Дмитрием Андреевичем

По теме: **«Новые генетически-кодируемые фотосенсибилизаторы»**

Специальность 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Москва - 2022

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 29 июня 2022 года.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.5.6)
5. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
6. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
9. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
10. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
11. Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14. Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
15. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
16. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
17. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18. Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
19. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Диссертационная работа Горбачева Дмитрия Андреевича «Новые генетически-кодируемые фотосенсибилизаторы» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология. Научный руководитель - доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Константин Анатольевич Лукьянов, заведующий отделом биофотоники ИБХ РАН. В качестве официальных оппонентов выступают Случанко Николай Николаевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы белок-белкового взаимодействия Федерального исследовательского центра биотехнологий РАН. Второй оппонент - Демидюк Илья Валерьевич, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра Курчатовский Институт. Ведущая организация - Институт биологии гена РАН.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает материалы личного дела)*

Материалы личного дела: Горбачев Дмитрий Андреевич, Российская Федерация, с отличием окончил Московский Государственный Университет, специальность - биохимия (2015 год), с 2015 по 2019 год обучался в аспирантуре МГУ, кандидатский экзамен по специальности "молекулярная биология" сдан с оценкой "удовлетворительно". С 2021 года по настоящее время работает в должности научного сотрудника в группе синтетической биологии нашего института, и данная работа выполнена в лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов отдела биофотоники ИБХ РАН. Научный руководитель, как уже было сказано, Константин Анатольевич Лукьянов. По теме диссертации опубликовано пять работ в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 27 апреля 2022 года. Все необходимые документы в деле имеются.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Уважаемые коллеги, есть ли какие-либо вопросы, комментарии по поводу деталей личного дела соискателя? Если нет, тогда Дмитрий Андреевич, Вам предоставляется слово. Изложите, пожалуйста, основные положения вашей диссертационной работы.

Горбачев Д.А., соискатель:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, открываем дискуссию и вопросы, пожалуйста.

Долгих Д.А.

Скажите, пожалуйста, когда вы проводили мутагенез по SuperNova и второму белку, по десятой аминокислоте - вы все-таки сказали сначала, что это рациональный дизайн

Горбачев Д.А., соискатель:

Нет, я оговорился, это был случайный мутагенез.

Долгих Д.А.

То есть вы выбрали эту аминокислоту все-таки из каких-то соображений? Если это случайный мутагенез, то вы получали по этой позиции большое количество мутаций или как? Поясните, пожалуйста.

Горбачев Д.А., соискатель:

Мы брали кодирующую последовательность белка SuperNova и методом ПЦР с ошибками вставляли туда различные мутации, клонировали это в экспрессионный вектор и смотрели на яркость флуоресценции бактерий. Сравнивали с исходным белком и увидели, что один из клонов очень-очень яркий, намного ярче, чем исходный. Мы его отобрали, отсеквенировали, и оказалось, что он содержит эту мутацию. То есть это был не направленный мутагенез.

Долгих Д.А.

То есть это большое количество мутантов вы получали?

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, десятки тысяч, почти сто.

Долгих Д.А.

Спасибо.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Коллеги, еще вопросы? Я тогда позволю себе задать вопрос. Вот это десятый серин он находится на периферии белка, вот бета-бочонка, далеко от хромофорного центра, экспонирован в воду. У вас есть какие-то идеи, почему такое влияние на спектральные свойства? И, может быть, исходя из этого, имеет смысл осуществлять дизайн не вблизи хромофорного центра - ну это уже известное направление, а вот где-то на периферии, или за центром?

Горбачев Д.А., соискатель:

Мы очень удивились, когда увидели такую замену и то, к каким последствиям она приводит. На самом деле, четкого объяснения, что делает эта мутация, нет. Более того, это на схеме я показал, что скорее всего аминокислотный остаток смотрит наружу, но никто не знает на самом деле, пока нет кристалла. Возможно, это связано с изменением заряда в этой области, т.е. вот этот локальный заряд влияет на первые этапы созревания белка. Красные белки созревают через синий интермедиат, и возможно, когда этот белок только синтезировался и этот заряд появился в целом, он увеличил образование синей формы. У меня есть слайд. Я посмотрел, как созревают полученные нами белки *in vitro*, и если сравнить созревание SuperNova и SuperNova2, то в самом начале наблюдения мы улавливаем синюю форму. Т.е. красные белки созревают через синий интермедиат и видно, что процент синей формы у SuperNova не сильно большой, в то время как у SuperNova2 он гораздо выше. Возможно это и является причиной того, почему он более эффективно созревает. Больше синей формы и, соответственно, больше красной формы. Возможно дело в этом, но как это происходит - это очень сложный вопрос.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Да, вы же по сути только максимум флуоресценции, поглощения контролируете. Т.е. со структурной точки зрения вы не знаете? А в гомологичных белках такие замены встречаются?

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, не знаем. В других белках такие замены я не видел.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Скажите, кому-то еще в мире удавалось сделать белки, которые бы тоже поглощали в синей области?

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, есть еще группа в Японии, которая собственно сделала SuperNova. После того, как мы сделали белок KillerOrange, они опубликовали зеленый вариант белка SuperNova. Очень забавно, потому что один из вариантов белка KillerOrange, который мы сделали, это его мономерный вариант - мы просто взяли SuperNova и поставили туда триптофан, получился оранжевый мономерный белок. А они опубликовали примерно такой же белок, он отличается одной мутацией от KillerOrange и назвали его SuperNova Green. Так что в принципе, люди этим занимаются, пытаются сделать, но это тоже не всегда просто получается. Т.е. сложно отбирать мутанты на фототоксичность, потому что клетки погибают, и вы их просто не отберете. Поэтому обычно это такой направленный дизайн или удача, как в нашем случае. Нам повезло, что мы увидели яркий мутант и он оказался с лучшей скоростью и эффективностью созревания хромофора и соответственно это повлияло на фототоксичность. Но в принципе это может являться и неким направлением для отбора на фототоксичность. Грубо говоря, если вы получаете не один мутант, а десять или сто мутантов, и у вас есть силы всех их проверить на фототоксичность, то это как один из вариантов пути решений, т.е. увеличения фототоксичности флуоресцентных белков.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Скажите, а SuperNova и SuperNova2 - они в мономерной форме работают?

