

## УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук  
д.х.н., профессор Курочкин И.Н.

«20» ноября 2017 г.



## ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА

заседания расширенного семинара по биофизике  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской  
академии наук  
от 05 октября 2017 г.

**Председатель семинара:** д.б.н., проф. Пальмина Н. П., главный научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем отдела кинетики химических и биологических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

**Секретарь семинара:** д.б.н. Дудник Л. Б., ведущий научный сотрудник ИБХФ РАН.

**Присутствовали:** чл.-корр. РАН, д.х.н., проф., научный руководитель ИБХФ РАН Варфоломеев С.Д.; д.б.н., проф., гл.н.с. ИБХФ РАН Пальмина Н.П.; д.б.н., проф., зав. лаб. ИБХФ РАН Розенфельд М.А.; д.б.н., вед.н.с. ИБХФ РАН Дудник Л.Б.; д.б.н., гл.н.с. ИБХФ РАН Семенова Н.А.; д.м.н., проф. кафедры пульмонологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова Анаев Э.Х.; к.ф.-м.н., вед.н.с. ИБХФ РАН Кононихин А.С.; к.х.н., н.с. каф. химической энзимологии химического

факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Рябоконт А.М.; к.б.н., н.с. ИБХФ РАН Ублинский М.В.; к.х.н., н.с. ИБХФ РАН Беликов Н.Е.; к.ф.-м.н., доц. МБЦ МГУ имени М.В. Ломоносова Филимонов И.С.

**Всего:** 15 человек.

**Повестка заседания:** обсуждение диссертационной работы Федорченко Кристины Юрьевны «Метод неинвазивной диагностики рака легкого, основанный на анализе белкового и пептидного состава конденсата выдыхаемого воздуха человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

**Слушали:** доклад по диссертационной работе Федорченко К.Ю. «Метод неинвазивной диагностики рака легкого, основанный на анализе белкового и пептидного состава конденсата выдыхаемого воздуха человека».

**Постановили:** рекомендовать диссертацию Федорченко К.Ю. к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской  
академии наук

Диссертационная работа «Метод неинвазивной диагностики рака легкого, основанный на анализе белкового и пептидного состава конденсата выдыхаемого воздуха человека» выполнена Федорченко Кристиной Юрьевной в лаборатории кинетики и механизмов ферментативных и каталитических реакций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

В 2007 году Федорченко Кристина Юрьевна окончила Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «микробиология», с 11.10.2007 год по 11.10.2015 год обучалась в очной аспирантуре Российской академии наук.

Удостоверение № 133 о сдаче кандидатских экзаменов «история и философия науки», «иностранный язык (английский)», «биофизика» выдано 18 октября 2017 года ИБХФ РАН.

В период подготовки диссертации с 2007 г. по 2010 г. работала младшим научным сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, с 2010 г. по настоящее время является ассистентом Международного биотехнологического центра МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Научный руководитель:** член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, **Варфоломеев Сергей Дмитриевич**, научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

**Рецензент:** д.б.н., профессор Розенфельд М.А., зав. лабораторией Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

**В ходе обсуждения были заданы следующие вопросы:**

*Розенфельд М.А.:* Известно, что при онкозаболеваниях новые белки не образуются, но возрастает концентрация белка. Согласуется ли это с Вашими данными?

*Федорченко К.Ю.:* Спасибо за Ваш вопрос. По составу конденсата выдыхаемого воздуха сложно делать количественные оценки, однако на основании наших данных можно утверждать, что в КВВ пациентов с диагнозом «рак легкого» идентифицируется значимо больше различных белков, чем в КВВ здоровых доноров, что косвенно подтверждает Ваше утверждение.

*Варфоломеев С.Д.:* Вы сравнили белковый и пептидный состав КВВ. Насколько они коррелируют?

*Федорченко К.Ю.:* Спасибо за Ваш вопрос. В ходе нашего исследования мы обнаружили, что программа Mascot, широко используемая для идентификации белков по данным масс-спектрометрии, при обработке данных анализа проб КВВ формирует белковую выдачу по избранным пептидам, при этом большая часть пептидных идентификаций не включается в итоговый файл. При построении диагностической модели была использована именно пептидная выдача. В дальнейшем, пептиды, вносящие наибольший вклад в ответ модели по диагнозу донора, были опять проаннотированы на предмет принадлежности к белкам, и мы обнаружили много совпадений с описанными ранее белковыми профилями групп сравнения. Однако, стоит отметить, что пептидный состав КВВ дает больше информации о состоянии организма и лучше подходит для целей установки диагноза.

