

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН
16 декабря 2015 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата химических наук

Царьковой Александрой Сергеевной

«Синтез люциферина люминесцентного червя *Fridericia heliota* и его
аналогов»

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Москва
2015 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

16 декабря 2015 года

Председатель диссертационного совета
Академик РАН

В.Т.Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов наук по профилю диссертации – 6. Кворум имеется.

- | | | | |
|-----|----------------|----------------------------------|------------|
| 1. | Академик РАН | Иванов Вадим Тихонович | (02.00.10) |
| 2. | Член-корр. РАН | Липкин Валерий Михайлович | (03.01.06) |
| 3. | Д.ф.-м.н. | Олейников Владимир Александрович | (03.01.06) |
| 4. | Д.х.н. | Арсеньев Александр Сергеевич | (02.00.10) |
| 5. | Д.х.н. | Безуглов Владимир Виленович | (03.01.06) |
| 6. | Д.х.н. | Бовин Николай Владимирович | (03.01.06) |
| 7. | Член-корр. РАН | Габибов Александр Габибович | (03.01.06) |
| 8. | Член-корр. РАН | Деев Сергей Михайлович | (03.01.03) |
| 9. | Д.б.н. | Долгих Дмитрий Александрович | (03.01.03) |
| 10. | Д.ф.-м.н. | Ефремов Роман Гербертович | (02.00.10) |
| 11. | Член-корр. РАН | Завриев Сергей Кириакович | (03.01.06) |
| 12. | Д.х.н. | Зубов Виталий Павлович | (03.01.06) |
| 13. | Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (03.01.03) |
| 14. | Академик РАН | Лукьянов Сергей Анатольевич | (03.01.03) |
| 15. | Академик РАН | Мирошников Анатолий Иванович | (03.01.06) |
| 16. | Д.б.н. | Патрушев Лев Иванович | (03.01.06) |
| 17. | Д.х.н. | Румш Лев Давыдович | (03.01.06) |
| 18. | Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (03.01.03) |
| 19. | Академик РАН | Свердлов Евгений Давидович | (03.01.03) |
| 20. | Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (02.00.10) |
| 21. | Д.х.н. | Формановский Андрей Альфредович | (02.00.10) |
| 22. | Д.х.н. | Шахпаронов Михаил Иванович | (02.00.10) |
| 23. | Д.б.н. | Шпаковский Георгий Вячеславович | (03.01.03) |

Вадим Тихонович Иванов:

– Уважаемые, коллеги, доброе утро! Хотя еще не истекло академических пяти минут после 10 часов, объявленных заранее, мне докладывают, что у нас есть полный кворум, и мы имеем все основания приступить к работе. Вашему вниманию была предложена вполне традиционная повестка дня: две защиты и принятие одной работы к защите. Есть ли какие-то сомнения в целесообразности данной повестки дня? Я не вижу, что вполне предсказуемо. Итак, переходим к первой защите. Владимир Александрович, материалы личного дела.

Владимир Александрович Олейников:

– Значит, личное дело: Царькова защищается, Александра Сергеевна, гражданка Российской Федерации, окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» по специальности химия в 2011 году, с 2012 года по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории биофотоники, затем в группе синтеза природных соединений она работает нашего Института. Кандидатский экзамен по специальности «Биоорганическая химия» сдан с оценкой отлично, работа выполнена в группе синтеза природных соединений нашего института. Научный руководитель работы – кандидат химических наук Ямпольский Илья Викторович. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, все необходимые документы в деле имеются.

Вадим Тихонович Иванов:

– Какие-то вопросы возникли по этому поводу? Вопросов не было. За всю историю ни разу не было вопросов по этим пунктам. Александра Сергеевна, слово для доклада – 20 минут.

Александра Сергеевна Царькова:

– Добрый день, уважаемые коллеги. (Излагает основные положения диссертационной работы).

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо за доклад. Переходим к обсуждению. У кого есть вопросы? Прошу, Васьковский.

Борис Викторович Васьковский:

– Вы упомянули в докладе, что вы использовали такой метод как масс-спектрометрия высокого разрешения.

Александра Сергеевна Царькова:

– Да

Борис Викторович Васьковский:

– Допускаете ли вы, что при современном развитии этого метода можно при установлении структур таких соединений использовать только масс-спектрометрию высокого разрешения, а метод ЯМР уже использовать как контрольный метод при анализе синтетических продуктов различных?

Александра Сергеевна Царькова:

– Учитывая уровень развития масс-спектрометрии и анализа, да, безусловно, многие соединения на данный момент можно определять исключительно этим методом. Однако это не всегда так, как, например, в нашем случае, нам было достаточно сложно исключительно по масс понять, какие фрагменты входят в люциферин. И именно по комбинации в данной ситуации ЯМР, спектроскопии и масс-спектрометрии мы смогли изначально предположить структурные фрагменты, а затем синтезировать эти вещества и, собственно, они же потом помогли нам определить, что изомер 4, наш синтетический люциферин, совпадает с природным.

Борис Викторович Васьковский:

– Где проводилась эта работа по масс-спектрометрии высокого разрешения? Потому что современные приборы позволяют видеть полную первичную структуру фактически всех соединений такого типа.

Александра Сергеевна Царькова:

– Работа по снятию масс-спектров проводилась...

Борис Викторович Васьковский:

– Не снятию масс-спектров – так не надо.

Александра Сергеевна Царькова:

– Да, приношу свои извинения. Эта работа проводилась у нас в ИБХ, как, собственно, и ЯМР-анализ.

Вадим Тихонович Иванов:

– Еще вопросы? Прошу.

Карен Сергеевич Саркисян:

– Быть может... Что вы думаете по поводу того, что соединение...

Вадим Тихонович Иванов:

– Чуть громче!

Карен Сергеевич Саркисян:

- ... которое, возможно, выполняет защитную функцию, забыл, как называется. AsLn2?

