

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01  
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

20 февраля 2019 года

Защита диссертации  
на соискание учёной степени кандидата биологических наук

**Поваровой Натальей Владимировной**

"Катализ образования кремнезема рекомбинантными силикатеинами,  
катепсинами и их мутантными вариантами"

специальность: 03.01.03 — молекулярная биология

Москва — 2019

## СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 20 февраля 2019 года.

Председатель  
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов Вадим Тихонович

Учёный секретарь  
диссертационного совета

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

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
4. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7. Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
8. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
10. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
12. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
13. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
14. Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
15. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
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. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

**Иванов Вадим Тихонович:** Итак, для защиты первая Поварова Наталья Владимировна, Владимир Александрович доложит материалы личного дела.

**Олейников Владимир Александрович:** Так, Наталья Владимировна Поварова, гражданка Российской Федерации, окончила в 2011 году биофак МГУ, с 2011 по 2015 инженер-исследователь, а с 2015 года по настоящее время младший научный сотрудник в лаборатории биофотоники нашего института. Кандидатский экзамен по специальности «Молекулярная биология» сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в лаборатории биофотоники под руководством члена-корреспондента РАН Константина Анатольевича Лукьянова, руководителя лаборатории биофотоники. По теме диссертации опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Объявления о защите автореферата диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, 19 декабря, и все необходимые документы в деле есть.

**Иванов Вадим Тихонович:** Какие-то уточнения, вопросы? Обычно не бывает. Наталья Владимировна, вам слово для доклада. 20 минут.

**Поварова Наталья Владимировна:**

*(Излагает основные положения диссертационной работы)*

**Иванов Вадим Тихонович:** Есть ли вопросы у присутствующих?

**Деев Сергей Михайлович:** Спасибо большое. Интересная для нашего совета работа, новая. Поэтому вопрос мой немного наивный. Просветите меня, какая изоэлектрическая точка у исследованных вами белков?

**Поварова Наталья Владимировна:** У силикатеина и катепсина человека изоэлектрическая точка, 8,6, если я не ошибаюсь, 8,6-8,7.

**Деев Сергей Михайлович:** Понятно. Тогда продолжение вопроса. Вы взяли в качестве контрольного белка BSA. Почему в таком случае вы не попытались использовать положительно заряженный белок, сравнить его каталитическую активность, например, лизоцим или что-то аналогичное?

**Поварова Наталья Владимировна:** На самом деле, просто в других работах по силикатеинам тоже иногда брали в качестве контроля BSA, поэтому мы так...

**Деев Сергей Михайлович:** Но вы продвинулись гораздо дальше, и логичней, согласитесь, было взять белок, и, если вы хотите сравнивать, контроль должен быть адекватный, по крайней мере, по изоэлектрической точке.

**Поварова Наталья Владимировна:** Да, пожалуй. На самом деле, у разных силикатеинов очень разная изоэлектрическая точка. В частности, другие силикатеины имеют, наоборот, изоэлектрическую точку около 5. У нас был еще один контроль, мы использовали просто флуоресцентный белок с His-тагом, так как мы белки выделяли с His-тагом, чтобы убедиться, что гистаг никак не влияет, раз возможность есть такая катионного катализа. Но там активность была вообще ниже предела детекции, поэтому...

**Деев Сергей Михайлович:** Я не буду настаивать, но даже из ваших данных, когда вы говорили, что даже в присутствии этаноламина у вас идет хорошо реакция...

**Поварова Наталья Владимировна:** У меня не идет, я не пробовала этаноламин, и она идет гораздо хуже, чем в присутствии белка.

**Деев Сергей Михайлович:** У вас там был... мне кажется, нет, работа, очень интересная, но, наверное, рассмотреть положительно заряженный белок для контроля было бы интересно.

**Поварова Наталья Владимировна:** Спасибо за совет.

**Ефремов Роман Гербертович:** Скажите, пожалуйста, а существуют какие-то альтернативные способы получения кремнезема?

**Поварова Наталья Владимировна:** Химически можно, да. При температуре 800 градусов там и при каком-то сильно повышенном давлении.

**Ефремов Роман Гербертович:** По стоимости вы можете сравнить?

**Поварова Наталья Владимировна:** Я, к сожалению, конкретными данными по стоимости не располагаю, но получение кремнезема биологическое стоит ровно выделения белка или даже просто пептида. В общем, мне кажется, что там разница раз в 100, может быть, в 1000.

**Ефремов Роман Гербертович:** Кремнезем, насколько я понимаю, тоннами получают.

**Поварова Наталья Владимировна:** Тут вопрос в том, чего ради получают этот кремнезем. Если мы хотим просто песок, то...

**Ефремов Роман Гербертович:** Я не понял, зачем?

**Поварова Наталья Владимировна:** Дело в том, что речь не идет о том, чтобы добывать таким образом кремнезем. Речь идет о направленном синтезе. И именно с этой точки зрения интересны белки и пептиды, поскольку они позволяют контролировать в перспективе форму или какие-то свойства частиц. С помощью силикатеинов, например, получены необычно гибкие материалы, которые нельзя получить химически. Или с помощью силикатеинов получают пространственные матрицы для последующей дифференцировки остеобластов. Получают специфические структуры, а не просто кремнезем ради кремнезема.

**Ефремов Роман Гербертович:** Да. Но если взять первую часть - может быть, я неправильно понял - вашего доклада, ваши предположения о механизме синтеза и роли каталитических остатков оказались неправильными, это так?

**Поварова Наталья Владимировна:** Да.

**Ефремов Роман Гербертович:** Получается, что синтез идет каким-то другим способом.

**Поварова Наталья Владимировна:** Да.

**Ефремов Роман Гербертович:** Тогда о каком направленном воздействии или рациональном синтезе может идти речь в дальнейшем?

**Поварова Наталья Владимировна:** Во-первых, мы надеемся, что это не конец в изучении силикатеинов, и в целом механизм можно будет установить и использовать направленно. Но даже сейчас, даже при том, что представления о механизме катализа были неправильные, люди использовали уже силикатеины для синтеза большого количества разных соединений. С их помощью даже без кремния синтезировали органосилоксаны, синтезировали наночастицы... получали цериевые катализаторы. Есть теория, а есть практика. Одни люди пытались понять, как это работает, и они ошиблись. Но это не отменяет того, что другие люди пытались это применить, и у них получилось.

**Иванов Вадим Тихонович:** Прошу, Виталий Павлович.

**Зубов Виталий Павлович:** У меня два вопроса. Один очень простой. ТГС – это новое соединение?

**Поварова Наталья Владимировна:** Нет, описано было ранее.

**Зубов Виталий Павлович:** А вы его синтезировали, показали, что это удобный субстрат?

**Поварова Наталья Владимировна:** Его синтезировали в нашей лаборатории, да.

**Зубов Виталий Павлович:** Второй вопрос такой. В природе этот самый гидролиз кремниевых прекурсоров приводит под действием тех же катализаторов к сложным конструкциям асимметрическим.