*Розенфельд М.А.:* Вы сказали, что иммуноферментный анализ не может использоваться для определения протеома КВВ, однако чувствительность метода вполне позволяет определять белки в Ваших пробах?

*Федорченко К.Ю.:* Спасибо за Ваш вопрос. Да, Вы совершенно правы, но проблемы с использованием данного метода анализа состоят не в недостаточной чувствительности, а в том, что наши белки летят в виде фрагментов, что создает трудности для работы антител.

*Кононихин А.С.:* Я хотел бы сделать замечание по презентации. На слайдах не были отражены коллаборирующие организации, которые участвовали в этой большой работе. Кроме того, я считаю, что нужно четче выделить группы сравнения, которые рассматривались в работе.

*Федорченко К.Ю.:* Спасибо за замечание, я обязательно его учту.

*Семенова Н.А.:* Как Вы считаете, насколько реально использовать Ваш метод диагностики в условиях клиники? Не везде стоят масс-спектрометры такого уровня.

*Федорченко К.Ю.:* Спасибо за Ваш вопрос. Надо сказать, что сейчас масс-спектрометрами все чаще оснащают больницы и крупные медицинские центры, поэтому эта проблема, скорее всего, временная. Кроме того, появились квадрупольные масс-спектрометры, которые по чувствительности даже лучше, чем использованный в работе комплекс, и больницы начали активно их закупать для нужд медицинской диагностики. Что касается остальных этапов работы, то мы постарались исключить сложные трудоемкие стадии пробоподготовки и автоматизировать анализ данных прибора. Также мы работаем над созданием интерфейса, который позволит врачам путем простого заполнения стандартных форм вносить и сохранять информацию о пациенте и его пробе, а затем получать ответ по предполагаемому диагнозу.

В обсуждении приняли участие Розенфельд М.А., Дудник Л.Б., Семенова Н.А., Кононихин А.С., Варфоломеев С.Д., Филимонов И.С.

### **Выступили:**

С положительным отзывом выступили д.м.н., проф. Анаев Э.Х. и к.х.н. Рябоконт А.М. Чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Варфоломеев С.Д. сообщил, что молодой специалист Федорченко К.Ю. участвовала в международных и отечественных конференциях, имеет публикации в рецензируемых журналах и является перспективным молодым ученым. Федорченко К.Ю. удовлетворяет требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

### **Оценка выполненной работы**

Диссертация Федорченко К.Ю. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований конденсата выдыхаемого воздуха человека разработана диагностическая модель, позволяющая выявлять легочные заболевания различной этиологии на основании математического анализа масс-спектрометрических данных по белковому и пептидному составу выдыхаемого воздуха. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

### **Актуальность темы**

Анализ КВВ является перспективным методом ранней неинвазивной диагностики состояния респираторной системы человека, включая дифференциальную диагностику таких социально значимых заболеваний, как рак легкого, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и пневмония. Созданные в рамках проекта подходы к проведению масштабных исследований КВВ будут способствовать ускорению внедрения метода в клиническую практику и повысят его производительность.

### **Научная новизна**

Основной результат исследования – информация о сравнительном белковом и пептидном составе КВВ больных раком легкого и пациентов с

ХОБЛ и пневмонией – является абсолютно новым. На основании полученных экспериментальных результатов показано, что анализ выдыхаемого воздуха – идеальный кандидат для скрининговых программ, открывающий, в сочетании с биоинформатическими подходами, новые возможности в области персонализированной медицинской диагностики. На основании проведенного исследования предложена панель белковых биомаркеров для диагностики рака легкого начальных стадий, а также создана аналитическая модель прогнозирования наличия рака легкого у донора на основе пептидного состава КВВ.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены при личном участии автора. Автор принимал активное участие в постановке задач исследования, самостоятельно проводил анализ литературных данных, участвовал в подборе методов исследования и сборе проб, осуществлял все этапы пробоподготовки, проведения экспериментов и обработки полученных результатов, а также подготовку материалов к публикациям. Измерения методом тандемной масс-спектрометрии производились автором при участии ведущего научного сотрудника отдела масс-спектрометрии Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН Кононихина А.С., биоинформатическая и статистическая обработка полученных результатов с использованием языков программирования осуществлялась при участии сотрудника лаборатории кинетики ферментативных реакций МБЦ МГУ имени М.В. Ломоносова Митрофанова С.И.