Александра Сергеевна Царькова:

– AsLn2, AsLn7 – они все...

Карен Сергеевич Саркисян:

– Они служат типа буфером в черве молекул, чтобы они сейчас прямо не окислились, но когда нужно, их можно было бы быстро расщепить, и они бы оказались в большой концентрации, для того чтобы ярко светиться.

Александра Сергеевна Царькова:

– Возможно, но тем не менее для того, чтобы соединить фрагменты ComrX и лизина, который уже есть как и в люциферине, как ты правильно заметил. Да, эти фрагменты есть и в AsLn2, но мне кажется, что потребуются куда большая работа на то, чтобы сначала провести условно биосинтетический синтез этого пептида, а потом его расщеплять, чтобы собрать его в другую сторону.

Вадим Тихонович Иванов:

– Так еще вопросы: сначала Долгих, а потом Василевский.

Дмитрий Александрович Долгих:

– Скажите, пожалуйста, вы сказали, что количество люциферина, которое у вас было, было изначально очень небольшим, в районе 5 мкг.

Александра Сергеевна Царькова:

– Да, 5 мкг.

Дмитрий Александрович Долгих:

– То, что вы синтезировали, и работали дальше с синтетическим, вы на каких количествах работали? Сколько вы получали?

Александра Сергеевна Царькова:

– Первый синтез, если мы не говорим о наработке люциферина, который потом пошел на определение структуры оксилуциферина и дальнейшие эксперименты с люциферазой, то для определения самой структуры люциферина мы нарабатывали миллиграммы. Т.е. у меня получилось люциферина непосредственно около 30 мг. Где-то так.

Вадим Тихонович Иванов:

– Прошу!

Александр Александрович Василевский:

– Если я правильно запомнил, один из аналогов, который не люциферин, его лизин вот так. Да? Эпсилон и альфа.

Александра Сергеевна Царькова:

– Да-да. Эпсилон- и альфа-аминогруппы. Я могу показать.

Александр Александрович Василевский:

– Но не люциферин. Почему это? Потому что его фермент не узнает или потому что не может люминесцировать? Как вы думаете? И туда же если оксалат сбрызнуть, такой может люминесцировать?

Александра Сергеевна Царькова:

– Мы провели n-ное количество опытов по определению вариативных фрагментов люциферина и обязательных его фрагментов и в результате наших экспериментов, нашего исследования мы выяснили, что фрагмент лизина, конденсированный с карбоксильной группой CompX альфа-аминогруппой, является обязательным фрагментом, точно так же, как и оксалат. Отсутствие оксалата не приводит к биолюминесценции. В то время как гамма-аминомасляную кислоту можно заменить каким-то, допустим, другим амидом.

Вадим Тихонович Иванов:

– У вас был вопрос? Пожалуйста.

Владимир Иванович Мартынов:

– Возможно, это вопрос не к вам, это чисто технический вопрос. Вы сказали, что содержание нативного люциферина составляет, по-моему, десятые доли микрограмма. И вы сравнивали ЯМР спектры нативного люциферина и синтетического. Возможно, кто-то другой ответит. Это какие-то новые методы ЯМР? Потому что, насколько я понимаю, нужно очень долго-долго копить сигнал вот с такими количествами...

Александра Сергеевна Царькова:

– И здесь необходимо сказать огромное спасибо лаборатории ЯМР-спектроскопии в нашем Институте и непосредственно Максиму Дубинному, который проводил все эти эксперименты. И это действительно было очень долгое выкапывание. И эти эксперименты проводились чуть ли не неделями и месяцами, но да, Максиму удалось выкопать настолько, что стали видны сигналы, вот эти протоны, и даже в двумерных спектрах. Несмотря на столь маленькое количество.

Вадим Тихонович Иванов:

– Может быть, я прослушал, какая функция процесса люцифериновой люминесценции? Биологическая функция.

Александра Сергеевна Царькова:

– У червей непосредственно?

Вадим Тихонович Иванов:

– Да, например, у червей. Даже не непосредственно ваш объект, а общее, у всех червей.

Александра Сергеевна Царькова:

– Нет, это совершенно не обязательно. На самом деле на вопрос «зачем и почему светятся те или иные организмы?» существует огромное количество теорий, и разные организмы применяют эту биолюминесценцию совершенно по-разному.

Вадим Тихонович Иванов:

– Хорошо, в нашем случае какая функция? Предполагаемая, во всяком случае. Идеи есть какие-то?

Александра Сергеевна Царькова:

– Она на данный момент пока еще не ясна.

Вадим Тихонович Иванов:

– Не ясна?

Александра Сергеевна Царькова:

– Предполагается, что это защитная функция для отпугивания тех или иных хищников, которые пытаются их съесть. То есть они светятся при механической стимуляции.

Из зала:

– Для привлечения особей противоположного пола!

Вадим Тихонович Иванов:

– Хорошо, у меня более технический вопрос. Вы нескромно упомянули свободные от рацемизации методы образования пептидов. Какие это были подходы? Что именно было выбрано в качестве свободных от рацемизации методов?

Александра Сергеевна Царькова:

– Мы на первом этапе синтезировали эфир по свободной карбоксильной группе в CompX . Очень удачное у нас было начальное соединение метиловый эфир и CompX , которое позволяло сначала конденсировать с салициловой карбоксильной группой, с соответствующей аминогруппой другого фрагмента (как это было, например, в люциферине). А изначально с аминогруппой гамма-аминомасляной кислоты. Затем мы защищали с использованием трет-бутельного эфира N-группу и щелочным гидролизом освобождали...

