

## Отзыв официального оппонента

Пенькова Никиты Викторовича на диссертационную работу **Можаевой Веры Александровны** «Методы спектроскопии комбинационного рассеяния света для идентификации белковых токсинов», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19. Лазерная физика

### Актуальность темы

Диссертация Можаева В.А. посвящена спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) белковых токсинов, а также цельных ядов змей.

Компоненты яда – токсины – интересны уникальными эффектами, которые они оказывают на организм млекопитающих, поэтому рассматриваются как многообещающие кандидаты на роль лекарств.

Определение структур токсинов, за счет которых реализуется их биологическое действие, дает возможность реализации последующего искусственного синтеза молекулы подобной структуры, а также может помочь в раскрытии механизмов действия токсинов. Высокая избирательность к цели (например, конкретному рецептору) и скорость взаимодействия многих токсинов делает их также полезными инструментами в биологии. Наиболее популярные методы анализа белковых структур, такие как рентгеноструктурный анализ и ЯМР, трудоемки и времязатратны, а также требуют наличия относительно большого количества образца. Анализ структур белковых токсинов альтернативными надёжными, быстрыми и экономичными методами **актуален**, как с точки зрения фундаментальной науки, так и прикладной, в частности, в связи с задачей разработки новых лекарственных препаратов.

Важной задачей также является валидация структур искусственно-синтезированных аналогов токсинов. Отсюда следует актуальность разработки подходов для анализа структур природных и искусственных токсинов.

Задача же определения составов змеиных ядов и их вариаций связана с разработкой и выбором противоядия для жертв укусов и крайне **актуальна**. Змеиные укусы все еще являются причиной множества смертей. Доступность компактных рамановских спектрометров делает возможным проведение полевых исследований (вне оснащенной лаборатории), что важно для работы в странах Южной Азии, где смертность от укусов змей высока.

Для изучения состава ядов в настоящее время используются методы, основанные на хроматографии и масс-спектрометрии, которые требуют применения сложного оборудования. Спектроскопия КР может послужить дополнением к этим методам.

Дополнительное применение используемых в машинном обучении математических методов обработки данных помогает упростить, ускорить и оптимизировать получение полезной информации об образцах из спектров КР.

Таким образом, в данной работе автором была поставлена следующая основная **цель**: разработка метода анализа белковых токсинов животных и ядов змей на основе спектроскопии КР.

### **Содержание диссертации**

Диссертационная работа содержит Введение, 5 Глав и Заключение. Материал изложен на 106 страницах, включает 35 рисунков и 11 таблиц, а также Список литературы, состоящий из 131 источника.

Во **Введении** содержатся общие сведения по тематике диссертационного исследования, актуальности и степени разработанности темы; сказано о целях и задачах исследования, а также о научной новизне; подчеркивается теоретическая и практическая значимость работы. Кроме того, кратко описана методология исследования; обозначены положения, выносимые на защиту. Также обозначена степень достоверности результатов и представлена их апробация.

В **Главе 1 «Обзор литературы»** рассмотрены наиболее важные с точки зрения темы диссертации литературные данные, касающиеся прикладных и теоретических аспектов метода спектроскопии КР применительно к исследованию белковых молекул. Проведено сравнение этого метода с альтернативными методами, а также описан ряд математических методов обработки спектральных данных. Также подробно рассмотрены некоторые животные токсины и яды, и примеры их анализа методом спектроскопии КР. В данной главе обосновывается применимость и большой потенциал метода КР для решения ряда токсикологических задач.

В **Главе 2** описана методика, основанная на спектроскопии КР и методе главных компонент (МГК), классификации и анализа белковых токсинов животных, включая их синтетические аналоги и дисульфидные изомеры.

В **Главе 3** описывается применение спектроскопии КР для классификации, с помощью МГК и методов кластеризации, ядов различных видов змей из семейств Elapidae и Viperidae.

Далее в **Главе 4** демонстрируется применение спектроскопия КР к изучению более тонких – внутривидовых – вариаций ядов змей: проанализированы яды вида *Vipera nikolskii* из разных популяций, проживающих в двух районах на расстоянии 300 км друг от друга. Кроме того, проведено сравнение внутривидовых вариаций ядов с межвидовыми относительно родственных видов змей.

В заключительной **Главе 5** проведено сравнение рекомбинантной, произведенной *E. coli*, версии подобного трехпетельным токсинам белка SLURP-1 – rSLURP-1 с синтетической версией sSLURP-1, полученной методом пептидного синтеза.

