

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

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН

14 февраля 2024 года

Защита диссертации

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Орлова Евгения Евгеньевича

По теме «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*»

Специальность – 1.5.3 – молекулярная биология

Москва – 2024 г.

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 14 февраля 2024 года.

Председатель

диссертационного совета

акад., д.х.н. А.И. Мирошников

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
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	(1.4.9)
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.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
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.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
14.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
15.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
16.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
19.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
20.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
21.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
22.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
23.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Так, уважаемые коллеги, у нас сегодня одна защита диссертации Евгения Евгеньевича Орлова «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология». Научный руководитель – Андрей Георгиевич Зарайский. Официальные оппоненты – Краус Юлия Александровна, доктор биологических наук из МГУ и Адамейко Игорь Игоревич из Венского медицинского университета. Отсутствует по уважительной причине, естественно. Ведущая организация – Санкт-Петербургский государственный университет. Пожалуйста.

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

Да. Материалы личного дела (ну поскольку там не видно меня из-за экрана). Вот, я позволил себе выйти на трибуну. Значит, Орлов Евгений Евгеньевич, Российская Федерация, окончил биофак МГУ, 2013 год, по специальности «физиология», специализация «эмбриология». С 2013 по 2017 год обучался в аспирантуре ИБХ РАН. С 2017 г. по настоящее время сначала инженер-исследователь, младший научный сотрудник, сейчас научный сотрудник лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего Института. Кандидатский экзамен по молекулярной биологии – «отлично». Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН. Научный руководитель – Зарайский Андрей Георгиевич, доктор биологических наук. По теме диссертации опубликовано 10 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и реферат диссертации размещены на сайте ВАК 11 декабря 2023 года, то есть, вовремя. И все необходимые документы в деле есть

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Вопросы? Вопросов нет. Так, Евгений Евгеньевич, пожалуйста.

Соискатель Е.Е. Орлов:

(Излагает основные положения диссертационной работы).

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Покажите, пожалуйста, публикации.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Да, конечно.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Коллеги, вопросы, пожалуйста. Никого не заинтересовала шпорцевая лягушка?

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Пожалуйста, Николай Владимирович.

Д. х. н. Н.В. Бовин:

У вас, судя по вашему докладу, уже сложилась некая концепция, представление, как всё это устроено, как всё это действует. Согласно вот этим вашим представлениям: скейлеров должно быть много? Или вы нашли то небольшое, что есть?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Вот, да, это очень хороший вопрос, я об этом сегодня думал как раз, насколько должно быть этих веществ, которые сильно изменяют концентрацию при регуляции. То есть, мы, с одной стороны, уменьшаем эмбрион в два раза, то есть, у нас коэффициент изменения линейного, ну, линейный коэффициент изменения 30 %. У нас должны сжаться градиенты на 30 процентов. Зачем нужно сильное изменение концентраций каких-либо веществ? И я не могу придумать никакой лучшей аналогии как с микроскопом: то есть, у нас есть два винта, один грубой настройки, другой тонкой настройки. Чтобы настроить морфогенетический градиент тонко, нужно крутить сильно, чтобы он настроился точно. Но, если у нас будет очень много таких винтов, скорее всего это не будет работать, потому что опять возникнет шум. Вот, термодинамический шум, возможно, если этих веществ будет много, то шум опять будет расстраивать систему. Ну, это, моё субъективное, честно говоря, мнение. Я не знаю, как это доказать. Это невозможно доказать. Даже вот то, что продемонстрировано, это не доказательство, это демонстрация.

Д. х. н. Н.В. Бовин:

Спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Да, предвосхитили ваш вопрос, Николай Владимирович. Дмитрий Александрович, пожалуйста.

Д. б. н. Д.А. Долгих:

У меня, если можно, два вопроса: один совсем коротенький. Такой образовательный. Скажите, пожалуйста, а вот эмбрионы, разделенные, там, на несколько частей, когда они разовьются, у них остается хоть какая-то память о том, что с ними провели эту операцию? Средний размер этих эмбрионов в сравнении с теми, у которых не было этой операции, -- он хоть сколько-нибудь отличается?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Смотрите, здесь интересно. У данного модельного объекта эмбрионы уменьшены до стадии головастика. То есть, они еще не успевают вырасти. Но, вот, у млекопитающих, ну, есть такое, такой факт, что образуются химеры, да? То есть до четырех эмбрионов слить в один – образуется очень большой эмбрион. Допустим, мыши. И было показано, что этот эмбрион чувствует свой размер. Тоже чувствует. Он имплантируется в матку, и, когда образуются уже полости в этом эмбрионе, там происходит во внутренней этой клеточной массе избыточный апоптоз. И эмбрион уменьшается сразу. То есть, то есть, у млекопитающих, скорее всего, вот этот вот скейлинг им не нужен даже. Они просто размер изменяют. Заранее. Вот. Ксенопус это, к сожалению, не может сделать, возможно потом он - ну, по идее - должен дорасти, да.