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, они являются мономерами, т.е. это показано в исходной статье про SuperNova, и один из оппонентов справедливо заметил, что мы получили мутант SuperNova и ничего не сказали про его мономерность. Поэтому, когда будут обсуждаться вопросы оппонентов, я об этом скажу. На самом деле, мы проверили и SuperNova, и SuperNova2 - они являются мономерами.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Так, коллеги, еще вопросы?

Вопрос из зала:

У меня вопрос по поводу механизма и фототоксичности. У всех белков примерно одинаковая фототоксичность, т.е. генерируют свободные активные формы кислорода? Никакого сдвига там в механизме нет?

Горбачев Д.А., соискатель:

Это тоже очень сложный вопрос, т.е. мы не смотрели эффективность образования АФК. Я думаю, что здесь на самом деле ничего не изменилось, скорее всего. А просто из-за того, что процент белка со зрелым хромофором больше, соответственно больше АФК получается. Есть одна очень хорошая работа, которая объясняет фототоксичность KillerRed. Его окружение участвует в переносе электрона с хромофора на кислород. И чтобы повлиять на такой тонкий процесс, нужна большая удача и понимать, что ты меняешь. В нашем случае изменения минимальны, и они затрагивают только эффективность созревания, поэтому, скорее всего, эффективность образования АФК не изменилась.

Вопрос из зала (продолжение):

Просто исходя из механизма действия разницу как-то можно объяснить локализацией белка в митохондриях или в мембране? У вас разбег фототоксичности больше получается.

Горбачев Д.А., соискатель:

Спасибо большое за вопрос. Когда я делал стабильные клеточные линии, я старался добиться одинакового уровня экспрессии как для митохондриальной локализации, так и для мембранной. Но мне не удалось это сделать, и я выровнял уровни экспрессии только между локализациями. Т.е. не такой высокий фототоксический эффект для мембранной локализации, скорее всего объясняется тем, что уровень экспрессии в 2-3 раза ниже, чем при митохондриальной. Понятно, действительно, что фототоксичность зависит от места локализации фотосенсибилизатора, но возможно даже мембранная локализация окажется более фототоксичной при одинаковом уровне экспрессии.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Тогда у меня еще один вопрос возник: что вы подразумеваете под термином “мембранная локализация”? Известно ли, как эти белки могут с мембраной взаимодействовать, встраиваться и т.д.?

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, у них есть специальный сигнал локализации на плазматической мембране, т.е. он просто закоривается - там пептид в пару десятков аминокислот, он как бы застревает в мембране и фотосенсибилизатор находится прямо вплотную к мембране. Он генерирует активные формы кислорода, а т.к. они очень реакционноспособные и не могут далеко диффундировать, то первое, на что они натываются - это клеточная мембрана. Собственно АФК разрушают клеточную мембрану и приводят к гибели клетки.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

А вот эта мутация, S10R, она не может влиять на мембранную локализацию?

Горбачев Д.А., соискатель:

Это интересный вопрос, мы это не проверяли.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

А аргинин - это как суперклей, он взаимодействует очень хорошо и с фосфатами, и т.д. Да, спасибо.

Донцова О.А.

У меня такой вот вопрос: вы там делаете разные варианты, чуть лучше, чуть хуже - а какие особенности применения, либо в науке, либо в медицине. Они дают какие-то преимущества или они не лучше и не хуже, или то, что вы сделали не сильно влияет на потенциал их применения в чем-то? Вы показали на чем-то, на каких-то раковых клетках?

Горбачев Д.А., соискатель:

Преимущества очень большие. Мы показали это на бактериях и на стабильных линиях.

Донцова О.А.

Бактерии и эукариоты - разные организмы, облучение у них разное и т.д.

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, вот тут, например, видно, что если мы будем использовать дозы облучения порядка 40 Дж/см, то если бы мы использовали SuperNova, мы бы никакого фототоксического эффекта и не увидели. А если мы используем SuperNova2, то увидим четкий фототоксический эффект. Т.е. снижение дозы облучения - это очень полезно. Чтобы достичь такой дозы, нужно долго облучать образец, а при облучении идет нагревание, и если вы долго будете облучать клетки, они начнут нагреваться и даже вскипать. Это очень насущная проблема, и

все стараются сократить время и дозу облучения, но при этом не хотят, чтобы фототоксический эффект пропадал. Поэтому, намного приятнее использовать более фототоксичный вариант. Более того, если у вас есть более фототоксичный вариант, у вас больше динамический диапазон. Например, не всегда требуется убить клетку, иногда нужно остановить клеточное деление. И если у вас более фототоксичный фотосенсибилизатор, вы можете использовать как высокие дозы облучения, так и низкие. А в случае SuperNova у вас особо вариантов нет, вам приходится очень долго облучать.

Завриев С.К.

Интересный доклад, хотел спросить одну вещь. Вы говорили, что у вас фототоксичность хромофора исчезает, если денатурировать белок.

Горбачев Д.А., соискатель:

Точнее исчезает влияние белкового окружения на хромофор.

Завриев С.К.

Да, но вот что значит исчезает, ведь оно, может быть, меняется, потому что даже в денатурированном состоянии окружение остается. Вы проверяли это или нет?

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, вот здесь это видно на спектрах, т.е. спектры сильно сдвигаются в область 450 нанометров. Спектр флуоресцентного белка складывается из двух вещей: спектра самого хромофора и того, как другие аминокислоты влияют на его способность поглощать свет ну и соответственно, флуоресцировать.

Завриев С.К.

Я почему этот вопрос задал, может быть, попробовать - вот если клетка живая и нормально функционирует (грубо говоря, от 15 до 42 градусов), вот можно как-то компенсировать или активировать, уменьшить дозу облучения или что-то изменяя в ту или другую сторону, температуру задействовать? В общем, практическая сторона интересует, вы это делали.

Горбачев Д.А., соискатель:

Мы не делали. Я думаю, что при увеличении температуры квантовый выход уменьшается, соответственно образование АФК будет меньше. Однако скорость реакций будет увеличиваться.

Завриев С.К.

А если уменьшить температуру?

Горбачев Д.А., соискатель:

Соответственно, будет увеличиваться. Но я не думаю, что мы находимся в том диапазоне температур.

Завриев С.К.

Может быть, уменьшение температуры окажет положительный эффект на конечный результат в плане практического использования.

