

ОТЗЫВ

официального оппонента Евстигнеева Максима Павловича

на диссертацию Лавриненко Игоря Андреевича

«Разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Диссертационное исследование Лавриненко И.А. посвящено анализу спектров поглощения некоторых простых и сложных белков на примере трипсина, альбумина, каталазы, гемоглобина и его производных как по апобелковой компоненте, так и по типу связанного с гемовым железом лиганда.

Несмотря на развитие новых методов исследования, молекулярная абсорбционная спектроскопия остается одним из наиболее универсальных, эффективных и доступных методов при анализе как структурных, так и функциональных свойств биомакромолекул. Этой проблеме посвящен ряд обзорных статей, монографий, академических учебных изданий.

Так, в монографии Демченко А.П. (1981) «Ультрафиолетовая спектроскопия и структура белков» рассмотрена природа электронных спектров поглощения белков и их применение для изучения структуры и структурных переходов в белках. Подробно освещена информационная значимость и область применения конформационно-чувствительных вариантов метода — дифференциальной, температурно- и сольвентно-пертурбационной, а также производной спектрофотометрии.

В монографиях Артюхова В.Г. (1995) «Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения», и Артюхов В.Г. и соавт. (2013) «Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов», большое внимание уделяется исследованию закономерностей структурных и функциональных модификаций под действием широкого спектра агентов различной природы как для гемоглобина человека, так и для некоторых других гемсодержащих белков.

Подробно освещены и методологические аспекты исследования УФ-спектров поглощения, в частности, белков и их комплексов (Talsky G. Derivative

Spectrophotometry: Low and Higher Order, 1994, Parson W.W. Modern Optical Spectroscopy, With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry, 2009).

Кроме изучения апобелковой составляющей хромопротеидов, большое значение имеет исследование протетических групп гемопротеидов, что рассмотрено в монографии Kadish K. M. и соавт. («Handbook of porphyrin science: With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine: Heme Proteins», 2010).

Таким образом, к настоящему времени накоплен обширный материал, касающийся исследования структурно-функциональных свойств белков, в т.ч., спектрофотометрическим методом.

Однако, несмотря на большой объем данных, полученных по спектрам поглощения белков, существуют определенные ограничения в системном анализе этих спектров, что связано с различиями в условиях проведения эксперимента, протоколов их регистрации и способов оценки переходов в спектрах светопоглощения биомакромолекул.

Другими словами, незначительные девиации в спектрах поглощения белков при воздействии различных физико-химических агентов могут быть маскированы различием протоколов экспериментов, представленных в опубликованных работах.

Кроме этого, полученные данные, преимущественно, относятся к исследованию спектральных свойств макромолекул в области поглощения боковых групп ароматических аминокислот и свидетельствуют об изменениях в диапазоне длин волн 240–320 нм. Зачастую эти вариации связываются с разворачиванием/сворачиванием белковой глобулы, сопровождающимся экспонированием/экранированием ее хромофорных групп относительно поверхности белковой макромолекулы. Однако такого рода оценка является малоинформативной и не учитывает вклад отдельных компонент, поскольку, как правило, в ультрафиолетовом (и видимом) диапазонах длин волн спектры поглощения белков, в отличие от атомов и простых молекул, характеризуются широкими перекрывающимися полосами, что существенно затрудняет их интерпретацию.

Поэтому актуальность выполненной работы не вызывает сомнений.

Для решения поставленных задач автором работы был использован комплекс методических приемов обработки регистрируемых данных. При этом акцент был

сделан не только на повышение качества регистрируемых спектрофотометром данных (отношение сигнал/шум, спектральное разрешение и т.д.), но и на их последующую математическую обработку. Часть таких приемов, как например NURBS аппроксимация, была использована в новом качестве, а способ разложения интегральных спектров поглощения хромопротеидов вообще является оригинальным, что было достигнуто созданием алгоритма и его математической реализации, опираясь, в том числе, и на существующие методы обработки сложных сигналов, известных своим применением в различных областях физики.

При этом Лавриненко И.А. принимал во внимание то обстоятельство, что решение задачи разложения спектров хромопротеидов потребует разработки такого способа, который мог бы быть универсальным, и в принципе, применимым по своему подходу к решению аналогичных задач, выходящих за рамки спектрального анализа белков.

В ходе работы диссертантом были систематизированы по унифицированному протоколу пики полос поглощения некоторых простых и сложных белков, что нашло свое отражение в разделе «Разрешение полос поглощения в спектрах белков с помощью второй производной» третьей главы и представлено в виде «Диаграммы расположения областей, в которых наблюдаются гомологичные пики вторых производных спектров поглощения белков».

