

Отзыв официального оппонента

Ширшина Евгения Александровича 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 Можаевой В.А. посвящена разработке метода на основе спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) (или рамановской спектроскопии) анализа таких веществ белковой природы, как токсины животных, а также яды змей. Эта работа актуальна, в частности, в рамках задач медицинской оптики и биотехнологии.

Определение структур токсинов животных, которые крайне разнообразны и, зачастую, сложны, может быть крайне полезным для реализации отбора перспективных веществ на роль лекарств, так как токсины вообще интересны оказывающими на организмы эффектами. Создание библиотек структур различных токсинов послужит для выявления характерных структурных мотивов и, таким образом, поможет в раскрытии механизмов действия этих белковых молекул и реализации искусственного синтеза аналогов токсинов. Дополнительная задача, возникающая при синтезе аналогов токсинов, – валидация их структур на соответствие природной конформации.

Существующие альтернативные методы структурного анализа белков (например, ядерный магнитный резонанс) сложнее в реализации, в частности, из-за большего потребления анализируемого вещества.

Учитывая большое количество образцов токсинов и их аналогов, анализируемое при скрининге (в частности, нацеленном на разработку лекарств), **крайне актуальна** (как с прикладной точки зрения, так и для фундаментальной науки) задача разработки дополнительных методов анализа структур белковых токсинов, в частности, на основе спектроскопии КР, которая может рассматриваться как крайне экономичный метод.

Анализ составов ядов змей, представляющих собой сложную смесь токсинов, может быть полезен, в первую очередь, при разработке эффективных противоядий и оценке вариаций змеиных ядов. Знание сходства и различия составов ядов различных змей важно при выборе противоядия для жертв укусов. Смертность от укусов змей в ряде регионов мира до сих пор высока, поэтому задача анализа ядов змей **крайне актуальна**. Разработка новых подходов для такого анализа на основе КР света перспективна, в том числе, в связи с возможностью реализации подобных спектроскопических исследований в полевых условиях.

Кроме того, существует биотехнологическая и криминалистическая задача определения вида змеи или места ее обитания (места отлова) путем анализа состава яда в связи с проблемой нелегальной перевозки и торговли ядами.

Таким образом, **актуальна** разработка новых методик на базе спектроскопии КР, в дополнение (или как альтернатива) к существующим методам, которые основаны на хромато-масс-спектрометрии и требуют сложного лабораторного оборудования и пробоподготовки.

Из вышесказанного вытекают основные **цели** диссертации, которые были поставлены автором:

- разработка метода структурного анализа белковых и пептидных токсинов животных на основе спектроскопии КР;
- разработка метода анализа и оценки состава цельных змеиных ядов на основе спектроскопии КР.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Можаевой В.А. содержит Введение, 5 Глав и Заключение. Работа изложена на 106 страницах, содержит 35 рисунков и 11 таблиц, а также Список литературы из 131 источника.

Во **Введении** изложена мотивация работы и подробно обсуждается ее актуальность; обозначены степень разработанности темы исследования, цели и задачи исследования, его новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Кратко описаны методология и методы исследования. Представлены положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов. Также обозначены личное участие автора, его публикации по теме диссертации и тезисы докладов.

Глава 1 «Обзор литературы» содержит общие сведения о рамановской спектроскопии (КР) применительно к исследованию структур белковых молекул, подробно обсуждаются методические вопросы. Рассмотрены альтернативные методы определения структуры белков. Далее содержатся необходимые сведения о животных токсинах и ядах змей и существующие примеры исследования пептидных и белковых токсинов методом КР. Также рассмотрены элементы теории метода главных компонент (МГК) и примеры его применения для анализа спектров КР.

В **Главе 2** представлен анализ спектров КР ряда токсинов и их классификация с помощью МГК. Подробно описаны образцы пептидов и белков, процесс сбора данных (записи спектров КР) и их обработка. В визуальной и информативной форме представлен результат анализа спектров КР токсинов. Отдельно представлено исследование

спектрального региона вторичной структуры токсинов. Также проведено сравнение спектров КР изомеров конотоксина RgIA.

В Главе 3 описывается классификация и анализ ядов разных видов змей с помощью КР света. Данна информация по образцам ядов и обработке их спектров. Проведены классификация спектров КР ядов посредством МГК и рассмотрение полученных результатов с точки зрения состава ядов. Дополнительно, метод анализа дискриминантных функций применен для разделения спектров КР ядов по семействам змей. Также представлен прямой анализ полос Amide I и S-S спектров образцов.

В Главе 4 уже описанная методика применяется для анализа спектров КР ядов отдельных особей змей. Проведено сравнение внутривидовых вариаций ядов с межвидовыми. Дополнительно проведен анализ полосы Amide I ядов *Vipera nikolskii* двух популяций (и оценка их составов) и фосфолипаз A2, которые являются основными компонентами этих ядов.