В **Заключении** сформулированы основные выводы диссертации:

1. Разработана методика структурного анализа белковых и пептидных токсинов животных на основе КР спектроскопии.
2. Разработана методика анализа цельных змеиных ядов на основе КР спектроскопии.
3. Впервые продемонстрировано, что КР спектроскопия в сочетании с МГК и кластеризацией может успешно применяться как для выявления структурных сходств и различий между белковыми (пептидными) токсинами животных, включая их синтетические аналоги, так и для классификации цельных ядов змей, отражающей состав ядов.
4. Показано, что на основе разработанной методики можно различать дисульфидные изомеры одного и того же пептидного токсина, а также фиксировать тонкие структурные различия близких по аминокислотной последовательности токсинов и им подобных белков.
5. Показано, что обработка КР спектров образцов ядов змей различных видов, с помощью метода анализа дискриминантных функций (DFA), совмещенного с МГК, корректно разделяет образцы на две группы, соответствующие семействам змей Viperidae и Elapidae.
6. Продемонстрированы и оценены внутривидовые (меж- и внутрипопуляционные) различия в составе ядов и проведено сравнение этих различий с межвидовыми.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций,** сформулированных в диссертации, обеспечивается и подтверждается использованием современного признанного в мире спектрометрического оборудования, корректностью применения экспериментальных методик и методов обработки спектральных данных;

анализом широкого круга литературных источников и содержащихся в них теоретических, методических и экспериментальных данных по рассматриваемой тематике; а также апробацией результатов диссертации.

**Научная новизна** работы заключается в получении и анализе новых спектров КР конотоксинов и некоторых других токсинов животных; также впервые предложена методика, основанная на спектроскопии КР (совмещенной с методами главных компонент и кластеризации), классификации белковых и пептидных токсинов животных в соответствии с их структурными особенностями. Кроме того, впервые продемонстрирована возможность различения дисульфидных изомеров токсинов с помощью спектроскопии КР, а также сравнения структур схожих токсинов и белков, подобных токсинам.

Также впервые были получены и проанализированы спектры КР цельных ядов различных видов змей и предложена методика анализа и классификации змеиных ядов в соответствии с составом. На основе предложенной методики впервые проведен анализ ядов отдельных особей гадюки Никольского.

Таким образом, **новизна научных положений, выводов и рекомендаций**, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

### **Практическая и теоретическая ценность работы**

Можно говорить о предложенном в работе методе как об инструменте крайне экономичного экспресс-анализа токсинов с целью выявления структурно-схожих и потенциально наиболее перспективных кандидатов на роль лекарств. В то же время, продемонстрированная способность метода различать конфигурации дисульфидных связей позволит обеспечить синтез определённого конформационного изомера токсина. Продemonстрированная возможность видеть тонкие структурные различия токсинов должна быть полезна при изучении влияния на их структуры аминокислотных замен, вносимых, в частности, при разработке лекарственных препаратов.

Анализ составов ядов змей может быть полезен, в первую очередь, при разработке эффективных противоядий.

Помимо практической значимости, описанная методика может быть востребована в эволюционной биологии и биологической систематике.

**Достоверность** полученных результатов (выводов), научных положений и рекомендаций обеспечивается за счет использования современной общепризнанной приборной базы, качественной постановки экспериментов и продуманных подходов анализа данных.

Дополнительно достоверность подтверждена публикацией материалов исследования в научных журналах высокого уровня и докладами на всероссийских и международных конференциях. Материалы диссертации достаточно полно опубликованы в работах автора. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы Web of Science и Scopus.

Несмотря на общую высокую оценку, работа не лишена недостатков, в связи с чем можно сформулировать следующие вопросы и замечания.

### **Замечания**

1. Стр. 4. «Рамановская спектроскопия (РС) ... относительно простая и удобная, и в то же время крайне информативная методика...» Здесь некорректное определение. РС – это метод, а не методика. Между этими двумя терминами большая разница.
2. Стр. 6. «Интересны также вопросы о том, насколько спектр многокомпонентной смеси соответствует сумме спектров компонент; возникает ли резонансное взаимодействие излучения с определенными компонентами разнородной смеси.» Не корректно написано, так как резонансный эффект может возникать между колебательными модами одной и той же молекулярной группы, а не между разными молекулами.
3. Стр. 9. «Если образцы предоставлялись в виде растворов, то их высушивали на воздухе.» Достаточно ли высушивать на воздухе? Контролировалось ли наличие гидратной воды и оценка степени гидратации?
4. Стр. 13 «РС способна анализировать аминокислотную последовательность и восстанавливать 3Д структуру белков». Завышенные ожидания. Не то ни другое данный метод не способен сделать в полной мере.
5. На стр. 13 указано, что спектр белка может быть примерно представлен как суперпозиция спектров аминокислот, плюс некоторая добавка слабых внутримолекулярных взаимодействий. Однако существенная часть спектра белка (иногда основная по интегральной интенсивности) определяется колебаниями пептидных связей, выражающихся в трёх амидных полосах. А эти связи являются ковалентными. Хотя далее

в главе 2 имеются более корректные формулировки на этот счёт, здесь они не вполне верны.

