

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.228.03  
(Д 003.075.04), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРАСНОЯРСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН),  
МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 31.10.2023 № 10

О присуждении Лисице Альберту Евгеньевичу, гражданину Российской Федерации, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Механизм влияния вязких сред на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой» по специальности 1.5.2. Биофизика, принята к защите 06.06.2023 (протокол заседания № 5) диссертационным советом 24.1.228.03 (Д 003.075.04), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН, КНЦ СО РАН), Министерство науки и высшего образования РФ, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, создан приказом Минобрнауки № 21/нк от 24.01.2017.

Соискатель Лисица Альберт Евгеньевич 03.04.1991 года рождения, в 2013 году соискатель окончил бакалавриат Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство

образования и науки РФ, по направлению подготовки «Физика»; в 2015 году окончил с отличием очную магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство образования и науки РФ, по направлению подготовки 03.04.02 Физика, присуждена квалификация Магистр; в 2019 году окончил очную аспирантуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ, по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки, присуждена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь», работает научным сотрудником в лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ.

Диссертация выполнена на кафедре биофизики Федерального автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Министерство науки и высшего образования РФ.

Научный руководитель – кандидат физико-математических наук, Немцева Елена Владимировна, Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), лаборатория биолюминесцентных биотехнологий, старший научный сотрудник, кафедра биофизики, доцент.

Официальные оппоненты:

Трофимов Алексей Владиславович, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), заместитель директора по науке, лаборатория фото- и хемилюминесцентных процессов, заведующий лабораторией;

Чернышев Андрей Витальевич, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), лаборатория цитометрии и биокинетики, старший научный сотрудник

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук (ИБ РАН), г. Пущино Московской области, в своем положительном отзыве, подписанном Тищенко Светланой Викторовной, доктор биологических наук, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, ведущий научный сотрудник, указала, что решаемая соискателем научная задача актуальна для установления физико-химических механизмов, определяющих скорость различных стадий ферментативных реакций в физиологических условиях, работа Альберта Евгеньевича вносит существенный вклад в понимание функционирования ферментов типа бактериальной люциферазы, особого внимания заслуживает разработанная математическая модель, описывающая сложную ферментативную реакцию люциферазы в присутствии веществ, меняющих вязкость, диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно «Положению о присуждении ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями и дополнениями).

Соискатель имеет 12 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликованы 12 работ, из них 7 в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы цитирований Scopus, Web of Science, а также 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, объем научных изданий (статей) составляет 84 стр., авторский вклад – 85%.

Наиболее значимые публикации:

1. Lisitsa A. E. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction / A.E. Lisitsa, L.A. Sukovatyi, S.I. Bartsev, A.A. Deeva, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // International Journal of Molecular Sciences, 2021. Vol. 22, I. 16, 8827.
2. Лисица А.Е. Вязкие среды замедляют распад ключевого интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий / А.Е. Лисица, Л.А. Суковатый, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни, 2020. Т. 492, №. 1, С. 320-324.
3. Deeva A. A. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: nothing is perfect / A. A. Deeva, A.E. Lisitsa, L.A. Sukovatyi, T.N. Melnik, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // International Journal of Molecular Sciences, 2022. Vol. 23, I. 15, 8119.
4. Суковатый Л.А. Влияние осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты / Л.А. Суковатый, А.Е. Лисица, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева // Биофизика, 2020. Т. 65. №. 6. С. 1135-1141.
5. Rozhko T.V. Enzymatic responses to low-intensity radiation of tritium / T.V. Rozhko, E.V. Nemtseva, M.V. Gardt, A.V. Raikov, A.E. Lisitsa, G.A. Badun, N.S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences, 2020, Vol. 21, I. 22, 8464.
6. Esimbekova E.N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E.N. Esimbekova, E.V. Nemtseva, A.E. Bezrukikh, G.V. Jukova, A.E. Lisitsa, V.I. Lonshakova-Mukina, N.V. Rimatskaya, O.S. Sutormin, V.A. Kratasyuk // Toxicology in Vitro, 2017. Vol. 45, P. 128-133.
7. Сутормин О.С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и триферментной систем / О.С. Сутормин, Е.М. Колосова, Е.В. Немцева, О.В. Искорнева, А.Е. Лисица, В.Р. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Цитология, 2018. Т. 60, № 10, С. 826-829.

