

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу **ВАСИЛЬЕВОЙ ИРИНЫ Дмитриевны** на тему «Метод масс-спектрометрического установления первичной структуры интактных пептидов амфибий семейства *Ranidae*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия

Успехи современной протеомики в значительной степени определены прогрессом масс-спектрометрии. Установление аминокислотных последовательностей пептидов (секвенирование) по масс-спектрометрическим данным стало в настоящее время настолько популярным, что, как отмечено на стр. 11 диссертации, в последнее время прекращено производство оборудования для реализации «классического» химического способа решения таких задач – метода Эдмана. Особенно «привлекательно» и информативно многообразие разновидностей масс-спектрометрии (прежде всего – вариантов активации соударениями) и их уникальных возможностей. Поэтому представленную в Диссертационный совет МГУ.014.1 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова диссертационную работу Ирины Дмитриевны Васильевой на соискание ученой степени кандидата химических наук, посвященную установлению первичной структуры пептидов (маркеров стресса) амфибий семейства *Ranidae*, вполне можно классифицировать как **законченное научное исследование**. Его результаты составили предмет трех статей в ведущих международных журналах (уровень Q1) и (**апробация работы**) восьми сообщений на конференциях различного уровня.

**Актуальность работы** обусловлена как общими задачами протеомики, так и уникальными биохимическими свойствами пептидов кожных секретов бесхвостых амфибий четырех охарактеризованных в работе популяций. Так, один из наиболее типичных для всех видов амфибий пептидов – Бревинин 2Г –

является мощным антибиотиком, активным как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (перечень приведен в диссертации на стр. 74). Кроме антимикробной такие пептиды обладают противоопухолевой, фунгицидной и другими активностями. При этом геномы (пептидомы, протеомы) большинства видов амфибий в настоящее время еще неизвестны. С другой стороны, именно современная техника масс-спектрометрии позволяет реализовать секвенирование не «традиционным» способом «снизу вверх» (с предварительным трипсинолизом пептидов), а «сверху вниз». Это эквивалентно использованию исключительно масс-спектрометрической информации (без трипсинолиза и дополнительных химических модификаций пептидов). Возможности такого подхода, основанного на разных вариантах активации соударениями, безусловно, заслуживают подробного рассмотрения. Результаты установления аминокислотных последовательностей большого количества пептидов без использования химических модификаций, сгруппированные в разделе «Обсуждение результатов» по видам амфибий, по классификационным признакам соответствуют как *научной новизне*, так и *практической значимости* работы. Впервые установлены составы пептидомов трех видов ранидных амфибий в которых обнаружено 160 пептидов, причем из них 16 описаны впервые. Дополнительно к указанным моментам следует заметить, что работа И.Д. Васильевой – не первая, в которой применен метод секвенирования «сверху вниз», но предыдущие примеры так или иначе сопровождалась, пусть и незначительными, химическими модификациями, а в данном случае они принципиально исключены.

*Цель работы* – создание надежного метода секвенирования олигопептидов с использованием возможностей исключительно тандемной масс-спектрометрии. Для ее достижения в число подлежащих решению *задач* включены следующие (далее с комментариями перечислены в сокращенном виде).

- Охарактеризовать применимость тройного гибридного метода фрагментации EThcD (диссоциация при переносе электрона с дополнительной актива-

цией соударениями при повышенной энергии). Показано, что этот вариант оказывается одним из наиболее информативных для целей протеомики;

- Охарактеризовать характер разрыва связей S-S дисульфидных фрагментов с целью установления последовательностей аминокислот без привлечения химических модификаций образцов. Предложена схема образования фрагментных ионов, отличительная особенность которой – диссоциация связей S-S не на первой, а на последующих стадиях процесса;

- Полностью установить пептидомы трех видов амфибий (задача решена);

- Сравнить полученные результаты с составом пептидомов других популяций рассмотренных видов (рассмотрено в самостоятельном разделе диссертации). Наблюдаемые различия объяснены естественным отбором, а именно климатическими условиями, наличием естественных врагов (хищников) и бактериальным окружением;

- Сравнить возможности интерпретации масс-спектрометрической информации вручную с результатами секвенирования с использованием программы PEAKS (Thermo Scientific). Отмечено, что эта программа чаще всего обеспечивает получение лишь частичной информации о рассматриваемых нетриптических пептидах. Большая же часть масс-спектров в работе проинтерпретирована вручную.

*Задачи работы* согласованы как с *выносимыми на защиту положениями*, так и с *заключением (выводами) диссертации*. *Достоверность результатов* не вызывает сомнений, поскольку в масс-спектрах пептидов регистрируются сигналы ионов нескольких последовательностей, что позволяет эффективно контролировать правильность интерпретации данных. Правда здесь необходимо заметить, что при рассмотрении каждого масс-спектра автору приходится иметь дело с весьма большим объемом информации. Небезынтересно также отметить, что содержание автореферата адекватно содержанию диссертации, но он отличается иной последовательностью изложения. На этом основании впол-



не можно заключить, что автор хорошо владеет обсуждаемой информацией.