Вадим Тихонович Иванов:

– Так речь вроде шла о конденсации. Что Вы проводили конденсацию, что конденсация шла методом, который гарантирует отсутствие рацемизации. Меня заинтересовала это утверждение, что есть такие методы, которые уверенно не сопровождаются рацемизацией. Меня заинтересовало это

утверждение. Какие именно методы конденсации Вы использовали? И почему Вы считаете, что он свободен от рацемизации? Так это Вы использовали это утверждение!

Александра Сергеевна Царькова:

– Но это действительно свободный от рацемизации метод пептидного синтеза. Я не совсем понимаю вопрос.

Из зала:

– Классический!

Вадим Тихонович Иванов:

– Мне казалось, что я внимательно слушал доклад. Было сказано, что Вы на каком-то этапе синтеза применяли метод наращивания пептидной цепи(конденсации пептидной), свободной от рацемизации.

Александра Сергеевна Царькова:

– Да.

Вадим Тихонович Иванов:

– Меня заинтересовало, какой Вы метод использовали, свободный от рацемизации.

Александра Сергеевна Царькова:

– А, ну это классический метод пептидного синтеза, который мы применяли. Они достаточно стандартные.

Вадим Тихонович Иванов:

– Ну, так какой именно метод Вы использовали?

Александра Сергеевна Царькова:

– Образование сначала эфира по карбоксильной группе, потом непосредственно его конденсация с ...

Вадим Тихонович Иванов:

– Здесь рацемизации не может быть никакой, тут карбоксил не связан с асимметрическим атомом.

Александра Сергеевна Царькова:

– Здесь нет, а вот в Лизине – да. Мы проводили конденсацию с альфа-аминогруппой Лизина, он и использовался.

Вадим Тихонович Иванов:

– У вас же Лизин не активировался, у вас активировался карбоксил с щавелевой кислотой. Поэтому здесь рацемизации не может быть никакой.

Александра Сергеевна Царькова:

– Тоже верно.

Вадим Тихонович Иванов:

– Поэтому я и не понял, что именно имелось в виду под методом, свободным от рацемизации. Хорошо, оставим вопрос открытым. У кого еще есть вопрос? Прошу.

Из зала:

- В продолжении этого вопроса. Опишите пожалуйста, как Вы с помощью ВЭЖХ хиральной доказывали оптическую чистоту Ваших соединений.

Александра Сергеевна Царькова:

– Непосредственно ВЭЖХ-анализ проводился в компании «Медицинские технологии» нашими коллегами. Проводился он с помощью ВЭЖХ, хиральной хроматографии. Образец природной и синтетического аналога AsLn2 были пропущены через хиральную колонку и времена их удерживания, времена их выхода были абсолютно идентичными. И таким образом мы установили, что все стерео центры имеют одну конфигурацию.

Вадим Тихонович Иванов:

– Еще вопросы? Да, прошу.

Александр Габирович Габиров:

– Александра Сергеевна, большое спасибо за всеобъемлющий химический доклад, где Вы нам встречным синтезом доказали практически, что предполагается в соединении, которое происходит в биосинтезе червя. Скажите пожалуйста, хоть это и не тема Вашей диссертации, но тем не менее Вы показали спекулятивный слайд по биосинтезу. Кто-то делал уже доказательство биосинтеза люцифериннов, например, во включение тех или иных ферментов, которые действительно доказывают (с точки зрения

вероятности в единицу), что действительно биосинтез идет таким путем. И наверно путь Ваш для методологизации Вашей схемы, какие будут Ваши соображения?

Александра Сергеевна Царькова:

– На данный момент дальнейшие исследования собственно ферментов, которые отвечают за биосинтез люциферина не ведутся.

Александр Габирович Габиров:

– Но в других случаях биосинтез люциферина, по-моему, доказан, нет? Не Ваш, а вообще.

Александра Сергеевна Царькова:

– Вообще да, безусловно.

Александр Габирович Габиров:

– Дело в следующем. Там вот доказано с вероятностью единицы, когда выключен соответствующий фермент. Здесь Вы (поскольку у Вас всё-таки не ясны участники пути) как будете делать? Вы доказали конечную точку, вы доказали синтезом, что у Вас это соединение. Мы Вам верим. Но с точки зрения ферментативного пути, у Вас есть какая-либо реальная подводка для будущего?

Александра Сергеевна Царькова:

– На данный момент это не входит в мои планы...

Александр Габирович Габиров:

– Я так и сказал, что это не входит в Вашу диссертацию. Вопрос в следующем. Биосинтез люциферина фактически доказан в различных объектах. Там известны более-менее ферменты. Поскольку здесь Вы ставите вопросы (один или даже больше возможно), то какие-либо намеки на доказательства в Вашем случае могут быть? Вы будете выключать ферменты подобно этому?

Царькова Александра Сергеевна:

– Мы, безусловно, планируем разнообразно изучить метод биосинтеза, но я, к сожалению, пока не могу ответить на этот вопрос.

Вадим Тихонович Иванов:

– Иссакли вопросы, или еще есть? Иссакли. Можете отдохнуть немножко. Давайте продолжим обсуждение. Речь идет об отзыве ведущей организации.

Владимир Александрович Олейников:

– Ведущая организация – это Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементарно-органических соединений имени Несмеянова РАН. Отзыв положительный.

(Зачитывает отзыв, отзыв прилагается)

В отзыве ведущей организации приведены следующие замечания:

1. В обсуждении деталей иногда опущены важные детали, что затрудняет понимание. Например, на странице 64 не указано, что цис- и транс-изомеры соединения CompX были разделены и выделены в виде индивидуальных веществ. Написано лишь «ключевой стадией CompX являлась реакция, позволившая получать оба изомера в соотношении Z к E – 2 к 1». Если не прочитать экспериментальную часть – создается впечатление, что речь идет о смеси.

