

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Басова Никиты Вячеславовича

«Разработка и применение подхода к целевому метаболомному анализу методом ВЭЖХ-МС/МС на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук

по специальности 1.5.4 - биохимия

Рецензируемая диссертационная работа Басова Никиты Вячеславовича посвящена разработке, экспериментальному обоснованию и применению нового подхода к целевому скринингу широкого спектра метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом, полученным путем сополимеризации стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола, и сочетанию режимов гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии с последующим использованием разработанного подхода для анализа метаболитов в биологических образцах различного происхождения. Применение такого комбинированного хроматографического подхода для целевого метаболомного анализа является актуальной научной задачей, находящейся на стыке биохимии, аналитической химии, системной биологии и медицины. Задача анализа максимально широкого набора метаболитов в одном эксперименте с минимальными изменениями в аналитической системе чрезвычайно актуальна, особенно когда дело доходит до практических приложений, где важна скорость анализа, простота настройки аналитической техники, применимость к биологическим образцам различной природы, широта охвата метаболитов и надежность полученных результатов.

Метаболомные подходы сами по себе всегда являются сложной многокомпонентной экспериментальной процедурой, включающей в себя бесконечные варианты пробоподготовки, подбора условий хроматографического разделения и условий масс-спектрометрического анализа и обработки полученных результатов. Разработка и создание эффективной, практичной, почти универсальной платформы для метаболомного анализа в сочетании с глубоким теоретическим и практическим изучением ее характеристик и примерами успешного практического применения являются серьезным достижением в этой области исследований.

Диссертационная работа Басова Н.В. изложена на 144 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка, 11 таблиц и состоит из Списка специальных терминов и сокращений (2 стр.), Введения (10 стр.), трех глав: Литературного обзора (10 подразделов, заключение, 35 стр.), Экспериментальной части (22 подраздела, 12 стр.), Обсуждения

результатов (12 подразделов, 61 стр.), Заключение, Выводов, Списка цитируемой литературы (230 литературных источников) и двух Приложений.

Во введении автор показывает актуальность, степень разработанности темы исследования и определяет задачи исследования. Актуальность метаболомных исследований не вызывает сомнения, в настоящее время метаболомика является относительно новым и активно развивающимся направлением и является эффективным подходом к изучению биохимических процессов, протекающих в живой системе. Метаболомные исследования находят широкое применение в биохимии, биоорганической химии, фармакологии и биомедицине. Поиск диагностических и прогностических биомаркеров особенно важен в биомедицинских и клинических приложениях.

Основными задачами диссертационной работы Басова Никиты Вячеславовича являлись: поиск оптимальных условий хроматографического разделения и анализа целевых метаболитов с использованием уникальной новой монолитной колонки на основе сополимера стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола и подвижной фазы, состоящей из буферного раствора карбоната аммония ($\text{pH} = 9,8$) и ацетонитрила; разработка оптимальных схем использования преимуществ этой колонки, связанными с последовательным разделением целевых метаболитов в двух режимах, гидрофильной (ГФХ) и обратнофазной (ОФХ) хроматографии и тандемной масс-спектрометрии, и сравнение количества метаболитов, определяемых с помощью данного подхода и традиционно используемых коммерчески доступных колонок; проведение анализа биологических образцов, включая плазму крови, сухие пятна крови и образцы биологических тканей и клеточных линий, с применением разработанного подхода; выявление метаболомных различий в биологических системах, подверженных различным видам воздействия или с патологическими изменениями; разработка и оптимизация протокола пробоподготовки адгезивных клеточных культур для метаболомного анализа и его апробация для изучения изменения метаболомов при воздействии терагерцового излучения. Можно отметить, что основные задачи выполнены автором полностью и на высоком профессиональном уровне.

В главе 1 диссертационной работы «Обзор литературы» автор рассматривает и детально обсуждает введение в проблематику темы, предпосылки развития метаболомики, развития аналитических методов для метаболомных исследований. Философское обоснование автором метаболомики как новой области науки может быть и не столь необходимо в данной работе, но не выглядит чем-то экзотическим и показывает способность автора видеть проблему в широком контексте. Особое внимание автор уделяет анализу развития, характеристикам и теории хроматографического разделения (18

страниц), в то время как масс-спектрометрическим методам дана очень скудная, можно сказать, поверхностная характеристика (2 страницы). Однако, это простительно - основная новизна и ценность данной работы в раскрытии потенциала новой монолитной бифункциональной по сути колонки, созданной коллегами из Института катализа СО РАН и детально изученной диссертантом для применения в метаболомике.

В главе 2 «Экспериментальная часть» автор описывает реактивы и материалы, детали приготовления монолитной колонки, описание характеристик животных и клеток, особенности облучения клеток терагерцовым излучением, а также детали сбора образцов от пациентов (с послеоперационным делирием (ПОД) и глиобластомой). Далее автором подробно описаны процедуры пробоподготовки биологических образцов, а именно образцов контроля качества плазмы крови человека, сухих пятен крови мышей, плазмы крови для скрининга сфингомиелинов в образцах пациентов с ПОД, образцов глиобластомы и перитуморальных тканей и подготовка клеточных образцов. Затем автор приводит описание условий и характеристик ВЭЖХ и МС/МС экспериментов, предварительной обработки и статистического анализа полученных данных. Завершает главу подраздел анализа метаболических путей.

