

**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
кандидата наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 05 октября 2023 г. № 8

О присуждении Вавилову Никите Эдуардовичу, гражданину РФ, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Детекция низкопредставленных белков 18 хромосомы методами таргетной протеомики» по специальности 1.5.4. – «биохимия» принята к защите 18 мая 2023, протокол № 5, 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 № № 561/нк от 03 июня 2021 г. и Приказом Минобрнауки России № 1162/нк от 12 октября 2022 г.

Соискатель Вавилов Никита Эдуардович, 1995 года рождения.

В 2018 году соискатель окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В 2022 году окончил очную аспирантуру по специальности «биохимия» при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». Работает младшим научным сотрудником в лаборатории системной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

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

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор РАН Згода Виктор Гаврилович, заведующий лабораторией системной биологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Официальные оппоненты:

Шевченко Валерий Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор Федерального государственного бюджетного учреждения (ФГБУ) «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт канцерогенеза, главный научный консультант лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей;

Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», заместитель Генерального директора по научной работе, заведующий лабораторией геномной инженерии;

ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (ФГБУН) «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», гор. Москва, в своём положительном заключении, подписанном доктором биологических наук Гмошинским Иваном Всеволодовичем и кандидатом медицинских наук Шипелиным Владимиром Александровичем, отметила отсутствие принципиальных замечаний по содержанию работы и сути полученных результатов. Вместе с тем, указала на ряд замечаний по оформлению диссертационной работы. Так, отмечается различие в формулировках раздела «Положения, выносимые на защиту» в автореферате и самой диссертации; наличие жаргонных

технических терминов, которые не подходят для изложения результатов академического исследования, в частности, «кислые значения рН», «кислые или щелочные условия»; наличие синтаксических ошибок и ряда опечаток. В главе «Материалы и методы исследования» недостаточно подробно описаны характеристики использованных при протеомном анализе стандартных и референтных образцов, а также примененной в качестве модельного объекта клеточной линии; отсутствует описание использованных методов статистической и биоинформатической обработки данных. Однако приведенные замечания не относятся к сути проведенных исследований и не снижают высокую оценку работы в целом.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 6 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 4.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Vavilov Nikita. Number of detected proteins as the function of the sensitivity of proteomic technology in human liver cells. / Vavilov Nikita, Ilgisonis Ekaterina, Lisitsa Andrey, Ponomarenko Elena, Farafonova Tatiana, Tikhonova Olga, Zgoda Victor and Archakov Alexander // Current Protein & Peptide Science – 2022 – V.23 – №4 – P. 290 - 298. Scopus, IF=3,118, 1,0395 условных печатных листа. В публикации показано влияние эффекта матрицы на чувствительность протеомных таргетных методов и способы преодоления ограничений с помощью двумерного фракционирования комплексных гетерогенных клинических образцов печени. Установлено, что технология двумерного фракционирования обладает высокой стабильностью, в том числе позволяет проводить двумерный таргетный анализ белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека. Соискатель принимал участие в планировании эксперимента, выполнял пробоподготовку образцов к МС анализу, обработку результатов и подготовку материалов к публикации.
2. Vavilov, N. E. Deep proteomic dataset of human liver samples obtained by two-dimensional sample fractionation coupled with tandem mass spectrometry. / Vavilov, N. E., Ilgisonis, E. V., Lisitsa, A. V., Ponomarenko, E. A., Farafonova, T.

E., Tikhonova, O. V., Zgoda, V. G., & Archakov, A. I. // *Data in Brief* – 2022 – V.42 – P.1 - 7. Scopus, IF=1,133, 0,8085 условных печатных листа. В статье подробно изложена разработанная методика двумерного фракционирования и масс спектрометрической идентификации белков как с помощью таргетных методов (SRM), так и панорамными методами (Shotgun). Соискатель принимал участие в планировании эксперимента, выполнял пробоподготовку образцов к масс-спектрометрическому анализу, обработку результатов и подготовку материалов к публикации.