Горбачев Д.А., соискатель:

Возможно, но это нужно проверять, в каком диапазоне температур это можно использовать.

Завриев С.К.

Вот я и задаю этот вопрос-предложение.

Горбачев Д.А., соискатель:

Хорошо, да, спасибо большое.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Коллеги, еще вопросы есть? Мы уже многое обсудили. Спасибо, тогда можете пока отдохнуть. Слово предоставляется научному руководителю, Лукьянову Константину Анатольевичу.

Лукьянов К.А., научный руководитель:

Дорогие коллеги, Дмитрий у нас очень давно, я с утра попытался вспомнить, когда, и не смог, много лет. Диплом был, потом аспирантура и после аспирантуры. Сейчас он в другой команде в ИБХ, но я рад, что он здесь остался и продолжает работать на благо института. Дмитрий давно созрел для защиты. И пока он от меня не ушел, это был один из основных моих сотрудников. Личные качества: он очень упорный и очень хочет сделать что-то такое большое и светлое. Не совсем все получается, но это всегда и у всех, и у Дмитрия такие большие замахы всегда происходят на большие проекты. Он очень уравновешенный, спокойный - я никого не хочу обидеть, но, наверное, самый спокойный и доброжелательный неизменно человек, который всегда готов помочь, как-то выслушать и все сделать, я никогда не видел никакого негатива. И просто очень классный специалист, профессионал, все умеет, все знает. Спасибо, я поддерживаю полностью.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, нет ли вопросов к научному руководителю? Тогда Владимир Александрович, огласите, пожалуйста, отзывы.

Олейников В.А., ученый секретарь:

(Излагает заключение организации, где выполнялась работа).

Во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. Работа выполнялась в нашем институте. Далее биографические сведения в этом заключении приводятся, тема диссертационной работы была утверждена на ученом совете 2 апреля 2022 года и далее идет само заключение. Актуальность темы исследования, то, что фотосенсибилизаторы - это красители, способные вырабатывать активные формы кислорода при облучении светом. И два типа фотосенсибилизаторов, один из них - это генетически кодируемые флуорофоры, их количество и функции ограничены. В связи с этим получение фототоксичных белков других цветов, не только тех, которые уже есть, а с улучшенной фототоксичностью, является задачей актуальной. Далее указана научная новизна, то, что получены KillerOrange и mKillerOrange, улучшены свойства еще одного белка. Далее, теоретическая и практическая значимость работы - высокая селективность, получены новые варианты фототоксичных белков. Степень достоверности результатов очень высокая, личное участие соискателя - все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации были проведены лично соискателем под руководством члена-корреспондента РАН Лукьянова Константина Анатольевича. Список статей впечатляет, т.е. пять статей в хороших журналах. Диссертационная работа соответствует заявленной специальности и семинар, на котором ее рассматривали, поддерживает эту работу и рекомендует ее к защите. Соответственно заключение организации подписано директором нашего института академиком Александром Габитовичем Габитовым.

(Зачитывает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный).

Что касается отзыва ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Институт биологии гена РАН”. Ну опять же, здесь говорится об актуальности темы выполнения работ, что она весьма актуальная и интересная. Сама работа построена по стандартной схеме, содержит введение, обзор литературы, описание методов и результаты. Изложена на 90 страницах и 122 ссылки. Обзор литературы написан кратко и лаконично, хорошо проиллюстрирован. Материалы и методы содержат необходимую информацию по использованным молекулярно-биологическим процедурам. Результаты и обсуждение содержат описание полученных экспериментальных результатов и их интерпретацию. Опять же, работа поделена на 2 части: первая описывает создание белка KillerOrange, вторая часть сфокусирована на изучении характеристик красных флуоресцентных белков KillerRed и SuperNova. Ну мы сегодня в докладе все это великолепно слушали, по-моему, доклад был великолепно представлен. Достоверность, обоснованность результатов исследования - проведено на высоком методическом уровне.

И вот я дошел до вопросов. Значит, несколько моментов рассматриваемой работы вызывают вопросы.

Вопрос первый: почему соискатель, получив кривые зависимости выживаемости клеток от дозы облучения для разных фототоксичных белков (соответственно, рисунки в диссертации перечислены) оценивал достоверность различий в цитотоксичности этих белков по выживаемости для некоторых доз облучения, но не кривые в целом, по таким их характеристикам, как например, D_0 , EC_{50} , и т.п., как это обычно делается (дается ссылка на конкретную работу, где эта методика приводится и описывается)?

Вопрос второй: какие конкретно сигналы мембранной и митохондриальной локализации соискатель использовал для создания фототоксичных белков с соответствующей локализацией? В диссертации представляется возможным увидеть лишь следующую информацию: “было создано 9 стабильных клеточных линий, экспрессирующих трансген с одной из генетических конструкций (далее перечислены промоторы, сигналы локализации). Эти конкретные вещи - их еще 2 здесь приведены, но я думаю, что сам соискатель сейчас ответит на эти вопросы и более подробно все это скажет.

В заключение пишется, что диссертационная работа соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней, и сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. “молекулярная биология”. Отзыв рассмотрен и одобрен единогласно на семинаре лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена Российской академии наук. Составил член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Александр Сергеевич Соболев. Соответственно, подпись Соболева и утверждено все это директором Института биологии гена Георгиевым Павлом Георгиевичем.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, Владимир Александрович, Дмитрий Андреевич, пожалуйста, ответьте на комментарии, которые прозвучали в отзыве ведущей организации.

Горбачев Д.А., соискатель:

Да, действительно, в некоторых статьях, особенно медицинских, часто показывают этот критерий, который соответствует дозе облучения, убивающей 50% клеток. Я сделал это, чтобы было нагляднее - т.е. показать дозы облучения, которые приводят к гибели 50% клеток. Однако, это всего лишь одно значение, и оно удобно в плане сравнения каких-то фотосенсибилизаторов между собой. Но если мы говорим про отдельные точки и сравниваем фототоксичность именно в них, то получаем более полную картину. Т.е. одно другому не мешает. Я согласен с этим замечанием, но также в литературе часто встречается сравнение тех же фотосенсибилизаторов KillerRed, KillerOrange и SuperNova по отдельным дозам облучения. Что касается второго вопроса - я действительно недостаточно подробно описал этот момент. Если говорить о сигнале митохондриальной локализации - это пептид, который имеет вот такой сиквенс. Он был взят из субъединицы цитохром-с-оксидазы, и данный сигнал, скорее всего, локализует белок в матриксе митохондрий. Другой же сигнал мембранной локализации локализует фотосенсибилизатор на внутренней стороне плазматической мембраны. У меня все.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Владимир Александрович, какие еще у нас отзывы?