### **Степень обоснованности и достоверности полученных результатов**

Для выполнения поставленных задач использовались общепринятые физико-химические методы исследования белков и пептидов: одномерный и двумерный электрофорез в ПААГ, триптический гидролиз белков, тандемная хромато-масс-спектрометрия ультравысокого разрешения, MALDI-TOF-масс-спектрометрия. Кроме того, в исследовании использовались

биоинформатические методы работы с большими массивами данных, математические методы компьютерного анализа (корреляционный анализ, кластерный анализ, метод логистической регрессии). Достоверность результатов обеспечивалась инструментальной и статистической оценкой погрешности измерений, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, полученных различными методами исследования.

Научные положения, выводы, рекомендации полностью обоснованы, достоверны, вытекают из полученных результатов и получили признание в научной литературе и на различных конференциях.

### **Практическая значимость работы**

Полученные результаты могут послужить базой как для прикладных исследований – внедрения нового метода ранней диагностики онкологических заболеваний, – так и для фундаментальных исследований, связанных с изучением процессов развития патологических изменений на ранних стадиях онкологических заболеваний. Созданные в рамках работы подходы к проведению масштабных исследований КВВ в условиях клиники, а также подходы к сбору, хранению, подготовке и анализу образцов являются абсолютно новыми и послужат базой для создания протоколов методов диагностики на стадии НИОКР.

### **Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

Работа соответствует специальности 03.01.02 – биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в 25 опубликованных работах Федорченко К.Ю., из них 8 – в рецензируемых научных российских и иностранных журналах по списку ВАК РФ, 2 – главы в монографиях, 15 – в тезисах конференций.



**Статьи в рецензируемых научных журналах и главы в монографиях:**

1. Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls / V. S. Kurova, E. C. Anaev, A. S. Kononikhin, **K. Y. Fedorchenko**, I. A. Popov, T. L. Kalupov, D. O. Bratanov, E. N. Nikolaev, S. D. Varfolomeev // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. — 2009. — Vol. 47, no. 6. — P. 706–712.

2. Structural and catalytic polymorphism of human enzymes: Novel potential platforms for biomedical diagnostics / V. S. Kurova, I. N. Kurochkin, G. R. Kalamkarov, A. E. Bugrova, **K. Yu Fedortchenko**, S. D. Varfolomeev // *Biotechnology Advances*. — 2009. — Vol. 27, no. 6. — P. 945–959.

3. Масс-спектрометрический мониторинг белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха больного, перенесшего трансплантацию легких / В. С. Курова, Э. Х. Анаев, А. С. Кононихин, И. А. Попов, **К. Ю. Федорченко**, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев, А. Г. Чучалин // *Известия Академии наук. Серия химическая*. — 2010. — № 1. — С. 284–288.

4. Varfolomeyev S., Kurova V., **Fedorchenko K.** The molecular pathway to personalized medicine // *From Promises to Practice. Applications of Science and Technology in Food, Healthcare, Energy and Environment/ Edited by Serageldin I., Masood E.* — Bibliotheca Alexandrina Alexandria, Egypt, 2010. — P. 255–262.

5. Структурный и каталитический полиморфизм ферментов человека. Современные потенциальные платформы биомедицинской диагностики / В. С. Курова, И. Н. Курочкин, Г. Р. Каламкарров, А. Е. Бугрова, **К. Ю. Федорченко**, С. Д. Варфоломеев // *Физическая химия биопроцессов*. — Издательская группа URSS Москва, 2014. — С. 673–724.

6. Протеомный анализ конденсата выдыхаемого воздуха в целях диагностики патологий дыхательной системы / А. С. Кононихин, **К. Ю. Федорченко**, А. М. Рябоконт, Н. Л. Стародубцева, И. А. Попов, М. Г. Завьялова, Э. Х. Анаев, А. Г. Чучалин, С. Д. Варфоломеев, Е. Н. Николаев // *Биомедицинская химия*. — 2015. — Т. 61, № 6. — С. 777–780.

7. Ранняя диагностика рака легкого на основе анализа протеома конденсата выдыхаемого воздуха / **К. Ю. Федорченко**, А. М. Рябоконт, А. С.

