

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Шевченко Валерия Евгеньевича на диссертационную работу Кайшевой Анны Леонидовны на тему: «Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия

В настоящее время при ранней диагностике заболеваний, разработке и коррекции персонифицированных схем лечения в основном используются генетические маркеры. Несмотря на клинически важную информацию, получаемую от них, часто наблюдается несоответствие между геномными, транскриптомными и протеомными данными. Многие геномные аномалии не транскрибируются или не транслируются в белки, а именно белки выполняют клеточные функции и являются терапевтическими мишенями. В частности, показано, что протеомные данные могут предоставить лучшую прогностическую информацию относительно фенотипа опухолей, чем уровни транскриптов. В этой связи активно разрабатываются методы жидкой малоинвазивной биопсии на базе протеомных маркеров биологических жидкостей и внеклеточных частиц. Однако, белковые маркеры присутствуют в биологических образцах в низких и сверхнизких концентрациях (от 10^{-15} М и ниже), что затрудняет их идентификацию и детектирование. Данное обстоятельство определило актуальность исследования Кайшевой А.Л., в котором обосновано и апробировано новое направление «протеомная масс-спектрометрия на чипе». Диссертантом показана высокая чувствительность комбинации масс-спектрометрической детекции с предварительным обогащением и концентрированием исследуемых молекул на функционализированной поверхности чипов атомно-силового микроскопа (АСМ) и нанопроводного биосенсора. Разработанные Кайшевой А.Л. нанотехнологические протеомные подходы позволяют с высокой чувствительностью выявлять маркеры патологических состояний организма.

Подготовленная диссертация свидетельствует об успешном достижении поставленной цели и решении всех задач, связанных с разработкой, характеристикой и сравнительной оценкой новых биоаналитических подходов.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка литературы (341 источник). Работа изложена на 241 странице, содержит 43 рисунка и 27 таблиц.

Во вводной части диссертации обосновывается актуальность исследования, дается общая оценка полученных результатов. Обзор литературы достаточно подробно рассматривает разнообразные протеомные аналитические системы для высокочувствительной детекции белков, их возможности и ограничения. Описываются особенности решения задач, связанных с выявлением молекулярных маркеров заболеваний при ультранизких концентрациях в образцах крови пациентов. Особое внимание отводится масс-спектрометрическим методам идентификации белков, подготовке образцов. С учетом решаемых в работе задач дается характеристика постаналитического этапа обработки масс-спектрометрических результатов с учетом объемов и информативности получаемых при этих измерениях данных.

В целом литературный обзор отражает полноту владения диссертантом информацией о современных исследованиях по тематике работы, формирует доказательную базу для выбора наиболее эффективных экспериментальных методов, оценки получаемых результатов.

В главе «Материалы и методы» представлены: приборное и реагентное обеспечение проведенных исследований, дизайн АСМ-чипов, а также разработанные диссертантом методики получения гидролизата белков на поверхности чипа, функционализированной молекулярными зондами и методики подготовки клинических образцов для анализа. Диссертантом подробно описываются параметры масс-спектрометрических методов, используемых для проведения исследований, и методы обработки полученных

результатов по идентификации белковых компонентов. Разработанный Кайшевой А.Л. уникальный метод протеомной масс-спектрометрии на чипе обеспечивает детектирование сверхнизких концентраций протеомных маркеров заболеваний и возможность анализа биоселективных взаимодействий. Методы исследования подробно изложены в диссертации, позволяя однозначно интерпретировать полученные в работе результаты.

Материалы глав 3-7, посвященных описанию полученных результатов и их обсуждению отражают успешное решение всех поставленных задач. Кайшевой А.Л. дано теоретическое обоснование чувствительности для масс-спектрометрической детекции белков на поверхности чипов, которое было подтверждено результатами экспериментальных измерений. Диссертантом впервые показано, что применение АСМ-чипов, локально модифицированных с помощью моноклональных антител и аптамеров, увеличивает чувствительность протеомной масс-спектрометрии на два порядка. Для решения поставленных задач разработаны и обсуждены оригинальные схемы концентрирования детектируемых белковых молекул на поверхности АСМ-чипов и нанопроволочного биосенсора. Сопоставлены возможности различных вариантов специфического и неспецифического фишинга. Представлены результаты исследований по функциональной активности ферментов, иммобилизованных на поверхности различных биосенсоров. Дополнительно показана эффективность разработанных подходов для обнаружения клинически значимых белковых маркеров заболеваний в сыворотке/плазме крови пациентов.

