



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

04.02.2018 № 110-217.1-97

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»  
ВРИО директора ИБХ РАН,  
академик А.Г. Рабибов

« 4 » февраля 2018 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Кристины Юрьевны Федорченко «Метод неинвазивной диагностики рака легкого, основанный на анализе белкового и пептидного состава конденсата выдыхаемого воздуха человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Респираторные заболевания, включая рак легких и хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), являются одними из ведущих причин смерти среди населения в мире и Российской Федерации. Правильный диагноз рака легких на ранних стадиях и выбор адекватного лечения значительно повышает шансы больных на выздоровление. С учетом этого, диссертация К.Ю. Федорченко, направленная на создание эффективного неинвазивного метода дифференциальной диагностики вышеупомянутых респираторных заболеваний на основе протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) человека несомненно является высокоактуальной. В ходе выполнения работы автору с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа ультравысокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС) удалось создать надежные методические основы для профилирования белков и пептидов в КВВ пациентов и здоровых доноров, а также разработать панель белковых биомаркеров соответствующих патологических состояний. Полученные результаты могут быть использованы в качестве основы для внедрения новых биомаркеров респираторных заболеваний в клиническую практику.

Диссертационная работа, изложенная на 151 странице компьютерного текста, содержит 35 рисунков и 21 таблицу, прекрасно оформлена и написана хорошим литературным языком. Список использованных источников литературы насчитывает 238 наименований. Рукопись построена по стандартному плану, т.е. состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, а также выводов. В дополнительных таблицах, представленных в виде приложения, приведены исчерпывающие данные обо всех белках и пептидах, обнаруженных за время осуществленного исследования.

Во введении автор четко определяет актуальность исследования, формулирует его цели и задачи, положения, выносимые на защиту, подчеркивает научную новизну и практическую значимость проделанной работы, приводит данные о личном вкладе в диссертацию, сделанных публикациях и апробации основных результатов на отечественных и международных конференциях.

Обзор литературы, изложенный на 17 страницах, состоит из двух глав и страдает излишней лаконичностью. В первой главе К.Ю. Федорченко рассматривает современные методы мониторинга состояния респираторной системы человека, при этом не поясняя принципы этих методов, что затрудняет восприятие материала. Например, по мнению автора (стр. 15) «работа дыхания представляет собой площадь под кривой (интеграл) в координатах (объем легких)/давление» - с чем трудно безоговорочно согласиться, если определять это явление единственной приведенной в обзоре фразой. Вторая глава обзора, посвящена КВВ, т.е. непосредственно объекту исследования в данной работе. Рассматриваются известные газовые, липидные и белковые компоненты аэрозоля КВВ, а также особенности и основные результаты его исследования в других лабораториях. В обзоре, на мой взгляд, не хватает обсуждения молекулярных основ патогенеза рака легкого и ХОБЛ, что было бы полезным при выборе панели молекулярных маркеров этих заболеваний и оценке ее адекватности поставленным задачам.. Кроме того в обзоре не хватает критического анализа информативности других современных минимально инвазивных методов детекции циркулирующих биомаркеров крови, слюны и мочи, в том числе, и нуклеиновых кислот. Недостатком обзора также является отсутствие заключения, которое бы направляло читателя к экспериментальной части работы.

Раздел «Материалы и методы» описывает принципы формирования групп пациентов, включенных в исследование, использованные методики забора КВВ и пробоподготовки конденсата для протеомных исследований. Отдельно описываются инструментальные методы анализа белков КВВ, включая хромато-масс-спектрометрию и электрофорез, а также многочисленные биоинформатические методы, использованные при

анализе полученных экспериментальных данных. В этом разделе обращает на себя внимание отсутствие статистической обработки сравниваемых групп по возрасту. В частности, в контрольную группу (таблица 1) были включены индивидуумы от 29 до 45 лет, тогда как возраст пациентов с раком легкого находился в пределах 32-81 года. Не исключено, что эти группы по возрасту статистически различаются и тогда их сравнение между собой было бы не совсем корректно.

Итоги большой высококвалифицированной работы, выполненной на современном уровне, представлены в основной части диссертации – разделе «Результаты и обсуждение». Поскольку белки и пептиды в КВВ присутствуют в следовых количествах, в начале работы автор уделяет самое пристальное внимание отработке методов пробоподготовки, которые бы минимизировали потери анализируемых аминокислотных последовательностей и делали результаты воспроизводимыми. Было четко продемонстрировано, что наиболее эффективным методом концентрирования белков и пептидов в КВВ перед хромато-масс-спектрометрическим анализом является лиофилизация. Кроме того на этом этапе исследования были тщательно подобраны условия обессоливания и обезжиривания исследуемых образцов, а также их трипсинизации. Эффективность и воспроизводимость разработанных аналитических методик была продемонстрирована на сложной искусственной смеси очищенных белков. Это позволило автору перейти непосредственно к анализу аминокислотных последовательностей, присутствующих в КВВ здоровых доноров. Оказалось, что в этом случае основными белками были цитоскелетные кератины, фибриллярные белки, участвующие в поддержании целостности эпителиальных клеток и тканей. Кроме того на этих контрольных пробах было убедительно продемонстрировано, что часть белков, обнаруживаемых в КВВ, имеет экзогенное происхождение и попадает в легкие при вдохе из окружающей среды. Это позволило автору вносить соответствующие поправки в результаты анализа протеома больных респираторными заболеваниями.