Вполне логично на следующем шаге исследований автор работы предпринял попытку соотнести регистрируемые полосы поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты», что представлено в одноименном разделе текущей главы. Выбор такой схемы анализа вполне целесообразен и аргументирован автором. Естественно, такая аддитивная модель имеет и недостаток, в части соответствия характера микроокружения хромофоров аминокислот в растворе и в составе белковой матрицы.

Однако для решения текущей задачи такой степени приближения модели к нативной системе оказалось вполне достаточным. Кроме того, регистрируемая разница в положении пиков для аддитивной модели и нативного спектра поглощения может быть использована в качестве теста на степень влияния микроокружения хромофоров белка в составе макромолекулы.

В качестве пожелания хотелось бы отметить, чтобы в будущих работах автор подумал над совершенствованием такой модели.

Так как соотнесение пиков в модели и нативном белке было проведено, на мой взгляд, вполне успешно, то это позволяет выяснить особенности формирования пиков поглощения для нативного белка путем разложения и анализа аддитивного спектра до уровня типов хромофоров аминокислот. Это было выполнено в последнем разделе третьей главы.

В ходе анализа спектров поглощения белков диссертантом также рассмотрена возможность по вторым производным спектров поглощения биополимеров оценивать соотношение боковых групп аминокислот в нативной макромолекуле. Однако в качестве замечания следует отметить, что этот подход требует верификации на большем количестве тест-объектов. С другой стороны, в диссертации этот прием является некоторым дополнением и не определяет ход дальнейших исследований.

Следующая глава диссертации посвящена разложению УФ-спектров поглощения хромопротеидов на спектры светопоглощения простетических групп и апобелка с помощью аддитивной модели. В первой части главы предложен и обоснован способ разложения таких спектров на примере гемоглобина. Данный способ разложения оригинален, причем актуальность решения задачи декомпозиции сложных спектров не вызывает сомнений, так как это позволяет решать ряд задач как в области исследования структуры макромолекулы, так и в контексте проблем молекулярной фотобиологии.

В используемом алгоритме автор внес ограничение на спектральную область (240–320 нм) и особенности его применения по количеству типов хромофорных групп. Однако такие ограничения не приводят к критически значимой неадекватности модели и получаемым результатам. Хотелось бы, чтобы в будущем диссертант провел исследования, направленные на оценку степени соответствия модели к нативному белку, в части гипохромизма хромофоров.

Заключительная часть данной главы ориентирована на разложение спектров поглощения гемоглобина и его производных. Полученные модельные спектры поглощения апобелковой и гемовой компонент хорошо координируют между собой и не вступают в противоречие с известными науке данными.

Последняя глава диссертации посвящена анализу спектров поглощения этих компонент с позиции взаимосвязи их спектральных свойств с изменением структуры макромолекулы гембелка при изменении ее конформационного состояния в ходе связывания лигандов комплексообразователем. Эта часть исследований логично завершает диссертационную работу.

Таким образом, полученные в данной работе результаты представляют значительный интерес как с точки зрения методологии исследований, так и с позиции обобщения и систематизации накопленных данных, связанных со спектрофотометрией белков, в части плохо разрешенных переходов боковых групп аминокислот и применительно к водорастворимым глобулярным биополимерам.

Необходимо отметить, что работа не лишена **недостатков**:

1. В работе ничего не сказано о том, как производилось дифференцирование спектра. Судя по всему, эта операция реализовывалась в программном комплексе обработки спектров. Поскольку дифференцирование является ключевой операцией всей работы, важно знать, каким образом это производилось, использовалась ли предварительная фильтрация данных и другие процедуры.
2. Известно, что при получении производных спектров возникают пики-сателлиты на хвостах полос поглощения, отчётливо заметные в спектрах первой производной. Их неустранение может привести к возникновению артефактов в спектрах второй производной. К сожалению, соискатель ничего об этом факте в работе не говорит. Возникает подозрение в том, нет ли ложных пиков в анализе производных спектров, ошибочно принятых за реальные?
3. С моей точки зрения, верификация модельных и реальных спектров второй производной должна была быть обязательно произведена с помощью дифференциального спектрофотометра - с целью подтверждения факта того, что процедура математического дифференцирования не вносит искажения в результат.

Однако, несмотря на замечания, работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком научно-методическом уровне.

Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации и не вызывают замечаний.

Диссертация Лавриненко Игоря Андреевича «Разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм», представляет собой законченное научное исследование.

По своей актуальности, новизне и содержанию работа Лавриненко И.А. полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заведующий кафедрой физики ФГАОУ ВО
«Севастопольский государственный
университет», доктор физ.-мат. наук,
профессор
Адрес: Россия, 299053, г. Севастополь,
ул. Университетская, 33.
Тел.: +7(8692) 435-110
e-mail: max_evstigneev@mail.ru

Евстигнеев М.П.

25.11.2015

Подпись профессора
Евстигнеева М.П.
Проректор по учебной
работе СевГУ



Крамарь В.А.