

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Лариной Ирины Михайловны на диссертационную работу Кайшевой Анны Леонидовны «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».

Актуальность темы диссертации. Диссертация Анны Леонидовны посвящена разработке метода АСМ-фишинга в комбинации с масс-спектрометрией в качестве подхода для подтверждения и верификации результатов измерений, выполненных с использованием молекулярных детекторов.

Развитие протеомики в пост-геномную эру закономерно сталкивается с запросом на создание новых высокочувствительных аналитических систем, которые могут позволить детектировать сверх-низкие концентрации белков в образце и, тем самым, выявлять потенциальные маркеры заболеваний на самой ранней стадии. Развитие нанотехнологических подходов, в этой связи, является не только модным, но многообещающим, т.к. ориентировано на использование сенсорных элементов, соразмерных изучаемым биологическим субстанциям и поверхностям, обладающих особыми свойствами на наноразмерном уровне. И если развитие методологии подхода для обнаружения белков с применением комбинации фишинга и атомно-силового микроскопа (АСМ-фишинг) происходит достаточно успешно на протяжении последней декады, то проблема идентификации выявленных в данном методе белков остается острой. В работе Кайшевой А.Л. масс-спектрометрия выбрана как основополагающий метод для верификации результатов АСМ-фишинга. МС-анализ обладает требуемыми точностью, селективностью и производительностью для подтверждения находок в анализе молекулярных объектов с поверхностями чипов для нанотехнологических устройств различного типа.

С практической точки зрения, развитие методического задела в этой области крайне важно с учетом приоритета научного развития России – развития персонализированной медицины, высокотехнологичного здравоохранения и технологий здоровьесбережения.

Научная новизна и практическая значимость исследований.

Представленная к защите работа продолжает цикл научных работ по молекулярному фишингу, выполняемых более полутора десятков лет на базе Института биомедицинской химии Российской академии наук под руководством академика Арчакова А.И.

Кайшевой А.Л. впервые отработан подход, позволяющий верифицировать, с помощью масс-спектрометрической идентификации пептидных фрагментов белков, результаты АСМ-фишинга. Автор диссертационной работы показала, что функционализированные химически и биоспецифически чипы для атомно-силового микроскопа позволяют концентрировать целевые белки из значительного объема образца в количестве, улавливаемом масс-спектрометром для идентификации этих белков. Автором установлено, что такая функционализация поверхности чипов позволяет концентрировать целевые белки из большого объема (около и свыше 1 мл) на небольшой площади от 400 мкм² до 1 см² в количестве, достаточном для масс-спектрометрического анализа.

Процедуры подготовки образцов для последующей масс-спектрометрической идентификации белков отработаны и апробированы на нескольких типах чипов. Впервые показано, что при использовании чипов с локально функционализированной поверхностью (антитела или аптамеры) возможно повышение концентрационной чувствительности масс-спектрометрического метода на два порядка по сравнению с измерениями в растворе. Показана эффективность концентрирования целевых белков на специально подготовленных поверхностях. При этом концентрационная чувствительность масс-спектрометрических детекторов (времяпролетный, ионная ловушка, тройной квадруполь, орбитальная ионная ловушка) повышалась до концентраций 10⁻⁶ - 10⁻¹⁵ М.

Также предложено использование многопараметрического чипа небольшой площади (до 1 см²) для идентификации нескольких целевых белков.

На примере использования чипов с ровными поверхностями для нанопроволочного биосенсора, оптического детектора и атомно-силового микроскопа показано, что разработанная методика сопряжения является универсальной и может быть использована для разных типов поверхностей.

Общие сведения о диссертации. Представленная диссертационная работа изложена на 241 странице машинописного текста формата А4, и включает 27

таблицы, 43 рисунка. Диссертация построена традиционно и состоит из введения, 7 глав основного текста, включая описания методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов и списка литературы из 341 источника. Обзор литературы по теме работы подробно изложен в первой главе диссертации, во второй главе описываются материалы и методы. В главах с третьей по седьмую скрупулезно излагаются и обсуждаются полученные результаты.