С позиций защищаемой в диссертации концепции отказа от дополнительной химической модификации пептидов весьма убедителен фрагмент масс-хроматограммы, приведенный на Рис. 3 автореферата, который наряду с дважды ацетиламирированным бревинином 1Та иллюстрирует образование моноацетиламирированного пептида, что усложняет интерпретацию результатов. Не менее убедительно сравнение (Рис. 2 автореферата) лишь частично соответствующих друг другу хроматограмм интактной смеси пептидов *Rana arvalis*, и образцов, полученных их восстановлением/алкилированием (реагенты – дитиотреитол и йодацетамид) и окислением (реагент – надмуравьиная кислота). Тем самым подтверждены ограничения химической модификации пептидов перед регистрацией масс-спектров. В подобных случаях вместо решения целевых задач приходится выявлять и компенсировать несоответствия различных методов получения производных.

Особенностью диссертационной работы представляется очень «концентрированная» по объему информации форма рассмотрения как собственных, так и литературных (например, в разделе 1.2) данных. Автором работы найдена удачная форма практически одновременного обсуждения структурно-химических проблем, относящихся к пептидам ранидных амфибий, и особенностей их масс-спектрометрической фрагментации, причем в сочетании с необходимой биологической классификацией объектов. Для оценки потенциальной биологической активности ранее не охарактеризованных пептидомов использовано построение 2D-карт (пузырьковые диаграммы), в которых по оси абсцисс представлены нормализованные дефекты масс, а по оси ординат – нормализованные изотопные сдвиги. Пептиды, относящиеся к одному семейству, занимают определенные области на полученном графике. Такой метод представляется более информативным, чем стандартные хемометрические подходы (например, QSAR), который демонстрирует корреляцию между массой молекул (элементным составом) и биологической активностью веществ.

Особое внимание автора уделено рассмотрению проблемы секвенирования так называемых *Rana box* фрагментов пептидов – участков полипептидной цепи, характеризующихся дополнительной топологической связностью за счет дисульфидных мостиков S-S, образованных цистеиновыми звеньями. Обычные варианты техники ДАС или ДАСПЭ, как правило, не позволяют установить аминокислотные последовательности внутри таких фрагментов. Предлагаемый же в работе вариант EThcD позволяет решить эту задачу.

Второй проблемой, осложняющей масс-спектрометрическое установление первичной структуры пептидов, является дифференциация изомерной пары «лейцин – изолейцин». Этот вопрос был специально подробно рассмотрен в предыдущей диссертационной работе; здесь же выявление сигналов так называемых *w*-серий закономерно использовано уже как рутинный прием.

Необходимо специально подчеркнуть, что особенности объектов исследования (природные олигопептиды), используемых методов (органическая масс-спектрометрия), а также характер интерпретации полученных результатов и сформулированного на их основании заключения позволяют утверждать, что рассматриваемая диссертационная работа *соответствует специальности 1.4.3 – органическая химия*. Изложенное выше позволяет считать *степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций диссертации* высокой.

Переходя к *замечаниям и пожеланиям* по работе необходимо отметить, что, как указано ранее, какие-либо ошибки интерпретации масс-спектрометрических данных полностью исключены. Следовательно, отмеченные ниже вопросы нельзя относить к принципиальным моментам.

- «Концентрированная» форма представления информации, являющаяся особенностью рассматриваемой диссертации, в известной степени «провоцирует» появление так называемого профессионального жаргона. Это выражения типа «двух цистеинов» (стр. 3), «два остатка цистеинов» (стр. 35), «соседству-

ющий с внутренним цистеином» (стр. 59), «хроматографирование» (стр. 7, 59, 70, 95 и 109), «слабокислые значения pH» (стр. 32). «Энергию в методах ДАСПЭ и EThcD ступенчато варьировали в интервале 5 – 40» (стр. 95 диссертации и стр. 9 автореферата) без указания единиц измерения. Вряд ли корректно говорить о «химических реакциях» в источнике ионизации (стр. 3 автореферата); лучше использовать термин «процессы». При обсуждении пузырьковых диаграмм (2D-карт) неудачно выражение «размер пузырька пропорционален интенсивности протонированной молекулы» (стр. 47). Про увеличение количества подлежащих рассмотрению вариантов сочетаний отдельных аминокислот в полипептидах на стр. 51 сказано, что число вариантов «экспоненциально возрастает», однако корректнее было бы говорить о комбинаторном увеличении числа вариантов.

На стр. 32 в качестве восстановителя указан *трис*(2-хлорэтил)фосфат. Маловероятно, что этот эфир обладает восстановительными свойствами; скорее всего, речь идет о *трис*(2-хлорэтил)фосфите.

Фактически, на этом перечень замечаний исчерпан. Подобные несущественные погрешности изложения не влекут за собой никаких выводов относительно научного уровня выполненной И.Д. Васильевой работы и не сказываются на значимости диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям к работам подобного рода, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.3 – «Органическая химия» (по химическим наукам), критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

**Из изложенного выше следует, что соискатель Ирина Дмитриевна Васильева заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – «Органическая химия».**

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор

Профессор Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

**ЗЕНКЕВИЧ Игорь Георгиевич**

15.10.2022 г.

Контактные данные:

Тел. (служ.) (812) 428-4045, E-mail: [izenkevich@yandex.ru](mailto:izenkevich@yandex.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
02.00.03 – Органическая химия

Служебный адрес:

Университетский проспект 26, С-Петербург 198504  
Институт химии ФГБОУВО СПбГУ