Проведенные эксперименты корректно спланированы и реализованы. Выводы на основании полученных результатов подтверждены статистическим анализом и однозначно сформулированы. Таким образом, достоверность выносимых на защиту положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнения.

Диссертационная работа Кайшевой А.Л. оригинальна, описывает полученные автором новые результаты, значимые для развития протеомной масс-спектрометрии.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы.

1. По литературному обзору: с учетом специфики данного исследования, в Таблице 1 не приводятся данные по чувствительности иммуно-масс-спектрометрии (iLC-MS/MS); отсутствует хотя бы краткий анализ динамического диапазона концентраций белков в других перспективных биожидкостях организма человека; при обзоре методов удаления высокопредставленных белков не проведен сравнительный анализ MARS-14 и Proteominer, в то время как последний в ряде случаев имеет ряд преимуществ, например, в опытах *in vitro* при работе с клеточными лизатами или при анализе других биожидкостей кроме сыворотки/плазмы крови; приборы для мультиплексного анализа (Luminex, Bioplex) позволяют количественно определять не 40, а 100 белков в одном образце; при рассмотрении масс-спектрометрической визуализации остались без внимания важные методы DART и SIMS.
2. По материалам и методам: отсутствуют данные по параметрам АСМ визуализации или ссылки на публикации; каким способом формировались сенсорные зоны (ручным или роботизированным)?; как обеспечивалась точность позиционирования АСМ-зонда при сканировании заданной зоны?; какой тип биоспецифического фишинга использовался (обратимый или необратимый)?; осуществлялся ли контроль попадания посторонних микрочастиц в растворы?; проводился ли дополнительный анализ чистоты не коммерческих препаратов белков методом протеомной ВЭЖХ?; оценивалась ли автором доля реакционноспособных антител и аптомеров на подложке АСМ-чипа.
3. По результатам и обсуждению: какие результаты визуализации ($h_{\max}$) были получены при унифицировании условий гидролиза белков разного молекулярного веса на поверхности двух типов АСМ-чипа после

химического фишинга?; не для всех полученных данных приведены величины стандартного отклонения для измерений.

Вышеизложенные замечания носят частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы.

Основные положения и выводы диссертационной работы в полной мере отражены в 42 опубликованных работах, в том числе в 30 статьях (включая 9 статей первого квартиля и 11 статей второго квартиля) и 9 материалах российских и международных научных конференций, 1 монографии, 1 главы в книге. Получен патент РФ на изобретения.

Автореферат информативно отражает проведенное исследование, представляя его содержание, результаты и выводы. Диссертационная работа в полной мере соответствует специальности — биохимия.

Диссертация Кайшевой А.Л. является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня, в полной степени удовлетворяющей требованиям к докторским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов. Соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области биохимии - разработан комплекс методов на основе протеомной масс-спектрометрии и различных функционализированных биосенсорах, позволяющих регистрировать белки в растворах с ультранизкими концентрациями и выявлять биомаркеры патологических состояний организма.

Диссертационная работа Анны Леонидовны Кайшевой «Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа» полностью отвечает всем требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 г. с последующими изменениями в редакции от 11

сентября 2021 г. №1539, а ее автор, Кайшева А.Л., достоин присуждения
искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 –
биохимия.

Доктор биологических наук, профессор, главный научный
консультант лаборатории онкопротеомики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

Шевченко Валерий Евгеньевич  /Шевченко В.Е./

10 октября 2022 г.

Подпись Шевченко В.Е. заверяю

Ученый секретарь

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

кандидат биологических наук  /Гудкова М.В./

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Адрес: 115478, г. Москва, Каширское шоссе д.23

Телефон: +7(499)324-24-24

Электронная почта: info@ronc.ru

М.П.

«10» октября 2022 г.