2. Хотя работа в основном синтетическая, выходы соединений при обсуждении результатов приведены далеко не всегда. Чаще всего приведен только суммарный выход на все стадии синтеза. Например, на то же странице 70: «предложенный нами пятистадийный метод синтеза позволил получить аналог люциферина AsLn2 с выходом 14%». Такое описание не позволяет оценить преимущества и недостатки выбранной схемы. Каждая из пяти стадий синтеза протекает с выходом около 70%? Или лишь одна из них дает выход 20%, а остальные превращения протекают с практически количественным выходом?

3. В работе не указано, как установлено количество остатка щавелевой кислоты в молекуле природного люциферина червя. Комментарий по этому поводу необходим, так как этот фрагмент особенно трудно идентифицировать с имеющихся спектральных данных.

Замечания не являются принципиальными, не затрагивают сути работы. Представленная диссертация является завершенной исследовательской работой, которая по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне, безусловно, удовлетворяет всем требованиям ВАК. Автор работы, Царькова Александра Сергеевна, достойна присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия». Соответственно, отзыв обсужден на

коллоквиуме лаборатории №102. Подписано старшим научным сотрудником лаборатории ИНЭОС РАН Перекалиным и утверждена заместителем директора этого института доктором химических наук Малеевым.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Там были замечания, хотелось бы услышать Ваши ответы на эти замечания.

Александра Сергеевна Царькова:

– Для начала я хотела бы поблагодарить сотрудников ИНЭОС РАН за написание отзыва. В особенности – Дмитрия Перекалина, взявшего на себя большую часть работы по его составлению. Безусловно, я согласна со всеми замечаниями и постараюсь учесть их в последующей работе и больше не допускать подобных ошибок. Что касается первых двух замечаний. Да, действительно, они в основном касаются оформления и достаточно, как обратил внимание Дмитрий, некоторое количество данных было вынесено из обсуждения результатов в экспериментальную часть. После его комментария я поняла, где и какие подобные неточности стоит исправлять в дальнейшей работе. Мне хотелось бы более подробно ответить на последнее замечание. Установление наличия остатка щавелевой кислоты в молекуле природного люциферина основывалось на анализе масс-спектрометрических данных и сопоставлении их с данными, полученными из ЯМР-спектров. Метод был озвучен мною в докладе. Он был приведен, однако он не вошел в мою диссертацию, так как он был выполнен моими коллегами в ходе предварительной работы по установлению структуры люциферина. Все замечания я постараюсь в будущем учесть.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Илья Викторович, у Вас есть возможность охарактеризовать своего подопечного-диссертанта.

Илья Викторович Ямпольский:

– Я думал, это после всех делается стадий.

Вадим Тихонович Иванов:

– Нет, это сейчас делается.

Илья Викторович Ямпольский:

– Я не буду долго Вас утомлять, могу сказать только, что я на 100% доволен тем, как Саша выполнила работу, тем, как она вообще работала в лаборатории, ведь она и в других проектах участвует. Могу сказать только все самые хорошие слова и надеюсь, что она продолжит работать в нашем Институте. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Переходим к заслушиванию отзывов оппонентов. Юровская Марина Абрамовна. Химический факультет МГУ, кафедра органической химии, профессор.

Марина Абрамовна Юровская:

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный)

– Добрый день, глубокоуважаемые члены ученого совета и коллеги. Я считаю, что явление биолюминесценции – это одно из самых загадочных и самых красивых явлений в природе. Поэтому все работы, посвященные этому явлению, безусловно, актуальны. Это, конечно, несерьезно. А если говорить серьезно об актуальности этой проблемы, то она связана с тем, что современная химия, медицина, современная фармакология требуют визуализации интимных процессов, которые происходят внутри клетки и в организме в целом. Для этого необходимы биолюминесцентные системы. Но, как Вы видели, содержание люцифериннов в этих системах природных настолько мало, что здесь нельзя обойтись без химического синтеза таких соединений и их аналогов. Для того, чтобы иметь достойное количество для дальнейшей работы. И не только это. Еще к таким структурам предъявляются очень жесткие требования (в смысле стереохимии и строения) и поэтому установление четкой структуры тоже входит в основную задачу подобных исследований. Разрешите мне охарактеризовать эту работу с точки зрения органика-синтетика, которым я являюсь.

Подобные работы сейчас, в современном мире, нельзя делать в одиночку. Это невозможно. Для этого нужны специалисты разных профилей. И действительно, это работа комплексная, которая началась с того, что в Красноярском крае впервые был обнаружен уникальный люминесцирующий червь. Была проделана колоссальная работа по выделению фрагментов, компонентов этой системы. Надо сказать, что эта комплексность была очень четко и корректно отражена в диссертации. Там понятно, кто, что и почему делал. После того, как было обнаружено 4 компонента этой системы, приступила к работе Александра Сергеевна. Здесь эта работа заключалась в