Д. б. н. Д.А. Долгих:

Спасибо. И второй вопрос, если можно: это вот о белке вы можете что-нибудь сказать? Вы это совершенно не затрагивали. Что за белок, размеры, организация, структура, домены, какие-то может быть еще активности? Вот есть какая-то информация у вас, в литературе?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Конечно, это металлопротеиназа, класс ммп3, она цинковая, у них каталитический домен очень консервативен до бактерий. У всех цинковых металлопротеиназ консервативный домен бактериального происхождения. Есть, там, про-домен у нее, который ингибирует ее. То есть, без отрезания про-домена она не функционирует. У нее на Ц-конце EGF-повторы, по-моему. Вообще ммп3 она у человека регулирует адипогенез и остеогенез. И при, например, при воспалении суставов она активируется. Поэтому, собственно, вот, ну, как мне кажется, то, что мы нашли - случайно, на самом деле, - два новых субстрата для этого фермента, мне кажется, достаточно интересно для медико-биологических исследований.

Д. б. н. Д.А. Долгих:

Спасибо большое.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Просветились, Дмитрий Александрович?

Д. б. н. Д.А. Долгих:

Да.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Окей. Еще вопросы? Да, пожалуйста.

Д. х. н. К.А. Мирошников:

Спасибо большое за доклад. У меня вот вопрос – он как раз навеян предыдущим. Насколько я понимаю, в вашей модели полагали, что зависимость между экспрессией гена *mmp3* активностью фермента – какая-то константа. А при том, что, в общем-то, фермент сам достаточно сложно процессируется, насколько это предположение корректно? Может быть, там когда чуть падает экспрессия, там, допустим, активность фермента совсем уходит?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Это неизвестно. Мы это не исследовали. Дело в том, что мы так и не... Так, как-то вот... Нужно было, конечно, выделить антитела на этот фермент, и естественно, померить его на уменьшенных эмбрионах антителами. Но этого не было сделано, потому что и так очень много чего...

Д. х. н. К.А. Мирошников:

Нет, это не упрек, просто вопрос.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Только экспрессия. Поэтому я говорю, то, что я вот, наверное, я не знаю, но вот я, возможно, специально говорил, что я не говорил про уменьшение концентрации фермента, я мог говорить только об изменении экспрессии. На данном этапе исследований.

Д. х. н. К.А. Мирошников:

Хорошо, спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Это будет следующая диссертация. Пожалуйста

К.б.н. Н.Г. Гурская:

Спасибо большое за доклад, у меня вопрос следующий: вот насколько потенциальные скейлеры или антискейлеры должны обязательно принадлежать к секретируемым белкам? Как вы думаете?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Не знаю. Ну, вот, вот, есть там данные по другому модельному объекту – морскому ежу. Там скейлер секретируемый тоже. Ну, то есть, это, ну, логично, что если у нас формируется во внеклеточной среде градиент морфогена. Ну, то есть, что он внеклеточный, это для саморегулируемых систем - это необходимость, потому что клетки должны друг друга чувствовать на дистанции. Поэтому должны выделяться некие

вещества, чтобы чувствовать свое окружение. Соответственно, если у нас система саморегулируемая, то скорее всего, естественно, эти скейлеры секретлируемые. Ну это как-то логично. Возможно, бывают и внутриклеточные, почему нет. У насекомых. У насекомых же синцитиальный эмбрион. То есть, там ядра дробятся в единой клетке и формируются внутриклеточные градиенты транскрипционных факторов. Как вот bicoid, dorsal, да. В таких системах, возможно, действительно, тоже есть скейлеры, хотя эти системы плохо как раз саморегулируются. Ну вот в таких системах как раз можно предположить наличие внутриклеточных скейлеров. Да, да.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Еще вопросы?

К. б. н. Ф.М. Ерошкин:

У меня вот такой вопрос. Вы изучали только дорзо-вентральную ось. Но мы все хорошо понимаем, что есть еще как минимум две. То есть, передне-задняя и право-левая. Можно что-то сказать в плане скейлинга про другие оси?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Да, я лично пытался изучать передне-заднюю разметку эмбриона при регуляции. Ну, возможно, то есть, передне-задняя разметка регулируется такими каскадами, как Fgf-каскад и Wnt-каскад. Лично я считаю, что фермент mmp3 влияет на один из этих каскадов. К сожалению, я этого доказать пока не смог. Но влияет, да. Я думаю, да.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Владимир Александрович.

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

А вот скажите, с линейным размером. Ведь как-то логичнее с объемом, допустим. А если всего в 2 раза изменение это уже в 8 раз будет (параметры меняться должны).

Соискатель Е.Е. Орлов:

Ну, как бы, у нас шарик. Ну вот если рассматривать эмбрион как шарик, если его уменьшить в 2 раза, то у нас все равно разметка эмбриональная происходит все-таки в поверхности. То есть в площади сферы. А внутри там находится желток, и он как бы не принимает участия основного. Поэтому естественно, если мы рассматриваем поверхность сферы, то если мы уменьшаем в два раза, то сфера-то она

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

Площадь изменяется в 4.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Нет, меньше, чем в 2 раза.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Ну если я правильно понимаю.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Так, еще вопросы? Ну, отдохните пока. Андрей Георгиевич, охарактеризуйте.

