



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

На № _____ от _____

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
доктор биологических наук,
академик РАН
Георгиева София Георгиевна



«24» октября 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук о научно-практической ценности диссертации Кайшевой Анны Леонидовны на тему «Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Актуальность темы исследования

За последние десятилетия был накоплен большой объем знаний о молекулярных основах биохимических процессов в живых системах. Соответственно, постоянно развиваются и совершенствуются методы молекулярной диагностики, основанные на анализе данных, полученных в результате детекции и оценки количественного содержания белковых и ДНК-маркеров, вариация содержания которых может коррелировать с протеканием того или иного патологического процесса. При этом, необходимость определения профилей

множеств молекулярных маркеров, включая таких, которые присутствуют в биологических образцах в мизерных количествах или вообще еще не выявлены существующими методами, постоянно повышает уровень требований к развитию все более высокочувствительных таргетно-специфичных методов молекулярного анализа.

Поэтому тема диссертации А.Л. Кайшевой, посвященная объединению и развитию методов высокоспецифичной адсорбции целевых молекул на функционализированных поверхностях и масс-спектрометрии, и направленная на повышение эффективности идентификации и количественного анализа социально-значимых диагностических маркеров, является весьма актуальной, поскольку ориентирована на решение задач, имеющих большое научное и прикладное значение для биологии и медицины.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна работы не вызывает сомнений и подтверждается 41-й публикацией основного содержания диссертации автора, включая статьи в рецензируемых зарубежных (24) и отечественных (6) научных журналах высокого рейтинга. Интеллектуальная собственность, полученная в ходе работы над диссертацией, закреплена в патенте РФ.

В частности, к новым направлениям исследований относятся развиваемые в диссертации А.Л. Кайшевой работы по совмещению процедуры измерений с помощью масс-спектрометрии с процедурой концентрирования исследуемых биообъектов, специфично связывающихся на специальных поверхностях с иммобилизованными зондовыми молекулами – так называемыми «молекулярными детекторами», применяемыми, в том числе, в атомной силовой микроскопии. Выполненные в этом направлении исследования позволили автору продемонстрировать продуктивность применения такого нового подхода к решению проблем повышения чувствительности и специфичности идентификации маркеров, присутствующих в биологических образцах в низких концентрациях, например – низкокопийных белков.

Среди новых и наглядно проиллюстрированных результатов следует также отметить представленную в диссертации зависимость фактора концентрирования белковых маркеров от их концентрации в анализируемом образце, рассчитанную автором теоретически и подтвержденную экспериментально.

Уникальность выполненного исследования безусловно характеризуется и большим объемом экспериментальных процедур, включая разработку новых оригинальных методик подготовки образцов, использование различных таргетно-активированных поверхностей, а

также применение значительного арсенала новейшего масс-спектрометрического оборудования как зарубежного, так и отечественного производства.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Результаты исследования А.Л. Кайшевой имеют большую научно-практическую значимость. Так, продемонстрированная возможность идентификации биомакромолекул на поверхности, функционализированной с помощью неспецифических реагентов, может быть использована для решения как научных, так и практических задач инвентаризации белкового состава образцов различного происхождения. Масс-спектрометрический анализ состава иммунокомплексов, сформированных на поверхностях, функционализированных с помощью молекулярных зондов, может применяться для выявления биомедицински значимых белков или белок-содержащих комплексов, которые присутствуют в низких концентрациях, но представляют интерес в качестве кандидатных маркеров различных заболеваний. Аналогичный методический подход может применяться для определения белков-партнеров исследуемых белковых мишеней при составлении профилей белок-белковых взаимодействий.

Масс-спектрометрическая идентификация биомакромолекул ферментов, сконцентрированных на поверхности, а также низкомолекулярных продуктов их ферментативной активности может применяться в биотехнологии для сравнительного анализа эффективности функционирования молекул, иммобилизованных различными способами.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается 41-й публикацией основного содержания диссертации автора, включая статьи в рецензируемых зарубежных (24) и отечественных (6) научных журналах высокого рейтинга, а также выдачей патента РФ на интеллектуальную собственность, полученную в ходе работы над диссертацией.

В работе использованы наиболее востребованные в современном биоанализе типы детекторов, привлечен внушительный парк масс-спектрометрического оборудования. Дизайн экспериментов тщательно продуман, предусмотрены необходимые контроли, технические и биологические повторы. Получен значительный объем расчетных и экспериментальных данных, который должным образом обработан, в том числе, и с помощью статистических методов. Полученные результаты убедительно иллюстрированы с помощью графиков и таблиц.

Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы в научных коллективах

Результаты работы востребованы в исследованиях, ориентированных на создание высокочувствительных биоаналитических систем, предназначенных для решения задач обнаружения низкокопийных белков, а также для анализа белок-белковых взаимодействий. Подобные работы проводятся, например, в институтах РАН (ИБХ РАН, ИМБ РАН, ФИЦ ХФ РАН). В долгосрочной перспективе, полученные результаты могут быть интегрированы в масштабные клинические медицинские исследования в части поиска новых биомаркеров заболеваний, а также для выявления изменений молекулярного профиля, сопровождающих генез и развитие патологических процессов в организме человека.

Следует подчеркнуть, что результаты работы будут полезны и в междисциплинарных исследованиях, проводимых на стыке биологических, химических, физических и медицинских наук. Оригинальная комбинация методов анализа, предложенная в работе Кайшевой А.Л., может быть также использована и при подготовке специалистов в организациях высшего специального образования. При этом полученные результаты могут рассматриваться в качестве демонстрации возможностей достижения синергетического эффекта при интеграции научно-исследовательских методов.

Общая оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа А.Л. Кайшевой построена в соответствии с традиционными принципами и включает: введение, обзор литературы по направлению исследования, главу по материалам и методам, пять глав, излагающих результаты собственного исследования, заключение и выводы, список сокращений и условных обозначений, а также библиографию, насчитывающую 341 источник. Работа изложена на 241 странице машинописного текста, включает 27 таблиц и 43 рисунка.

Во введении обосновывается актуальность исследования, формулируются цели и задачи диссертационной работы. Определяется научная новизна, практическая значимость, основные положения диссертации, выносимые на защиту, обозначается теоретическая и практическая значимость работы, личный вклад автора в проводимом исследовании, сообщается о публикациях полученных результатов.

В обзоре литературы, представленном в первой главе диссертационной работы, подробно и основательно анализируются достижения современных отечественных и зарубежных научных групп по направлению исследования – высокочувствительному протеомному анализу. Обзор отражает текущее развитие чиповых технологий для детектирования белков в биологических

образцах, а также характеризует диапазоны концентраций, в которых эффективны существующие решения. Обозначены проблемы анализа белковых молекул в сложных по составу биологических образцах, в первую очередь крови, для которой концентрационный диапазон содержания различных белков превышает десять порядков. Описаны основные методы масс-спектрометрического анализа.

Каждый раздел литературного обзора обосновывает необходимость решения задач, поставленных в диссертационной работе. Осуществлен выбор методик экспериментальной работы с применением масс-спектрометрического анализа, обоснована необходимость разработки специализированной подготовки образцов, подбора условий протеолиза, состава смесей для гидролиза и элюирования пептидов с функционализированных поверхностей.

Во второй главе диссертации «Материалы и методы» тщательно описано оборудование, реагенты и биологические объекты исследований. Особое внимание уделено многообразию использованных в работе функционализированных поверхностей: приведены и кратко охарактеризованы принципы и типы концентрирования (фишинга) как неспецифического, так и специфического. Описаны молекулярные зонды, необходимые для обеспечения специфичности анализа, приведены физико-химические характеристики чипов и сенсорных зон, а также материалов, из которых изготовлены чипы для атомно-силового микроскопа. Подробно описаны методики получения гидролизата белков на функционализированных поверхностях чипов для АСМ, методики масс-спектрометрической регистрации белков в модельных растворах и образцах биологического происхождения, протоколы процедур для идентификации биологических молекул.

Третья глава посвящена теоретическому и экспериментальному обоснованию возможностей реализации МС/АСМ подхода для интеграции масс-спектрометрического метода в систему высокочувствительных анализов, проводимых с применением молекулярных детекторов. Так, выполненное в диссертации расчетное обоснование возможностей применения развиваемого подхода для детекции белков (зависимость фактора концентрирования белковых маркеров от их концентрации в анализируемом образце) получило соответствующее подтверждение в проведенных автором экспериментах по обнаружению и анализу белков, в том числе различающихся по физико-химическим свойствам, при измерениях в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-15} М.

Четвертая глава посвящена разработке методик для масс-спектрометрического анализа в АСМ/МС формате. В частности, разработана процедура гидролиза белков на поверхности чипов для последующего масспектрального анализа.