Олейников В.А., ученый секретарь:

Поступили еще три отзыва на автореферат, все отзывы положительные.

Тем не менее, зачитываю: удалось сконструировать новые варианты белка, автор разработал количественный тест на фототоксичность, были созданы новые фототоксичные белки. К недостаткам изложения текста и графического оформления автореферата можно отнести следующее:

1. Несколько неожиданно звучит в автореферате похвала самому себе (страница 5): “работа выполнена на высоком научно-методическом уровне”. Эта фраза традиционно принадлежит оппонентам, тем более, что в автореферате отсутствует описание методик.
2. Опечатки на рисунке 4: “возбуждение” (голубая линия) должно быть заменено на “эмиссия” и, наоборот, “эмиссия” (сиреневая и оранжевая линии) следует обозначить как “возбуждение”.

Считаю важным отметить, что указанные недостатки имеют чисто технический характер и не мешают восприятию основной идеи работы. Анализ автореферата позволяет заключить, что работа заслуживает присуждения искомой степени. Подписано: заведующий лаборатории нейробиологии основ развития мозга ФГАУ НМИЦ Здоровья детей Минздрава России, доктор биологических наук Александр Михайлович Сурин.

Далее, отзыв на автореферат, тоже полностью положительный, тоже отмечено, что работа соответствует... Подписано: кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ имени Пирогова Дашинимаев Эрдем Баирович.

Наконец, третий отзыв на автореферат, тоже положительный. Есть такое псевдозамечание: несмотря на то, что в автореферате методы исследования частично изложены по ходу описания результативной части экспериментов, представляется целесообразным вынести основные методические приемы в специализированные разделы автореферата. Было бы желательно видеть в автореферате не только выводы, но и какое-то обобщающее заключение, в котором автор смог бы подвести итог проделанной работе. Кроме того, было бы интересно понять, проводил ли автор оценку характера типа клеточной гибели, которая наблюдалась в культурах после применения фотосенсибилизаторов, особенно в ситуации, когда экспрессия этих белков была по-разному локализована (плазматическая мембрана или митохондрии). Вместе с тем все это не умаляет значимости, работа соответствует, автор

достоин. Подписал ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, доктор биологических наук Степаничев М.Ю.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, Владимир Александрович. Дмитрий Андреевич, в двух отзывах прозвучали замечания, ответьте, пожалуйста.

Горбачев Д.А., соискатель:

В целом замечания справедливые, я с ними согласен. Относительно вопроса, проводили ли мы оценку клеточной гибели – нет, не проводили, но безусловно, это интересная тема и мы, наверняка, этим займемся.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, теперь, уважаемые коллеги, мы перейдем к отзывам оппонентов. Случанко Николай Николаевич.

Случанко Н.Н., оппонент: (Излагает отзыв. Отзыв положительный).

Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета, мое выступление будет состоять из двух частей. Одна – общими словами и моя точка зрения, а вторая – более официальная, я буду следовать написанному отзыву, чтобы соблюсти всю структуру и ничего не забыть. Во-первых, мне было очень интересно познакомиться с данной диссертацией – во многом потому, что в моей лаборатории мы по нескольким проектам занимаемся цветными белками, правда не флуоресцентными, но тем не менее, набор методов, которые мы применяем, довольно сильно перекрывается с тем, что использовал диссертант. Значит работа диссертанта посвящена генетически кодируемым сенсibiliзаторам, о которых мы слышали из очень красочного доклада. И может показаться, что эта тема немного утрачивает интерес, который был 15-20 лет назад, несмотря на то, что практически в каждой лаборатории используются в той или иной степени разные флуоресцентные белки, вот создается такое некое ощущение. Но я хотел бы сказать, что это ложное ощущение, потому что 2 месяца назад в журнале Nature Biotechnology с пересчитанным сейчас импакт-фактором 69 вышла статья, посвященная исключительно созданию нового варианта флуоресцентного белка из медузы, который просто отличается повышенной флостабильностью и яркостью – есть на что ориентироваться. Работа Дмитрия Андреевича посвящена чрезвычайно актуальной теме, поскольку фундаментального интереса и удобства работы с объектом достаточно очевиден прикладной аспект его исследований, т.е. да, в докладе прозвучало, что низкомолекулярные экзогенные флосенсибилизаторы обладают повышенной флотоксичностью, но они не могут быть генетически кодируемыми. А в случае белков, конечно же, на лицо удобство применения, поскольку их можно закодировать в соответствующую генетическую конструкцию и в конкретной популяции клеток добиться определенного воздействия, определенного оптического контроля. Тем не менее, на момент начала работы существовало всего несколько вариантов генетически кодируемых флосенсибилизаторов, а на основе флуоресцентных белков всего 2: можно сказать, один – KillerRed, а другой – его мономерный вариант. Поэтому, безусловно, уйти в другую часть спектра и получить новые варианты, которые были бы совместимы с красным вариантом KillerRed было чрезвычайно актуально и наверняка, очень интересно. Научная новизна работы не вызывает сомнений в этой связи, поскольку автором были получены новые генетически кодируемые флосенсибилизаторы KillerOrange и мономерный вариант этого белка, который активируется синим светом, т.е. мог бы использоваться вместе с предшественником, с которого работа стартовала – KillerRed вариант. Сама диссертация занимает всего 90