Научный руководитель, д. б. н. А.Г. Зарайский:

Добрый день, коллеги, кого не видел. Ну, прежде всего, небольшой исторический экскурс. Как уже говорилось тут, Женя пришел к нам давно уже. Он делал у нас диплом, и потом, когда он стал поступать в аспирантуру, вот, я ему предложил две задачи. Одна была такая – продолжением его диплома, и там было в общем все ясно, и вот у меня давно уже летала вот эта идея, что нужно сравнить транскриптомы маленьких и больших эмбрионов. Но тогда было совершенно ничего не понятно: почему, что, как? Но вот очень хотелось. И вот я ему предложил такое тоже на выбор. Задачу. И он выбрал вторую, конечно, задачу, вот эту. И это его характеризует, потому что он всегда направлен на решение больших научных проблем, а эта проблема о регуляции пропорций при изменении размера – это такая фундаментальная совершенно проблема биологии развития. Я бы даже сказал всей биологии, потому что этот вопрос связан с дальнедействующей самоорганизацией, с диссипативными структурами. То есть она такая – на стыке физики, математики, биологии, химии. И вот она занимала умы ученых очень давно, начиная с этого Дриша, который тут показан. Ну действительно, это удивительно, делите эмбрион пополам и вдруг вы видите, что половинки хорошо очень развиваются. Ну и вот только благодаря Жениному упорству и погруженности в процесс удалось эту тему развить. Да, большинство тут экспериментов сделаны Женей. Конечно, вот вся эта математика вся – это делал в основном Лёша Нестеренко. Без него бы мы не сделали. Но вот весь эксперимент, и всё, всё-всё-всё – это вот Женина заслуга. И тут это его, конечно, очень хорошо характеризует. Ну и вот как он делал доклад и отвечал на вопросы: мне кажется, видно, что он вполне осознанный такой и продвинутый ученый, и в общем я, конечно, характеризую его очень-очень положительно. Вот. И прошу поддержать при голосовании. Спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Владимир Александрович, давайте.

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

Так, ну у меня в руках *заключение организации*, где выполнялась работа – это заключение нашего Института. Ну, сразу скажу, что работа, конечно, рекомендована. Ну, и как обычно здесь биографические данные, которые были уже оглашены. Я хочу подчеркнуть, что тема утверждена была в 2013 году, то есть, начало работы было больше 10 уже лет назад. Но она изменена тема несколько, и в 2023 году это произошло. Теперь значит: научный руководитель уже выступил, Андрей Георгиевич. Работа обсуждена на открытом семинаре отдела геномики и постгеномных технологий нашего Института. Ну, и по итогам обсуждения сделаны следующие заключения: во-первых, про актуальность. Ну про актуальность тоже мы... здесь пишется: «исследование новых молекулярных механизмов эмбриональной регуляции, проведенное в работе, имеет важное значение для современной биологии развития, что подтверждается публикацией основного материала работы в журнале *Developmental Cell* – одном из наиболее авторитетных журналов по биологии развития на данный момент.». Новизна. Ну, опять же, встречаются постоянно упоминания, что впервые была выдвинута вот такая гипотеза. Впервые было произведено экспериментальное разделение первых двух бластомеров, и работа эта может служить основой для поиска новых скейлеров в различных модельных системах. И короче, значит, новые субстраты выявлены. То есть этим подчеркивается новизна работы. Личное участие: ну об этом уже произнес научный руководитель. Здесь подчеркивается, что большинство генетических конструкций получены, эти эксперименты проведены лично Орловым Е.Е. Ну и далее говорится, что некоторые эксперименты, какая-то часть, в «Еврогене» были сделаны. И еще, значит, участвовала Паршина Е.А. Результаты. Ну, результаты мы в выводах уже слышали, здесь все сказано. Степень достоверности работы на высоком уровне проведена. Материалы опубликованы в 10 хороших статьях, и в целом работа рекомендуется к защите, поскольку работа полностью соответствует положению о присуждении ученых степеней, удовлетворяет требованиям ВАКа, соответствует заявленной специальности, и это заключение принято на открытом семинаре отдела геномики и постгеномных технологий нашего Института. Единогласное голосование, секретарь семинара – Ерошкин. Подписано зам. Директора ИБХ РАН Ямпольским, и утверждено нашим директором академиком Александром Габибовичем Габибовым. Это что касается заключения организации.

Теперь отзыв ведущей организации. (*Зачитывает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный*). Ведущей организацией здесь является Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Ну и, соответственно, пишется об актуальности темы

