

ОТЗЫВ

официального оппонента Родина Игоря Александровича на диссертационную работу Васильевой Ирины Дмитриевны «Метод масс-спектрометрического установления первичной структуры интактных пептидов амфибий семейства *Ranidae*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия

Не убывающий интерес учёных к исследованию секретируемых амфибиями кожных пептидов вызван, с одной стороны, разнообразием их свойств: антибактериальной, противовирусной, фунгицидной, противоопухолевой и антидиабетической активностью, при этом практически невозможной адаптацией к ним патогенов, с другой – сложностью их строения, обусловленной посттрансляционными модификациями: внутримолекулярными дисульфидными связями и амидированием С-конца. Современные масс-спектрометрические методы анализа позволяют устанавливать первичную структуру таких объектов, однако не лишены своих недостатков. Особую сложность составляют пептиды с внутримолекулярной дисульфидной связью, поскольку такие объекты требуют химической обработки для раскрытия соответствующих циклов. Дериватизация же в свою очередь требует очистки исследуемого образца от реагентов перед вводом в ВЭЖХ-МС, что приводит к потере минорных компонентов анализируемых кожных секретов. Таким образом, создание метода анализа белков и пептидов без использования даже небольших химических модификаций является **актуальной задачей**. Основной **целью** диссертационной работы Васильевой И.Д. как раз выступила разработка такого метода.

Диссертационная работа имеет классическую структуру и изложена на 142 страницах. Состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части и заключения. В списке цитируемой литературы содержится 271 наименование. **Выносимые на защиту**

положения и заключение диссертации согласованы с **целями и задачами** диссертационной работы

Во *Введении* диссертационной работы автор обосновывает актуальность выполненного исследования, указывает его цель и задачи, демонстрирует **научную новизну** и **практическую значимость** полученных результатов, их **апробацию**, которая включает три опубликованных статьи (все в журналах с импакт-фактором выше 3), а также 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации.

Литературный обзор охватывает публикации в основном последнего десятилетия в области масс-спектрометрии природных нетриптических пептидов. Автор приводит общие сведения о современных приборах, используемых для анализа таких объектов, подходах к анализу и трудностях, с которыми исследователи сталкиваются при их осуществлении. Отдельный раздел обзора посвящен программному обеспечению для автоматического установления аминокислотных последовательностей, существующему на сегодняшний день.

Обсуждение результатов сосредоточено на описании полученных спектров и ручном установлении последовательностей пептидов (в работе определено более ста последовательностей). Отдельные разделы посвящены сравнению популяций амфибий одного вида, в том числе с использованием наглядных двумерных карт. Особый интерес представляет собой глава о раскрытии дисульфидных циклов в условиях MS³ эксперимента EThcD, в которой автор, обнаружив новую серию фрагментных ионов, позволяющую установить последовательность аминокислот в дисульфидном цикле, предлагает механизмы их образования, выделяя наиболее возможный. С использованием такого подхода Васильева И.Д. устанавливает последовательности всех дисульфидсодержащих пептидов, обнаруженных ею в исследованных кожных секретах, при этом не используя химических

модификаций, то есть обнаруживая и минорные компоненты пептидных смесей.

Еще один раздел обсуждения результатов посвящен сравнению результатов установления последовательностей вручную и при помощи программного обеспечения PEAKS Studio, выбранного автором из-за наибольшей популярности в протеомных исследованиях. Автор выполняет сравнение для модифицированных и немодифицированных образцов, демонстрируя максимальную эффективность ручного секвенирования с учетом новых серий ионов. При этом автор не умаляет возможностей программной интерпретации спектров, показывая способность полностью прочесть пептидную последовательность в случае дериватизированных образцов, подчёркивая при этом, что химическая модификация значительно влияет на сам образец – иногда реакция не протекает для исследуемых пептидов, а очистка анализируемого субстрата после реакции приводит к удалению минорных компонентов.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, поскольку часть пептидов, для которых был применен новый разработанный метод, была уже известна и установлена другими методами (клонированием кДНК или деградацией по Эдману). Разработанный метод полностью подтвердил полученные ранее результаты, а также был апробирован на новых молекулах, которых в данной работе было обнаружено 16.

Объем выполненной работы большой, качество при этом находится на очень высоком уровне. Однако в ходе ознакомления с диссертационной работой возникли некоторые вопросы, на которые хотелось бы получить ответы:

1. По какой причине масс-спектры были зарегистрированы на двух разных приборах с одним и тем же масс-анализатором?
2. При исследовании межпопуляционных различий для амфибий вида *Rana temporaria* были выбраны 4 популяции, а для амфибий вида *Rana arvalis* – две. Планируется ли увеличить выборку для второго

вида? А также планируется ли исследовать подобные различия для амфибий других видов?

3. В работе были исследованы пептиды, содержащие одну внутримолекулярную дисульфидную связь. Есть ли у автора предположения, как подобный метод поможет анализировать пептиды с бóльшим числом дисульфидных связей, и будет ли он в принципе полезен для подобных объектов?

Сформулированные замечания и вопросы не затрагивают сущность работы, а диссертация представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Работа соответствует паспорту заявленной специальности 1.4.3. – Органическая химия в пунктах:

2. Открытие новых реакций органических соединений и методов их исследования;
5. Создание новых методов установления структуры молекулы;
7. Выявление закономерностей типа «структура – свойство».

Результаты, полученные диссертанткой, имеют существенное значение для развития масс-спектрометрии белков и пептидов. Можно заключить, что диссертационная работа Васильевой И.Д. по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности, научной новизне и практической значимости безусловно **соответствует** требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к подобной работе. Кроме того, работа соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, оформлена согласно положениям №5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а ее автор, **Васильева Ирина Дмитриевна**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – Органическая химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

ведущий научный сотрудник

кафедры аналитической химии

Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Родин Игорь Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 495 939-44-16, e-mail: igorrodin@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 3, ГСП-1,

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет,

кафедра аналитической химии