Кононихин, С. И. Митрофанов, В. В. Бармин, О. В. Пикин, Э. Х. Анаев, И. В. Гачок, И. А. Попов, Е. Н. Николаев, А. Г. Чучалин, С. Д. Варфоломеев // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. — 2016. — № 2. — С. 112–120.

8. Влияние космического полёта на белковый состав конденсата выдыхаемого воздуха космонавтов / **К. Ю. Федорченко**, А. М. Рябоконт, А. С. Кононихин, С. И. Митрофанов, Е. А. Михантьева, А. И. Спасский, И. Р. Суходолов, И. А. Попов, А. В. Поляков, И. М. Ларина, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев // Известия Академии наук. Серия химическая. — 2016. — № 11. — С. 2745-2750

9. Spaceflight induced changes in human proteome / A. S. Kononikhin, N. L. Starodubtseva, L. K. Pastushkova, D. N. Kashirina, **K. Yu. Fedorchenko**, A. G. Brhozovsky, I. A. Popov, I. M. Larina, E. N. Nikolaev // Expert Review of Proteomics. — 2017. — Vol. 14, no. 1. — P. 15–29.

10. Э. Х. Анаев, **К. Ю. Федорченко**, М. Э. Кушаева, А. М. Рябоконт, А. С. Кононихин, В. В. Бармин, О. В. Пикин, И. А. Попов, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев, and А. Г. Чучалин. Диагностика заболеваний легких на основе протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха. Пульмонология, 27(2):187–197, 2017.

#### **Апробация работы (тезисы докладов):**

1. Протеомика конденсата выдыхаемого воздуха: перспективы развития неинвазивной диагностики воспаления и других патологических процессов в легких (организме) человека / В. С. Курова, Э. Х. Анаев, А. С. Кононихин, **К. Ю. Федорченко**, И. А. Попов, Д. О. Братанов, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев // Альманах клинической медицины. — 2008. — № 17-2. — С. 112–114.

2. Протеомика КВВ: перспективы поиска потенциальных биомаркеров воспаления и других патологических процессов в легких (организме) человека / **К. Ю. Федорченко**, В. С. Курова, А. С. Кононихин, Э. Х. Анаев, Д. О. Братанов, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев // IV Съезд Российского общества

биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск). Сборник материалов съезда. — Новосибирск, Россия, 2008. — С. 564.

3. Suche nach neuen diagnostischen eiweismarkern im atemkondensat bei lungenerkrankungen / E. Anaev, A. Chuchalin, V. Kurova, **K. Fedorchenko**, A. Ryabokon, E. Nikolaev, S. Varfolomeev // *Pneumologie*. — 2011. — Vol. 65, no. 1. — P. 321.

4. Discrimination of protein and peptide composition of exhaled breath condensate in patients with pulmonary disease by mass spectrometry / A. M. Ryabokon, V. S. Kurova, E. K. Anaev, A. S. Kononikhin, **K. U. Fedorchenko**, E. N. Nikolaev, S. D. Varfolomeev // *Eur Respir J*. — 2011. — Vol. 38: P. 4792.

5. Respiratory disease confirmation via proteome analysis of exhaled breath condensate / **K. Fedorchenko**, A. Ryabokon, K. Alexey, N. Starodubtseva, E. Anaev, S. Varfolomeev, A. Chuchalin, E. Nikolaev // *14th Human Proteome Organization World Congress - HUPO 2015 Vancouver. Collected volume*. — Канада, 2015. — P. 170–171.

6. Ранняя диагностика рака легкого у больных пневмонией на основе анализа конденсата выдыхаемого воздуха / М. Э. Кушаева, **К. Ю. Федорченко**, Э. Х. Анаев, А. М. Рябоконт, А. С. Кононихин, С. И. Митрофанов, И. А. Попов, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев, А. Г. Чучалин // *Сборник трудов XXV Национального Конгресса по болезням органов дыхания под ред. академика Российской Академии Наук А.Г. Чучалина*. — г. Москва, 2015. — С. 360.

