

**Заключение диссертационного совета 24.1.172.01, созданного на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича», по диссертации на соискание ученой степени
доктора наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 17 ноября 2022 г. № 7

О присуждении Кайшевой Анне Леонидовне, гражданке РФ, учёной степени доктора биологических наук.

Диссертация «Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4.– «биохимия», принята к защите 07 июля 2022 г., протокол № 2, диссертационным советом 24.1.172.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения (ФГБНУ) «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, созданного Приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г. с внесением изменений Приказом Минобрнауки России № 1162/нк от 12 октября 2022 г.

Соискатель Кайшева Анна Леонидовна, 1983 года рождения.

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Масс-спектрометрическая идентификация белков и белковых комплексов на чипах атомно-силового микроскопа» по специальности 03.01.04 — биохимия, защитила в 2010 году в диссертационном совете, созданном на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». В 2018 году удостоена премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники для молодых ученых.

Работает старшим научным сотрудником, руководителем группы биобанкинга Научно-практического образовательного центра (обособленное

подразделение) ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Диссертация выполнена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научные консультанты – доктор биологических наук Плешакова Татьяна Олеговна, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и доктор биологических наук Пономаренко Елена Александровна, главный научный сотрудник лаборатории анализа постгеномных данных, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Официальные оппоненты:

1. Шевченко Валерий Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение (ФГБУ) "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, главный научный консультант;
2. Ларина Ирина Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (ФГБУН) Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ИМБП), ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией протеомики;
3. Вирюс Эдуард Даниэлевич, доктор химических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП»), ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, гор. Москва, в своём положительном заключении, подписанном Заседателевым Александром Сергеевичем, доктором физико-математических наук, профессором, главным

научным сотрудником лаборатории биологических микрочипов, указала на некоторые замечания. Так, в работе не приведены данные, позволяющие оценить соотношение концентрации анализируемого раствора и концентрации целевого белка в растворе, передаваемом на МС-анализ. Эти данные хотелось бы представить в виде графиков, которые отразят реализуемые концепции.

На гистограммах на рис. 4 автореферата, а также на рис. 17 и 26 диссертации не указаны ошибки измерений; в табл. 18 диссертации и табл. 2 автореферата приведены значения площадей хроматографических пиков с точностью до 5-го - 6-го знака, хотя из приведенных рядом значений ошибок измерений следует, что реальные значения измерены с точностью до 2-го – 3-го знака. Однако указанные замечания имеют преимущественно дискуссионный характер и не снижают ценности представленной диссертации.

Соискатель имеет 84 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 42 работы, опубликованных в рецензируемых научных изданиях – 30, а также 1 главу в книге, 1 монографию и 1 патент.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Kaysheva A.L., Isaeva A.I., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Valueva A.A., Ershova M.O., Ivanova I.A., Ziborov V.S., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Ryabtsev S.V., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Detection of circulating serum microrna/protein complexes in ASD using functionalized chips for an atomic force microscope // *Molecules*. 2021. V.26(19). P.1-19. DOI: 10.3390/molecules26195979 (ИФ 4,4, печ. листы 1,49).

В статье предложен подход для идентификации белков в составе нуклео-белковых комплексов методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС). Соискатель провел МАЛДИ-МС анализ белковых компонентов, сконцентрированных на подготовленных поверхностях для атомно-силового микроскопа, и участвовал в подготовке текста публикации.

2. Kaysheva A.L., Frantsuzov P.A., Kopylov A.T., Pleshakova T.O., Stepanov A.A., Malsagova K.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Mass spectrometric identification

of proteins enhanced by the atomic force microscopy immobilization surface // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22 (1). P.1-13. DOI: 10.3390/ijms22010431 (ИФ 5,9, печ. листы 1,02)

В статье предложен подход для высокочувствительного обнаружения белков, сконцентрированных на специально подготовленных поверхностях для атомно-силового микроскопа. Соискателем выполнены расчетное обоснование эффекта концентрирования белковых молекул из инкубационного раствора на специально подготовленные чипы для атомно-силового микроскопа; экспериментальные работы в части масс-спектрометрического анализа и обработки полученных результатов измерений. Соискатель также участвовал в подготовке текста публикации.

3. Кайшева А.Л., Копылов А.Т., Кушлинский Н.Е. и соавт. Сравнительный анализ протеома плазмы крови больных почечно-клеточным раком // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2019. – Т.167(1). – С.99-104 (ИФ=0,8, печ. листы 0,66).

В статье предложен подход сравнительного анализа состава белков в образцах плазмы крови больных почечно-клеточным раком и здоровых участников исследования с применением масс-спектрометрического детектора сверхвысокого разрешения с хроматографическим разделением (ВЭЖХ-МС/МС). Соискателем выполнен анализ результатов масс-спектрометрических измерений для групп сравнения с применением трех протеомных поисковых алгоритмов: OMSSA, Mascot и X!Tandem и подготовлен текст публикации.