том, чтобы установить строение крайне малых количеств веществ и провести достойный синтез. Работа, во-первых (первая часть по установлению строения), предполагает высокую квалификацию автора. В смысле использования интерпретации физико-химических методов, великолепное знание спектров ЯМР, масс-спектров высокого разрешения и так далее. И умелое пользование ими в работе. А потом наступает время синтеза. Этот синтез состоит из двух частей. Это органический синтез и пептидный синтез. И каждая из этих стадий выполнена очень добротнo. В органическом синтезе используются четко всякие разные и перегруппировки, и именные реакции, и установление и удаление защит – это всё очень хорошо характеризует человека как органика-синтетика, скажем. И пептидный синтез тоже выполнен крайне достойно. Всё это позволило не только установить структуру соединений. Подумайте, какая огромная должна была быть работа! Надо было синтезировать конфигурационные изомеры, для того, чтобы идентифицировать с природными. И надо было синтезировать структурные изомеры, для того, чтобы тоже их идентифицировать их с природными. И всё это было сделано на очень высоком уровне. Работа мне очень понравилась. Она выполнена настолько достойно и серьезно, что у меня замечаний по существу практически нет. Одно из замечаний, которое можно сделать по делу, а остальные – это редакторские придирки, от которых я не могу никак избавиться. Первое замечание, которое действительно по сути работы – это предположение о том, что люминесценция происходит за счет окисления одной из трёх карбоксильных групп люциферина ничем не обосновано. Во-первых, их три. Какая из них окисляется – неизвестно. И почему вообще возникло такое утверждение, аргументов в пользу этого утверждения в работе не предвидено. А дальше начинается то, о чем я говорю «редакторские придирки». Например, в обзоре литературном, на странице 10 одно из соединений неправильно названо тиоформамидом. На странице 11 и 16 два соединения названы модифицированными пептидами, хотя я там пептидной связи не увидела. В экспериментальной части для ряда кристаллических соединений не приведена температура плавлений. Отчасти я это понимаю. Когда веществ так мало, жалко использовать кристалл, для того, чтобы использовать температуру плавления. Но к характеристике органических веществ – есть требования, которые надо выполнять. Потом, в работе употребляются такие вульгаризмы, как «снятие защиты». Этого я не люблю, я люблю, чтобы было «удаление защиты». Употребляются такие англицизмы, как «бороновые кислоты», хотя все химики-органики настаивают на том, чтобы был использован термин «борные кислоты», а не англицизм «бороновые». И, наконец, последнее – это «сушили над

осушителем». Сушили над осушителем – это предполагает сушку над или в эсикаторе, или в пистолете. А когда осушитель просто сыплют в раствор – это просто сушка сульфатом натрия. Это мелкие замечания, но, понимаете, это привычка редактировать статьи и требовать соблюдения каких-либо определенных канонов. Как Вы понимаете, это настолько незначительные замечания, что они ни в коей мере не умаляют моего впечатления от этой прекрасной работы. Во-первых, эта работа четко выполнила все поставленные перед ней задачи. Во-вторых, она соответствует паспорту специальности, как теперь принято говорить. Естественно, что публикация и автореферат удовлетворяют требованиям и т.д. Интересно то, что работе в работе предписан эпиграф. Там по латыни написано «Я сделал всё, что мог. Кто может лучше – пусть сделает». Но я считаю (скажу Вам и другую фразу), что лучшее – враг хорошего. Работа выполнена хорошо и лучше – не надо. Об этом свидетельствует публикация в журнале *Angewandte Chemie*. Известно, что этот журнал плохие работы не печатает. Он иногда даже хорошие работы не печатает. Так что это – очень высокая оценка. Я считаю, что Александра Сергеевна – сложившийся, очень квалифицированный специалист, достойный искомой степени. Спасибо за внимание.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Александра Сергеевна, были замечания. Ваша реакция.

Александра Сергеевна Царькова:

– Можно я вновь открою презентацию? Она продолжает убежать.

Я благодарю Марину Абрамовну за внимательное прочтение моей работы и ценные замечания, а особенно хотелось бы сказать побольше по поводу первого замечания. В мою диссертационную работу это исследование не вошло. То есть исследование непосредственно механизма биоломинесценции, окисление. Однако после завершения синтетической работы изучение биоломинесцентной системы червя, естественно, продолжилось. И в ходе дальнейших исследований, в которых я тоже принимала участие, мы установили механизм действия нашего люциферина. И, как Вы видите на приведенном здесь слайде... Хотя здесь не очень хорошо видно кислород, вчера гораздо лучше было разрешение... Реакция биоломинесценции люциферина червя *Fridericia heliota* начинается с образования аденилата люциферина по карбоксильной группе лизина с последующим депротонированием α -СН лизина и присоединением молекулы кислорода по карбоксилу. Дальнейшая нуклеофильная атака приводит к

циклизации и образованию диоксетанового цикла. Дальнейшее отщепление молекулы CO_2 , собственно, приводит к образованию окцилюциферина в возбужденном состоянии, при переходе которого в нормальное состояние выделяется свет. И спектр биолюминесценции здесь, то есть длина волны лежит в синей области спектра - 480 нанометров. Так что на данный момент структура окцилюциферина и окисление одной из карбоксильной групп, мы уже доказали, какой конкретно карбоксильной группы, механизм был нами доказан. А посему – заявление не является голословным, хотя и не было приведено в моей диссертации. Прочие замечания, указанные Марией Абрамовной, больше относятся к оформлению работы, а не к её содержанию, и, безусловно, свидетельствует о вдумчивом прочтении моего материала. Я согласна с ними и постараюсь впредь учесть и в дальнейшем не совершать таких ошибок. Спасибо большое.

Вадим Тихонович Иванов:

– Заслушаем второго официального оппонента. Туманов Василий Викторович, Институт органической химии, кандидат химических наук.

Василий Викторович Туманов:

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный)

– Уважаемые коллеги, добрый день. Я, когда взялся читать эту работу, поймал себя на мысли, которая для меня не нова, а просто давнее наблюдение, что первая часть работы, предшествующая эксперименту и дает обзор, может сказать об авторе не меньше, а едва ли не больше иногда, чем всё остальное. Я не хочу этим сказать, что эксперимент и его анализ подвластен каждому. Конечно же нет. Но экспериментальными навыками владеют многие, а вот умение сопоставить что сделал ты и что сделали остальные, умение понять, где ты находишься, умение проанализировать, что происходило, что происходит или вот-вот произойдет вокруг этой темы – оно показывает, имеем ли мы дело с ученым, или пока еще не очень. В данном случае мы точно имеем дело с ученым. Мне очень понравился обзор, он был написан великолепно, как хорошее произведение искусства, содержал все необходимое и не содержал ничего лишнего. И тут Александра Сергеевна была очень хорошим для меня, читателя, гидом в абсолютно новую область, за ручку меня провела. Всё было очень хорошо, спасибо. Что касается её содержательной части, Вы сами уже всё видели и слышали комментарии от Марины Абрамовны. Я повторяться не буду. Это – высококлассное исследование. Хотя в самой работе и в докладе было сказано, что оно