страниц, тем не менее, ам имеется очень большой набор информации, которая хорошо структурирована, иллюстрирована. Диссертацию приятно читать, в общем, все достаточно увлекательно. По поводу формальных вещей: в списке литературы 122 ссылки, 45 рисунков, 1 таблица. Эти результаты достаточно полно отражены в публикациях диссертанта – это 5 статей, где с учетом совместного первого авторства (я так понимаю, в трех работах) Дмитрий Андреевич – первый автор. Поэтому всем формальным требованиям, с точки зрения ВАК, все это соответствует. В обзоре литературы все очень логично подогнано под тот масштаб результатов, который был получен в работе, т.е., что называется ничего лишнего и все по делу. Автор знакомит читателя с тем, какие бывают фотосенсибилизаторы, как они применяются, какие бывают виды генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, и подводит довольно логично к целям и задачам работы. Раздел “Материалы и методы” описывает широкий набор современных методов и подходов - это и клонирование белков, и мутагенез, и направленная эволюция, и выделение, и очистка рекомбинантных белков, спектральные исследования, микроскопия, работа с клетками. Плюс некоторые методы и подходы были фактически разработаны в диссертации, о чем я скажу чуть позже. Результаты и обсуждение содержат 3 раздела: в первом разделе на основе варианта KillerRed получается вариант, который не формирует Ds-Red подобный хромофор, т.е. фактически обладает спектральными свойствами в другой части видимого диапазона спектра. Второй раздел посвящен непосредственно получению этого варианта KillerOrange белка, который является оранжевым вариантом KillerRed и может быть активирован синим светом. Третий раздел посвящен изучению и увеличению фототоксичности полученных в работе фотосенсибилизаторов. В итоге получено 2 варианта: SuperNova2 и KillerRed2 на основе введения одиночной мутации S10R в структуры их предшественников SuperNova и KillerRed. В целом, все положения и выводы достоверны, обоснованы, здесь никаких сомнений нет, работа выполнена на высоком уровне.

Тем не менее, как и любая научная работа, работа Дмитрия Андреевича имеет ряд некоторых недостатков и вызывает некоторые вопросы, которые, на самом деле, во многом связаны с интересом, который вызывает данная работа. Для начала я хочу отметить сильные стороны, а потом поговорю о недостатках. Сильные стороны: во-первых, проведено объемное исследование, в процессе которого конечно же возникали трудности и неудачи, но тем не менее, диссертант на этом не остановился, и мы слышали в отзыве научного руководителя эту черту – упорство диссертанта. Я считаю, что это неотъемлемая особенность успешного научного исследователя. Например, при замене тирозина-66 сработала только одна замена на триптофан, и в какой-то момент потребовалось проводить скрининг у ста тысяч колоний, для того, чтобы найти субоптимальный вариант и в дальнейшем его улучшить. Но тем не менее, диссертант не остановился, в результате чего все задачи исследования в общем были выполнены. Сильная сторона также – это то, что разработана очень изящная, простая методика оценки фототоксичности, когда белок, фототоксичность которого исследуется, экспрессируется в одной линии клеток, в другой линии клеток экспрессируется просто флуоресцентный белок, который не обладает фототоксичностью, потом клетки просто смешиваются, и после облучения светом оценивается количество колоний. С учетом того, что фактически вводится внутренний стандарт, очень удобно оценивать динамику изменения соотношения числа клеток. Таким образом, это действительно очень простой и красивый вариант, и нет сомнений, что он найдет применение в дальнейших исследованиях, в т.ч. возможно и в других лабораториях, или уже находит такое применение. Помимо получения и характеристики новых вариантов фотосенсибилизаторов отработаны методики исследования созревания хромофора, что в целом представляется очень важным, поскольку зачастую для пигмент-белковых комплексов соотношение апахолоформ или соотношение созревшей и несозревшей формы

достаточно важно. Т.е. если вы нагружаете клетки суперэкспрессией какой-то целевой конструкции, важно, чтобы КПД был высокий, чтобы доля активной формы была достаточно высока. Это что касается сильных сторон.

Что касается вопросов и замечаний. Несмотря на то, что в работе активно обсуждается проблема олигомерного состояния (и это нашло также отражение в дискуссии, вопросы были заданы на эту тему), в случае KillerRed указывается, что это димерное состояние, в случае SuperNova – это белки, с которых стартовало исследование – ему приписывается мономерное состояние. И дальше автор активно использует эти термины, как два разных дерева, направления усовершенствования этих белков, и тем не менее, в работе не встречается ни один из способов оценки олигомерного состояния этих белков. Как будто бы принимают на веру то, что уже опубликовано, причем другими людьми и без указания того, каким методом были получены эти белки. Тем не менее, поскольку белок-белковые взаимодействия крайне динамичные и это все очень сильно зависит от концентрации, то хотя бы грубая оценка олигомерного состояния в работе была бы весьма выгодной. Помимо того, что такое исследование, как кажется из текста диссертации, не проводилось, на странице 46 диссертации автор делает предположение об олигомерном состоянии по расположению субъединиц в кристаллической решетке. На самом деле, это не совсем корректно, по причине того, что при кристаллизации могут образоваться разные кристаллические контакты, которые могут вовсе не соответствовать биологическим интерфейсам. Соответственно, вывод о том, какой олигомер присутствует в растворе или в клетке, оказывается достаточно спорным. То есть здесь независимая оценка была бы полезна. Также вызывает удивление разница в величине эффекта мутации S10R в составе KillerRed2 и SuperNova2, которые заявлены как димерный и мономерный белки, на эффективность созревания хромофора, яркость и фототоксичность фотосенсибилизаторов. Автор отмечает, и мы слышали это в докладе, что мутация расположена на периферии. Эффект мутации, как я понимаю, не очень понятен, но мне кажется, что можно было бы подсветить, хотя бы в дискуссии, эффект олигомерного состояния на димер/мономерные переходы в клетке.

Далее, не очень понятно, почему при введении мутации с целью блокирования водного канала фотосенсибилизатора автор объясняет сходство эффектов мутаций и I199F, I199L тем, что в обоих случаях введение объемного остатка блокирует водный канал. Ну если в случае замены I199F такая интерпретация более чем обоснована, то в случае I199L такая интерпретация довольно странная, поскольку изолейцин и лейцин, как известно, являются изомерами.

При анализе строения флуоресцентных белков и мутаций, меняющих их свойства, ни в диссертации, ни в автореферате не приведены ссылки на соответствующие структуры в Protein Data Bank. Во-первых, получение пространственных структур – это большой труд, и в целом – это норма, отмечать не только ссылками на статью, но и идентификаторами структур в базе данных. А во-вторых, это дает возможность обратиться к структуре, и помимо тех особенностей, которые отмечены на рисунках автора, еще сделать независимую оценку возможных эффектов мутаций или особенностей строения исследуемых белков. Но это скорее рекомендация, что лучше отмечать все идентификаторами из PDB, чтобы помочь читателю отметить исходных авторов.