**Поварова Наталья Владимировна:** Да.

**Зубов Виталий Павлович:** То, что получили вы, это некая такая аморфная бяка. Скажите, какая движущая сила дополнительная заставляет строить эти сложные надмолекулярные кремниевые конструкции?

**Поварова Наталья Владимировна:** На самом деле, это, грубо говоря, основной вопрос, который пытаются решить все, кто работает с силикатеинами, потому что, действительно, очень хочется получать регулярные структуры с какими-то заданными свойствами. Секрет, скорее всего, в том, что в природе это делает не только силикатеин. В аксиальном филаменте у губки находится еще ряд белков. Как правило, это коллаген, спонгин, силинтаффин 1, силинтаффин 2, у разных губок это разные белки. То есть для синтеза спикул сложной формы, скорее всего, мало использовать один силикатеин. С другой стороны, даже при использовании одного силикатеина уже были работы, где был получен кристаллический кремнезем. Там просто были другие условия по концентрации прекурсора. При использовании того же самого ТГЭОС можно получить кристаллические структуры. Но, скорее всего, секрет в использовании каких-то дополнительных факторов. В целом, в принципе, можно и без них.

**Долгих Дмитрий Александрович:** У меня конкретный вопрос, касающийся определения вторичных структур. Если можно, предпоследний слайд. Смотрите, пожалуйста, у меня вопрос такой. Как вы определяли содержание вторичной структуры? Потому что здесь у вас 33 % и 63 %, а формы спектра, вообще говоря, меняются весьма несильно. Это просто по эллиптичности на одной длине волны? Или, все-таки, разложение по каким-то реперным спектрам, и как бы вы могли объяснить такое очень сильное расхождение вторичной структуры? Там не много замен у вас?

**Поварова Наталья Владимировна:** Да, там не так много замен, но декэволюцию спектра проводили на программном обеспечении, которое прилагалось к прибору, который снимал спектр, и там рассчитывали содержание всех элементов вторичной структуры. И, скорее всего, такое большое изменение связано просто с тем, что, так как остатки находятся в начале альфа-спирали, то они не просто убирают эту альфа-спиральность в этих точках, а, скорее всего, они разрушают всю эту альфа-спираль, из-за этого изменяется так сильно структура. Эти данные сходятся с тем, что было получено ранее. Вот график, про который вы говорите, это катепсин-L и его замены, и мы для химерного катепсин-L проводили аналогичные исследования в другой группе, и там получались аналогичные результаты. То

есть, действительно, казалось бы, небольшие точечные замены оказывают очень большое влияние на вторичную структуру.

**Долгих Дмитрий Александрович:** Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Еще вопросы?

**Ефремов Роман Гербертович:** Был уже этот вопрос, я просто не стал, раз его затронули... Скорее всего, по концентрации просто ошибка, потому что реперный спектр базовый, по которому идет разложение, альфа-спиральных и бета-структурных элементов, они по форме сильно отличаются. Поэтому не может быть, что у вас просто шкалирование, и вы получаете явление вторичности, форма спектра не меняется. Умножьте на 2,5-3, и получите. Скорее всего, это мое предположение.

**Долгих Дмитрий Александрович:** Форма, все-таки, меняется. Посмотрите.

**Поварова Наталья Владимировна:** Я бы сказала, что форма меняется. На самом деле, если мы говорим про значение именно 63, максимальная ошибка именно здесь. Я могу поверить, что это какой-то, может быть, не очень удачный спектр, и содержание альфа-спиралей в спектре белка дикого типа меньше, но, все-таки, что спектры одинаковой формы, я не согласна. Тут есть этот выступ характерный.

**Ефремов Роман Гербертович:** Все зависит от концентрации. От точности определения концентрации белка.

**Поварова Наталья Владимировна:** Да, я понимаю. Белки выделялись, параллельно концентрация определялась одинаковым методом, и снималось все в один день.

**Иванов Вадим Тихонович:** Тут уже примеры обсуждений пошли. Будет специальная возможность обсуждения работы. Давайте в чистом виде вопросы в начале. Или они иссякли? Вопросы кончились. Спасибо.

Теперь можете немного вздохнуть. Переходим к заслушиванию отзывов. Есть ли отзывы на диссертацию и наверняка есть отзывы ведущей организации?

**Олейников Владимир Александрович:**

*(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).*

Ведущая организация - это Московский Физтех. Отзыв полностью положительный. Я зачитаю по поводу актуальности, вот пишет ведущая организация: «Несмотря на активные попытки практического применения силикатеинов, очень мало известно о механизме каталитической активности. Отчасти это связано с плохо растворимым субстратом тетраэтилортосиликатом, который образует эмульсию, что затрудняет исследование взаимодействия с белком. Кроме того, многие силикатеины плохо экспрессируются, что также усложняет изучение каталитической активности белка». Далее довольно большой раздел идет о научной новизне диссертационной работы, в котором, в общем-то, излагается и суть работы. И пишут: «Для достижения целей автор сформулировала задачи, которые можно разделить на прикладные, это подбор субстрата, подбор условий, определение оптимальных условий, и теоретические, которые включают мутационный анализ силикатеинов и родственных белков для установления роли различных остатков в катализе. Предложенный автором субстрат тетраглицерол ортосиликат, ТГС, оказался удобным соединением для работы с силикатеинами». Достоинства ТГС описываются. «Поварова подобрала условия для экспрессии и выделения силикатеина А1 обыкновенной губки,

латинское название, в бактериальной системе. Белок выделяется из растворимой фракции бактериального лизата без добавления массивных меток, в отличие от силикатеина других губок. В дальнейшей работе были определены оптимальные условия для ферментативного образования кремнезема в присутствии ТГС. При исследовании кинетики образования кремнезема Поварова обнаружила, что частицы становятся значительно прочнее со временем даже без участия белка.

Во второй части работы автор использовала 3 белка: силикатеин и катепсин-L губки, а также катепсин-L человека. Указанные белки демонстрируют 60 % гомологии, но при этом белки губки способны были полимеризовать кремнезем, а для катепсина-L человека такой активности показано не было. Выбор позиций для мутагенеза основывается на предполагаемом механизме конденсации кремнезема. Мы слышали те места, где проходила мутация, и для контроля силикатеиновой активности использовались бычий сывороточный альбумин и флуоресцентный белок mKate. И они этой активности не продемонстрировали.