4. Kopylov A.T., Stepanov A.A., Malsagova K.A., Soni D., Kushlinsky N.E., Enikeev D.V., Potoldykova N.V., Lisitsa A.V., Kaysheva A.L. Revelation of proteomic indicators for colorectal cancer in initial stages of development // Molecules. 2020. V.25(3). P.1-20. DOI: 10.3390/molecules25030619 (ИФ 4,4, печ. листы 2,03)

В работе выполнен сравнительный протеомный анализ образцов плазмы крови пациентов с диагнозом колоректальный рак и здоровых участников исследования. В результате анализа были выявлены белки, специфичные

образцам крови пациентов с колоректальным раком, а также их вероятные посттрансляционные модификации. Соискателем спланирован дизайн исследования, выполнен анализ результатов экспериментальных измерений, в том числе выявлены посттрансляционные модификации белков, специфичные образцам крови, полученных от пациентов с диагнозом колоректальный рак. Соискатель также участвовал в подготовке текста публикации.

5. Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Kiseleva O.I., Teryaev, N.B., Potapov A.A., Izotov A.A., Morozov S.G., Kudryavtseva V.Y., Archakov A.I. Relative Abundance of Proteins in Blood Plasma Samples from Patients with Chronic Cerebral Ischemia // *Journal of Molecular Neuroscience*. 2018. V.64(3). P.440-448. DOI: 10.1007/s12031-018-1040-3 (ИФ 3,4, печ. листы 0,70)

С помощью масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения проведен сравнительный анализ белкового профиля образцов плазмы крови пациентов с диагнозом ишемия и здоровых участников исследования. В результате анализа была выявлена группа из 44 белков, специфичных для образцов плазмы крови пациентов, которые участвуют в процессах поддержания гомеостаза, врожденного иммунного ответа, обеспечивают реакцию организма на стресс и участие в свертывании крови. Соискатель спланировал дизайн исследования, выполнил анализ результатов экспериментальных измерений и участвовал в подготовке текста публикации.

6. Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Bayzyanova J.M., Anashkina A.S., Uchaikin V.F., Ziborov V.S., Konev V.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. The detection of hepatitis c virus core antigen using afm chips with immobilized aptamers // *Journal of Virological Methods*. 2018. V.251. P.99-105. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.10.015 (ИФ 2,0, печ. листы 0,94)

В работе показано, что применение аптамеров в качестве молекулярных зондов эффективно для обнаружения HCVcoreAg. Полученная чувствительность подхода АСМ/МС на два порядка предпочтительнее по сравнению с использованием чипов с иммобилизованными моноклональными антителами. Соискателем разработаны и проведены процедуры предварительной

подготовки чипов (слюда), с организованными на поверхности 4 сенсорными и одной контрольной зонами; выполнен масс-спектрометрический анализ белковых объектов на поверхности чипов. Соискатель также участвовал в подготовке текста публикации.

7. Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Bayzyanova J.M., Anashkina A.S., Uchaikin V.F., Shumov I.D., Ziborov V.S., Konev V.A., Archakov A.I., Ivanov Yu.D. Advantages of aptamers as ligands upon protein detection by AFM-based fishing // Analytical Methods. 2017. V.9(42). P.6049-6060. DOI: 10.1039/c7ay01216k (ИФ 2,9, печ. листы 1,38)

Выполнено исследование белков в растворе с низкой концентрацией с применением комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии. Подход основан на обратимом специфическом концентрировании целевого белка из большого объема анализируемого раствора на небольшой по площади сенсорной зоне чипа (слюда) для атомно-силового микроскопа с иммобилизованными аптамерами специфичными кор-антигену вирусного гепатита С. Соискатель спланировал и провел масс-спектрометрическую детекцию белковых объектов на поверхности чипа с применением времяпролетного детектора, оснащенного источником ионизации матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации, участвовал в подготовке текста публикации.

8. Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Tatur V.Y., Ziborov V.S., Kanashenko S.L., Galiullin R.A., Ivanov Y.D. Highly sensitive protein detection by biospecific AFM-based fishing with pulsed electrical stimulation // FEBS Open Bio. 2017. V.7(8). P.1186-1195. DOI: 10.1002/2211-5463.12253 (ИФ 2,2, печ. листы 0,98)

В работе показана возможность высокочувствительного обнаружения белков в растворах концентрацией 10^{-15} М с использованием комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии (метод мониторинга множественных реакций). В исследовании в качестве чипов для атомно-силового микроскопа использовали высокоориентированный пиролитический

графит. Соискатель разработал методики предварительной подготовки чипов (графит), а также спланировал и провел работы по масс-спектрометрическому детектированию белков с поверхности чипов для атомно-силового микроскопа, участвовал в подготовке текста публикации.

9. Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Pleshakova T.O., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Shchetkin A.A., Archakov A.I., Ivanov Y.D. Proteomic analysis of serum proteins of children with autism // *Biotechnologia Aplicada*. 2017. V.34(2). P.2211-2214. (ИФ 0,1, печ. листы 0,60)

В исследовании проведен сравнительный панорамный масс-спектрометрический анализ с использованием масс-спектрометра сверхвысокого разрешения, оснащённого орбитальной ловушкой, образцов сыворотки крови детей с диагнозом расстройства аутистического спектра (РАС). В ходе сравнительного анализа белкового состава образцов сыворотки детей с РАС и здоровых участников исследования была выделена небольшая группа из 15 белков, перспективных для изучения молекулярных основ развития РАС. Соискатель спланировал дизайн эксперимента, провел анализ результатов масс-спектрометрической детекции белков, участвовал в подготовке текста публикации.

10. Kaysheva A.L., Ivanov Y.D., Frantsuzov P.A., Krohin N.V., Pavlova T.I., Uchaikin V.F., Konev V., Kovalev O.B. Ziborov V.S., Archakov A.I. Mass spectrometric detection of the amino acid sequence polymorphism of the hepatitis C virus antigen // *Journal of Virological Methods*. 2016. V.229. P.86-90. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.12.012 (ИФ 2,0, печ. листы 0,51)

В исследовании предложен метод МС идентификации антигена вируса гепатита С (HCVcoreAg) в образцах сыворотки крови человека с учетом возможных аминокислотных замен. В данной работе Соискатель спланировал дизайн эксперимента, разработал методику предварительной подготовки чипов для атомно-силового микроскопа, а также методику масс-спектрометрической детекции. Соискатель выполнил экспериментальные масс-спектрометрические измерения и их анализ и участвовал в подготовке текста публикации.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

В отзыве официального оппонента Шевченко Валерия Евгеньевича, доктора биологических наук, профессора, ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, главного научного консультанта, указано на ряд недостатков в обзоре литературы. Так, в обзоре не приведены данные по чувствительности иммуно-масс-спектрометрии (iLC-MS/MS); не проанализирован динамический диапазон концентраций белков в других перспективных биологических жидкостях организма человека; при рассмотрении методов удаления высокопредставленных белков не проведен сравнительный анализ MARS-14 и Proteominer; при рассмотрении масс-спектрометрической визуализации остались без внимания важные методы DART и SIMS. Также поставлен ряд вопросов по разделам «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение». Однако отмеченные замечания носят частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы, которая является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня.

В отзыве официального оппонента Лариной Ирины Михайловны, доктора медицинских наук, профессора, ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, ведущего научного сотрудника, заведующей лабораторией протеомики, замечаний по работе нет, однако поставлен вопрос относительно критериев, которыми пользовался автор при отборе модельных объектов для отработки метода АСМ-фишинга с последующим МС-анализом.

В отзыве официального оппонента Вирюса Эдуарда Даниэлевича, доктора химических наук, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП»), ведущего научного сотрудника лаборатории регуляции агрегатного состояния крови, замечаний нет.

В положительном отзыве на автореферат Перцова Сергея Сергеевича, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», директора, принципиальных замечаний нет, однако отмечено, что интересно было бы обсудить возможные причины значительного увеличения числа идентифицированных пептидов для биоспецифического фишинга при уменьшении концентрации белка в инкубационном растворе (рисунок 7 автореферата).

В положительном отзыве на автореферат Астрелиной Татьяны Алексеевны, доктора медицинских наук, профессора, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», руководителя Центра биомедицинских и аддитивных технологий, заведующей кафедрой регенеративной медицины, гематологии, молекулярной цитогенетики с курсом педиатрии Медико-биологического университета инноваций, замечаний нет.

В положительном отзыве на автореферат Замятнина Андрея Александровича, доктора биологических наук, доцента ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), директора Института молекулярной медицины, отмечается недостаточная убедительность релевантности представленной в работе технологизации ферментативных процессов на поверхностях чипов для медицинских задач, в частности диагностики-на-чипе; указывается также, что вопрос медицинского применения кандидатных маркеров белковой природы, ассоциированных с развитием различных заболеваний, остается открытым. Однако изложенные критические соображения очевидно неоднократно обсуждались и будут обсуждены в ходе защиты, поэтому не рассматриваются как замечания к автореферату.

В положительном отзыве на автореферат Темердашева Азамата Зауалевича, доктора химических наук, доцента, ФГБОУ ВО «Кубанский

государственный университет», профессора кафедры аналитической химии, имеется ряд замечаний. Так, при описании образцов сыворотки в экспериментальной части работы целесообразнее было бы указывать не средний возраст, а медианный; вместо выражения «калибровочные измерения» имеет смысл использовать выражение «калибровка шкалы масс». Также отмечены некоторые опечатки и неточности. Однако сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают, безусловно, положительное впечатление от представленной работы.

