

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата химических наук**  
**Васильевой Ирины Дмитриевны**  
**на тему: «Метод масс-спектрометрического установления первичной**  
**структуры интактных пептидов амфибий семейства Ranidae»**  
**по специальности 1.4.3 – «Органическая химия»**

Диссертационная работа Васильевой Ирины Дмитриевны посвящена разработке новых подходов к установлению строения пептидов, имеющих в своем составе циклический дисульфидный фрагмент, с использованием масс-спектрометрии ультравысокого разрешения в сочетании с различными методами активации ионов и их применению к определению аминокислотной последовательности пептидов лягушек.

**Актуальность темы** исследований предопределяется выбранным направлением работы: с одной стороны, секвенирование пептидов, содержащих циклический дисульфидный фрагмент, представляет собой самостоятельную сложную задачу, которая ранее решалась только с использованием методов химической модификации аналитов. С другой стороны-выбранные для работы объекты относятся к соединениям, обладающим широким спектром биологической активности и являющимися потенциальными лекарственными средствами. Поэтому разработка методов, позволяющих проводить секвенирование интактных пептидов без проведения дериватизации, а значит и без потери минорных компонентов смесей, приобретает ключевое значение.

**Научная новизна** работы очевидна и не вызывает сомнений: автором предложен оригинальный подход к раскрытию циклического фрагмента исследуемых пептидов за счет применения гибридного метода активации ионов сочетающего захват электронов и высокоэнергетическое соударение. Показано, что такое комбинирование различных методов продуцирования

фрагментации ионов позволяет в большинстве случаев полностью описывать аминокислотную последовательность пептидов включая дифференциацию остатков лейцина и изолейцина.

**Степень обоснованности, достоверности и новизны научных положений, выводов, рекомендаций и заключений.** Достоверность полученных результатов подтверждается применением комплекса современных масс-спектрометрических методов, получением воспроизводимых экспериментальных данных, не противоречащих современным научным представлениям и закономерностям. Полученный массив данных квалифицированно обработан, на основе его анализа сделаны оригинальные выводы полностью соответствующие результатам экспериментов. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сделанных в работе, подтверждается публикациями соискателя в рецензируемых научных журналах, входящих в первый квартиль международных наукометрических баз данных Web of Science и Scopus, а также докладами на международных и всероссийских научных конференциях.

**Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики.** Научная значимость работы заключается прежде всего в разработке универсального метода масс-спектрометрического установления аминокислотной последовательности пептидов имеющих в своем составе циклический фрагмент с дисульфидным мостиком. Подобный подход может быть использован не только для изучения строения пептидов амфибий, но и при анализе протеома других живых организмов. Важно отметить, что предложенный подход применен для решения реальной задачи, что позволило идентифицировать ранее не секвенированные пептиды. С практической точки зрения полученные результаты имеют важное значение для разработки новых препаратов для лечения различных заболеваний.

**Общая характеристика диссертационной работы.** Диссертационная работа Васильевой И.Д. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов,

экспериментальной части выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 271 наименование. Текст изложен на 142 страницах машинописного текста, включает 51 рисунок и 15 таблиц

Литературный обзор, предшествующий изложению экспериментальных методов и обсуждению собственных результатов, обстоятельно рассматривает существующие подходы к применению современных методов установления аминокислотной последовательности пептидов. Обзор прекрасно систематизирован, написан хорошим научным языком, тщательно выверен и практически не содержит опечаток. Он не оставляет сомнений в оригинальности подходов, использованных диссертантом в работе, и в правомочности постановки решаемой диссертантом научной задачи.

Основные результаты и их обсуждение изложены автором во второй главе. Первый и второй раздел этой главы посвящены определению состава кожного пептидома остромордой лягушки *Rana arvalis*, отловленной в Словении, и сопоставлению полученных данных с результатами изучения того же объекта, но для особи, обитающей в Московской области. Автор наглядно демонстрирует преимущество использования гибридной техники, сочетающей активацию ионов переносом электронов и последующую активацию соударением при изучении пептидов, имеющих в своем составе циклический фрагмент с дисульфидным мостиком. Получаемые таким образом масс-спектры ионов-продуктов содержат все необходимые сигналы для установления аминокислотной последовательности внутри циклического фрагмента. При этом, если в некоторых случаях полученные результаты в целом могут быть достигнуты и с использованием других методов активации, например, диссоциации индуцированной соударением при повышенных энергиях, то для ранатуеринов предложенная автором техника оказалась единственным способом достижения необходимых результатов. Сравнения двух массивов полученных данных для особей из различных ареалов обитания позволило выявить популяционные различия. При этом были показаны преимущества разработанного подхода: отказ от использования химических

методов раскрытия сульфидного цикла позволил достичь ранее не доступных пределов обнаружения.