Таким образом, было продемонстрировано, что данные остатки не являются необходимыми для катализа полимеризации кремнезема. В работе впервые показана возможность полимеризации кремнезема катепсином-L человека, и этот результат позволяет предположить, что и другие белки могут быть использованы для получения частиц кремнезема с различными свойствами. При анализе силикатеиновой активности мутантных вариантов белков автор обнаружила варианты силикатеина и катепсина, обладающие в 3 раза большей активностью, чем соответствующие белки дикого типа. Эти варианты белков можно использовать для более эффективного синтеза частиц кремнезема. Возможно, что конденсацию других соединений эти варианты могут осуществлять более эффективно. Полученные результаты показывают, что существующие представления о механизме полимеризации кремнезема силикатеинами не верны. Тем не менее, мутантные варианты, полученные в работе, демонстрируют разную активность. Поварова предполагает, что эффект от мутаций связан с изменением пространственной структуры белка. Это предположение проверено с помощью спектров кругового дихроизма. Введенные мутации действительно сильно влияют на вторичную структуру. Однако, для утверждения, что именно этот эффект является ключевым для полимеризации кремнезема, экспериментальных данных пока недостаточно».

Далее практическая значимость, мы это тоже уже слышали сегодня, достоверность тут сомнения не вызывает. Основное содержание диссертационной работы – классический план, 92 страницы, 85 ссылок, обзор литературы четко и лаконично написан. Замечания:

Первое, в диссертации присутствуют некоторые опечатки и жаргонизмы, например, «спектры пустого буфера». В разделе «Материалы и методы» прекрасно описаны методы исследования, но практически нет сведений о материалах. В работах отсутствуют эксперименты с силикатом натрия, который является природным субстратом. Также нет данных по олигомеризации силикатеинов, хотя известно, что они собираются в филаменты сложным образом. На рисунке 51 стоило бы показать результаты деконволюционного анализа спектра кругового дихроизма, например, точками. Тогда было бы понятно, насколько успешно проведена деконволюция.

Однако, указанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертации Поваровой Натальи Владимировны». И в заключении ведущая организация указывает, что диссертация Поваровой Натальи Владимировны соответствует критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней, а сама она заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология». И отзыв диссертации обсужден и одобрен на расширенном заседании кафедры биофизики МФТИ, подписан Чупиным Владимиром Викторовичем, доктором химических наук, и утвержден отзыв проректором по научной работе Физтеха Баган Виталий Анатольевич.

**Иванов Вадим Тихонович:** Там была пара замечаний. Будете отвечать на них или согласны?

**Поварова Наталья Владимировна:** В целом, согласна с замечаниями.

**Иванов Вадим Тихонович:** Принимается к сведению. И можно двигаться дальше. Дальше у нас по процедуре научный руководитель имеет право дать характеристику диссертанту. Константин Анатольевич, будете?

**Лукьянов Константин Анатольевич:** Будем. Коллеги, я в очередной раз с некоторым ужасом вспомнил, что Наташа с 2011 года здесь работает над этой диссертацией. Действительно, она пришла в аспирантуру, не очень характерно (обычно со студенчества, а здесь так), но мы ни разу не пожалели, она очень хорошо влилась в коллектив, участвует в очень многих проектах, и просто поддержании лаборатории на плаву, и всем вообще. Про Наташу можно сказать, что она удивительного оптимизма человек, притом, что кроме диссертации было много проектов. На самом деле, это верхушка айсберга от того, что она сделала, и что отчасти получилось, отчасти не получилось по объективным причинам сделать. И все эти годы она была очень позитивно настроена, что очень приятно для всех окружающих. Я надеюсь, для Наташи тоже. Параллельно я просто видел, как люди почти ломаются на том, что год за годом чего-то не получается, не выходит защита и прочее. И они в конце концов случаются, но психологическое напряжение возрастает. Наташа относится к людям с позитивным исходом, видимо, настроенным в жизни, и все воспринимает хорошо. Это очень приятно и правильно. За это время, естественно... она, на самом деле, и пришла хорошим специалистом, что-то новое, наверное, тоже освоила, я надеюсь, в не бесполезно проведенные года. И сейчас это сложившийся, конечно, ученый. Более того, когда я стал обдумывать, я вдруг понял, что эта вся практически работа была, на самом деле, и придумана Наташей. И то, что я предлагал, это не получилось, а то, что Наталья предлагала, оно вылилось в статьи и работы. И поэтому в данном случае прошу полностью поддержать.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Есть ли отзывы на автореферат?

**Олейников Владимир Александрович:** Да-да.

**Иванов Вадим Тихонович:** Есть, да? Давайте.

**Олейников Владимир Александрович:** В Совет поступили 2 отзыва на автореферат, оба полностью положительные, оба без замечаний. Поэтому разрешите их не зачитывать. Вот в первом написано: «Работа выполнена на высоком профессиональном уровне, результаты работы доложены, автореферат полностью соответствует критериям». И подписано: кандидат биологических наук по специальности «Молекулярная биология»



лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Института молекулярной биологии им. Энгельгардта. Значит, Путляева подписала этот положительный отзыв.

И второй отзыв тоже абсолютно без замечаний. Мне очень понравилась фраза: «автореферат написан строгим, но ясным языком». «К незначительным претензиям можно отнести лишь некоторое число опечаток». Подписано: Золотарев Николай Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник Института Макса Планка. Вот, значит, замечаний фактически нет.

**Иванов Вадим Тихонович:** Макса Планка, это не российский, по-видимому.

**Олейников Владимир Александрович:** Да, и штампик стоит именно зарубежный.

**Иванов Вадим Тихонович:** Все понятно. Поскольку там не было замечаний, на которые можно отвечать, то мы двигаемся дальше. Дальше у нас по процедуре официальные оппоненты. Вейко Владимир Петрович. Профессор ФИЦ Биотехнологии РАН.

**Вейко Владимир Петрович:**

*(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается)*

Добрый день, уважаемые коллеги! Пользуясь случаем, я хотел бы, прежде всего, поздравить институт с юбилеем, который буквально через 2 дня, пожелать всем научных успехов, и чтобы институт еще длительное время был флагманом российской, да, пожалуй, и мировой, науки. Теперь давайте проанализируем некоторые аспекты работы, представленные нам соискателем.