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов. Все отзывы положительные. Отзывы: доктора химических наук Монастырной М.М., и.о. заведующего лабораторией химии пептидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН); кандидата биологических наук Мухаметгалиевой А.Р., научного сотрудника НИЛ OpenLab «Биохимическая нейрофармакология» Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; доктора физико-математических наук, профессора Туроверова К.К., главного научного сотрудника лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН); кандидата химических наук, доцента Чикаловец И.В., старшего научного сотрудника лаборатории химии неинфекционного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН); доктора биологических наук Чеботаревой Н.А., ведущего научного сотрудника лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» замечаний не содержат. В отзыве кандидата химических наук, доцента Петровой Ю.Ю., директора Института естественных и технических наук, доцента кафедры химии Бюджетного учреждения высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет» (СурГУ) содержатся следующие замечания: «В качестве замечаний к автореферату можно указать наличие некоторых неточностей в тексте: “сорастворителей с молекулярной

массой от 62 до 70 000” (стр. 14) – не указана единица измерения молекулярной массы сорастворителей, речь, видимо, идет о кДа; опечаток – “выводы относительно *влияние* вязких сред” (стр. 19); и не очень удачные выражения “проанализированное с помощью молекулярной динамики” (стр. 13)». В отзыве доктора химических наук, профессора Угаровой Н.Н., главного научного сотрудника кафедры химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова) отмечены следующие замечания: «Вряд ли можно говорить о “скорости элементарной биохимической стадии”, рассматривая скорости индивидуальных стадий в люциферазной реакции (стр. 9); в главе 5 говорится, что “кинетику биолюминесценции реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi* и *V. harveyi*, изучали при температуре 5-45 °С в буфере и 30% сахарозе”, но приведены результаты только для люциферазы *P. leiognathi*».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью и высокой квалификацией специалистов в области ферментативного катализа, химической кинетики, а также соответствием основных направлений исследований задачам диссертационной работы Лисицы А.Е. Исследовательский коллектив лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук (ИБ РАН) занимается теоретическими и экспериментальными исследованиями структурно-функциональных взаимосвязей белков при вариации среды, имеет высокую квалификацию по теме диссертации, что подтверждается публикациями и выполняемыми проектами. Доктор химических наук Трофимов А.В. (г. Москва) является заведующим лабораторией фото- и хемилюминесцентных процессов, его публикации охватывают широкий спектр тем, включающих исследования

механизмов влияния вязкости на химическую кинетику различных процессов, тем самым область его компетенции существенно перекликается с 3, 4 и 5 главами диссертации Лисицы А.Е. Кандидат физико-математических наук Чернышев А.В (г. Новосибирск) является специалистом в области биокинетики, математического моделирования кинетики сложных процессов, что так же существенно перекликается с тематикой диссертации Лисицы А.Е.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработан** новый научный подход, позволяющий выявить качественно новые закономерности влияния вязких сред на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой; определена кинетическая схема реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*;

**предложена** оригинальная научная гипотеза о связи между значениями каталитической константы люциферазы *P. leiognathi* и константой Норриша;

**доказано**, что общий эффект вязких сред на биолюминесцентную реакцию заключается в диффузионных ограничениях стадий связывания восстановленного флавина и распада пероксифлавинового интермедиата реакции; скорость стадии образования электронно-возбужденного интермедиата реакции, (каталитическая константа люциферазы) не зависит от вязкости среды; вязкие среды не дают кинетического преимущества при функционировании бактериальной люциферазы за пределами температурного оптимума, но замедляют термоинактивацию фермента.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказано**, что для описания кинетики реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, применима модель с семью константами скоростей; доказана возможность разнонаправленного влияния вязких сред на отдельные стадии ферментативной реакции, приводящего к сохранению функциональных свойств фермента;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** метод остановленного потока, обеспечивающий высокую точность

регистрации кинетики биолюминесцентной реакции, в сочетании с методом математического моделирования кинетических кривых для определения констант скоростей отдельных стадий реакции;

**изложены** доказательства диффузионного контроля стадий связывания флавинового субстрата и распада пероксифлавинового интермедиата реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, и отсутствия зависимости каталитической константы фермента от вязкости среды;

**раскрыты** ранее неизвестные механизмы влияния вязких сред на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой;

**изучены** кинетические параметры бактериальной биолюминесценции *in vitro* в вязких средах с низкомолекулярными соразтворителями и биополимерами;

**проведена модернизация** подхода определения скоростей отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, использующего математическое моделирование нестационарной кинетики реакции.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**разработан** и апробирован подход для определения влияния различных факторов на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, на основе анализа нестационарной кинетики;

**определены** перспективы практического использования люциферазы *V. harveyi* в биоаналитических методах;

**представлены** предложения по дальнейшему совершенствованию ферментативных препаратов на основе биолюминесцентной системы для применения в биотестировании.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**  
**для экспериментальных работ** использованы методы остановленного потока и оптической спектроскопии; достоверность полученных данных подтверждается их воспроизводимостью в серии экспериментов и статистической обработкой;



**теория** построена на известных, проверяемых данных и согласуется с опубликованными результатами влияния вязких сред на другие ферментативные реакции;

**идея базируется** на анализе эффектов вязких сред на ферментативную кинетику с использованием полуфеноменологического подхода на основе теории Крамерса и обобщении передового мирового опыта аналогичных исследований;

**использованы** сравнения авторских данных и данных, полученных ранее по влиянию вязкости среды на функционирование ферментов и кинетическим механизмам бактериальной биолюминесценции *in vitro*;

**установлено** качественное и количественное совпадение результатов автора по значениям кинетических констант и вязкостных зависимостей параметров с результатами, представленными в независимых источниках научной информации по данной тематике;

**использованы:** современные методики сбора исходной информации с помощью метода остановленного потока на анализаторе кинетики быстрых процессов SX-20 и её обработки путём математического моделирования в программном пакете Scilab.