3. Vavilov, N. Genome of the Single Human Chromosome 18 as a “Gold Standard” for Its Transcriptome. / Ilgisonis, E., Vavilov, N., Ponomarenko, E., Lisitsa, A., Poverennaya, E., Zgoda, V., Radko, S., & Archakov, A. // *Frontiers in Genetics* – 2021 – V.12 – P.1-7. Scopus, РИНЦ, IF=4,772, 0,8085 условных печатных листа. В этом исследовании определены оптимальные сочетания параметров для надежного анализа транскриптомных данных. Комбинация технологий Illumina RNASeq и Oxford Nanopore MinION позволила обнаружить, по крайней мере, один транскрипт для каждого гена, кодируемого 18 хромосомой человека. Комбинация этих технологий обеспечила полное покрытие всех 275 белок-кодирующих генов 18 хромосомы человека. Соискатель принимал участие в анализе и интерпретации данных.

4. Vavilov, N. E. Proteomic Analysis of Chr 18 Proteins Using 2D Fractionation. / Vavilov, N. E., Zgoda, V. G., Tikhonova, O. V., Farafonova, T. E., Shushkova, N. A., Novikova, S. E., Yarygin, K. N., Radko, S. P., Ilgisonis, E. V., Ponomarenko, E. A., Lisitsa, A. V., & Archakov, A. I. // *Journal of Proteome Research* – 2020 – V.19 - №12 – P.4901–4906. Scopus, РИНЦ, IF=4,466, 0,693 условных печатных листа. В статье приведены результаты исследования протеомного состава клеток HepG2 с использованием комбинации методов панорамной и таргетной масс спектрометрии, а также двумерного фракционирования. Показано, что наиболее чувствительным методом по количеству зарегистрированных белков, кодируемых генами 18 хромосомы,

является двумерный таргетный анализ. Также представлены результаты исследования транскриптома клеток HepG2, которое показало, что сходимость транскриптомных и протеомных данных составляет 50%. Сделаны предположения, что увеличению сходимости может способствовать увеличение чувствительности протеомных методов или анализ только тех транскриптов, которые связаны с рибосомами. Соискатель принимал участие в планировании эксперимента, выполнял пробоподготовку образцов к МС анализу, обработку результатов и подготовку материалов к публикации.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

официального оппонента Шевченко Валерия Евгеньевича, доктора биологических наук, профессора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт канцерогенеза, главного научного консультанта лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей, в котором имеются некоторые замечания и вопросы. Так, в обзоре литературы не приводятся данные по чувствительности и точности метода SRM без изотопной метки; отсутствует также сравнительный анализ чувствительности и точности методов SRM с разным способом введения изотопной метки в пептиды и белки; полезно было бы привести ряд подходящих носителей и соответствующих колонок для ВЭЖХ. В разделе «Материалы и методы» отсутствует описание методики обработки ткани печени, от которой во многом зависит величина покрытия белков. В отзыве спрашивается проверялась ли стабильность эффективности ионизации при анализе протеома большого количества клеточных линий, какова чистота очищенных меченых пептидов; чем объясняется более высокая вариабельность транскриптомных данных по отношению к протеомным. Перечисленные замечания носят частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы;

официального оппонента Лазарева Василия Николаевича, доктора биологических наук, доцента ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», заместителя Генерального директора по научной работе, заведующего лабораторией генной инженерии, принципиальных замечаний нет, однако имеются мелкие замечания. Так, указывается на неудачные формулировки при обозначении источника образцов печени; отсутствие в разделе «Материалы и методы» описания производителя или белкового состава «стандартного объекта UPS1», а также количества клеточного материала (печень, клетки линии HepG2), используемого для выделения белков приведенным в работе методом. Большую информативность материалу подраздела 4.11 придало бы указание на стр. 86 названий белков, а не только их номеров в базе данных. Вместе с тем указанные недочёты никоим образом не умаляют значимости проведенного диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы, результаты которой не вызывают сомнений, а выводы надежно подкреплены экспериментальными данными и являются обоснованными.