6. Разделы 2.1.2, 3.1.2, 4.1.2 называются «Сбор данных». Всё же в спектроскопической терминологии лучше было бы использовать «измерение спектров».

7. стр. 45, 48 Для выравнивания аминокислотных последовательностей использовался биоинформатический сервис ClustalO. При этом не объясняется, что такое выравнивание, как, хотя бы в принципе, работает указанный сервис.

8. В названии раздела 2.2.5 триптофановый дуплет перепутан с тирозиновым дуплетом.

9. В разделах 2.2.5 утверждается, что лиофилизированный белок имеет ту же степень гидрофильно/гидрофобного соотношения окружения тирозина, как и белок в растворе. Откуда в лиофилизате гидрофильное окружение? Аналогичный вывод для сухого белка в разделе 5.2 (стр. 88), по-видимому, некорректен.

10. На рисунке 3.2 визуальное ядро кенийской мамбы может быть отнесён как к синему, так и голубому кластеру. Автор справедливо пишет, что этот ядро отдалён от остальных ядер голубого кластера, однако он отнесён именно к нему. По какому численному критерию был сделан такой выбор? Тот же вопрос про ядро ромбического гремучника, который визуальное мог бы относиться к красному кластеру, но был сделан выбор в пользу жёлтого.

11. В таблице 3.2 образцы разделены на две группы: обучающие и тестовые. Как осуществлялся этот выбор, абсолютно ли случайно? Пробовали провести тот же анализ при другом выборе?

12. Стр. 77 положение пика нерегулярных структур белка искалось в двух диапазонах 1661–1667 см<sup>-1</sup> или 1678–1689 см<sup>-1</sup>. Первый диапазон более классический. Зачем второй? Если пик может быть в любом из них, почему он не может быть между ними? Как выбирался один из этих диапазонов в каждом конкретном случае?

13. На стр. 82 сказано, что «... корреляции между составом яда и полом змеи обнаружено не было.», а насколько сильно состав ядов может зависеть от возраста змеи?

14. Неоднократно оценивается соотношение трёх основных вторичных структур в белках: альфа, бета и неупорядоченных. Погрешности не указываются. Я понимаю, что достичь высокой точности этих параметров никогда не удаётся, и обычно сравнение делают на уровне средних. Но хотя бы приблизительно, какова погрешность определения вклада этих структур?

15. Не совсем понятен смысл заключительной фразы на стр. 93: «Также перспективной кажется попытка обнаружения и анализа с помощью РС змеиного яда в определенных средах, приближенным к биотканям жертвы укуса, для имитации проб, получаемых на практике от пострадавших от укуса змеи.» Если взять ткань человека, то там белков по массе будет на порядки больше, чем в змеином яде.

16. В основе работы лежит спектроскопия КР. При этом не показан исходный спектр хотя бы одного образца. На рисунках даны только предобработанные спектры. С методической точки зрения было бы интересно увидеть, как меняется типичный «сырой спектр» в результате предобработки.

17. Спектральное разрешение указано только в главе 4 на стр. 77, но оно не указано в главах 2 и 3, хотя это один из важнейших спектральных параметров.

18. Было бы лучше унифицировать единицы измерения:  $\text{см}^{-1}$ . В тексте диссертации везде используется  $\text{см}^{-1}$ , а на рисунках в подписях оси рамановского сдвига –  $1/\text{см}$ . В автореферате на рисунках используются оба обозначения.

19. Неоднократно вместо аббревиатуры МГК используется ошибочная МКГ.

20. Имеются немногочисленные опечатки.

Тем не менее, перечисленные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

### **Заключение**

Работа выполнена на достаточно высоком научном уровне, автор демонстрирует владение сложными современными экспериментальными методиками, а также методами математической обработки данных.

Нужно подчеркнуть актуальность, новизну и практическую ценность диссертационного исследования.

Работа написано хорошим языком и снабжена информативными иллюстрациями; материал изложен доступно и подробно.


Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Можаяевой В.А. несомненно соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (ред. от 25 января 2024 г.), а ее автор Можаяева Вера Александровна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19. Лазерная физика.

**Официальный оппонент**

Ведущий научный сотрудник,

руководитель лаборатории методов оптико-спектрального анализа Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», д.ф.-м.н.

16.05.2024 

Пеньков Никита Викторович

Согласен на обработку персональных данных.

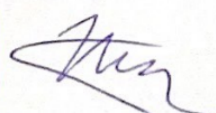
Почтовый адрес места работы: Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д.3

Телефон: +7 905 549 83 98

E-mail: nvpenkov@rambler.ru

Познис Пенькова  
Ученый секретари



Докторовича утврверю.  
 (Шавкунов К.С.)

16.05.2024 г.