Сравнение белкового состава КВВ 17 больных ХОБЛ, 13 больных внебольничной пневмонией и 46 пациентов с диагностированным раком легкого в I и II стадии позволило К.Ю. Федорченко выявить в анализируемых конденсатах 42 белка некератиновой природы, характерных только для онкологических больных и необнаруживаемых в остальных исследованных группах. Аналогично, специфические профили белков, найденных в КВВ, были характерны и для других исследованных групп доноров конденсата. На основании полученных данных диссертант делает заключение о том, что белковые профили доноров различных групп поддаются разделению с помощью использованных методов и могут быть взяты за основу при разработке биомаркеров соответствующих состояний организма. Для решения этой задачи диссертант сопоставила биоинформатическими методами собственные

данные с информацией об экспрессии генов в опухолевой ткани легкого, извлеченной из в представительной базы данных GEO DataSets (NCBI). В итоге из общего построенного профиля были выделены 19 белков, которые автор диссертации предложила использовать в качестве будущей диагностической панели рака легкого.

Большой объем информации, касающейся протеома КВВ индивидуумов разных клинических групп, который был получен К.Ю. Федорченко во время выполнения диссертационной работы, и который несомненно будет возрастать в будущем, ставит закономерный вопрос удобства работы с этой информацией и ее доступности другим исследователям. Поэтому в заключительной части диссертации автор логично обращается к созданию собственной реляционной базы данных проб, доноров КВВ и пептидного состава имеющихся образцов. В базу данных помещены сведения о каждом обследованном пациенте, а также результаты анализов, в том числе и файлы со спектрами и масс-листами проанализированных пептидов. Была проведена иерархическая кластеризация исследованных образцов, результаты которой представлены в виде тепловых карт. В завершение работы с учетом всей совокупности полученных данных К.Ю. Федорченко удалось построить линейную аналитическую модель прогнозирования наличия у пациентов рака легкого. Модель была успешно протестирована ( $AUC=0.99$ ) с помощью группы пациентов, не включенных в машинное обучение, что открывает возможность использования ее при лечении соответствующих патологических состояний организма человека.

Опубликованные по результатам диссертации статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, также, как и автореферат, достаточно полно отражают содержание работы. Достоверность сделанных выводов, которые хорошо аргументированы, не вызывает сомнений.

Подводя итог всему сказанному, можно заключить, что диссертация Кристины Юрьевны Федорченко соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 04.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. №650) и представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. В результате проведенной работы автору удалось получить новые фундаментальные данные относительно протеома КВВ пациентов с респираторными заболеваниями, весьма перспективные для внедрения в клиническую практику. Автор диссертации, К.Ю. Федорченко, безусловно заслуживает присуждение ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02

– «Биофизика».

Отзыв на диссертационную работу К.Ю. Федорченко заслушан и утвержден на семинаре отдела пептидно-белковых технологий ФГБУН Института биоорганической химии РАН 1 февраля 2018 г.

Отзыв подготовил:

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

ФГБУН Института биоорганической химии РАН,

доктор биологических наук, профессор

Тел. 8(499)793-46-11

e-mail: [patrush@ibch.ru](mailto:patrush@ibch.ru)

Л.И. Патрушев

Заместитель директора ИБХ РАН по научной работе,

доктор химических наук

И.В. Ямпольский

1.02.2018

Заведующий отделом пептидно-белковых технологий ИБХ РАН,

академик

В.Т. Иванов

Почтовый адрес: Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7

телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)

**Патрушев Лев Иванович**, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Тел.: 8(499)793-46-11

E-mail: [patrush@ibch.ru](mailto:patrush@ibch.ru)

Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10

**Ямпольский Илья Викторович**, доктор химических наук, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела биомолекулярной химии, заведующий лабораторией химии метаболических путей

Тел.: +7 (495) 995-55-57

E-mail: [ivyamp@ibch.ru](mailto:ivyamp@ibch.ru)

Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10

**Иванов Вадим Тихонович**, доктор химических наук, профессор, академик РАН, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела пептидно-белковых технологий, заведующий лабораторией химии пептидов

Тел.: +7 (495) 330-56-92, +7 (495) 330-56-38

Эл. почта: [ivavt@ibch.ru](mailto:ivavt@ibch.ru)

Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10