В разделе «Введение» автором отражена высокая актуальность избранной темы исследования. В разделе сформулированы цель и задачи работы, указаны основные положения, выдвигаемые на защиту, подчеркивается научная новизна и практическая значимость исследования. В этом разделе описан личный вклад соискателя, приводятся данные о публикациях и научных докладах, апробации работы.

Содержание диссертационной работы. В первой главе диссертации приведен обзор современной литературы по направлению исследования. Автором проведен детальный анализ проблем практического применения современных протеомных аналитических методов, возможные причины ограничения их концентрационной чувствительности и применяемые способы преодоления этих ограничений. Описаны современные подходы концентрирования целевых белков, основанных на особенности взаимодействия макромолекул с поверхностями большой площади (микроразмерные частицы) и плоской ограниченной площади (чипы для биосенсорных устройств). Описаны требования и принципы создания поверхностей, обладающих химическим или биоспецифическим сродством к биомолекулам различной природы. Представлены данные о современном научном заделе зарубежных и отечественных научных коллективов в области сочетания биосенсорных устройств и масс-спектрометрических детекторов для выявления белков, определены пределы концентрационной чувствительности. Необходимо отметить, что несмотря на разнообразие затрагиваемых тем, каждый подраздел достаточно полно и подробно суммирует основные наработки в каждой области и определяет проблемы при их развитии.

Во второй главе диссертации приведено описание материалов, объектов исследования, а также методов, которые автор разрабатывает в диссертации. Описаны методы получения гидролизата белков на функционализированных поверхностях чипов для атомно-силового микроскопа, методики масс-спектрометрической

регистрации белков в растворе и образцах биологического происхождения, протоколы идентификации биологических молекул.

Третья глава работы посвящена расчетному обоснованию возможности применения подхода комбинации атомно-силового микроскопа и масс-спектрометра (АСМ/МС подход) в детектировании белков. Представлены экспериментальные результаты, подтверждающие эффект концентрирования различающихся по физическим и химическим свойствам белковых молекул на поверхностях чипов из исследуемых растворов с концентрацией белков в широком диапазоне концентраций, составляющих девять порядков вплоть до 10^{-15} моль/л.

В четвертой главе рассматриваются пути разработки методик предварительной подготовки чипов атомно-силового микроскопа различной конфигурации для последующей идентификации с применением трех типов масс-спектрометрических детекторов. Последнее представляется исключительно важным для подтверждения надежности работы АСМ/МС подхода. В главе подробно описаны и проанализированы как выбор оптимального состава смеси для гидролиза, так и условий проведения процедуры трипсинолиза, а также - элюции триптических смесей с поверхностей чипов.

В пятой главе отражены результаты определения аналитической чувствительности АСМ/МС - подхода с применением трех вариантов концентрирования, включая неспецифическую сорбцию молекул белков на поверхность чипов, неспецифическое ковалентное связывания белков с функционализированной химическими агентами поверхностями и биоспецифическое ковалентное связывание и концентрирование целевых белков с поверхностями, содержащими иммобилизованные молекулярные зонды (моноклональное антитело или аптамеры).

В шестой главе представлены результаты применения АСМ/МС подхода для детектирования вирусных и отдельных клинически значимых белков в исследуемых образцах сыворотки и плазмы крови.

В седьмой главе обсуждаются результаты применения комбинации нанотехнологических устройств и масс-спектрометрических детекторов для анализа сохранения функциональной активности ферментов после иммобилизации на поверхностях чипов. В частности, показаны результаты количественного анализа

продуктов ферментативных реакций для белков семейства цитохромов P450. Эти результаты являются важным заданием для расширения применения АСМ/МС подхода в области кинетики ферментативных реакций. Так, применение разработанных подходов в ранней диагностике социально-значимых заболеваний, когда концентрация целевых молекул в биообразцах характеризуется низкой концентрацией, позволяет оценивать эффективность функционирования ферментативных систем путем регистрации низкомолекулярных продуктов, а также изучать состав макромолекулярных белковых комплексов, формируемых на поверхности чипа.

