

Отзыв

на автореферат диссертации Васильевой Ирины Дмитриевны
«Метод масс-спектрометрического установления первичной структуры интактных пептидов
амфибий семейства *Ranidae*»,
представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.3 – органическая химия.

Известно, что пептиды, входящие в состав кожных секретов амфибий, являются частью иммунной системы этих организмов и обладают большим набором защитных функций, включая антибактериальные и противовирусные свойства. Более того, в случае, например, лягушек, кожные секреты являются их основной, если не единственной защитой от патогенных микроорганизмов. Основным компонентом кожных секретов амфибий являются наборы пептидов, которые могут являться природной альтернативой антибактериальным препаратам в противодействии резистентным штаммам бактерий. Таким образом, секвенирование и исследование биологических свойств пептидов кожных секретов амфибий представляет не только серьезный научный, но и практический интерес. В этих исследованиях, тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения в сочетании с ионизацией биомолекул на основе электрораспыления или МАЛДИ, позволяющие установить первичную структуру пептидов и белков, является основным методом анализа. Однако, сложность и разнообразие пептидов амфибий, необходимость секвенирования их аминокислотных последовательностей *de novo* в силу отсутствия геномных данных, наличие изомерных форм аминокислотных остатков, влияющих на их биологические свойства, требуют развития новых подходов к установлению их структуры. Также, серьезных методических решений требует также анализ и интерпретация получаемых тандемных масс-спектров. Таким образом, сформулированные в диссертационной работе Васильевой И.Д. актуальность и цели исследования, а также его научная и практическая значимости не вызывают сомнения.

Описание экспериментальной части работы в автореферате содержит всю необходимую информацию об объектах исследований и используемых методах. Основная часть исследований посвящена тестированию нескольких комбинированных методов тандемной масс-спектрометрии для секвенирования пептидов кожных секретов ранидных амфибий. Задачей этого цикла исследований было выяснение их возможностей для выяснения частей последовательностей пептидов, «спрятанных» внутри дисульфидных S-S мостиков, образуемых между боковыми группами цистеинов. Для решения этой проблемы, диссертантом было предложено использовать гибридный метод EThcD, представляющий из себя двухкратную фрагментацию прекурсорного иона пептида двумя комплементарными методами. Сначала идет фрагментация на основе диссоциативной передачи электрона (ДПЭ), характеризующаяся образованием ионов фрагментов *z*- и *c*- типов. При этом, как правило, глубина фрагментации в методе ДПЭ невысокая и значительная часть прекурсорных ионов остается нефрагментированной. Эти ионы подвергаются фрагментации, активированной столкновениями. Таким образом, метод позволяет получать масс-спектры фрагментации, в которых представлены практически все возможные типы ионов фрагментов. Более того, в работе было показано, что если использовать ступенчатое изменение энергии столкновений в методе EThcD, то удастся надежно получать характеристические ионы фрагментов, связанных с изомерами аминокислотных остатков, в частности, лейцина (L) и изолейцина (I). Различение этих изомеров в последовательностях пептидов является одной из наиболее сложных задач в масс-спектрометрии. Так, на рис.4 и 5 в автореферате показаны примеры решения этой задачи. Еще одной довольно интересной темой исследований в рамках

диссертационной работы, был анализ возможностей существующей программной реализации *de novo* секвенирования пептидов на основе масс-спектров фрагментации PEAKS Studio. Основные результаты диссертационной работы были изложены в 3 публикациях в высокорейтинговых журналах, индексируемых международными наукометрическими системами Web of Science и Scopus.

В качестве недостатков в автореферате следует отметить ряд терминологических и стилистических неточностей. Диссертант в автореферате довольно вольно обращается с описанием методов протеомного анализа «сверху вниз» и «снизу вверх». Эти термины довольно прочно устоялись за подходами к идентификации белков на основе тандемной масс-спектрометрии и геномных баз данных с использованием или без использования предварительного гидролиза белков. Подходы автора, описанные в работе, являются классическими подходами *de novo* секвенирования пептидов. Фраза «показана эффективность продления времени хроматографирования и сбора спектров в режиме зависимых сканирований с временно отложенным сканированием интенсивных ионов (DDA)...» (стр.7) крайне неточна терминологически (если DDA здесь – это data dependent acquisition), а влияние длительности градиента хроматографического разделения на эффективность этого метода хорошо известно. Далее, на стр.15 дается описание довольно сложных экспериментов для выяснения, какой из аминокислотных остатков, пролина или глутаминовой кислоты, находится в третьей позиции в последовательности пептида Темпорин AVa. Разве разница масс пролина и глутаминовой кислоты не более чем достаточно уникальна, чтобы это выяснить просто на основе точной массы пептида (при условии, что остальные участки последовательности были ранее определены)? В целом, отмеченные недостатки автореферата носят, скорее, рекомендательный характер и не снижают высокой оценки полученных результатов.

Представленные в автореферате материалы позволяют сделать вывод о том, что диссертационная работа «Метод масс-спектрометрического установления первичной структуры интактных пептидов амфибий семейства *Ranidae*» полностью соответствует всем требованиям и отвечает критериям, установленным в п.п. 2.1 – 2.5 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Васильева Ирина Дмитриевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 – органическая химия

Горшков Михаил Владимирович, к.ф.м.н., к.т.н.
Руководитель ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе
ФИЦ ХФ РАН,
119334, г. Москва, Ленинский пр. 38, корп.2,
email: mike.gorshkov@gmail.com, тел.: +7(499)137-8257

(Горшков М.В.)

«20» ноября 2022 г.

Подпись Горшкова М.В. заверяю:

Начальник Отдела кадров
ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН

(Кутырина Г.В.)