В итоговой Главе 5 проведено сравнение спектров КР рекомбинантного и синтетического белка SLURP-1 и представлены их различия.

В Заключении сформулированы следующие выводы работы:

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, 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.

Практическая и теоретическая ценность работы заключается в разработке метода экономичного экспресс-анализа структур токсинов и их сравнения с целью выявления кандидатов на роль лекарственных препаратов и создания полезных для биологической науки библиотек. Метод способен фиксировать тонкие структурные различия токсинов, в том числе, различать конфигурации дисульфидных связей в них, что полезно, в частности, для анализа структур токсинов, полученных синтетически. Спектроскопический анализ ядов змей может быть полезен при разработке и выборе противоядий, а также в связи с проблемой контрабанды ядов змей. Предложенная методика может дополнительно быть востребована в областях эволюционной биологии и систематики.

Научная новизна

В процессе работы впервые получены спектры КР конотоксинов и ряда других белковых токсинов и предложена методика на основе КР света анализа белковых и пептидных токсинов и их тонких структурных особенностей. Далее впервые были получены спектры КР цельных ядов разных видов змей и предложена методика их сравнения (путем классификации) и оценки их составов; впервые был произведен анализ вариаций ядов отдельных особей змей *Vipera nikolskii*. В итоге, **новизна научных положений, выводов и рекомендаций**, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечивается за счет получения спектров КР на заслуживающем доверия рамановском микроскопе-спектрометре корректными экспериментальными методами, подробности которых описаны автором; корректностью выбора и применения математических методов обработки полученных спектральных данных, подробности реализации которых также описаны автором; подробным описанием образцов исследования; опорой на большое количество литературных данных; публикациями по теме диссертации и тезисами докладов автора.

Достоверность полученных результатов (выводов), научных положений и рекомендаций обеспечивается за счет использования качественного оборудования, воспроизводимостью экспериментальных данных и подробным описанием примененных материалов и методов. Достоверность подтверждена также публикацией материалов исследования в 3 статьях в рецензируемых научных журналах высокого уровня и докладами на всероссийских и международных конференциях. Материалы диссертационной работы достаточно полно опубликованы в работах автора.

Замечания

Несмотря на общую высокую оценку работы, нужно сделать некоторые замечания:

1. Автор указывает, что в измеренных спектрах КР присутствовал флуоресцентный, который вычитался с использованием стандартной процедуры. Тем не менее, исходных спектров и примеров вычитания фона в работе не приведено, что следовало бы сделать, поскольку при возбуждении на 532 нм флуоресцентный сигнал может значительно превышать сигнал КР, а процедура его вычитания – влиять на интерпретацию данных.
2. В работе отмечено, что образец в процессе измерения может нагреваться (интенсивность излучения на образце высока). Хотелось бы увидеть характерный вид спектра КР при использовавшихся параметрах регистрации и при большей интенсивности или дозе, чтобы убедиться, что процесс измерения не влиял на состояние образца.
3. В работе ко всем спектрам применяется метод МГК, однако не показано, какую долю вариабельности дают 2-3 компоненты (использовавшиеся далее для кластеризации). Следовало бы привести зависимость невязки от числа главных компонент отдельно для модельных систем (Глава 2) и различных ядов (Главы 3 и 4).
4. В последней главе с помощью спектроскопии КР обнаружено, что два белка, минимально отличающихся между собой по первичной последовательности, обладают при этом значительным отличием конформации (что следует из сравнения их спектров) – хотелось бы, чтобы автор более детально проанализировал этот интересный факт и предложил гипотезу, объясняющую его.

Перечисленные замечания не снижают общей положительной оценки диссертации.

Заключение

Диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, актуальна, в должной мере обладает новизной и практической ценностью. Автор работы имеет достаточную базу, что следует из анализа и опоры на множество литературных источников. Автор владеет экспериментальными методиками, а также крайне уместными методами математической обработки спектральных данных. Автор корректно применяет имеющиеся в литературе данные для решения поставленных ею задач. Отметим эффективность способов достижения поставленных автором целей.

Также следует положительно оценить стиль написания работы, отметить ее информативность, подробное изложение материала и достаточное его снабжение рисунками, графиками и таблицами.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертационного исследования, присутствует необходимая для понимания работы информация.

Диссертационная работа Можаевой В.А. 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 Можаева Вера Александровна несомненно заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19. Лазерная физика.

Официальный оппонент

Доцент кафедры квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
д.ф.-м.н.

20.05.2024

Ширшин Евгений Александрович

Согласен на обработку персональных данных.

Почтовый адрес места работы: 119991, Ленинские горы 1/62

Телефон: 89104571247

E-mail: eshirshin@gmail.com

Подпись Е.А. Ширшина заверяю:

доктор физико-математических наук, профессор, и.о. декана
физического факультета федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»

В.В. Белокуров