В главе 3 «Обсуждение результатов» автор приводит данные о разработке метода анализа метаболитов с использованием комбинации разделения ГФХ и ОФХ на органической монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола и масс-спектрометрического детектирования, изучении хроматографического поведения эндогенных метаболитов на монолитной колонке, комбинировании режимов ВЭЖХ с гибридным механизмом разделения и применении разработанного подхода для решения нескольких практических задач метаболомики. В число таких задач входило выполнение анализа образцов сухих пятен крови, полученных от мышей, облученных рентгеновским излучением, исследование содержания сфинголипидов в плазме крови пациентов с ПОД с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, изучение особенностей метаболизма глиобластомы и разработка протокола пробоподготовки для метаболомного скрининга клеточных образцов, а также исследование метаболомного покрытия при анализе образцов клеток с разным количеством клеток. Закljučают главу разделы, посвященные ключевым этапам пробоподготовки клеточных культур для метаболомного анализа, нормализации данных, основанной на количестве клеток в образце и исследованию воздействия терагерцового излучения на метаболизм клеток меланомы человека SK-MEL-28.

Научная новизна исследования состоит в том, что в данной работе впервые экспериментально показана возможность использования новой монолитной хроматографической колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола для целевого

метаболического анализа в двух режимах хроматографии (как гидрофильной, так и обращенно-фазовой) на одной аналитической платформе ВЭЖХ-МС/МС. Показано, что применяемый сорбент дает возможность воспроизводимого удерживания и разделения метаболитов различной химической природы.

Впервые с использованием одной платформы ВЭЖХ-МС/МС с гибридным хроматографическим разделением выявлены изменения липидного профиля плазмы крови у пациентов с послеоперационным делирием, а также метаболические различия между тканью глиобластомы и перитуморальным пространством. Это подтверждает применимость данного подхода для исследований различной биомедицинской направленности. Также впервые этот подход был успешно применен для анализа сухих пятен крови в задачах радиационной биологии, что выявило метаболические маркеры и нарушенные метаболические пути в крови мышей после рентгеновского облучения, а также дало возможность проследить их временную динамику.

Необходимо отметить, что диссертационная работа Никиты Вячеславовича имеет ярко выраженный междисциплинарный характер, она основана на подходе, объединяющем методы аналитической химии, биохимии, клеточной биологии и биоинформатики, что является несомненной заслугой автора.

По материалам диссертации опубликованы 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, а также тезисы 12 докладов. Результаты исследования докладывались на конференциях в виде 5 устных докладов.

Заключение и выводы полностью соответствуют поставленным целям диссертационной работы соискателя. Основные положения, выносимые на защиту, полностью выполнены автором и представляют из себя новые значимые научные результаты и данные, полученные и проанализированные автором самостоятельно.

В целом, диссертация написана хорошим литературным языком, практически без опечаток и орфографических ошибок, библиографические ссылки оформлены корректно, текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования.

Существенных недостатков в представленной диссертационной работе нет. В качестве рекомендации можно отметить, что читателю не хватает информации о рабочих давлениях, применяемых автором в его исследовании. Следовало бы отметить, что хроматографическое разделение проводилось на монолитных колонках из стекла, интересно, какое максимальное давление выдерживают такие колонки. Как правило, это не больше 30, редко 50 атм, таким образом, можно говорить, что эта система относится к системам среднего давления или нижним пределам ВЭЖХ. Таким образом, разделение в

этой системе должно уступать ВЭЖХ и ультра-ВЭЖХ системам и преимущество данного метода именно в возможности сочетания режимов хроматографии.

Автор проводит свои исследования, используя в качестве масс-спектрометрического анализатора тройной квадруполь. В диссертации автор указывает название прибора Sciex 6500 Q-TRAP, такая система может работать в режиме тройного квадруполя, а может выполнять более сложную функцию, позволяя проводить эксперименты МСⁿ за счет использования квадрупольной линейной ловушки, то есть получать более глубокую фрагментацию выбранных ионов. В качестве пожеланий и рекомендаций автору на будущее рекомендую использовать эту опцию для подтверждения идентификации целевых метаболитов.

В литературном обзоре для наглядности и более ясного понимания материала неспециалистами было бы полезно привести химические структуры основных обсуждаемых автором хроматографических фаз.

Автор в тексте часто использует слово «робастность», это буквальная трансляция английского слова «robust» (крепкий, устойчивый, надежный), введенного в масс-спектрометрический глоссарий доктором Игорем Чернышевичем в его классической работе о принципах и применении масс-спектрометров типа Q-TOF. Этот термин широко используется сейчас в англоязычной литературе, но мне кажется более уместным в наших текстах использовать простое и ясное слово «надежность».

Высказанные замечания и небольшие недостатки не снижают общего положительного впечатления от диссертации и не вызывают сомнений в достоверности полученных Басовым Н.В. результатов и обоснованности выводов.

Представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертация Басова Никиты Вячеславовича выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой. В работе содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для развития биохимии, в целом, эта работа по новизне, научной и практической значимости, объему и полученным результатам соответствует паспорту специальности 1.5.4 – биохимия и требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Басов Никита Вячеславович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

Официальный оппонент,

Дмитренко Павел Сергеевич

Доктор химических наук, специальность 1.4.9 – биоорганическая химия, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Еякова Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Контактные данные

Почтовый адрес: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Еякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690022, г. Владивосток, проспект 100-лет Владивостоку, 159

Тел. +7 904 624 08 62

Электронная почта: paveldmt@piboc.dvo.ru

«8» сентября 2026 г.

П.С. Дмитренко

Согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись Дмитренка П.С. заверяю:

Ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН,

К.Х.Н.

«8» сентября 2026 г.



К.Л. Борисова