исследования, новизна. Ну, здесь тоже повторяется, что впервые сделано одно, впервые второе, впервые третье, и подчеркивается, что действительно она соответствует по научной новизне. Структура и содержание работы: 151 страница, 294 ссылок, классическая, стандартная структура. Обзор литературы написан понятно, дает хорошее представление об основных вопросах, связанных с темой диссертации. Раздел «Результаты» - это 8 частей и подробно описано, в какой части что здесь представлено. В коротком разделе «Обсуждение» формулируется новая гипотеза о различных механизмах дифференцировки клеток на дорсальном и вентральном полюсах зародыша амфибий, что требует дальнейшей экспериментальной проверки. Этот раздел по стилю больше соответствует заключению, что оправданно в связи с наличием элементов дискуссии в разделе «Результаты». Материалы и методы – полный список реактивов, оборудования, методов и так далее. Выводы – 6 пунктов, полностью соответствуют целям и задачам работы. Достоверность сомнений не вызывает. Теперь общие замечания и вопросы. Значит, в целом – сразу подчеркивается – работа Евгения Евгеньевича Орлова написана хорошо, включает в себя все необходимые разделы. Сама работа возражений не вызывает, однако к тексту диссертации имеются некие вопросы и небольшие замечания. Вот, ну, тут довольно много. «Так, в манускрипте встречаются и неоправданно повторяются слова в одном и том же предложении, или в двух последовательных. Например, «мезодерма также дифференцируется вдоль дорзо-вентральной оси вдоль градиента активности BMP-каскада». Некоторые фразы и предложения построены неудачно. Например: «несмотря на то, гипотеза Ру была экспериментально опровергнута на моделях амфибии и морского ежа, наличие мозаицизма в развитии животных было подтверждено во многих других случаях несмотря на неудачный опыт Ру». Далее «идентифицирована группа из генов». «Эмбрионы оплодотворились». А вот опечатки встречаются редко». «Имеются некоторые неточности в терминологии. Так, определение эмбриональной регуляции, данное автором во введении (восстановление нормальной структуры эмбриона после искусственного изменения его размеров) несколько сужено, поскольку сам термин подразумевает любые события восстановления недостающих структур и нормального хода развития на всех стадиях эмбриогенеза. Диссертант использует словосочетание «дорсо-вентральная асимметрия», хотя следовало говорить об осевой организации, а не асимметрии. Из уважения к автору открытия правильнее употреблять термин «организатор Шпемана» вместо «шпемановского организатора». Кроме того, не следует использовать этот термин по отношению к моделям за пределами класса амфибий, где уместно говорить лишь об аналогах организатора Шпемана. Не совсем понятна суть используемого словосочетания «шпемановская индукция». Шпеман описал множество событий индукции в разных

моделях, поэтому требуется уточнение, о чем идет речь. В тексте встречаются и другие неточности. Например, *Tubifex tubifex* не полихета, а олигохета. Не всегда написание названия генов следует общепринятым правилам. Всем хорошо понятный термин «хорда» часто заменяется на «нотохорд», хотя в российской традиции сравнительной анатомии животных нотохорд – небольшое слепое выпячивание кишки, поддерживающее основание хоботка у полухордовых. В разделе «Материалы и методы» не все методики описаны полно. Это компенсируется ссылками на статьи с опубликованными оригинальными протоколами, однако для читателя такая форма изложения не совсем удобна. Обилие элементов дискуссии в разделе «Результаты» с одной стороны, облегчает понимание общей стратегии исследования, а с другой стороны, затрудняет восприятие собственных результатов диссертанта. Название рисунка 36 «Предполагаемая схема формирования нотохорда белками Хордин и Ноггин¹» не отражает сути представленной схемы, поскольку речь идет о пороговых значениях белков Хордин и Ноггин, предположительно необходимых для формирования зачатка хорды у зародышей нормального и уменьшенного размера. В замечательных экспериментах по изучению зависимости экспрессии *mpz3* от размера зародыша был использован метод получения уменьшенных эмбрионов шпорцевой лягушки с помощью бисекции бластулы. Хотелось бы узнать, в чем преимущество этого метода в данном случае, и приводится ли сходный анализ на уменьшенных зародышах, полученных путем деления бластомеров на 2-х клеточной стадии. Интересным было бы также уточнить, в какое время после оплодотворения производили инъекцию морфолино - в ходе кортикальной ротации или после нее. Приведенные выше замечания не снижают ценности диссертационной работы и значимости полученных результатов». Заключение: «Таким образом, работа соответствует полностью положениям о присуждении ученых степеней». Перечисляются подробно постановления Правительства. И она соответствует «...и ее автор Евгений Евгеньевич Орлов заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.» Ну, соответственно, обсужден, утвержден на заседании кафедры эмбриологии СПбГУ, и подписан Костюченко Романом Петровичем, доцентом, кандидатом биологических наук по специальности «эмбриология, гистология, цитология». И.О. заведующего кафедрой эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Ну и соответственно, ведущая организация. Утверждено проректором по научной работе этого университета. Микушев подписал.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Евгений Евгеньевич, отвечайте.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Да, спасибо Роману Петровичу. Как раз он тоже занимается эмбриональной регуляцией на других моделях, моделях беспозвоночных. Как раз на полихетах. Значит, тут по поводу неправильного наименования *Tubifex tubifex*. Да, это ошибка, нельзя называть их полихеты, хотя конечно формально наверно можно. Лучше *Annelida*. По новой классификации. Да, это ошибка. Далее, нотохорд нельзя называть... ну то есть, нужно называть хордой, а не нотохордом. Ну, да. Ну, на самом деле просто я перевел с английского. В английском языке это нотохорд. По поводу пороговых значений на рисунке 3б, который к сожалению, здесь не представлен: речь идет о том, что да, там есть 2 картинки. На одной картинке изображена схема, которая показывает, что есть некая пороговая концентрация, пороговое значение активности ВМР-каскада, которое запускает формирование хорды. А на другой картинке уже градиенты изображены. Ну это такие две иллюстрации, наверное, одного и того же процесса. Мне кажется, так я могу ответить. По поводу вопроса экспериментальной части. Действительно, тут следует сказать (оговориться), что уменьшенные эмбрионы можно получать не только с помощью деления бластомеров. А можно ножиком просто разрезать бластулу. Вот когда несколько тысяч клеток в эмбрионе еще есть, когда он еще не начал гастрюляцию, его можно разрезать вдоль сагиттальной оси, вот как раз вдоль дорзо-вентральной оси, и этот эмбрион заживет и тоже отрегулируется. Это известный факт, что так можно делать, так делал еще Дриш, разрезая бластулы морских ежей, так делал эмбриолог Де Робертис в своих экспериментах. Мы это использовали тоже, потому что мы посчитали, что, в принципе, что там регуляция на стадии из бластомеров, что из разрезанной бластулы, в принципе – мы посчитали, что это сходные процессы. И мы иногда заменяли для простоты деление бластомеров на разрезание бластул, потому что разделить бластомеры достаточно тяжело, очень тяжело сделать много их. А путем разрезания бластулы можно получать сотни уменьшенных эмбрионов. С одной оговоркой, что все эмбрионы, которые получают из бластулы, они все-таки травмированные. И они никогда не образуют близнецов, они не дорастают, они умирают. Поэтому мы сначала показывали, что те эффекты, которые мы имеем на бластулах, из разрезанных бластул, такие же что и в тех эмбрионах, которые мы получали из бластомеров. И только после этого мы со спокойной совестью уже делали эксперименты на бластулах.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Владимир Александрович...