актуально, я, когда читал, думал и думал, что даже будь оно в силу каких-то обстоятельств не очень актуально – то его всё равно стоило бы делать. Ведь оно такое красивое и интересное, что его стоило бы сделать. Я благодарю Александру Сергеевну и Илью Викторовича за то, что меня позвали поучаствовать в этой истории. У меня есть официальное заключение, что я считаю, что Александра Сергеевна должна стать по итогам сегодняшнего выступления кандидатов химических наук. Спасибо за внимание, у меня всё. А, извините, надо же какие-то замечания. У меня они есть. Я тоже не избавлен от занудства, есть. Опечатки есть у многих, я об этом не буду. Там в экспериментальной части есть небольшая чехарда с цифрами. Там всё приведено точно и хорошо, только иногда небрежность со значащими цифрами. Где-то их после запятой одна, где-то их две, а где-то даже чуть ли не три. И не очень это обосновано. То есть иногда действительно достаточно одной, а иногда надо три. А вот когда в одном месте одна, две и три без обоснований – это дает налет небрежности. Вот такой момент. А второй момент, но уже не в эксперименте, а в обсуждении. Сказано, что соединение $AsLn_2$ может быть побочным продуктом. Наверное. Просто когда побочных продуктов больше в процентах, чем основного – это несколько странно звучит. Хотелось бы каких-либо комментариев по этому поводу. Вот и всё, спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Александра Сергеевна, будете объяснять про проценты? Вам слово.

Александра Сергеевна Царькова:

– Спасибо большое Василию Викторовичу за отзыв, очень внимательно прочитал мою работу и обратил внимание на цифры. Я абсолютно согласна с этим замечанием. Единственное, что я хочу сказать – да, действительно это была в некоторой степени небрежность. Но иногда, когда ты получаешь миллиграммы вещества, то очень хочется указать до последнего. Не 230, а 233, или 0,233. Просто очень хотелось. И да, я понимаю, что действительно надо иметь некоторое единообразие. Посему я, безусловно, учту это замечание. Так же было замечание об окислении карбоксильной группы в официальном отзыве. Формулировка, предложенная Василием Викторовичем, действительно более корректна, так как в диссертации было сказано, что происходит окисление карбоксильной группы, хотя на самом деле происходит скорее окисление СН-связи. Хотя я тоже абсолютно согласна с этим замечанием, спасибо огромное. Я учту и перестану так делать.

Василий Викторович Туманов:

– Вы про побочный продукт можете рассказать что-нибудь? Почему его назвали побочный?

Александра Сергеевна Царькова:

– Побочный продукт AsLn2. Мы предположили, что он является побочным продуктом в силу того, что

Вадим Тихонович Иванов:

– В силу того, что он не был целевым?

Александра Сергеевна Царькова:

– Нет, нет. Сейчас я покажу вот эти две структуры вместе... Вероятного ошибочного присоединения, конденсации, в процессе биосинтеза лизина к C10 карбоксильной группе соединения CompX. Так как этот фрагмент лизина, ε-аминогруппы лизина, достаточно сильно похож на фрагмент гамма-аминомасляной кислоты. Если аминокислотные лигазы неспецифичны, то есть предположение, что непосредственно этот фрагмент может являться побочным продуктом. Действительно, можно сказать, что весь AsLn2, возможно, им не является, потому что есть еще тирозин. И должны быть какие-либо суперспецифичные лигазы для присоединения всего этого... Предположение было сделано на основании сочетания и похожести комбинации вот этих двух фрагментов и фрагмента гамма-аминомасляной кислоты. Всё.

Василий Викторович Туманов:

– Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Добро. Мы закончили запрограммированную часть процедуры защиты, можем перейти к общей дискуссии. Кто хотел бы выступить? Прошу. Академик Лукьянов.

Сергей Анатольевич Лукьянов:

–Уважаемые коллеги, я хочу сказать, что работа мне очень понравилась. Я наблюдал её со стороны. По эмоциональному накалу она происходила как в старые добрые времена поиска флуоресцентных белков или изобретения вычитающих технологий. Это действительно была гонка за истиной. С

перебором возможных вариантов и работала Александра Сергеевна очень увлеченно и заражала окружающих этим, поэтому я поддерживаю. Но я хотел несколько слов сказать, чтобы обрисовать ситуацию с люцернами. Дело в том, что Саша может быть растерялась и, не будучи биологом, просто не ответила на этот вопрос. Хотя я думаю, что она прекрасно знает, что ни одного люциферина на сегодня путем биосинтеза природного и ферментов (кроме отдельных каких-то фрагментиков) не установлено. Даже целентеразин, который всем известен и продаётся. Как делают его организмы – неизвестно. В данном случае речь идет о новом виде червячка, в Красноярске который живет в почве, маленький, геном которого даже не секвенирован. Поэтому на сегодня это преждевременная постановка вопроса, хотя в перспективе мысль о том, чтобы разобраться с этим биосинтезом у лаборатории Ильи Викторовича, я думаю, есть. И интерес есть. Но мы тут в данном случае находимся в общей канве. С биосинтезом люцифериников наука пока не разобралась. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

- Спасибо. Есть еще желающие выступить?

Да, Александр Сергеевич, прошу.