В положительном отзыве на автореферат Пилипенко Павла Ивановича, доктора биологических наук, профессора ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующего кафедрой клинической неврологии и нейрогериатрии, отмечаются небольшие недочеты в работе. Так, диссертанту следовало бы уделить больше внимания описанию практического применения разработанного им подхода, поскольку работа представляет бесспорный интерес для практической медицины и биохимии. Однако высказанное замечание не снижает достоинств диссертационной работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован тем, что доктор биологических наук Шевченко Валерий Евгеньевич, доктор медицинских наук Ларина Ирина Михайловна и доктор химических наук Вирюс Эдуард Даниэлевич являются ведущими специалистами в области протеомики, масс-спектрометрии, масс-спектрометрического профилирования белков и низкомолекулярных органических соединений в биообразцах для обнаружения потенциальных маркеров заболеваний человека, что подтверждается публикациями в ведущих мировых и отечественных рецензируемых журналах.

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук является одним из ведущих центров в области бионанотехнологии и разработки фундаментальных основ молекулярных клеточных технологий, а также геномной и протеомной биоинформатики.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- Впервые предложен подход на основе разработанной системы высокочувствительного определения белков, позволяющий верифицировать результаты анализа, проводимого с помощью атомно-силовой микроскопии с применением АСМ-фишинга, путем масс-спектрометрической идентификации пептидных фрагментов белков;
- Разработаны и апробированы на нескольких типах чипов для АСМ процедуры подготовки поверхностей для последующей идентификации белков;
- Впервые показано, что применение АСМ-чипов, локально модифицированных с помощью моноклональных антител и аптамеров, увеличивает чувствительность протеомной масс-спектрометрии на два порядка;
- Показано, что масс-спектрометрический анализ может быть использован не только для идентификации белков с чипов для АСМ, но и для оценки биологической активности ферментативных систем.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что продемонстрированная возможность идентификации биомакромолекул на поверхности, функционализированной с помощью неспецифических реагентов, может быть использована для решения фундаментальных научных задач инвентаризации белкового состава образцов различного происхождения. Результаты работы будут полезны и в междисциплинарных исследованиях, проводимых на стыке биологических, химических, физических и медицинских исследованиях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что появилась принципиальная возможность изучения и выявления биомедицински значимых белков или белок содержащих комплексов, которые присутствуют в низких концентрациях, но представляют интерес в качестве кандидатных биомаркеров различных заболеваний.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается использованием современного высокоточного и высокочувствительного

аналитического оборудования, грамотным планированием экспериментов с применением достаточного количества технических повторов, контрольных и опытных образцов, соответствующей статистической обработкой результатов экспериментов, а также публикациями по теме диссертации в высокорейтинговых зарубежных и отечественных изданиях и выдачей патента.

Личный вклад соискателя состоит в том, что им выдвинута идея объединения масс-спектрометрии и системы молекулярных детекторов на поверхности биочипов для осуществления высокочувствительного анализа биоинформативных молекулярных маркеров. Спланирована и проведена экспериментальная часть работ, в результате которой разработаны процедуры предварительной подготовки чипов для масс-спектрометрических измерений, проведен масс-спектрометрический анализ белков, сконцентрированных на чипах, с использованием матрично активированной лазерной десорбции/ионизации в комбинации с времяпролетным детектором, а также детектора типа ионная ловушка в режиме сканирования фрагментных ионов в комбинации с системой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведен анализ белкового состава химически и биоспецифически функционализированной поверхности чипов после инкубации в растворах аналита и образцах плазмы и сыворотки крови. Соискателем также выполнен цикл масс-спектрометрических экспериментов по идентификации и оценке функциональных свойств ферментов семейства цитохромов P450, иммобилизованных на поверхности чипов для атомно-силового микроскопа и оптического биосенсора.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

На заседании 17 ноября 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Кайшевой Анне Леонидовне учёную степень доктора биологических наук за разработку нового научно-обоснованного комбинированного подхода к определению низкокопийных молекулярных маркеров, основанного на интеграции технологии масс-спектрометрии в систему молекулярных детекторов, открывающего новое направление повышения чувствительности

анализа молекулярного состава биоматериала и новые возможности для изучения молекулярных основ развития патологических процессов в организме человека, что вносит значительный вклад в развитие отечественной биомедицинской науки в области диагностики состояния здоровья человека.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 10 докторов наук по специальности 1.5.4. – «биохимия», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против - 0, недействительных бюллетеней – 0.

Зам. председателя Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Медведев А.Е.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

17 ноября 2022 года