Пятая глава диссертации посвящена методикам повышения чувствительности

обнаружения белков в модельных буферных растворах с помощью МС с применением трех вариантов их концентрирования на поверхности чипов, в том числе сорбция белков на нефункционализированную поверхность, ковалентное связывание белков с функционализированной химическими агентами поверхностью (химический фишинг) и биоспецифическое связывание белков с поверхностью, содержащей иммобилизованные молекулярные зонды (биоспецифический фишинг). Границы пределов чувствительности были оценены для различных типов поверхностей и масс-спектрометрических детекторов.

В шестой главе продемонстрирована применимость предложенного подхода для обнаружения биомаркеров в образцах биологического происхождения. Показана возможность идентификации антигена вирусного гепатита С на функционализированной поверхности после инкубации в сыворотке крови пациентов. При этом обработка данных масс-спектрометрического анализа проводилась с учетом аддуктов белка и ионов, присутствующих в биологических образцах, что существенно повышает достоверность результатов анализа.

В седьмой главе представлены экспериментальные результаты, демонстрирующие возможности масс-спектрометрического анализа при исследовании ферментных систем, расположенных на функционализированных поверхностях. Показана возможность сохранения функциональных свойств ферментов и возможность идентификации продукта каталитической реакции. В том числе, представлены результаты количественного анализа продуктов ферментативных реакций для белков семейства цитохромов P450.

В разделе «Заключение» автором обобщены сведения, изложенные в предыдущих разделах диссертационной работы, и проведен анализ полученных результатов.

Замечания по содержанию диссертации

На фоне достаточно высокой оценки результатов работы А.Л. Кайшевой, нельзя не высказать несколько замечаний:

1. Поскольку существенная часть диссертационной работы посвящена решению проблем повышения чувствительности и специфичности идентификации молекулярных маркеров, присутствующих в биологических образцах в низких концентрациях, то непосвященному читателю было бы интересно ознакомиться с возможностями развитого подхода непосредственно из зависимостей концентраций в контрольных образцах, измеряемых методом МС/АСМ, от реальных концентраций, задаваемых экспериментатором. Такого типа отложения в двойных логарифмических координатах могли бы быть представлены в некотором диапазоне концентраций с указанием ошибок измерений. К сожалению, графиков именно такого типа зависимостей не приводится, несмотря на то, что соответствующие экспериментальные данные

имеются в диссертации в достаточном количестве.

2. На гистограммах на Рис.4 автореферата, а также на Рис.17 и Рис.26 диссертации не указаны ошибки измерений.

3. В таблице 18 диссертации и таблице 2 автореферата приводятся значения площадей хроматографических пиков с точностью до 5-го или даже 6-го знаков, хотя рядом приводятся значения ошибок измерений, из которых следует, что реальные значения измерены с точностью до 2-го – 3-го знака.

Указанные выше замечания имеют преимущественно дискуссионный характер и не снижают ценности представленной диссертации.

В целом, диссертационная работа А.Л. Кайшевой прекрасно оформлена и изложена, имеет внутреннее единство и демонстрирует эффективный вклад автора в развиваемое им научное направление. Работа является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы А.Л. Кайшевой открывают новые методические возможности молекулярно-биологических и биомедицинских исследований, а также практических приложений в биологии и медицине.

Заключение

Диссертация Кайшевой Анны Леонидовны «Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является самостоятельно выполненной, оформленной, законченной научно-квалификационной работой, посвященной созданию и развитию нового комбинированного подхода к анализу низкокопийных молекулярных маркеров на основе метода масс-спектрометрии с привлечением процедуры селективно-специфичной адсорбции маркеров на модифицированных поверхностях биочипов. В результате исследования убедительно показана эффективность применения предложенного подхода для решения задач в биологических и медицинских науках. Достигнута цель работы - осуществлена интеграция масс-спектрометрии и системы молекулярных зондов (молекулярных детекторов) на поверхности биочипа для высокочувствительного анализа биоинформативных молекулярных маркеров.

Таким образом, диссертация Кайшевой Анны Леонидовны является научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 №1168 с изменениями от 20.03.2021

№426), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Отзыв подготовил доктор физ.-мат. наук, профессор А.С. Заседателев.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании межлабораторного коллоквиума Лаборатории биологических микрочипов, Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений и Лаборатории нуклеотид-модифицированных нуклеиновых кислот Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), протокол заседания № 1 от 28 сентября 2022 г.

Главный научный сотрудник ИМБ РАН,
доктор физико-математических наук, профессор
Александр Сергеевич Заседателев



А.С. Заседателев

Подпись Заседателева Александра Сергеевича удостоверяю

Ученый секретарь кандидат ветеринарных наук Бочаров Александр Анатольевич



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Телефон: 8(499)135-23-11,

Электронная почта: isinfo@eimb.ru