Александр Сергеевич Арсеньев:

– Я с интересом прослушал эту работу. Мне кажется, работа достаточно тривиальная и характерная для группы Ильи. То есть насобирали в Сибири. Сибирь большая. Насобирали светящихся червячков, собирать легко. Они же светятся. Насобирали мало. Взяли тривиальный ЯМР... А, ну сначала поделили, выделили... Опять же, легко было выделять, поскольку светилось. Взяли тривиальный ЯМР, наснимали спектров. Потом синтез встречный. Чем-то таким древним, я со своего детства помню такие термины. Синтез достаточно простой. Синтезировали, получили соединение. Где-то совпало. Вот, собственно, и опубликована диссертация, в значительной части в журналах типа *Angewandte Chemie* ну и некоторых несколько попроще. Все стадии, казалось бы, совершенно элементарны. И чего тут защищать? Но мне кажется, что комбинация таких простых вещей привела к хорошему результату. В этой связи мне вспоминается ... Александр Степанович Хохлов, кажется. Был, по-моему, у нас такой замдиректора.

Вадим Тихонович Иванов:

– Был, и в будущем году ему бы исполнилось 100 лет.

Александр Сергеевич Арсеньев:

– Ну, чудно. Я помню, зашел как-то на ученый совет, совсем еще молодой аспирант. А он вышел на трибуны и говорит: «Я не понимаю этих сложных методов. Зачем? Я помню свою молодость, когда мы практически при помощи палки и веревки делали такие крутые вещи». И мне кажется, что в данном случае произошла такая же вещь. При помощи хорошей компоновки простых вещей получилась очень интересная работа. И вполне достойная степени кандидата наук. Я не знаю, кто внес большой интеллектуальный вклад. То ли Илья всё так скомбинировал, то ли диссертант очень аккуратно работал, то ли всё это вместе происходило... Но результат мы видим, результат достойный, опубликован в хороших работах и вполне достоин, на мой взгляд, защиты. И, наверное, на наш взгляд ученых, и в этом институте и стране особенно, ожидает такое светлое будущее, когда при помощи палки и веревки мы будем добиваться хороших результатов. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Вышли за темы диссертации. Да, прошу.

Андрей Альфредович Формановский:

– Добрый день, коллеги. Мне легко выступать, потому что в свое время я представлял эту работу к защите. Хочу буквально одну фразу сказать. Очень красивая и изящная, элегантная работа, сделанная абсолютно в классическом духе биоорганической химии. Выделение малейших количеств природного вещества и доказательств его структуры встречным синтезом – это огромный и тяжелейший труд. Спасибо. А, ну автор, безусловно, достоин искомой степени.

Вадим Тихонович Иванов:

– Александр Габирович, прошу.

Александр Габирович Габиров:

– Здесь, поскольку меня Сергей процитировал, я просто действительно несколько в агрессивной манере... Работать мне всегда нравилось. И Илья это знает. Я, к сожалению, вынужден не согласиться с Александром Сергеевичем, роль его лаборатории в установлении аналитических структур велика (и здесь цитировалась), но она, конечно, не главная. Главное – это, конечно, встречный синтез, который может быть и был сделан палкой и веревкой, но даже Зелинский со своим противогазом не работал палкой и

веревкой. А, слава Богу, органическая химия в России была вполне на европейском уровне. Хохлов Александр Степанович был очень известный академик, специалист в области и синтеза и выделения низкомолекулярных соединений. Работа эта, действительно, очень хороша. Я бы сказал, будучи выпускником химфака, что она сделана на субмикрочастицах. И нужно было сначала сделать анализ (я пропустил, опоздал минут на 7, делали Вы анализ или до Вас он был сделан?). Но встречный синтез многостадийный был точно сделан Вами. И это прекрасно.

Что касается моего вопроса. Я действительно не знал, что отсутствует, хотя я выпускник кафедры Березина, где очень любили заниматься люциферазами разными и аналитическими разработками. Я действительно не знал, что наука так отстала и неизвестен 1 фермент. Потому что Бронштейн установил кучу путей метаболизма. Но у Вас открыта прекрасная перспектива. Просто я немножко агрессивно задал, но, раз рисуется гипотетическая схема, то диссертанту можно простить, как она хочет реализовать. Собственно, я это и спрашивал. Но раз неизвестны базовые вещи, то, конечно, новый люциферин... Хотя это не предмет Вашей диссертации. Просто хотелось бы услышать ваши мысли, как бы Вы устанавливали. Я Вам дал пассаж, как бы я делал в этом случае. Но раз ничего не сделано вообще – то прекрасно! У Вас прекрасное комбинаторное поле для развития. Диссертация очень интересная. У нас на биоорганической химии защищается и микробиология (фактически). Но Вы действительно химик-органик. Очень хорошо, что у нас эта школа не ликвидирована. В Гарварде, по-моему, химический синтез уже забыт. Очень приятно, что у нас такой ремейк на другом уровне (благодаря работам Ильи). Наш институт может гордиться синтетической, биоорганической химией Большое спасибо, а Вам, конечно, у Вас прекрасные коллеги по выключению генов. Выключите – и будете дальше перебирать, какой ген, какой фактор и что действительно участвует в механизме. Спасибо, я считаю, что диссертация должна быть полностью проголосована положительно. Спасибо.

Борис Викторович Васьковский:

– Еще можно вопрос?

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Сейчас время для дискуссии. Если есть желание выступить – прошу. Прощу.