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

Так. Ну, в Совет поступило *два отзыва на автореферат*, оба отзыва положительные. Значит, в одном отзыве замечательные слова: «Диссертационную работу Е.Е. Орлова считаю выдающимся, великолепно выполненным, завершенным исследованием». Ну и так далее. Значит, подписал кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории проблем регенерации Института биологии развития РАН Никишин Денис Александрович. Значит, вот это первое. И второе. Отзыв на автореферат – тоже полностью положительный. Замечаний никаких нет. Значит, И.О. заведующего отделом регенеративной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава Российской Федерации, кандидат биологических наук Гурская Надежда Георгиевна. Всё.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Юлия Александровна, будьте добры.

Оппонент, д. б. н. Ю.А. Краус:

Здравствуйте, уважаемые коллеги. Мне очень приятно выступить здесь с оппонированием диссертации Евгения Евгеньевича Орлова, потому что работа действительно очень интересная. Ну, о том, об истории изучения эмбриональной регуляции уже хорошо рассказал автор работы и научный руководитель. Я хочу только подчеркнуть, что с того момента, как началось вообще изучение эмбриональной регуляции встал вопрос о том, как эмбрион, откуда эмбрион вообще знает (может знать) что с ним вообще что-то происходит? То есть, если сказать более научным языком, какова система обратных связей, которая позволяет эмбриону поддерживать себя как целостную систему? На самом деле сейчас идет поиск вот этих вот механизмов обратных связей с разных сторон. В том числе, например, со стороны механики исследуются механизмы того, как клетки чувствуют, например, механические напряжения, чувствуют форму поверхности, свою собственную форму. Но вот заход вот с этой стороны, со стороны, со стороны молекулярной биологии – он совершенно оригинален. И это исследование – почему мне понравилось – оно очень четкое и красивое по дизайну. То есть, сначала выдвигается гипотеза – причем выдвигается она совершенно определенным образом – на основе анализа моделей. Потом эта гипотеза экспериментально проверяется, причем проверка гипотезы осуществляется параллельно несколькими методами. Автор работы уже их назвал. То есть, это фактически все методы функционального анализа, которые применяют в современной биологии развития и молекулярной эмбриологии. Ну и дальше

на основе полученных данных делаются уже как-бы... делается шаг на уровень молекулярных взаимодействий. Об этом тоже сказал автор – о том, каким же образом происходит взаимодействие между белками Mmp3, Noggin, Tolloid. Ну, и в конце концов, строится модель, объясняющая, каким образом за счет этих взаимодействий происходит корректировка предразметки эмбриона. Вот эти вот все шаги, о которых я сейчас сказала, они позволили... То есть, они, во-первых, свидетельствуют о новизне не просто результатов, а именно подхода к выполнению данной работы. Даже не к выполнению работы, а к решению данной проблемы. Понятное дело, что использование такого подхода не могло не привести к получению абсолютно новых и оригинальных результатов. Действительно, впервые удалось показать, что есть такие вещества, которые изменяют... за счет которых эмбрион (в кавычках) «чувствует», что у него изменился размер. И прекрасно, что эти результаты уже опубликованы, что подтверждает их научную значимость. Значимость эта не только биологии развития, но и для молекулярной биологии большая. И для эволюционной биологии развития в первую очередь. Потому что дальше разработанный автором подход позволит реконструировать возможно эволюцию вот этой вот системы – системы скейлинга. Поскольку, имея уже этот подход, можно работать и с другими объектами. Ну, я думаю, что я достаточно похвалила работу. Давайте теперь перейдем к более формальным вещам. Работа построена, ну, так, на первый взгляд, она построена по достаточно традиционному... по достаточно традиционной схеме. То есть, у нее есть «Результаты», «Обзор литературы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Материалы и методы». Так, сейчас я скажу, сколько у нее каких страниц, как положено. Работа изложена на 151 странице, включая 39 рисунков, 7 таблиц, 295 ссылок на литературные источники. На самом деле работа очень хорошо проиллюстрирована, все изображения, полученные автором – они очень хорошего качества. Все прекрасно видно. По разделам: «Обзор литературы» - на самом деле это очень объемная часть работы. Но она оправданно объемная, потому что, ну, без нее фактически было бы непонятно, как автор и его коллеги пришли вот к той формулировке гипотезы, которую в ходе исследования они и проверяли. Начинается все с совершенно классических моделей. Экспериментов и моделей.