Когда мы говорим о кремнии, у нас сразу в памяти всплывают такие вещи, как, естественно, Кремниевая долина, все необходимые технические приспособления, соединения кремния и структуры в которых играют определенную роль. Но особый интерес в этом аспекте, конечно, представляют наноструктурные формы кремниевых соединений, которые открывают еще больше возможностей в использовании материалов на их основе. В последнее время уделяется очень большое внимание такому факту, как использование определенных структур кремнезема и соединений кремния в медицине. По этому поводу в настоящее время уже есть достаточно много очень обширных докладов, которые раскрывают эту тему абсолютно полностью. Химия самого кремния и его производных является довольно сложной, это, как правило, не очень стойкие соединения, и ежели вы хотите получить какую-то структуру, обладающую определенными свойствами, то вам приходится в этом случае применять высокие температуры, о чем говорил уважаемый диссертант, либо другие ухищрения чисто химического свойства. В настоящее время, когда исследователи уже вооружены определенными методами молекулярной биологии, то они обращаются в этом случае для получения такого рода соединений к самому надежному своему колаборатору, которым является природа, которой уже подвластны длительные эксперименты и формирование этих структур. Именно такой подход в своей работе и продемонстрировала Поварова Наталья Владимировна. В природе обнаружен процесс формирования таких структур у спикул губок и диатомовых водорослей, для которых показано образование защитных поверхностных кристаллических структур. При этом центральным по мнению исследователей являются силикатеин, тогда как там работает целый комплекс белков, это, действительно, силикатеины, катепсины, силаффины, силиказы.

Силиказы, кстати говоря, это тоже неплохой фермент, который в какой-то степени подтверждает то, что здесь есть в этом процессе элементы ферментативные, ибо силиказы в этом случае исправляют те неправильно собранные структуры на поверхности спикул, которые так или иначе оказались дефектными, вообще говоря.

В связи с этим необходимо было дополнительное исследование, если мы хотим получать такие структуры. И в этом случае автор диссертационной работы выбрала центральный фермент, это силикатеины. И безусловно, все вышесказанное подтверждает то, что эта работа актуальная, своевременная, если сказать, даже немного запоздалая, поскольку нужно было заниматься этим гораздо раньше. И безусловно, имеются признаки практической значимости. Традиционно построение самой диссертационной работы: изложена хорошо цель, изложены хорошо задачи, которые в диссертационной работе должны были быть выполнены, обзор литературы достаточно полный. Я понимаю, что в связи с тем, что силикатеины открыты недавно, процесс с точки зрения молекулярной биологии исследуется не очень давно, примерно 20 лет, то, наверное, литературный обзор, описание не вызывал каких-то больших трудностей, но умело очень написан в том смысле, что уделено и акцентировано внимание именно на силикатеинах и на их роли. Диссертант хорошо понимает, что эти все белки, которые я перечислил, могут принимать участие в сборке ортосиликатов, в различные структуры включая и аморфные наночастицы. Я не говорю о кристаллических пока что! Вместе с тем Поварова очень четко отмечает, что состав синтетических полипептидов может контролировать форму получения таких частиц ортосиликатов. Это, действительно, любопытный факт, который тесно увязывается автором с планами дальнейших исследований. Полученная и хорошо проанализированная информация, предложенная в научных статьях, привела автора к вполне обоснованной центральной нити собственной работы. На основе всестороннего сравнительного исследования свойств этих двух типов протеиназ - силикатеина и катепсина, обладающего силикатеиновой активностью, выяснена не только природа этой активности в исследуемом процессе, но и показано, какие именно структурные особенности придают силикатеинам и катепсинам свойство осуществлять полимеризацию ортосиликатов, и какова роль как отдельных кислотных остатков полипептидной цепи, так и активного центра в полимеризации производных на основе кремния.

В разделе «Материалы и методы» автор описывает подробно экспериментальные подходы. Должен сказать, что в этой части возникала трудность, связанная с самополимеризацией соединений субстратов. И автор удачно разработала методику определения, и тем самым обеспечила успех дальнейшей работы. Но, к сожалению, формат преподнесения этой части работы у меня вызвал некие замечания, часть из них довольно существенная. То, что в разделе полностью отсутствует список реагентов и солей, я уже в каком-то отзыве слышал. Эта информация, кроме формальной благодарности фирме-производителю, несет принципиальный характер. Так как благодаря именно определенному качеству солей можно воспроизвести те или иные экспериментальные результаты. При описании электрофореза фрагментов ДНК в агарозном геле приводится все это с излишней подробностью. Это уже настолько устоявшийся метод! То же самое касается, вообще говоря, и полиакриламидного геля.

Синтез субстратов приведен без ссылок на ранее разработанные другими авторами методы получения соединений. Кроме того, вот понимаете, мы работаем в этой ситуации с парой субстрат – фермент. Хорошо бы характеризовать субстрат для понимания того, что вы в руках имеете именно то, что вы предполагаете.

При описании конструкций экспрессионных плазмид допускается некая неточность. Дело в том, что при клонировании или получении фрагмента ДНК, в основе лежит кДНК. И в этом случае даже с помощью каких-то изощренных методик автор не может получить ген, может получить только структурную часть гена, фрагмент структурной части гена, а геном эта часть ДНК становилась тогда, когда внедрялась в состав плазмиды и становилась под контроль определенного промоторного либо операторного участка. Это мелкие такие, может быть, замечания, но порой они принципиально отражают, насколько автор понимает саму процедуру, о чем я скажу немного позже.

Теперь, сама плазида сама по себе не обоснована. То есть почему выбирается именно эта плазида, а не какая-то другая. рЕТ-вариантов для этих случаев достаточно много, а что касается рЕТ-40(b+), необходимо было дополнительные манипуляции, для того чтобы создать работающую конструкцию и в конечном итоге получить белок. Я думаю, что в этом случае желательно было бы привести структуру самой плазмиды, которая была получена, это позволило бы автору не допустить таких ошибок в приведенных первичных структурах рекомбинантных белков, где не только не указан стартовый аминокислотный остаток метионин, но исчез His-Tag. Есть определенные сцепки с тем, что молекулярный вес получаемого белка несколько выше, чем расчетный, который проводит автор диссертационной работы.

Наконец, было бы крайне полезно оценить протеолитические свойства этих протеиназ, которые получают. В конце концов, это вторая часть этой пары. Если первым является субстрат, то второй – фермент. Мы получили рекомбинантную протеиназу, катепсин или силикатеин, вы покажите, что действительно это работающий фермент активный. И тогда, когда он активный, вам будет легче ориентироваться в дальнейшем по остальным результатам. Вот в разделе «Анализ цитотоксичности» выбрана была линия HeLa Kyoto. Вообще говоря, это нужно обосновывать! В конце концов, если вы хотите посмотреть, а влияет ли данный субстрат на жизнеспособность клетки, то почему берется раковая клетка, метаболизм которой существенно отличается от нормальной? Наверное, в параллель надо было бы провести те же процедуры с какими-то нормальными линиями. Это было бы вполне разумно, и более того, в этом же основная цель! Вы же не хотели уничтожить раковую клетку и обратить этот субстрат в метаактивное соединение терапевтического свойства.