В работе указывается, что новый фотосенсибилизатор KillerOrange может быть использован для уничтожения нежелательных клеток не только независимо от KillerRed, но и вместе с ним. Возникает вопрос, будет ли эффект совместного использования KillerOrange и KillerRed синергичным или просто аддитивным.

Ну и последнее, в работе существует ряд опечаток, неправильных обозначений, стилистически неудачных конструкций и пунктуационных ошибок. Примеры: “аминоксилотный остаток” (страница 35), “литературный обзор”, а не “обзор литературы” в автореферате, опечатки “метел”, “флуоресциин” и некоторые другие некорректные фразы. То, что уже отмечалось в отзыве на автореферат, я пропущу. Плюс нарушен порядок цитирования некоторых рисунков, например, рисунок 13 на странице 27 цитируется сразу после рисунка 9, но не до 10 и 12 рисунка. И последнее, рисунок 65, про увеличение возраста бактерий (далее делаются какие-то выводы про фототоксичность) – фраза не совсем понятна, что такое возраст бактерий в данном контексте.

Заканчивая, я хочу отметить, что ни одно из озвученных замечаний не умаляет значимости результатов и не вызывает сомнений в выводах, сделанных в диссертации. И в заключение, диссертационная работа Дмитрия Андреевича соответствует критериям, в т.ч. пункту 9, установленным в Положении о присуждении ученых степеней (утверждено Правительством РФ 29 сентября 2013 года с изменениями Правительства и т.д.) Сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности “молекулярная биология”. Спасибо большое за внимание.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Николай Николаевич, спасибо большое за столь обстоятельный отзыв и разбор работы. Дмитрий Андреевич, пожалуйста, ответьте оппоненту.

Горбачев Д.А., соискатель:

Николай Николаевич, спасибо большое, что так подробно разобрали мою работу. Вопросы, действительно, очень важные и правильные. Первый вопрос-замечание касательно структуры белков. Да, действительно, никакой рентгеноструктурный анализ конечно не говорит о том, в каком состоянии находится белок в клетке или просто в растворе. Т.е. это мой недочет, нужно было написать, что в исходной статье проводили хроматографию (гель-фильтрацию), где показали, что белок SuperNova мономерный. На данном рисунке представлена структура белка KillerRed и его димеризационный интерфейс. Видно, что фенилаланин и лейцин образуют этот интерфейс, гидрофобные взаимодействия, из-за чего KillerRed является димером. Этот интерфейс убран у белка SuperNova, таким образом, он превращается в мономер.

Также касательно вопроса об олигомерном состоянии белков, которые мы получили. Мне показалось, что это очень важное замечание и мне действительно стало интересно это проверить, и я успел это сделать. Существует такой тест на олигомерное состояние белка внутри клеток. Т.е. если мы локализуем этот белок в эндоплазматическом ретикулуме, и если он является димером, то на микроскопии мы обнаружим вот такие структуры овальные. а если белок мономерный, то мы увидим сеть эндоплазматического ретикулума - так она должна выглядеть. Собственно, я сделал три генетических конструкции с локализацией в эндоплазматическом ретикулуме для мономерного белка mScarlett (не раз описана его мономерность) и для белков SuperNova2 и KillerRed2. И я увидел, что SuperNova2 ничем вообще не отличается от mScarlett. Я просмотрел достаточно много клеток, здесь только самые красивые. Я не увидел ни одной клетки, которая бы имела такие структуры, как клетки с KillerRed2. У практически всех клеток с KillerRed2 я видел такие структуры. Я думаю, можно считать, что олигомерное состояние этих белков не изменилось.

Касательно вопроса о замене изолейцина в 199 положении на лейцин в белке KillerOrange. Да, действительно, не совсем корректно писать, что была замена на более крупный аминокислотный остаток. Однако лейцин имеет некую большую степень свободы, чем изолейцин. Это и объясняет перекрытие водного канала. С остальными замечаниями я также согласен, они справедливы. Спасибо.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Николай Николаевич, вы удовлетворены ответом соискателя?

Случанко Н.Н., оппонент:

Да.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, следующий отзыв будет предоставлен Ильей Валерьевичем Демидюком.

Демидюк И.В., оппонент: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).*

Уважаемые члены совета, уважаемые коллеги, ну, я бы совсем уже мог не выходить, но раз уж я приехал, вам придется меня выслушать. Я постараюсь быть кратким и не буду рассказывать про то, как важны флуоресцентные белки в современных биологических исследованиях, но скажу, что, хотя это уже и говорили, это не совсем правильно ощущается сообществом, что кажется, что флуоресцентных белков уже так много, что любая мыслимая задача с их использованием может быть решена. Но когда ты начинаешь эти задачи решать, оказывается, что это не так. Стоит чуть-чуть в сторону отклониться от стандартных протоколов и процедур, ты понимаешь, что свойства белков не оптимальны и ты не можешь получить те результаты, которые хочешь. А если от мейнстрима уходишь далеко, то понимаешь, что просто белков, которые тебе нужны, их просто нет. И соответственно во всем мире их усовершенствованием так или иначе занимаются, как в плане расширения ассортимента, так и в плане улучшения конкретных свойств, но проблема в том, что теперь делать это крайне сложно. Мне кажется, что все решения, которые были относительно просты и лежали на поверхности, уже реализованы, и теперь каждое усовершенствование дается огромным трудом. Фотосенсибилизаторы - вообще отдельная история в этом контексте. На самом деле, GFP-подобные фототоксичные белки кажутся очень привлекательными, прежде всего, как инструмент исследований, потому что, в отличие от белков с внешними хромофорами, здесь при работе вообще не нужно использовать никаких низкомолекулярных соединений, что существенно снижает неспецифическую токсичность. Однако, если посмотреть, то GFP-подобные фототоксичные белки используются достаточно мало. А это связано как раз с тем, про что уже много раз говорили, во-первых, они имеют низкую цитотоксичность, а во-вторых крайне ограничены варианты этих белков. На самом деле, белки с которыми люди работали до Дмитрия Андреевича – это Supernova, KillerRed и все, и они оба красные. Поэтому, понятно, то, что делал Дмитрий Андреевич чрезвычайно актуально, и те задачи, которые он решал – они ровно те, которые и надо решать. Т.е. получать белки с новыми спектральными свойствами и получать белки с повышенной фототоксичностью. И опять же, в работе 2 части: одна - это получение KillerOrange, т.е. измененные спектральные характеристики, вторая – SuperNova2 и KillerRed2, т.е. увеличенная фототоксичность. И здесь Дмитрием Андреевичем достигнут очень серьезный, действительно значимый результат. Т.е. на самом деле 4 новых фототоксичных белка: KillerOrange, mKillerOrange (мономерный его вариант) и вот эти два белка SuperNova2 и KillerRed2. Т.е. если считать, что на входе было 2 флуоресцентных фототоксичных белка, активно использующихся, то сейчас их 6. Значит в три раза увеличили набор инструментов, как ни думай. Если сюда еще зеленую Supernova приплюсовать, то как минимум в два раза. Т.е. это действительно серьезный результат, и я