Это работы Ру и Дриша, это работы по изучению эмбриональной индукции, работы по изучению регионов организаторов. Очень приятно, что автор не ограничился регионами организатора и индукциями у позвоночных, но рассматриваются также и беспозвоночные животные. Последняя часть литобзора посвящена молекулярным механизмам скейлинга, ну, то есть, как бы сказать, подход вот к той гипотезе, которую высказывает автор. И фактически за счет анализа вот тех моделей о которых говорится в обзоре литературы, в

том числе и моделей, в разработке которых... разработка которых осуществлялась в лаборатории, где работает автор, как раз и выдвигается та гипотеза, проверке которой посвящен раздел «Результаты». Раздел «Результаты» написан с одной стороны достаточно сжато, но, с другой стороны, все понятно. По объему в основном никаких претензий нет. Единственное, что я вот сразу хочу сделать замечание, давайте так, сразу по ходу: во-первых, самое начало раздела «Результаты» - это численный анализ моделей скейлинга, и вот здесь хотелось бы более подробно выяснить, как же он проходил. Потому что раздел этот коротенький. Как бы по сути никаких возражений нет, все выводы я считаю корректными, но более подробно процесс хотелось бы видеть. Кроме того, как уже отмечалось, неудачная компоновка раздела «Результаты», он очень сильно пересекается с обсуждением, и поэтому читать его не всегда просто. Более того, вот раздел «Обсуждение» - следующий раздел – он получился очень таким обиженным, маленьким, то есть это раздел скорее заключения, потому что само обсуждение ушло в «Результаты». С другой стороны, этот раздел написан хорошо, и он хорошо подытоживает результаты работы. В этом смысле тоже никаких замечаний нет. Выводы: шесть выводов, которые полностью соответствуют цели и поставленным задачам работы. Ну из, как сказать, из недостатков, может быть, можно было их сформулировать чуть более четко и кратко. Ну, это тоже на вкус и цвет – это мое мнение. Но по сути никаких замечаний нет. Все четко. Ну, еще раз подчеркну, что к научной составляющей работы замечаний нет вообще никаких, все очень понятно. Отдельно хочу отметить сегодняшний доклад Евгения Евгеньевича. Он был сделан неторопливо, четко, и из него, я думаю, может даже те, кто не читал работу, не читал автореферат, все прекрасно поняли. За это огромное спасибо. Ну, если говорить о вопросах, которые возникли по ходу знакомства с работой. По замечаниям я уже в основном все сказала. Часть замечаний пересекается с замечаниями ведущей организации, повторять я не буду. Так. Единственное, что может быть – вопрос, который у меня возник к автору: в работе имеется такое утверждение, что уменьшение количества инъецированного морфолино к mmp3 в два раза, а также нокаут mmp3 с помощью системы CrispR/Cas9 увеличивали долю правильно сложенных уменьшенных головастиков в эксперименте. То есть, фактически, с моей точки зрения это два разнонаправленных воздействия: если уменьшать морфолино (концентрацию), то экспрессия должна возрастать на уровне белка. А CrispR/Cas9, значит, наоборот – концентрация этого вещества должна уменьшаться, если не исчезать. Вот, тогда, соответственно, у меня вопрос: почему и то, и другое привели к уменьшению, то есть, увеличению доли вот такой вот... вот таких вот головастиков, уменьшенных, правильно сложенных? Ну, высказанные мной замечания и вот этот вопрос – он никак не влияет на

мою высокую оценку результатов работы. И как заключение хочу сказать, что диссертационная работа Евгения Евгеньевича Орлова «Секретируемая металлопротеиназа Mmp3 как регулятор скейлинга системы морфогенетических градиентов белков BMP/Chordin/Noggin в раннем эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*» соответствует всем критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденных Правительством, постановлением Правительства Российской Федерации, а Евгений Евгеньевич Орлов несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология. Спасибо за внимание.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо, Юлия Александровна. Евгений Евгеньевич, оправдываться будете?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Юлия Александровна, спасибо. Сейчас скажу. Значит, по поводу инъекций морфолино. Сейчас включим. Вот этот слайд. Значит что такое морфолино, что он делает. Морфолино это синтетический олигонуклеотид, 25 нуклеотидов в ряд. Он блокирует не экспрессию, а трансляцию белка. Он залипает на старт-кодон и не дает на него сесть рибосоме. Соответственно, почему это называется не нокаут, а нокдаун, потому что это временная мера. Морфолино рано или поздно выйдет в ходе метаболизма, хотя это инертное вещество достаточно. Вот, то есть, и инъекция морфолино, и нокаут, вызывают невозможность производства белка финального, хоть и разным способом. Касательно того, что мы уменьшаем количество инъецированного морфолино, и у нас количество правильно сложенных, но уменьшенных зародышей возрастает. Это вот такой вот... я попытаюсь объяснить этот момент. Значит, смотрите, значит, если у нас маленький, в 2 раза меньше, то у нас экспрессия *mmp3* должна снизиться очень сильно, чтобы уменьшить зачатки сильно. Они в маленьком эмбрионе уменьшаются, и он нормально развивается. Но в большом эмбрионе ситуация другая: он сам по себе больше, поэтому если мы в нём так же сильно уменьшим концентрацию *mmp3*, он сожмется так, что просто перестанет развиваться. Но если его недостаточно сильно «добить», ну, снизить, но не очень сильно, пропорционально тому, что его размер больше, то сами по себе зачатки уменьшаются так, что происходит уменьшение самого эмбриона. Вот. Ну, наверно, я ответил. Далее, по поводу моделей: какие модели использовались. Я сделал здесь дополнительный слайд, это не было оговорено в основной части. Что за модели вообще существуют скейлинга? Ну, интересно же. Вот, оказывается, были придуманы в конце нулевых такие модели, которые называются «экспандер-репрессор» или «контрактор-индуктор». Модель «экспандер-