В положительном отзыве на автореферат, доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук Сапожникова Александра Михайловича указано на наличие изредка встречающихся опечаток, а также пожелание использования ортогонального метода регистрации белков в дальнейших исследованиях.

В положительном отзыве на автореферат, доктора медицинских наук, старшего научного сотрудника ООО «Вест-тех» Жемчугова Владислава Евгеньевича отмечается пожелание автору диссертации в дальнейшей научной работе провести выделение хотя бы некоторых из обнаруженных 129 белков, кодируемых 18 хромосомой, и изучить их физиологическую роль в клетке.

В положительном отзыве на автореферат кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики Шляпникова Юрия Михайловича имеются некоторые замечания. Так, отмечается, что было бы целесообразно указать более подробные условия, в частности, состав буфера при описании разделения в щелочных условиях; также было бы целесообразно привести результаты регрессионного анализа данных, представленных на рис.12; в выводе 4 (первая строка) пропущено тире. Вместе с тем, эти замечания не умаляют достоинств настоящей работы, а ее значимость, полученные результаты и обоснованность выводов не вызывают сомнений.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован тем, что доктор биологических наук Шевченко Валерий Евгеньевич является крупным специалистом в области масс-спектрометрической протеомики, а доктор биологических наук Лазарев Василий Николаевич является ведущим специалистом в области применения различных омиксных технологий; ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» - один из ведущих научных центров, занимающийся фундаментальными и прикладными разработками, в том числе с применением современных постгеномных методов анализа биологического материала, к которым относится представленная в диссертации технология протеомного анализа.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- впервые выявлены факторы, лимитирующие детекцию низкокопийных белков в биологических образцах;
- впервые предложена и апробирована 2D-SRM-технология (высокочувствительный метод таргетного протеомного анализа) с применением двумерного ВЭЖХ-фракционирования сложных биологических образцов для повышения эффективности метода SRM;

- детально охарактеризованы возможности разработанного метода, показаны его преимущества перед стандартными одномерными методами анализа на примере линии клеток HepG2;
- с помощью разработанного нового метода впервые в клинических образцах печени человека обнаружены и измерены концентрации 129 белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученные результаты представляют большой интерес для исследователей, так как позволяют углубить имеющиеся представления о недостаточной чувствительности существующих протеомных методов при детекции низкопредставленных белков в биологических образцах.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что разработанный диссертантом подход позволяет получать более полную информацию об исследуемом биологическом объекте по сравнению со стандартными методами протеомного анализа и эффективно исследовать сложные биологические объекты, в частности проводить оценку белков-биомаркеров патологического процесса в клинической практике.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается тем, что диссертант использовал методы обработки и оценки данных, соответствующие современным научным критериям, проводил эксперименты с использованием технических повторов, использовал, где необходимо, стандартные охарактеризованные образцы и способы обработки биологических препаратов. Обсуждение результатов проведено с учетом актуальных исследований, опубликованных в области биохимии, протеомики и масс спектрометрии. Основные положения работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях.

Личный вклад соискателя состоит в том, что им проведены поиск и анализ литературы, планирование экспериментов, выполнение пробоподготовки к протеомному анализу, масс-спектрометрического анализа на системах ВЭЖХ/МС: Orbitrap, Triple Quad, и хроматографического анализа

на системе ЖХ/УФ, а также биоинформатический анализ полученных протеомных данных и подготовка результатов работы к публикации.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

На заседании 05 сентября 2023 г. диссертационный совет принял решение присудить Вавилову Никите Эдуардовичу учёную степень кандидата биологических наук за решение вопросов, связанных с разработкой метода детекции и количественной оценки уровня экспрессии белков, которые не могут быть выявлены в пределах чувствительности стандартного таргетного или панорамного масс-спектрометрического анализа, и имеющих значение для диагностики патологических состояний в клинической практике.

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,
академик РАН


Арчаков А.И.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук


Карпова Е.А.

05 октября 2023 года