думаю, что к вопросу об использовании - появляется инструментарий, появляется и способ использования. Когда нет инструментов, нет и никаких методов. И сейчас, когда эти белки появились, а это, если говорить о SuperNova2 и KillerRed2, то это, наверное, самые лучшие фототоксичные белки, то соответственно, будут и новые приложения, в которых они будут использованы. Потому что флуоресцентные GFP-подобные белки позволяют достичь беспрецедентной точности доставки при наименьшем уровне фоновой цитотоксичности, и это, конечно, очень ценно.

Если говорить о работе, я не буду ее пересказывать, то я бы отметил два основных момента. Один из них уже отмечался, он такой методический. Сама работа, если посмотреть с инженерной точки зрения, она достаточно обычная. Достаточно стандартный мутагенез случайный и направленный, дальше очистка белка, его получение и характеристика, экспрессия в общем тоже достаточно обычная. И в этом всем ничего такого особенного нет, кроме простой вещи – необходимости охарактеризовать эти фототоксичные белки. И поскольку с этими фототоксичными белками люди в общем не так много работают, стандартного подхода для характеристики этой фототоксичности – его просто не существовало. И этот подход был создан в рамках этой работы, и он действительно позволяет количественно характеризовать фототоксичность. И как там ее выражать, это вопрос следующий, но он позволяет количественно, аккуратно характеризовать. Не назвал бы этот подход простым, особенно в случае клеток млекопитающих, потому что для того, чтобы это сделать, пришлось сделать 9 стабильных линий. Тем не менее, те, кто пойдет вслед и будет заниматься этими белками, будут этот подход использовать.

И второй момент – идеологический. Его не отмечали, но в докладе это прозвучало довольно сильно, не знаю, обратили ли вы на это внимание. На самом деле, мы хотим улучшить фототоксичность, и кажется очевидным путь, что нужно увеличить коэффициент экстинкции и нужно, соответственно, увеличивать квантовый выход активных форм кислорода. Но как я понимаю, этот путь, по-видимому, тупиковый, потому что реально существенно увеличить эти параметры не удастся. И вот тут, на мой взгляд, ценно то, что Дмитрий Андреевич обратил внимание на другой аспект, на то, что на самом деле флуорофоры во флуоресцентных белках, особенно в красных, созревают в общем неэффективно. И когда мы экспрессируем белок в клетке, то реально мы имеем среди белков, которые там накапливаются, существенную долю нерабочих. Это было показано, до 70% примерно в Supernova нерабочих белков, и это очевидный путь оптимизации, которого тоже раньше не было, и его придумал, как я понимаю, Дмитрий Андреевич. И понятно, что у этого пути есть предел. Если 30% активного белка, то мы можем увеличить в три раза и все, больше не получится. Но это реальный путь оптимизации, который при этом сработал. Наверное, везение было, несомненно, как и в любой такой деятельности, но везет тем, кто что-то делает, тем кто везет, как известно.

В общем, работа действительно выполнена на высоком уровне и по работе как таковой лично у меня серьезных замечаний нет. Там есть много всего на самом деле, к чему можно придираться, но скорее дело не в работе, а в том, как она представлена, на мой взгляд. И это вопросы, скорее, к диссертации, которую из тех, кто сидит в зале, видел мало кто, и к тому, как в этой диссертации представлена работа. На самом деле диссертация совершенно традиционная, она вполне хорошая, и в ней все есть, что должно быть, и все нормально оформлено, легко читается. Но есть несколько моментов. Вот первый момент – литобзор. Он очень соответствует тематике работы, посвящен фотосенсибилизаторам и соответственно, с таким большим акцентом на GFP-подобные белки. И я лично прочел его так легко, с большим интересом, и для меня, в плане осознания работы, которую мы обсуждаем, он был крайне полезен. Наверное, та информация, которая, на самом деле, так

хорошо охватывает область, и данных там представлено много, в общем она была полезна. Но я прочитал это, как-будто такую энциклопедию, и задал сам себе вопрос: и что? Когда читаешь такой обзор от высококвалифицированного специалиста в предметной области, а несомненно, Дмитрий Андреевич является высококвалифицированным специалистом в области генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, хочется каких-то обобщений, какого-то визионерского взгляда, ну просто четкой формулировки проблем и перспектив, потому что человеку из другой сферы это сделать невозможно. Я этого честно ждал весь литобзор и не дождался.

Что касается изложения экспериментальной части: основная проблема в том, что там не хватает подробностей в тексте и обсуждения. Там упущены некие существенные экспериментальные детали, довольно много просто не описано. Например, непонятно, в какую область генов этих флуоресцентных белков был направлен случайный мутагенез, почему те или иные направленные мутации, не очень понятно проведена селекция. Естественно, Дмитрий при встрече мне все объяснил, и все стало совершенно на свои места. Непонятно, чем обусловлен выбор клеток в том же тесте и еще довольно много всего. Удивительно, что нет таких технических принципиально важных результатов с точки зрения оценки достоверности, как например, декларируемого доказательства структуры генетических конструкций, которые были получены. И, что меня совсем удивило, там нет вообще никакого описания белковых препаратов, с которыми Дмитрий работал. Это должно быть. Что касается обсуждения результатов, то здесь очень часто Дмитрий Андреевич интерпретирует данные и опускает какие-то логические шаги, которые привели его к таким заключениям. В результате, смотришь и не понимаешь, куда надо посмотреть, для того, чтобы понять, почему автор так думает. Разобраться можно, несомненно, потому что вся информация так или иначе присутствует, но сделать это достаточно сложно, и это затрудняет восприятие. Ну и не хватает обсуждения, какого-то взгляда чуть со стороны: что дальше, куда мы идем, что значат эти мутации. Отчасти это звучало – отсутствие какого-то обобщения.

