

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по научной работе

ФГБУН «Институт химической
физики им. Н.Н. Семенова РАН»

доктор физ.-мат. наук

Крупянский Ю.Ф.

«11» ноября 2015 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН» на диссертационную работу Лавриненко Игоря Андреевича «Разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — Биофизика.

Актуальность темы

Диссертационная работа Лавриненко И.А. посвящена исследованию спектров поглощения некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм с привлечением математических методов обработки сложных сигналов.

Доступность спектрофотометрического метода широкому кругу исследователей позволила аккумулировать достаточно большой объем знаний в этом направлении. Однако различия в условиях проведения эксперимента и способов оценки полос поглощения при изучении нативных белков не позволяют корректно оценить диапазон варьирования их максимумов по местоположению и интенсивности, что затрудняет сравнительную оценку полос светопоглощения для биополимеров, сходных по своему аминокислотному составу и структуре, но полученных по различному протоколу эксперимента.

Другой проблемой, связанной с предыдущей, является исследование вклада тех или иных хромофоров белков в суммарное поглощение нативной макромолекулы. Разделение физико-химическими методами молекулы белка на составляющие зачастую приводит к ненадежным результатам исследований вследствие нарушения системы внутримолекулярных взаимодействий. При этом изменения в локальном окружении хромофоров могут повлечь за собой соответствующие изменения их спектральных свойств.

В связи с вышеизложенным, актуальность проведения исследований, направленных на разрешение этих проблем, не вызывает сомнений.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов

Диссертантом с помощью современной программно-аппаратной базы спектрофотометрического метода, оптимизацией измерений, применением математических методов цифровой обработки сигналов и эффективных алгоритмов анализа данных решен ряд задач, связанных с идентификацией полос поглощения в спектрах белков: трипсина, альбумина, каталазы, гемоглобина и его производных, с соотношением этих полос в спектрах поглощения макромолекул к таковым в спектрах аддитивных моделей и их последующей расшифровкой.

В диссертации Лавриненко И.А. разработан способ разложения УФ-спектров поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент на примере гемоглобина и его производных; выполнен сравнительный анализ УФ-спектров поглощения апобелковой составляющей окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина, а также исследованы УФ-спектры поглощения простетических групп этих гемпроизводных.

Таким образом, научная новизна проведенных автором исследований вполне очевидна.

Анализ содержания диссертации

Диссертационная работа Лавриненко И.А. изложена на 217 страницах машинописного текста; состоит из «Введения», 5 глав, «Заключения» и «Выводов». Список литературы представлен 172 источниками, из них 69 отечественных и 103 зарубежных. Иллюстративный материал включает 12 таблиц и 62 рисунка.

В «Обзоре литературы» автор излагает современные представления о структуре, некоторых физико-химических и спектральных свойствах простых белков, апобелковой составляющей сложных белков, а также их структуры, электронных, магнитных и спектральных свойств простетической группы гемопротеидов. При этом отмечены подходы и концепции, лежащие в основе квантово-механических представлений о строении вещества и являющиеся теоретической основой абсорбционной молекулярной спектроскопии электронных переходов. Вследствие ограничений на объем данной главы, иллюстративный материал в ней не приводится, однако, это не затрудняет восприятие материала.

Результаты экспериментальных исследований в диссертации Лавриненко И.А. представлены в главах 2–5.

В 2 главе автор подробно описывает пробоподготовку образцов, получение производных гембелка и коррекцию их спектров поглощения на предмет

присутствия неосновных компонент. Диссертант описывает методические приемы, направленные на повышение качества проводимых измерений спектров поглощения, их последующую цифровую обработку. Эффективность и обоснованность применения того или иного методического приема хорошо проиллюстрирована графически.

Глава 3 посвящена непосредственно разрешению и идентификации перекрывающихся полос поглощения хромофоров белков в диапазоне длин волн 240–320 нм. При этом последовательно решаются следующие задачи: 1) разрешение полос поглощения в спектрах белков с помощью второй производной; 2) соотнесение полос поглощения в спектрах белков к полосам поглощения в спектрах аддитивных моделей и 3) идентификация полос поглощения в спектрах белков путем их сопоставления в системе «аддитивная модель апобелка–свободные аминокислоты».

В 4 главе описан предложенный автором алгоритм разложения УФ-спектров поглощения хромопротеидов на составляющие светопоглощения апобелковой и небелковой компонент. С его помощью выполнено разложение УФ-спектров светопоглощения производных окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина на составляющие поглощения апобелка и протетических групп и определена относительная доля поглощения этих частей макромолекулы в нативном белке.

Глава 5 посвящена анализу УФ-спектров поглощения апобелковой и гемовой компонент некоторых производных гемоглобина в составе макромолекулы. В этой главе проведен сравнительный анализ УФ-спектров поглощения апобелковой составляющей окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина, а также изучены УФ-спектры поглощения протетических групп окси-, карбокси-, дезокси- и метгемоглобина.

Содержание автореферата и выполненных по работе публикаций полностью отражают основные положения диссертации. Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют целям и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Работа хорошо апробирована на нескольких конференциях и обсуждалась на последних съездах биофизиков России.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты систематизируют, расширяют и углубляют современные представления о спектральных свойствах простых и сложных белков на примере трипсина, альбумина, каталазы и гемоглобина.

Результаты работы представляют интерес как для биофизиков, биохимиков, для которых спектральный анализ является одним из основных аналитических методов изучения белков, так и для фотобиологов, исследующих влияние УФ-света на эти биополимеры.

Используемые подходы и способы анализа спектров поглощения белков также могут быть полезны и для специалистов, сталкивающихся с практическими вопросами разрешения сложных сигналов, регистрируемых от многокомпонентных систем в случае плохого разделения их составляющих хроматографическими, электрофоретическими или другими физико-химическими методами исследования.

Результаты исследований и приемы анализа спектров поглощения белков, представленные в диссертации, нашли свое отражение в учебных программах дисциплин спецкурсов, предлагаемых студентам кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета.

Замечания и пожелания

К сожалению, диссертация не свободна от недостатков.

Так, пункт 2.2.11 «Коррекция молярных спектров поглощения производных гемоглобина на присутствие неосновных компонент» перегружен подробностями и мог бы быть представлен более лаконично.

Для наглядности, в работе следовало привести блок-схему цифровой обработки регистрируемых спектров поглощения исследуемых образцов.

Автору также следовало выполнить сравнительный анализ спектров светопоглощения гематопорфирина и нативного гембелка. Это позволило бы более уверенно заявлять о наличии полос поглощения гемовой компоненты в составе гемопротеида в диапазоне длин волн 240–320 нм.

Требует пояснения подобие моделей спектров поглощения карбокси- и метгемоглобина со спектром для HbO_2 и сделанный отсюда вывод о сходном положении железа в плоскости порфиринового кольца.

Заключение

Приведенные выше замечания и пожелания не влияют на качество оценки рецензируемой работы, носят преимущественно рекомендательный характер и могут быть учтены автором при подготовке доклада. Диссертация Лавриненко И.А. «Разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм» является законченной научно-исследовательской работой, в которой осуществлено комплексное и системное исследование спектров поглощения некоторых глобулярных белков. Новизна, методология и результаты работы