Борис Викторович Васьковский:

– Я только кратко скажу свое мнение о диссертации. Диссертация огромная по объему. Это еще раз подтверждает старую истину, почему у нас кандидатские лучше, чем докторские. Потому что у нас докторские делают кандидаты, а кандидатские – доктора. Поэтому работа блестящая и по объему, и по качеству. Тут уже почти готовая докторская диссертация. Я пришел в институт чуть позже, чем Александр Сергеевич. Мне посчастливилось девять лет отработать в отделе Юрия Анатольевича Овчинникова. Чем наш Институт всегда отличался, так это тем, что у нас всегда было самое лучшее приборное обеспечение. Во всём Советском Союзе. С тех пор я так был избалован Юрием Анатольевичем, что до сих пор считаю, что современные методы физические – они очень помогают химикам в их сложных синтезах. И поэтому нужно как можно больше использовать последние достижения масс-спектрометрии высокого разрешения. Теперь таких приборов и специалистов в России очень много. ЯМР – у нас великолепный ЯМР. Он позволяет определять структуру уже на уровнях 100 микрограмм, даже меньше – 50 микрограмм. Работа блестящая, и дай Бог ей продвижения дальше. Но приборная база наше сейчас немножко отстает от, например, приборной базы такого же института (нашего теперь тоже) – Института биомедицинской химии. Надо на немножко обновить приборную базу. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Конечно, было спорное утверждение, что у нас всегда кандидатские лучше докторских... Но не будем вязываться в этот спор. Кто-то хотел бы еще выступить, нет? Ситуация, мне кажется, ясная. По поводу данной диссертации. Тогда на этом мы завершаем выступление, и я даю слово диссертанту для заключительного слова. Прошу.

Александра Сергеевна Царькова:

– В заключение мне бы хотелось выразить благодарность всем тем людям, без кого бы эта работа была бы невозможной. В первую очередь своему научному руководителю Ямпольскому Илье Викторовичу. Он поддерживал меня на всех этапах этой работы, жестко критиковал, но помогал советами и всегда направлял в нужное русло мои руки и мои мысли. Так же хотелось бы сказать огромное спасибо сотрудникам лаборатории биофотоники Института Биофизики сибирского отделения РАН Валентину Петушкову и Наталье Родионовой, которых здесь сегодня в зале нету, но с чьего многолетнего труда по поиску, сбору, разделению и выделению компонентов биолюминесцентной системы червя *Fredericia*, собственно, началась наша

большая работа по установлению структуры. Безусловно, ни одна синтетическая работа не обходится без анализа полученных веществ, а в ситуации моей работы она и не началась бы без анализа выделенных веществ. Поэтому отдельное огромное спасибо лаборатории бимолекулярной ЯМР спектроскопии. А особенно Максиму Дубинному и Константину Минееву, без чьего участия, опять же, эта работа была бы крайне сложной. В отдельности огромное спасибо руководителю отдела биофотоники Константину Анатольевичу Лукьянову, в чьей лаборатории проводилась часть нашей работы. Как мы смотрели биолюминесценцию там, когда смотрели последний четвертый изомер люциферина и именно там мы танцевали чечетку, когда у нас наконец-то всё засветилось, за что, собственно, огромное спасибо. Так же хотелось бы сказать спасибо всем членам группы синтеза природных соединений за создание прекрасной рабочей атмосферы и членам своей семьи за помощь и поддержку. Спасибо.

Вадим Тихонович Иванов:

– Спасибо. Чтобы проголосовать, нам нужно набрать счетную комиссию. Тут Владимир Александрович провел предварительную работу и сформировал предложения. Я без регалий, имён-отчеств. Бовин, Формановский, Олейников. Предлагается счетная комиссия в таком составе. Есть ли какие отводы, самоотводы? Есть ли возражения против данного состава счетной комиссии? Если нет, я буду считать её принятой нашим ученым советом. Утвердили счетную комиссию. Еще нам после голосования предстоит утвердить проект заключения, который члены ученого совета имеют возможность увидеть. И я надеюсь, они имеют его на руках при заключении. Если есть какие-либо предложения по редакции – лучше сейчас их сказать. С тем, чтобы потом просто проголосовать за и с этим кончить. Так еще достаточно очевидные вещи, там просто констатируются замечания, которые были сделаны оппонентами и в ходе дискуссий, и упоминается личный вклад соискателей. То есть достаточно простые формальные вещи. Но тем не менее. Нет никакого возражения? Есть? Прошу.

Александр Габирович Габиров:

– У меня, наверное, больше не возражение, а вопрос. Я посмотрел списки публикаций четыре везде, а в списке заключения мы пишем, что три. Это потому что четвертая статья – это неосновной вклад?

Вадим Тихонович Иванов:

– Сейчас. Это на какой такой странице?

Из зала:

– Это 4-5 страница. Вместо четырех работ там три.

Вадим Тихонович Иванов:

– Я считаю, что надо дать так, как на самом деле есть.

Из зала:

– Да, надо четвертую включить.

Александра Сергеевна Царькова:

– Там в оформлении документа сказано, что не обязательно нужно четыре. Основные работы было сказано.

Из зала:

– А, основные, да?

Вадим Тихонович Иванов:

– То есть ответ такой: основных три, а вторая – она как бы менее основная. Поэтому мы имеем право подать три, хотя их всего было четыре.

Голос из зала:

– Ну, если это сознательно, то...

Вадим Тихонович Иванов:

– Ответ такой: это было сделано сознательно. Поэтому есть предложение оставить в таком же варианте...

– Спасибо. Значит, я сейчас объявляю перерыв на голосование, но просьба не расходиться, поскольку у нас есть в повестке дня еще один вопрос. Простой, но, тем не менее, он имеет место быть. Голосуем.

Владимир Александрович Олейников:

(оглашает результаты голосования)

– Защита Царьковой Александры Сергеевны. Присутствовало 23 члена диссертационного совета. Роздано бюллетеней 23. В урне нашли 23. «За» - 22, недействительный -1, «против» - нет.

Вадим Тихонович Иванов:

– Прошу утвердить итоги голосования. Кто за? Что ж, поздравим диссертантов. Поздравляем с успешной защитой. Успехов вам. Вот. И спасибо за работу. Я так понимаю, это последняя защита на совете в этом году?

(Проходит голосование по проекту заключения совета. Заключение совета принято единогласно.)

Вадим Тихонович Иванов:

– Предварительные поздравления с наступающим Новым годом, но еще мы будем встречаться не раз в этом году.

Председатель диссертационного совета
Академик РАН



В.Т. Иванов

В.Т.Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

В.А. Олейников