Остальные проблемы с презентацией менее существенные. Есть проблемы с подписями к рисункам: в части рисунков многопанельных нет названий общего рисунка, на каких-то рисунках много не расшифрованных сокращений. В материалах и методах нет условий центрифугирования, описана только скорость вращения ротора в оборотах в минуту, понятно, что это не отражает условия разделения, потому что это зависит от диаметра ротора, надо указывать фактор разделения в g , как это обычно принято. И что совсем меня позабавило, что единицы измерения времени приводятся с нестандартными сокращениями. Например, минуты с точкой, “сек” вместо “с.” для секунд. И что особенно удивительно, это не везде так: местами так, местами по-другому. Понятно, что это недосмотр, но в работе такого уровня, честно говоря, досадно видеть такие вещи.

Но, наверное, вы уже поняли, что все замечания, которые я делаю, не носят принципиального характера, и соответственно, совершенно точно можно сказать, что работа, которую мы сегодня обсуждаем, это работа, выполненная на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. В ходе этой работы получены значимые результаты, они опубликованы очень хорошо. Выводы, которые сделаны в работе, обоснованы и соответствуют тем результатам, которые были получены. Квалификация автора не вызывает сомнения, автореферат отражает содержание диссертации. Таким образом, можно сделать очевидное заключение, которое можно было сделать с самого начала, когда я сюда вышел, что диссертация полностью соответствует всем требованиям, которые предъявляются к кандидатским диссертациям, а ее автор, Горбачев Дмитрий Андреевич, заслуживает присуждения искомой степени.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо, Илья Валерьевич. Дмитрий Андреевич, замечания прозвучали, ответьте на них оппоненту.

Горбачев Д.А., соискатель:

Илья Валерьевич, спасибо, что согласились быть оппонентом моей работы. Мне очень приятно и приятно было обсуждать с вами мою работу. Да, я согласен со всеми замечаниями, они справедливые. И как уже Илья Валерьевич говорил, мы их обсудили. В целом, мне добавить нечего, буду стараться делать работу лучше. Спасибо.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Илья Валерьевич, принимаете?

Демидюк И.В., оппонент:

Абсолютно.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо. Уважаемые коллеги, теперь мы переходим к открытой дискуссии. Пожалуйста, кто хотел бы высказаться по данной работе. Много мы уже о ней сегодня говорили. Есть желающие в дискуссии поучаствовать? На самом деле у нас была уже обстоятельная дискуссия, много вопросов, комментариев. Спасибо, тогда, Дмитрий Андреевич, у вас есть возможность сказать заключительное слово.

Горбачев Д.А., соискатель:

Я хочу сказать всем, что я очень благодарен тем людям, с которыми я работал на протяжении всего этого времени. Особенно я хочу поблагодарить своего научного руководителя, Константина Анатольевича Лукьянова. Это лучший руководитель, которого я знаю, потому что он создал для меня все условия, чтобы мне было комфортно работать. Я делал все, что я хочу и ни о чем не беспокоился. Это было прекрасно, мне очень понравилось, и это ценный опыт. Также я хочу поблагодарить еще отдельно Карена Саркисяна и Александра Мишина. Это тоже мои руководители и они очень много сделали для того, чтобы я чему-то научился, чтобы я умел нормально работать. И за это я им очень благодарен, эти три человека по сути ответственные за то, кто я сейчас. Также я хочу поблагодарить моих коллег из лаборатории Константина Анатольевича Лукьянова, лаборатории Ильи Ямпольского, Саши Мишина. Спасибо вам, было приятно с вами работать, я от вас узнал много нового. Спасибо за помощь, которую вы оказывали, я очень ценю это. Также я хочу поблагодарить мою семью, которая меня поддерживала и хотела, чтобы я защитился. Также я хочу сказать спасибо Александру Габибовичу Габибову, потому что, если бы не он, то я бы сегодня не защищался. И в целом, я благодарен тем людям, с которыми я работал, спасибо.

Ефремов Р. Г., заместитель председателя:

Спасибо. Уважаемые коллеги, теперь мы должны избрать счетную комиссию. Напомню, что по традиции нашего совета, счетная комиссия работает сразу по двум защитами и тайное голосование проводится после окончания второй защиты. Я думаю, мы не будем отступать от этой традиции и если нет возражений, предлагается следующий состав счетной комиссии: Шапаронов, Лебедев, Олейников - председатель комиссии. Есть ли возражения, отводы? Я не вижу, тогда мы утверждаем состав счетной комиссии.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо большое. Уважаемые коллеги, на этом мы заканчиваем заседание и переходим к тайному голосованию. Просьба проголосовать. А во время подсчёта голосов мы рассмотрим проект и заключение по обеим диссертациям. Спасибо.

Ефремов Роман Гербертович: Так пока идёт подсчёт голосов, уважаемые члены совета, если у кого комментарии, замечания по проектам заключений по обеим диссертационным работам? Вот Николая Владимировича Бовина сегодня нет, поэтому без него нам трудно сформулировать какие-то пожелания и стилистические правки. Ну может быть есть у кого какие-то предложения? Не вижу. Тогда предлагается принять проекты заключений, которые у всех членов совета на руках. Кто за то, чтобы принять эти проекты заключений? Против? Воздержался? Принято единогласно. Спасибо.

(Проводится тайное голосование)

Ефремов Роман Гербертович: Так, коллеги, минуточку внимания.

Олейников Владимир Александрович: *(оглашает итоги тайного голосования)* Да, спасибо, счётная комиссия закончила свою работу. Горбачев Дмитрий Андреевич. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней - 20, оказалось в урне - 20, за - 20, против, недействительных - нет.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо, Владимир Александрович. Уважаемые коллеги, прошу утвердить протокол счётной комиссии открытым голосованием. Кто за? Против? Воздержался? Принято единогласно. Поздравляем и на этом разрешите завершить наше сегодняшнее заседание. Всем спасибо.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