Перейдем, наверное, после этого уже непосредственно к обсуждению результатов, которое было выполнено. Хотя, впрочем, здесь можно еще одну вещь вспомнить. Вот цитата непосредственно из диссертационной работы: «Затем белок элюировали раствором таким-то таким-то содержащим 20 мМ имидазола. Полученный препарат белка хранили не более 3 дней. Перед анализом белок переносили в требуемый буферный раствор с помощью колонок таких-то». При этом, естественно, возникает вопрос, первое: При какой температуре хранился раствор? Что происходило с данным белком через 3 дня? Почему нельзя было

перенести белок сразу в требуемый раствор? Нельзя ли данный фермент лиофилизировать из подходящего буфера и использовать в дальнейшем? Ответа на эти вопросы нет, и это автоматически предполагает, что человек, желающий повторить эти результаты, должен каждые 3 дня выделять белок. А так ли это? И почему?

Мы говорили с вами в предыдущих моментах относительно ферментов и субстратов. Автор очень удачно предложил использовать ТГС в качестве субстрата, показал, что это действительно наиболее удовлетворяющее исследованиям вещество, и в конечном итоге, полученные результаты основные и были получены на основе именно этого субстрата. Здесь надо сказать, что в данном случае ТГС - это новый субстрат, и он имеет ряд преимуществ по сравнению с ТГЭОС. Получив необходимые характеристики субстратов, Поварова приступила к исследованию непосредственно роли силикатеинов в процессе полимеризации производных ортосиликатов. Важно отметить, что, основываясь на анализе литературных данных, очень четком анализе, автор сделал сознательный выбор в качестве объекта исследования именно силикатеин А из морской губки. Это было во многом связано с тем, что, хотя первичная структура силикатеинов из других организмов имеет достаточно высокую гомологию, до 78 % с исследуемым белком, тем не менее, изоэлектрическая точка силикатеина А, а здесь все время прослеживалось в работе желание в дальнейшем использовать все это в системе *in vivo*, близка к физиологической и составляет 8,4. Поэтому оценка именно активности именно силикатеина А с субстратом ТГС, и встретившиеся на этом пути трудности были решены автором достаточно уверенно. В этом проявились лучшие качества исследователя, хорошее знание литературных данных и достаточно гибкая тактика постановки экспериментальной работы. Поварова сделала совершенно обоснованное предположение о том, что весь процесс ферментативной полимеризации ортосиликата имеет два независимых этапа – ферментативное образование частиц кремнезема и одновременное, самопроизвольное и независимое от белка, уплотнение их структуры, то есть, фактически, спекание.

Исследование было проведено по отдельным аминокислотным остаткам. В частности, по цистеинам, и это очень важно, и сразу же было доказано то, что эти цистеины не выполняют какой-то важной роли. Но при оценке температурной зависимости функционирования этого белка для силикатеина А оказалось, что ферментативная активность его составила 5 градусов Цельсия. Это довольно любопытно, потому что если использовать систему *in vivo*, то в этом случае, конечно же, 5 градусов не являются оптимальными. Но на рисунке есть выраженный дополнительный пик при температуре 25 градусов. А вот объяснения этому возрастанию и появлению этого пика, вообще говоря, в работе совершенно не дано. Что является довольно любопытным само по себе.

Конечно, есть определенные неточности в оформлении каких-то рисунков. Допустим, тот же самый ТГС, когда его получают, то используют DOWEX в кислой форме, то есть фактически рН довольно низкий. И вместе с тем, на рисунке 39, который начинается со значения рН с 3 единиц, почему-то ТГС оказывается абсолютно индифферентен к концентрации протонов. Это, наверное, может быть, неудачная форма преподнесения материала, но тем не менее...

Полученные группы мутантов, которые произвела в своей работе Наталья Владимировна, эта тактика, которую она избрала, сравнение между отдельными катепсинами и силикатеинами, может быть признана, конечно, наиболее оптимальной. То, что все белки проявляли силикатеиновую активность, и при этом осмысленность проведенных замен подтверждалась заметным изменением ферментативной силикатеиновой активности, вы понимаете, как раз здесь начинается основной момент, который я сказал относительно того, что хорошо бы характеризовать, на какие белки, протеиназную активность. Ибо в этом случае могла бы произойти некая оптимизация и мутаций, либо можно было бы отслеживать параллельно изменения как силикатеиновой активности, так и ферментативной активности, это дало бы возможность расшить эту тему несколько шире и четко понять, какие могут быть варианты дальнейших исследований.

То, что Поварова доказала и показала, что катепсин человека является также активным, во многом это впервые, во многом это достаточно удачно. Но полученные данные подтверждают только лишь то, что, действительно, и в организме человека такого рода соединения, как ортосиликаты, могут подвергаться определенному воздействию. Доказательством того, что полимеризация может осуществляться без участия силикатеиновой активности, без участия самого активного центра, оно приведено в работе при анализе белков рекомбинантных с помощью КД. Да, результаты полученные довольно убедительны, и показано, что нарушение неких элементов вторичной структуры приводит в конечном итоге к тому, что белок теряет активность, либо эта активность несколько возрастает. Поэтому эта часть, связанная с измерением КД, она во многом является некой замещающей для эффекта, которые не получены при исследовании протеиназной активности.

Здесь можно даже говорить вот о чем: итак, у нас показано автором то, что активный центр не играет никакой роли. Это вполне реально и возможно. Мы должны учитывать другой факт, что все предложенные субстраты, в том числе ТГС, могут подвергаться самопроизвольному гидролизу в растворе. При этом образуются силанолы, очень активные соединения. Их источник этих силанолов может быть самопроизвольный, либо каталитическое воздействие на субстрат и получение силанолов. Сами силанолы могут модифицировать боковые радикалы аминокислотных остатков. Образуются некие центры для последующей конденсации ортосиликатов, либо их производных. В конечном итоге в этом случае, конечно, важной становится и объяснимой как первичная, так и вторичная структура самого полипептида, и значение рН, при котором производится процесс. Все это, конечно, предположение, но его можно учитывать, и в дальнейшем имеет смысл рассмотреть.

Подводя итоги, я бы высказал следующее. Обратите внимание, что я не увлекся критическими замечаниями. Я эти замечания высказал как оппонент, которому должно это высказывать. Но вместе с тем полученные результаты, безусловно, имеют большое научное и практическое значение. К научному значению можно отнести, прежде всего, выяснение элементов механизма проявления силикатеиновой активности как самих силикатеинов, так и катепсинов. Немаловажным является и второй факт в этом плане, что скромность настоящего исследователя, характерная для Натальи Владимировны, не позволяет в

автореферате диссертации отметить очень хороший научный и практический аспект своей работы. Таким фактическим результатом выполнения исследования является конструирование пусть даже в каком-то элементе случайно, тем не менее, новых высокоэффективных биокатализаторов на основе мутантных форм катепсинов и силикатеинов, которые в 3 раза либо в 7 раз активнее исходного. Эти мутантные формы должны бы заинтересовать, конечно, автора. И я бы приложил в дискуссии это выносить в выводы или выносить в научные достижения, практические достижения, ибо отсюда, от этой точки стартуют многие вещи.