7. Протеомный анализ конденсата выдыхаемого воздуха до и после длительных полетов на международной космической станции / А. М. Рябоконт, **К. Ю. Федорченко**, А. С. Кононихин, И. М. Ларина, А. В. Поляков, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев // *Пилотируемые полеты в космос. Журнал НИИ ЦПК им. Ю.А. Гагарина*. — Материалы XI Международной научно-практической конференции 10–12 ноября 2015 года. — Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский испытательный центр подготовки космонавтов имени Ю.А. Гагарина Звездный городок, 2015. — С. 460–462.

8. Lung cancer early diagnosis based on proteome analysis of exhaled breath condensate / A. Ryabokon, **K. Fedorchenko**, A. Kononikhin, V. Barmin, O. Pikin, E. Nikolaev, S. Varfolomeev // Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals & Applications". — Moscow, 2015. — P. 149.

9. Eiweißmarker im atemkondensat für differentialdiagnose bei pneumonie und lungenkarzinom / E. Anaev, **K. Fedorchenko**, M. Kushaeva, A. Ryabokon, A. Kononikhin, S. Mitrofanov, E. Nikolaev, S. Varfolomeev, A. Chuchalin // Pneumologie. — Vol. 70, S 01. — 2016. — P. 257.

10. Диагностика легочных заболеваний на основе анализа белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха методами масс-спектрометрии с использованием биоинформатических подходов / **К. Ю. Федорченко**, А. М. Рябоконт, М. А. Аксенова, Т. С. Широковских, С. И. Митрофанов, А. С. Кононихин, Э. Х. Анаев, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев // V Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Дагомыс). Сборник материалов съезда. — Дагомыс, Россия, 2016. — С. 135

11. Bestimmung von eiweisstoffen im atemkondensat als diagnostische methode bei verschiedenen lungenerkrankungen / E. Anaev, A. Chuchalin, **K. Fedorchenko** et al. // Pneumologie. — 2017. — Vol. 71, no. S01. — P. S1–S125.

12. Diagnosis of lung diseases based on proteomic analysis of exhaled breath condensate / E. Anaev, M. Kushaeva, **K. Fedorchenko**, A. Ryabokon, A. Kononikhin, O. Pikin, E. Nikolaev, S. Varfolomeev, A. Chuchalin // European Respiratory Journal — 2017. — Vol. 50, no 61. — P. P4939-P4939.

13. Proteome analysis of exhaled breath condensate before and after space flight / E. Nikolaev, **K. Fedorchenko**, A. Ryabokon, A. Kononikhin, S. Mitrofanov, N. Kotlov, I. Popov, A. Spasskii, I. Sukhodolov, A. Polyakov, I. Larina, S. Varfolomeev // 16th Human Proteome Organization World Congress - HUPO 2017 Dublin. — Ирландия, 2017. — P. 1.

14. Белковый спектр конденсата выдыхаемого воздуха при диагностике заболеваний легких / **Федорченко К.Ю.**, Кононихин А.С., Попов И.А., Николаев Е.Н., Варфоломеев С.Д., Анаев Э.Х., Кушаева М.Э., Рябоконт

А.М., Чучалин А.Г. // Сборник трудов XXV Национального Конгресса по болезням органов дыхания под ред. академика Российской Академии Наук А.Г. Чучалина. — г. Санкт-Петербург, 2017. — С. 92-93.

15. EXHALED BREATH PROTEOMICS AS APPLICABLE TO ONCOLOGY / **Fedorchenko K.**, Ryabokon A., Kononikhin A., Anaev E., Mitrofanov S., Kotlov N., Barmin V., Pikin O., Spasskiy A., Polyakov A., Larina I., Chuchalin A., Varfolomeev S., Nikolaev E. // Международная конференция по персонализированной онкологии – г. Москва, 2017.

Диссертационная работа Федорченко Кристины Юрьевны на тему «Метод неинвазивной диагностики рака легкого, основанный на анализе белкового и пептидного состава конденсата выдыхаемого воздуха человека» соответствует требованиям п. 9 и п.14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335 в редакции Постановления Правительства РФ от 2 августа 2016 г. № 748), и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заключение принято на заседании расширенного семинара по биофизике ИБХФ РАН 5 октября 2017 года.

На заседании присутствовали 15 человек из них 4 доктора биологических наук по специальности 03.01.02 -биофизика.

Результаты голосования:

«за» - 15 чел.;

«против» - нет;

«воздержались» - нет.

Председатель семинара  
д.б.н., профессор

Н.П. Пальмина

Секретарь семинара  
д.б.н.

Л.Б. Дудник