**Личный вклад соискателя состоит в:** участии в формулировании цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментов, выборе объекта исследования, изучении способов работы с исследуемыми препаратами, отработке этапов пробоподготовки, обработке и интерпретации полученных экспериментальных данных, модернизации математической модели реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, апробации результатов исследования на научных конференциях и подготовке публикаций.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний, относящихся к сути диссертации, однако был задан ряд вопросов: какое можно подобрать микроокружение, чтобы сместить равновесие в сторону светоизлучающего или темновых путей; сорастворители могут оказывать

воздействие через повышаемую вязкость или химическую специфику, можно ли подобрать такие сорастворители, чтобы разделить влияние этих факторов; можно ли при интерпретации обратной задачи, по изменению одного из эмпирических параметров, такого как, например, константа спада, определить какие механизмы лежат в основе наблюдаемых изменений; были ли ранее получены данные о влиянии вязкости, смоделированной теми же веществами, на кинетические кривые биолюминесценции; какая стадия реакции является наиболее чувствительной к воздействию вязкости в контексте влияния на свечение; к какой константе имеет отношение выносимое положение 2; в заключении автореферата упоминается изменение вязкости внутри клетки как механизм адаптации к неблагоприятным условиям, что имеется в виду; связаны ли выбранные в эксперименте значения вязкости с реально наблюдаемыми значениями в разных компартментах внутри клетки; инвариантны ли полученные результаты к отношению температура-вязкость для одинаковых коэффициентов диффузии; являются ли ньютоновскими жидкостями используемые высокомолекулярные сорастворители, чтобы по отношению к ним было корректно использовано понятие вязкости; можете ли вы к какой-то части работы применить слово «впервые»; каков механизм влияния вязкости на скорость темного распада пероксифламина; можно ли интерпретировать тип диффузионного ограничения для определения механизма влияния вязкости; какую часть работы можно выделить как фундаментальную; о диффузионных ограничениях какого компонента идет речь; приведет ли расширение модели дополнительными стадиями к улучшению описания кинетических кривых.

Соискатель Лисица А.Е. согласился с замечаниями и ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы, в частности: сорастворитель, который небольшим количеством молекул смог быть уменьшать активность воды, не будучи при этом вязким, сместит равновесие в сторону светоизлучающих путей; для исключения фактора химической природы

сорастворителя возможно следует попробовать использовать инертные полимеры; чем больше будет изучено различных факторов, воздействующих на отдельные компоненты эмпирического параметра, например, на ассоциацию альдегида или темновой распад пероксифлавина для константы спада, тем точнее мы сможем сделать вывод о механизме по изменению эмпирического параметра; воздействие использованного набора повышающих вязкость сорастворителей на биолюминесцентные кинетические кривые представлено впервые; наиболее чувствительной к воздействию вязкости является стадия связывания флавина, т.к. она является диффузионно-контролируемой, в то время как каталитическая константа не зависит от вязкости; положение 2 относится к каталитической константе; под неблагоприятными условиями имеется в виду, например, изменение температуры или голодание, в ответ на что внутри бактериальной клетки выделяются низкомолекулярные вещества – осмолиты, которые повышают вязкость, их роль для биолюминесценции заключается в сохранении структуры белков; диапазон вязкостей 2-5 сП характерен для внутриклеточной среды, в том числе цитоплазмы; для диффузионно-контролируемых стадий не является принципиальным за счет какого фактора, добавления сорастворителей или изменения температуры, были получены соответствующие эксперименту значения вязкости; были использованы значения кажущейся вязкости высокомолекулярных сорастворителей, полученных при помощи флуоресцентного зонда, адекватность данных значений косвенно подтверждается зависимостью  $k_1$  от вязкости; впервые были установлены стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, к вязкости среды, впервые была показана корреляция с константой Норриша константы формирования возбужденного интермедиата; механизм влияния вязкости на скорость темнового распада обусловлен замедлением высвобождения продукта, ввиду повышенной вязкости вблизи активного центра фермента; в рамках использованного набора методов без привлечения дополнительных, как, например, методов

молекулярной динамики, однозначно выявить тип диффузионного ограничения не представляется возможным; как фундаментальную часть работы можно выделить изучение взаимодействий осмолитов с белком; имеются в виду диффузия субстратов, а также зависимость от вязкости каталитического акта; расширение модели дополнительными стадиями к улучшению описания кинетических кривых не приводило.

На заседании **31 октября 2023 года** диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи, направленной на выявление механизмов влияния вязких сред на биохимическую реакцию с многостадийной разветвленной кинетической схемой, имеющей существенное значение для развития молекулярной биофизики, присудить **Лисице А.Е.** ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

При проведении тайного голосования с использованием информационно-коммуникационных технологий диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика отрасли физико-математические науки, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – **16**, против – **0**.

Председатель

диссертационного совета,

д.ф.-м.н., академик РАН

Дегерменджи Андрей Георгиевич

Ученый секретарь

диссертационного совета,

к.б.н.

Дементьев Дмитрий Владимирович

03.11.2023