Достоверность не вызывает сомнений, полученные результаты в достаточной степени опубликованы, автореферат соответствует. Можно рекомендовать автору следующий путь. Наверное, я бы сказал, что надо бы более тесно совершить контакт с исследователями из Дальневосточного отделения РАН, где такого рода вещами занялись чуть раньше в силу чисто географического местоположения, и в конце концов, выяснить, почему в некоторых описаниях, статьях и т.д. этих авторов получаются не аморфные, а кристаллоподобные – я буду здесь крайне аккуратен - структуры, которые, конечно же, являются очень важными, очень нужными, и имеют в дальнейшем определенные перспективы.

Конечно, это только пожелание, но это вполне реально. Автор данной диссертационной работы проявила себя как высококвалифицированный исследователь, способный не только к решению, но как я убедился и со слов руководителя, и инициировать некие новые элементы исследований, ставить некие задачи и выбирать правильный путь их решения. Этот факт также наиболее ярко проявился, когда мы проводили личную беседу по части диссертационной работы непосредственно с автором этой работы.

Конечно же, работа полноценная, работа заслуживает в соответствии с положениями и т.д., со всеми изменениями, которые обычно вписываются, автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук, и, наконец, я бы сказал следующее. Чем для меня хороша эта работа? Вот эти замечания, которые я высказал, они только лишь отражают мой интерес к этой работе. Во многом, я пытался понять все от начала до конца. Является ли эта работа цельной? Является. Законченной? В общепринятом понимании – да. Но это выражение «законченная работа», меня всегда настораживает. Что значит работа закончена? Хорошее исследование ставит новые задачи, раскрывает более широкие перспективы и намечает те пути, решения которых приведут к еще большим успехам. И в этом смысле диссертационная работа Поваровой Натальи Владимировны, конечно же, раскрывает перспективы и дает возможности очень серьезно подумать над многими вещами, связанными с образованием кристаллического и аморфного кремнезема. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Наталья Владимировна, вам слово для ответного замечания.

**Поварова Наталья Владимировна:** Большое спасибо, Владимир Петрович, за детальный разбор работы. Я, безусловно, принимаю все замечания, которые касаются слишком подробного или, наоборот, недостаточно подробного описания методов исследования. Тем не менее, могу ответить на некоторые вопросы, в частности, по поводу обоснования выбора экспрессионной системы, конкретной плазмиды. Дело в том, что я перепробовала все экспрессионные системы, которые были у меня в руках, и это была

единственная, которая работала, и я не стала просто приводить неудачные попытки, привела удачную. Что касается выбора культуры клеток, то мы рассчитывали использовать силикатеин в живых клетках для образования частиц кремнезема в различных генно-инженерных приложениях, и с этой точки зрения важно не только понятие токсичности для живой клетки, а важно еще представлять их фенотип, нормально ли они переносят то, что мы с ними делаем. И поэтому мы взяли культуру клеток, с которой мы сейчас работаем в лаборатории, и фенотип которой мы хорошо себе представляем. Значит, что касается хранения белка, разумеется, мы его хранили в холодильнике. Что касается хранения в течение 3 дней, это тоже просто факт эмпирический, что когда я оставила белок дольше, он не работал, и я больше не стала так делать, использовала свежий белок. Мы, разумеется, не выделяли белок раз в 3 дня, потому что там мало выделить белок, сами по себе эксперименты по определению силикатеиновой активности тоже отнимают много времени, поэтому просто я выделяла порцию белка, проводила довольно много экспериментов параллельно, а потом обрабатывала результаты. Я не выделяла много белка раз в 3 дня, такого, все-таки, не было.

Что касается температурного максимума при 25 градусах, к сожалению, в его текущем виде я не вполне уверена, что он есть. Потому что в этой точке наблюдается очень большой разброс. И с учетом разброса различие не вполне достоверно. Проблема в том, что этот разброс воспроизводим, потому что кривую я, разумеется, переснимала, и в наличии разброса здесь я уверена. Как правило, такой большой разброс может быть связан с тем, что осадок почему-то отваливается, когда я его промываю. И, на самом деле, для того, чтобы разобраться, что здесь происходит, и где здесь реально максимум, по-хорошему, нужно бы сделать раститровочку с разницей в пару градусов от 15 до 30, и только тогда я смогу лучше представить себе, что здесь, на самом деле, происходит. К сожалению, на нынешнем уровне я не могу объяснить, что здесь происходит. И действительно ли здесь настолько возрастает активность.

Что касается рН и стабильности ТГС при разном рН, разумеется ТГС должен гидролизаться в кислых рН, и он гидролизуется. С другой стороны, полимеризация в кислых рН происходит хуже, а, опять же, в растворе субстрата сами по себе происходят все те же самые реакции. Я имею в виду количество полимеризованного кремнезема. На самом деле, при смещении в кислую область гидролиз в растворе субстрата, конечно, тоже возрастает. Проблема в том, что вся эта полимеризация происходит в микромолярной шкале, а в случае с белком в миллимолярной, и поэтому сделать эту кривую более видимой на данном графике я не могла. Наверное, стоило привести два, я учла это замечание, и могу показать это прямо сейчас. Я ответила на замечания? Хорошо. Тогда, вроде бы, все.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. А теперь давайте слушаем Владимира Александровича Митькевича, официальный оппонент, ведущий научный сотрудник Института молекулярной биологии.

**Митькевич Владимир Александрович:**

*(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается)*

Глубокоуважаемые коллеги, наверное, хорошо выступать последним, потому что мне уже не надо делать такой детальный анализ работы, который блестяще сделал предыдущий

оппонент, поэтому я позволю себе отметить основные моменты, которые мне запали, понравились в диссертационной работе Натальи Владимировны. Сразу скажу, что, когда ко мне обратились за отзывом, я ничего не знал о силикатеинах, и вообще этой области. Такая некая терра инкогнито, как я думаю, для большинства исследователей. Но оказалось, что это, действительно такая узкая область, очень немногие группы во всем мире занимаются этой проблемой. Хотя польза силикатеинов для возможного применения в практике, на мой взгляд, очень актуальна. Уже отмечалось сегодня не раз. Действительно, очень привлекательно использовать ферменты для создания таких инновационных материалов, как какие-то нанопленки с заданными свойствами, наночастицы для доставки лекарств, все это достаточно бурно развивается. И как раз силикатеины могли бы стать такой хорошей отправной точкой для синтеза таких материалов. Но пока эта область, действительно, очень неразвита. С одной стороны, это определяет сложность исследования, поскольку приходится действовать методом проб и ошибок, и ошибок достаточно много, как мы видим. С другой стороны, каждый результат - это что-то новое, которое развивает эту область, и это должно привлекать исследователя, на мой взгляд.