репрессор»: что это такое? Репрессор это сам морфоген. Вот он, синий. Он формирует свой градиент. Одновременно, если его концентрация ниже какого-то порогового значения (вот оно изображено прерывистой линией), он запускает выработку так называемого «экспандера». Экспандер - это как раз модулятор морфогена, который его производит экспансию, он его... ускоряет его диффузию. Предположим, что у нас происходит рост какого-то эмбрионального зачатка. И этот эмбриональный зачаток должен расти пропорционально, то есть там тоже должна происходить регуляция. Если он растет, то допустим, у нас домен экспрессии экспандера расположен в какой-то дистальной области. Когда у нас градиент еще не сформирован, то домен секреции экспандера большой, и он нарабатывается, его концентрация растет, и градиент распространяется дальше. Но когда градиент дораспространится до края, до края, до нужного края зачатка, он ингибирует, как... он ингибирует экспрессию экспандера, концентрация экспандера стабилизируется, и градиент перестает распространяться дистально. Вот такая простая система. И, собственно, что мы выяснили, то, что в таких моделях, вот конкретно, там есть список статей, это работы Баркай, это работа, забыл автора, на системе Nodal-Lefty (такая система разметки зародышевых листков), вот, вот где-то примерно 5-6 моделей разных было выбрано, которые, вот было показано, что они работают (как раз модели «экспандер-репрессор» и «контрактор-активатор» да?). «Контрактор-активатор» - эта модель обратная, соответственно. То есть, ну, понятно, мы меняем на обратные функции и получаем то же самое. И оказывается, что в таких моделях концентрация экспандера меняется очень сильно. Да, вот так. Еще вопросы были по поводу структуры. Да, я честно скажу, я переводил с английского и ничего не менял, потому что и так огромный объем работы, честно говоря, очень тяжело было писать. Спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Так, второй оппонент у нас Игорь Игоревич Адамейко из Венского медицинского университета. Естественно отсутствует по уважительной причине. Пожалуйста, Владимир Александрович.

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

(Зачитывает отзыв официального оппонента Адамейко И.И.) у меня в руках отзыв официального оппонента Адамейко Игоря Игоревича. Отзыв полностью положительный. Ну, опять же, традиционно, значит, начинается с актуальности: посвящена целая страница мелким шрифтом очень, которая кончается тем: «...поэтому актуальность данной работы несомненна». Научная новизна: там опять же «...впервые показано, - и вот тут концовка, -

таким образом, в диссертационной работе было впервые предположено и экспериментально доказано наличие скейлеров. Данный результат имеет большую практическую значимость, поскольку метод, примененный в работе, может быть использован на большом количестве моделей для поиска новых механизмов регуляции зародышей. Кроме того, были описаны новые субстраты для белка матричной металлопротеазы 3, что имеет несомненную ценность для биомедицинских исследований.». Степень обоснованности и достоверности секвенирования: результаты корректны, статистически значимы. Предсказания продуктивно подтверждены и, короче, результаты эти не вызывают сомнений. Структура и содержание – уже было сказано про 151 страницу и 295 ссылок. Далее, введение: хорошо написано. Обзор литературы выполнен на высоком уровне и дает хорошее понимание экспериментальной работы. Результаты – это опять же 8 подразделов. Здесь очень подробно анализируются и описываются вот эти вот, так сказать, результаты, то что мы сегодня уже слышали. Замечания. «К незначительным замечаниям в отношении данной работы можно отнести весьма краткую дискуссию о потенциальных ограничениях использования шпорцевой лягушки в качестве модельной системы. А также того, как полученные результаты могут не полностью или полностью экстраполироваться на другие виды, включая человека, - в скобках, - и почему?». Указанные замечания не снижают ценности диссертации, и в заключении: «таким образом, диссертационная работа соответствует всем пунктам постановления Правительства по поводу Положения о присуждении ученых степеней, а Евгений Евгеньевич несомненно заслуживает присвоения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология. И это, значит, подписал Адамейко Игорь Игоревич, руководитель лаборатории нейроиммунологии центра изучения мозга Венского медицинского университета. Доктор биологических наук, профессор. Ну и заверена подпись правильно.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Больше замечаний нет?

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

Фактически нет, но идет, так сказать, товарищ.