Следующие три раздела посвящены решению схожей проблемы изучения пептидома и выявления популяционных различий лягушек *Rana temporaria*. Как и в предыдущем случае автору удалось показать преимущества разработанного метода, а сравнения полученных результатов для лягушек разных ареалов обитания позволило выявить значимые различия в пептидомах кожи, обусловленные климатическими особенностями регионов и их биоразнообразием.

Два последних раздела обсуждения результатов подробно освещают механизмы фрагментации, позволяющие добиваться приведенных в предыдущих разделах диссертации результатов применения гибридного метода активации ионов, а также рассматривают результаты программного определения аминокислотных последовательностей. Автор выдвигает обоснованное предположение, что раскрытие дисульфидного цикла протекает через захват электрона протонированной амино-группой в боковой цепи с последующей миграцией атома водорода на кислород близлежащей амидной группы, перенос радикального центра на ее атом углерода и разрыв N- $\alpha$ -S связи пептида. В дальнейшем активация соударением приводит к разрыву S-S связи и элиминированию соответствующего фрагмента молекулы. Предложенный механизм объясняет получаемые масс-спектры продуктов активации и позволяет экстраполировать его на аналиты близкого строения. Применение программных средств интерпретации масс-спектров так же дает возможность получения определенного набора данных, однако требует внимательной обработки получаемых результатов.

Третья глава работы посвящена описанию условий и процедур пробоподготовки, проведения экспериментов, режимов работы оборудования и использованных в работе реагентов и расходных материалов. Подробность приведенных сведений позволяет оценить масштаб проделанной работы и

использовать данные описания для воспроизведения полученных результатов и разработанных методик.

В целом работа представляет собой завершенное оригинальное научное исследование, тематика которого и полученные результаты соответствуют заявленной специальности 1.4.3 - Органическая химия. Основное содержание диссертации опубликовано в трех статьях, а также апробировано на международных и всероссийских конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Несмотря на общее благоприятное впечатление от работы, к ней есть следующие вопросы и замечания:

1. В экспериментальной части отсутствует описание условий работы источника ионов масс-спектрометра Orbitrap Fusion.
2. Приведенный на Схеме 4 фрагмент, обозначенный как  $z_2$  ион-нейтрален.
3. Рассуждения о механизме раскрытия Rana box в ходе экспериментов с использованием гибридного метода активации ионов, приведённые в шестом разделе второй главы выглядят вполне резонными. Поэтому не вполне понятно, почему обсуждая фрагментацию протеолитического фрагмента бревинина 2AV(13-33) с массой 2136.0726 Да (стр. 59), автор отмечает, что «В результате переноса электрона в EThcD происходит радикальный разрыв дисульфидной связи в протеолитическом фрагменте интактного бревинина 2AV(3-33) с последующей частичной фрагментацией внутри «Rana box» во время дополнительной ДАСПЭ активации».

Следует отметить, что высказанные замечания не затрагивают сути проведенного исследования и не противоречат сделанным в работе выводам и выносимым на защиту положениям.

Таким образом, можно заключить, что по объему теоретических и экспериментальных исследований, их актуальности, научной новизне и практической значимости диссертация отвечает требованиям, установленным

Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.3 - Органическая химия, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Работа оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Автор же диссертационного исследования, *Васильева Ирина Дмитриевна*, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 - Органическая химия.

Кандидат химических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории спектральных и  
хроматографических исследований Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени  
Института нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева Российской  
академии наук (ИНХС РАН)  
Борисов Роман Сергеевич

24 ноября 2022 года

Контактные данные:

тел.: 7(916)5969013, e-mail: borisov@ips.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

02.00.03 - Органическая химия

Адрес места работы: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, 29, ИНХС  
РАН, лаборатория спектральных и хроматографических исследований

Тел.: +7(495)954-2269; e-mail: borisov@ips.ac.ru

Подпись сотрудника ИНХС РАН Р.С. Борисова удостоверяю:

Ученый секретарь ИНХС РАН

д.х.н., доцент

24 ноября 2022 года

Костина Ю.В.