Сама работа, как отмечалось, построена по традиционной схеме: введение, обзор литературы. Отмечу сразу, что обзор литературы написан таким легким языком, в нем достаточно подробно представлено, как силикатеины работают, в современном представлении как они работают в губках, как происходит образование спикул у губок, представлены данные о каких-то возможных механизмах, о том, что предполагается. Обзор читается легко и дает представление о современном состоянии дел в этой области. В разделе «Материалы и методы» достаточно хорошо показана квалификация автора в работе руками. Видно, что Наталья Владимировна применяла много методов, хорошо ими владеет, и квалификация ее в данном смысле не вызывает у меня вопросов. Основной раздел материала, результаты, написан тоже, я бы сказал, достаточно легко. Там нет каких-то заумных фраз, настроений для такого достаточно неподготовленного читателя. Он не вызывает каких-то трудностей. Результаты описаны в достаточно доступной манере. И в целом, вся работа производит благоприятное впечатление. Высокий академический уровень, выводы, сформулированные в работе, отвечают тому, что было заявлено в качестве целей. И они обоснованы. Что же, на мой взгляд, является основным достижением автора? В первую очередь, это то, что был получен новый субстрат ТГС, и это, на мой взгляд, определило дальнейший успех работы, потому что субстрат оказался легким в работе, с ним можно было измерять различные активности и т.д. И, собственно говоря, это упрощение детекции с помощью ТГС позволило хотя бы частично ответить на вопрос о молекулярном механизме катализа силикатеинами, образовании кремнезема. Стало очевидно, что остатки активного центра ферментов не играют в этом процессе определяющей роли, и по всей видимости, конфигурация заряда молекулы фермента критична для осуществления реакции полимеризации. Собственно говоря, это было подтверждено данными точечного мутагенеза, анализом вторичной структуры силикатеинов. Также в поддержку этого предположения были получены данные по силикатеиновой активности катепсина L человека, который является родственным для всех силикатеинов. И, на мой взгляд, полученные результаты имеют как теоретическую, так и практическую значимость для развития биохимии



силикатеинов и их применения в биотехнологии. Достоверность полученных результатов обеспечивается комплексом современных исследований. Выводы, как я говорил, соответствуют. Опять же, о квалификации и уровне работы говорят опубликованные работы в хороших журналах, где Наталья Владимировна является первым автором, то есть в большей части это ее заслуга, естественно.

Конечно, у меня возникли некоторые вопросы к диссертационной работе. То, что говорилось про клетки HeLa. Кроме всего прочего, Наталья Владимировна не указала источник этих клеток. А как известно, кроме того, что они раковые клетки, они еще очень разнятся от того, как они были получены. Потому что очень старая культура, и как известно, клетки HeLa в одних лабораториях уже суспензионные, в других прикрепленные. В общем, эти клетки, которые хорошо бы как-то охарактеризовать. Потом, не очень понятно, как оценивалась выживаемость клеток. Надо было указать прибор, на котором были произведены измерения, поскольку, похоже, использовался флуоресцентный субстрат, там могло бы быть возбуждение и, соответственно, детекция. Такие методические мелочи.

Потом, я отметил, что на стр.67 было сделано сравнение силикатеинов A1 и альфа. Эти белки отличаются величиной поверхностного заряда, и максимум их активности достигается при разных значениях pH. При этом автор сделала вывод, что активность фермента зависит от поверхностного заряда. На мой взгляд, этот вывод был сделан значительно раньше, чем следовало. И его надо было перенести в конец работы. Где уже подробно описано влияние замены поверхностных остатков в силикатеине на его активность. Тогда этот вывод уже был бы более обоснованным. Также одно короткое замечание, Наталья Владимировна, видимо, ей очень нравится субстрат ТГС, поэтому она на протяжении всей работы несколько раз выбирает его в качестве лучшего субстрата. Наверное, достаточно это было сделать один раз. Итак, из работы видно, что он хороший. Конечно, эти замечания носят частный характер и не умаляют важных сторон работы. И можно заключить, что диссертационная работа Натальи Владимировны является законченным научным исследованием, соответствует всем критериям и положениям о присуждении ученых степеней, и сама Наталья Владимировна, на мой взгляд, заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Вывод понятен. Тем не менее, Наталья Владимировна, вам слово для ответа на замечания.

**Поварова Наталья Владимировна:** Спасибо. Я принимаю все замечания, которые были сделаны. Могу сказать, запоздало, но пояснить, что наши HeLa из коллекции EMBL центра. И запоздало, но я, все-таки, могу на слайдах привести условия, в которых мы снимали выживаемость клеток. Вот. Это все, все комментарии по тексту, я с ними согласна, и, возможно, даже не стоило настаивать, что ТГС такой хороший субстрат, хотя с этим, возможно, не до конца согласна. Он определенно не стал хуже от того, что я упомянула его лишней раз. Это все. Больше нет замечаний? Хорошо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Мы заслушали все подготовленные отзывы, открываем общую дискуссию. Кто хотел бы дать свои соображения?

**Деев Сергей Михайлович:** Дорогие коллеги, мы услышали новую работу для того коллектива, в котором она выполнялась. Мы знаем наших коллег, профессора Лукьянова и

его сотрудников как мировую элиту по флуоресцентным белкам. Это объект новый и для этой лаборатории. И здорово, что появилась работа, безусловно, очень актуальная. Не зря показали периодическую таблицу (кстати, у нас сейчас год периодической таблицы Менделеева, ЮНЕСКО определил). Может быть, это не только для соединений кремния, но и для других будет очень интересно. По-моему, работа отличная, абсолютно квалификационная очень хорошая работа. Она новая. Поэтому методология новая, видно, что авторы нащупывали некую методологию, которая для них, может быть, не всегда была абсолютно привычна, поэтому было столько вопросов. У нас блестящий институт, много специалистов – каждый спросил про свое. И получил, на мой взгляд, достаточно хорошие ответы, что характеризует диссертантку как абсолютно подготовленную к защите. Прекрасные публикации: «BBRC», «Scientific Reports». Мне кажется, несмотря на то, что мы сегодня немного долго заседаем, это здорово, что коллектив авторов подобрал таких квалифицированных оппонентов, которые задали так много вопросов, и мы услышали прекрасные ответы. Я считаю, что мы являемся свидетелями отличной работы, предлагаю поддержать эту работу. Выступаю «за».