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

Да, да. Вот.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Да. Вот прозвучал такой вопрос по поводу того, насколько можно экстраполировать данные которые были получены, на модель млекопитающих, в том числе человека. С одной стороны, нет, потому что эмбриогенез человека, и вообще млекопитающих, сильно модифицирован. Там, в эмбрионах человека нет желтка, совершенно другой способ развития путем имплантации. Но. Вот почему изменяется экспрессия *mmp3*? Мы же не рассматриваем этот вопрос. Мы просто констатируем факт: изменяется в 10 раз. А почему она изменяется? Каков механизм этого изменения? Мы этого не знаем. Но этот механизм, скорее всего, он глобален. То есть, если он работает у шпорцевой лягушки (механизм чувствования размера, да, то что Юлия Александровна сказала). Вот как, как эмбрион вообще может чувствовать свой размер? Это совершенно неочевидно. И вот скорее всего механизм этого чувствования универсален. И как Юлия Александровна сказала, обмолвилась, это скорее всего связано с некими механическими «делами». С механическими каскадами. То есть, данная работа как бы такой вот первый шаг, но вот в дальнейшем, если нам удастся показать, вот, механизм – почему изменяется экспрессия именно этого гена, - это будет скорее всего универсально в том числе для человека. Спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Всё?

Соискатель Е.Е. Орлов:

Да.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Так, следующая по порядку проведения диссертации у нас должна быть дискуссия. Кто хотел бы выступить? О, пожалуйста!

Д. х. н. И.В. Ямпольский:

Коллеги, ну трудно, вот, удержаться от восторженного отзыва, потому что, ну, вот редкая на самом деле работа производит вот такое потрясающее впечатление, когда, вот здесь ученый сам себе придумал, вот, задачу, из головы, а взял и действительно попытался ответить на фундаментальнейший вопрос, вот, об устройстве очень сложного природного явления. Да, вот, я бы сказал, что, вот, постановка задачи на самом таком уровне. Можно сравнить, вот, какие есть вопросы? «Как возникла Вселенная?», да, вот, «Как зарождается жизнь?» там из одной клетки. Вот здесь на таком уровне постановка задачи. И, действительно, найдены очень глубокие ответы на эти вопросы. Вот. Спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

То есть биологическая эволюция получила еще одного достойного исследователя. Еще кто хотел бы выступить? Спасибо. Не вижу. Тогда слово диссертанту заключительное.

Пожалуйста.

Соискатель Е.Е. Орлов:

Да, ну в заключительном слове я хотел бы благодарности зачитать. Немножко волнуясь, поэтому немножко помогу себе. Ну, во-первых, Андрею Георгиевичу я хочу выразить огромную благодарность. То, что, вот, он руководил меня вот в этом предприятии довольно, так сказать, интересном. И второе, что хочется сказать, благодарность Алексею Михайловичу Нестеренко, кандидату физмат наук, биофизику, который вот, какие-то, вот, догадки, то что «вот, а может быть, там существуют эти вещества?». Он просто взял и посчитал, и оказалось, что да, скорее всего существуют. Если эти модели верны, то есть если эти модели, которые, вот, представлены на экране имеют хоть какое-то отношение к реальности, то должны существовать и скейлеры. Ну вот они действительно существуют. Елене Анатольевне Паршиной хочется объявить благодарность за то, что она сделала очень много конструкций, которые даже не вошли в работу многие, там, очень много гибридизаций ин-ситу было сделано. Это огромный труд. Наталье Юрьевне Мартыновой за то, что она начала делать вестерн-блоттинги, и меня научила делать. Андрею Георгиевичу Зарайскому и Дарье Дмитриевне Коротковой благодарность за CrispR/Cas9-эксперименты. Я этого тоже не делал. Коллективу родной кафедры, за то, что они советовали, помогали. Ну вот и Юлии Александровне Краус, Адамейко Игорь Игоревичу за комплиментарные отзывы, мне кажется. Прекрасные. Роману Михайловичу Костюченко, собственно, и кафедре эмбриологии СПбГУ – то что тоже вникли в проблему и сделали отзыв. И Надежде Георгиевне Гурской и Никишину Денису Александровичу за то, что сделали отзывы на автореферат. Всё. Спасибо.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Спасибо. Коллеги, следующий вопрос: у нас счетная комиссия, у нас сегодня выдающаяся счетная комиссии – все члены дирекции. Смирнов, Ямпольский и ученый секретарь. Пожалуйста, приступайте к голосованию.

(Идет тайное голосование)

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

Так, счетная комиссия завершила свою работу. Соответственно, присутствовало на заседании 23 члена совета нашего диссертационного. Роздано бюллетеней 23, оказалось в урне 23, «за» 23, «против» и недействительных нет.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Утверждаем? Кто «за»? «против»? Утверждаем. Спасибо. Коллеги, и последнее, значит, у нас проект заключения совета. Пожалуйста.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Николай Владимирович уже высказался. А?

Д. х. н. Н.В. Бовин:

Несколько шероховатостей, но я их Евгению покажу лично.

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

То есть, лично вы высказали. Соответственно Андрею Георгиевичу.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Окей. Ну тогда спасибо.

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

Да, давайте поздравим.

Председатель, акад., д.х.н. А.И. Мирошников:

Поздравляем диссертанта.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