В разделе «Заключение» соискатель резюмирует полученные результаты интеграции масс-спектрометрии в систему биологического анализа с применением нанотехнологических устройств и фишинга. Диссертант определяет перспективы дальнейших исследований и области применения разработок по данному направлению. Как отмечается автором, одной из таких перспектив является дальнейшее повышение концентрационной чувствительности масс-спектрометрического анализа с использованием функционализированных атомарно-ровных поверхностей представляется путем создания технологии прямого масс-спектрометрического измерения исследуемых белков непосредственно с поверхности чипа.

Достоверность научных результатов, степень обоснованности выводов и рекомендаций. Выводы диссертации, а также основные положения, выносимые на защиту, в достаточной степени обоснованы полученными автором результатами проведенных исследований.

Результаты работы важны для практического использования в сфере биомедицинских технологий. Разработка новых аналитических систем востребована в практической медицине для выявления патологических процессов на ранних стадиях развития, когда потенциальные молекулярные маркеры патологического процесса присутствуют в биологических жидкостях организма человека в низких и сверх-низких концентрациях.

Следует отметить, что результаты диссертации А.Л. Кайшевой отражены в 42 публикациях, в том числе в 30 статьях (6 – в российских и 24 – в международных периодических научных изданиях), 9 тезисах российских и международных научных

конференций, а также монографии, главе в книге и патенте. Индекс Хирша соискателя ученой степени составляет 13 по данным системы Scopus.

Диссертационная работа написана хорошим литературным языком, изложение логично построено и содержит небольшое количество опечаток, выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных вычислительных и экспериментальных подходов. Содержание и оформление диссертации и автореферата полностью отвечают требованиям ВАК.

Общее впечатление от работы. Большой объем исследований и надежность примененных методов обеспечивают достоверность и значимость полученных результатов. Выводы диссертации являются хорошо осмысленными и обоснованными. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации, характеризуют результаты проведенных исследований, открывают перспективы как дальнейших изысканий теоретического плана, так и их практического применения. Большое уважение вызывает величина и качество личного вклада автора в разрабатываемую тему. Полученные автором результаты вносят существенный вклад в развитие методов протеомного анализа биологических образцов и, несомненно, будут востребованы работающими в этой области исследовательскими коллективами.

Замечания и вопросы по работе. Замечаний по работе нет. Однако хотелось бы получить разъяснение автора по вопросу выбора «модельных белков» для отработки метода АСМ-фишинга с последующим МС-анализом. Логично было бы отобрать белки, в норме не присутствующие в плазме крови и появляющиеся в ней как маркеры развития патологического процесса. Какими критериями руководствовался автор при отборе модельных объектов в данном разделе?

Заключение

Диссертационная работа Кайшевой Анны Леонидовны «Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа» является законченной научно-квалифицированной работой, выполненной на актуальную тему, в ходе которой получены новые научно-обоснованные решения, внедрение которых имеет научное и практическое значение для биомедицинских наук. По своей научной

новизне, актуальности, объёму выполненных работ, научной и практической значимости диссертация полностью соответствует всем требованиям п 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с последующими изменениями в редакции от 11 сентября 2021 г. №1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Кайшева Анна Леонидовна, заслуживает присуждение искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Доктор медицинских наук, профессор, ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, заведующая лабораторией протеомики



Ларина Ирина
Михайловна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук
123007, г. Москва, Хорошёвское шоссе, д. 76 А
Телефон: +7 (495) 1956528
e-mail: irina.larina@gmail.com

Подпись д.м.н., профессора И.М. Лариной заверяю

Ученый секретарь, доктор биологических наук,
ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук



Левинских Маргарита
Александровна

20 октября 2022