**Иванов Вадим Тихонович:** Учтем ваше мнение. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Уважаемые коллеги, я хочу сразу сказать, что я буду голосовать «за», и я согласен с Сергеем Михайловичем. Я получил удовольствие. Защита, на мой взгляд, состоялась. Сделана, причем, руками самого соискателя, оригинальная работа. Любая научная работа не лишена недостатков, если пристально на нее посмотреть. Это просто... я не встречал, пожалуй, научных оригинальных работ, к которым нельзя было «придраться» и задать вопросы. Очень стойко соискатель оборонялся. Это свидетельствует о том, что это уже выросший специалист. И это особенно приятно, потому что не секрет, что еще бывают в отдельных местах нашей большой страны случаи, когда молодого человека просто ставят на конвейер и защищают, что называется. Получается, пишут за него статьи, включая его в статьи, иногда даже в первых позициях, а потом оказывается, что кандидат наук не может сам ни сформулировать выводы по своей работе, ни написать статью внятную и опубликовать ее. А здесь человек прошел все этапы. Я буду голосовать за. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Лев Давыдович?

**Румш Лев Давыдович:** Я не займу много времени, мы уже давно заседаем. Уважаемые коллеги, я представлял эту работу к защите. Надо сказать, что потрясающе интересная работа. Вот я ее читал и вспоминал какие-то книги фантастов 50-летней давности о том, что где-то на других планетах может быть силиконовая жизнь. Тут просто мы видим, что да, кремний и углерод находятся рядом, и даже одно заменяет другое в каких-то условиях. И конечно, потрясающим оказалось то, что протеолитический фермент, протеазы силикатеины, тем более еще катепсин L человека, они могут выполнять такие функции полимеризации кремния. Механизм не очень известен, но все еще впереди. Хочу отметить смелость диссертанта, потому что она опровергла классические представления о том, что там триада, такой стандартный фермент. Показала, что не так. Видимо, может быть, заряды на поверхности белка играют роль. Но это все впереди. Тут мне было бы очень интересно, если это действительно катализ такой. Может быть, он и такой есть, и такой. Проходит ацил-фермент на протеазу, что может быть, тут могут получаться какие-то соединения силикона с

азотом, например, катализироваться. Но это все впереди. Очень интересная работа! Я говорю, как-то я не помню, чтобы я, представляя диссертацию, с таким интересом ее прочитал. Желаю удачи и дальнейших успехов диссертанту и руководителю. Спасибо большое.

**Иванов Вадим Тихонович:** Отлично. Есть еще желающие? Виталий Павлович, прошу.

**Зубов Виталий Павлович:** Я постараюсь быть очень кратким, не буду повторять те фразы, которые характеризовали ценность с точки зрения молекулярной биологии и биологических дисциплин. Несколько слов глазами химика. Вот кремнийорганическая химия, это очень обширная область, и гидролизу и просто образованию кремнезема посвящены тысячи работ и щелочной, и кислый, и каталитический. И очень много зависит от того, какой катализатор, какие при этом образуются структуры. При виде гидролиза образуются, в основном, линейные, которые потом формируют сетку, в других сразу образуются сильно разветвленные близкие к сферическим. И от этого начинает возникать другая морфология. Вот здесь совершенно новый субстрат, совершенно новый с точки зрения химика подход. И мне кажется, что это будет очень ценный вклад в смежные дисциплины. Что, вообще говоря, для работы является большим достоинством. Могу сказать, что мы, например, занимались тем, что много лет занимались получением так называемых гибридных гидрогелей, когда получали наночастицы кремнезема путем гидролиза прекурсоров в растворах полимеров, и они выступали в качестве узлов сшивки. Получались гидрогели без образования химических связей за счет взаимодействия наночастиц с функциональными группами водорастворимых полимеров, в том числе природными, и получаются очень интересные гидрогели. Это один из примеров. Поэтому управление морфологией кремнеземов, как мне кажется, может быть очень ценным в дальнейшем развитии этого направления. Конечно, надо эту работу поддержать. Спасибо.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Есть еще желающие? Не вижу. На сем дискуссию завершаем. И мы приближаемся к концу нашей процедуры, осталось диссертанту произнести заключительное слово. Последняя возможность сегодня выступить.

**Поварова Наталья Владимировна:** Я бы хотела поблагодарить научного руководителя, разумеется, за предоставленную свободу в выборе объектов, в постановке задач и вообще в работе в целом. Я бы хотела поблагодарить своих коллег, особенно своих соавторов Михаила Баранова, Мышкину Надежду, всех остальных сотрудников лаборатории тоже, потому что в лаборатории очень приятно работать, и мой оптимизм не был бы так прочен, если бы его не поддерживали такие приятные люди. И я бы хотела всех участвующих в дискуссии поблагодарить за теплые слова в адрес моей работы, и всех, кто сегодня пришел меня послушать. Спасибо большое.

**Иванов Вадим Тихонович:** Спасибо. Переходим к техническим моментам. Нам нужно голосовать. Для этого нужна счетная комиссия, у меня уже подготовлено предложение нашему ученому совету по составу счетной комиссии. Традиционно 3 человека без регалий и имен-отчеств: Шапаронов, Овчинникова, Олейников. Все кандидаты согласованы, поэтому самоотводов не будет. Может быть, есть отводы какие-то? И этого не вижу. Есть возражение против данного состава счетной комиссии? Не вижу. Комиссия

принята. Единственное, что надо сделать перед тем, как объявить перерыв, это, может быть, у ученого совета есть замечания по поводу проекта заключения. Нам голосовать предстоит после заслушивания итогов голосования, тем не менее, чтобы это произошло быстро и без задержки, может быть, сейчас мы внесем замечания и исправления в проект заключения? Бывает иногда... Мы готовы голосовать по этому вопросу тоже.

*(Проводится тайное голосование)*

**Иванов Вадим Тихонович:** Слушаем, Владимир Александрович.

**Олейников Владимир Александрович:** Значит, счетная комиссия отработала. По диссертации Поваровой Натальи Владимировны. Присутствовало на заседании 22 члена диссертационного совета. Роздано бюллетеней – 22. В урне оказалось – 22. Результаты голосования: «за» - 21, «против» - нет, и один недействительный. То есть принято положительное решение.

**Иванов Вадим Тихонович:** Приступаем к голосованию. Кто за? Кто против?

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

**Иванов Вадим Тихонович:** Решение принято. Ну, что ж, поздравим диссертанта с прекрасной защитой. У нас пополнение кандидатов наук в институте. Спасибо, мы выполнили повестку дня. До следующих встреч, коллеги.

Председатель  
диссертационного совета

Ученый секретарь  
диссертационного совета



академик РАН Иванов В.Т.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.