

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Толпиной Мириам Давидовны на тему: «Масс-спектрометрическое установление первичной структуры пептидов кожных секретов трех видов амфибий (*de novo* секвенирование)» по специальности 1.4.3 (02.00.03) – «органическая химия»

Диссертационная работа Толпиной М.Д. изложена на 146 страницах текста, содержит 74 рисунка, 17 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения (выводов) и списка цитируемой литературы, включающего 272 наименования.

Актуальность работы, выполненной Толпиной М.Д., не вызывает сомнений и обусловлена важностью исследования структуры биоактивных пептидов из различных организмов, которые потенциально могут быть использованы в качестве антимикробных медицинских препаратов. В качестве объектов исследования были выбраны пептиды из кожных секретов трех ранее не изученных видов амфибий – лягушек *Rana latestei*, *Osteopilus septentrionalis* и *Pelophylax ridibundus*, что вполне обосновано, так как из подобных земноводных уже выделялись пептиды, на основе которых были созданы синтетические лекарства с сильным антибактериальным или анальгетическим эффектом. Работа Толпиной М.Д. посвящена установлению первичной структуры пептидов, секретируемых кожными железами лягушек указанных выше видов методами *de novo* секвенирования. Помимо получения информации о строении секретируемых пептидов, вполне актуальным является и развитие самих подходов для *de novo* секвенирования с использованием методов масс-спектрометрии.

Обзор литературы очень подробно освещает состояние проблемы по теме диссертационной работы. Автором обсуждаются различные методы секвенирования белков и пептидов, включая как классические

биохимические подходы, так и методы масс-спектрометрии, причем критически осмыслены их достоинства, недостатки и ограничения. Также обсуждаются защитные пептиды из различных семейств амфибий, некоторые аспекты их синтеза, биологическая функция и механизмы действия на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Научная новизна диссертационной работы Толпиной М.Д. заключается в том, что автором впервые охарактеризованы пептидные профили кожных секретов амфибий *R. latestei*, *O. septentrionalis* и *P. ridibundus*, причем для последнего вида в исследовании были использованы особи из различных популяций – московской и словенской. Всего были установлены аминокислотные последовательности 64 пептидов, из которых 30 ранее не были описаны в литературе и были внесены автором в белковую базу данных UniProtKB. Важно отметить, что Толпина М.Д. не просто применяла различные виды масс-спектрометрии в качестве основного инструмента исследования, но целенаправленно и максимально использовала возможности хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометров, различающихся способами ионизации, фрагментации ионов и типом анализаторов, что в итоге позволило преодолеть ограничения, налагаемые тем или иным методом. При этом в ряде случаев были использованы методы химической модификации пептидов, а также возможности ручной обработки масс-спектров, что позволило получить дополнительную информацию о строении исследуемых пептидов. В частности, с помощью указанных подходов были установлены последовательности 16 анионных пептидов из двух новых семейств: септенинов 1 и септенинов 2 с зеркально-симметричными N- и C-концевыми последовательностями в кожном секрете *O. septentrionalis*. В работе также было проведено сравнение кожных пептидомов особей *P. ridibundus* из словенской и московской популяций и установлены аминокислотные последовательности шести новых дисульфидсодержащих бревенинов 2 и одного темпорина. Более того, впервые с помощью MS³ эксперимента, включающего дополнительную активацию фрагментации z-

катион-радикалов, проведена идентификация изомерных остатков Leu/Ile в дисульфидных пептидах амфибий из указанных популяций.

Практическая значимость работы Толпиной М.Д. обусловлена тем, что в ней проведена оценка потенциальной биологической (антимикробной) активности для шести новых бревининов 2 и одного темпорина путем построения 2D-карт. Экспериментально показано, что пептиды из кожного секрета *P. ridibundus* оказывают ингибирующее влияние на рост гемолитической патогенной бактерии *Staphylococcus haemolyticus*. К несомненной практической ценности работы стоит также отнести и некоторые методические подходы, разработанные в диссертации, которые могут оказаться полезными для исследователей, занимающихся масс-спектрометрией белков и пептидов.

Таким образом, благодаря разработанному автором системному подходу к *de novo* секвенированию пептидов со сложной структурой, цели, поставленные в диссертационной работе, были успешно достигнуты, и научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обладают несомненной достоверностью и новизной.

Что касается оформления диссертации, то сама она и автореферат написаны ясным и четким языком, в них практически отсутствуют опечатки, что оставляет очень хорошее впечатление. Автореферат и публикации (по теме диссертации опубликовано 6 статей, из которых 5 – в журналах с импакт-фактором выше 2, а также 7 тезисов докладов) в полной мере отражают содержание диссертации.

К диссертационной работе и автореферату имеются некоторые замечания.

1. Один из разделов диссертации посвящен исследованию деградации пептидов из кожных секретов лягушек под действием эндопептидаз. При этом в работе для экстракции пептидов использовали всего лишь один метод – смесь воды с метанолом в равной пропорции, причем показано, что метанол при таком содержании в смеси не предохраняет полностью пептиды от

протеолиза. А не пытался ли автор использовать для предотвращения деградации пептидов ингибиторы эндопептидаз или просто воду (буферный раствор) с pH, отличающимся от нейтрального (близкого к нейтральному)? И вообще, что известно о том, какие эндопептидазы (протеазы в более широком смысле) присутствуют в кожных секретах лягушек? Каков pH-оптимум их действия? И каков был pH раствора в кожных смывах?

2. В работе обнаружены различия в кожных пептидомах *P. ridibundus* из словенской и московской популяций. При этом из чтения диссертации осталось неясным, а были ли различия в пептидомах отдельных особей из одной и той же популяции? И вообще исследовался ли этот вопрос?

3. В таблице 2.3 диссертации и таблице 4 автореферата приведено выравнивание аминокислотных последовательностей бревининов, идентифицированных в кожных секретах особей *P. ridibundus* из словенской и московской популяций, однако не понятно, какие пептиды присутствуют или отсутствуют в той или иной популяции. Вероятно, следовало бы пометить каким-либо образом такие пептиды, что облегчило бы восприятие данных.

4. В таблицах 1 и 4 автореферата некоторые названия пептидов почему-то даны латиницей, тогда как в самой диссертации правильно используются их русскоязычные названия.

Однако в целом диссертация Толпиной М.Д. выполнена на очень высоком научном и методическом уровне, а указанные выше недочеты не влияют на общую положительную оценку работы. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.3 (02.00.03) — «органическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация

оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Толпина Мириам Давидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3 (02.00.03) — «органическая химия».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
кафедры химической энзимологии
химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
Гусаков Александр Васильевич

Контактные данные:

тел.: +7(939)939-59-66, e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.15 - катализ, 03.00.23 - биотехнология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 11
МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет,
кафедра химической энзимологии

Тел.: +7(939)939-59-66, e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru