

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию 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**», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 - биохимия.

Актуальность работы. Метаболомика является одной из наиболее бурно развивающихся в настоящее время дисциплин. Установление качественного и количественного метаболомного состава тканей и биологических жидкостей находит широкое применение в медицине, экологии, зоологии, ботанике, клеточной биологии и других областях, связанных с биохимическими исследованиями. Для решения метаболомных задач наиболее часто используют методы масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ЖХ-МС), которые обладают высокой селективностью, точностью и чувствительностью и позволяют регистрировать и измерять чрезвычайно низкие концентрации органических соединений в биологических матрицах. Ключевым элементом этих методов является хроматографическое разделение метаболитов, содержащихся в тканях. Проблема заключается в высокой неоднородности химических свойств метаболитов, что приводит к необходимости использования различных способов хроматографического разделения различных типов метаболитов. Наиболее часто используемые методы – это обращенно-фазовая хроматографии (ОФХ, применяется для умеренно полярных соединений) и хроматография гидрофильных взаимодействий (ГФХ, применяется для разделения высокополярных соединений). В настоящей работе разрабатывается и используется комбинированный подход, позволяющий использовать одну и ту же колонку, а также одни и те же элюенты как для ОФХ, так и ГФХ. Показано, что такой подход позволяет существенно расширить круг метаболитов, детектируемых за один эксперимент, а также сократить время ЖХ-МС эксперимента, что делает данную работу весьма актуальной. Актуальными являются также результаты, полученные в результате применения разработанного подхода: так, установление изменений в метаболомном составе тканей подопытных животных и клеточных колоний под действием рентгеновского и терагерцового излучений позволяет более полно установить механизмы биохимических процессов, протекающих в живых организмах под воздействием облучения.

Научная новизна работы в первую очередь заключается в том, что впервые был предложен и реализован комбинированный подход к метаболомному скринингу, основанный на последовательном анализе одной и той же пробы в режимах ГФХ и ОФХ на одной монолитной колонке с использованием одной пары элюентов. Впервые показано, что разработанный подход обеспечивает более широкий охват метаболитов при анализе плазмы

крови человека по сравнению с традиционно применяемыми колонками. Разработанный подход был применен к различным типам биологических тканей, включая плазму человеческой крови, сухие пятна крови, опухолевая ткань, а также колонии клеток, что также принесло ряд новых результатов: выявлены изменения липидного профиля плазмы крови у пациентов с послеоперационным делирием, а также метаболические различия между тканью глиобластомы и перитуморальным пространством. Установлены изменения метаболических путей в крови мышей после рентгеновского облучения.

Научная и практическая ценность работы. Разработанный в работе подход может успешно применяться для метаболомного анализа широкого спектра биологических тканей. Особо важное место этот подход может занять в масштабных доклинических и клинических исследованиях, поскольку он позволяет за относительно короткое время установить наличие и концентрацию большого количества метаболитов в ткани.

Основные положения, выносимые на защиту, заключаются в следующем: Разработана экспериментальная методика для быстрого (в пределах 30 минут) скрининга как полярных метаболитов, так и липидов. Эта методика успешно применена для решения следующих задач: установление изменений в метаболомном составе крови мышей под воздействием ионизирующего излучения; установление изменений в липидном составе плазмы крови пациентов с послеоперационным делирием; установление метаболомных различий между тканями глиобластомы и перитуморального пространства; выявление метаболические перестройки клеток при воздействии физических факторов на примере терагерцового излучения.

Диссертационная работа хорошо оформлена, написана грамотным языком с минимальным количеством грамматических и стилистических ошибок, изложена на 144 страницах, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы из 230 пунктов. Работа включает 13 таблиц, 63 рисунка и 1 приложение.

Во введении обоснована важность данной работы для развития метаболомики, основанной на применении платформы ЖХ-МС, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, отражены актуальность, научная новизна и практическая значимость. В обзоре литературы проведен анализ работ, описывающих эволюцию аналитических платформ, основанных на применении ЖХ-МС методов для метаболомного анализа. Особое внимание в обзоре уделено рассмотрению особенностей хроматографического разделения метаболитов с различными физико-химическими свойствами, а также современным подходам к расширению метаболомного покрытия, включая комбинированные и двумерные схемы разделения и использование смешанных и

многофункциональных фаз. На основании литературного анализа показаны недостатки существующих на настоящий момент методов и аргументирована необходимость проведения работ, изложенных в диссертации.

В Главе 2 «Экспериментальная часть» приводится описание использованных в работе реактивов и инструментария, а также описание процедур пробоподготовки и проведения экспериментов. Хочется отметить детальное освещение процедур пробоподготовки различных типов биологических образцов. Именно эта стадия является основным источником ошибок при метаболомном анализе, и внимательное отношение автора к вопросу пробоподготовки повышает доверие к полученным результатам.

Глава 3 «Обсуждение результатов» состоит из четырех подглав. Подглава 3.1 посвящена разработке метода анализа низко- и высокополярных метаболитов методами ГФХ и ОФХ с использованием одной и той же монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола, а также сравнение результатов разделения с результатами, полученными при использовании коммерческих колонок. Установлено, что применение колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола позволяет реализовать как режим ГФХ для разделения высокополярных метаболитов, так и ОФХ для разделения низкополярных соединений. Переключение между режимами осуществляется инверсией подачи элюентов на колонку. Показано, что использование колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола в дуальном режиме приводит к заметному повышению метаболомного покрытия при анализе плазмы человеческой крови по сравнению с коммерческими колонками Phenomenex Kinetex F5, Econova ProntoSIL 120-5 C18 AQ и Econova ProntoSIL 120-5 NH₂, обладающими сходными размерами.

В подглаве 3.2 приводятся результаты применения разработанного метода для решения различных типов метаболомных задач. Эти задачи включают в себя анализ метаболомных изменений в мышинной крови под воздействием рентгеновского облучения, изучение содержания липидов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием, а также сравнение метаболомных составов тканей глиобластомы и перитуморального пространства. Во всех случаях показана применимость и эффективность предложенного подхода.

Подглавы 3.3 и 3.4 посвящены метаболомному анализу клеточных образцов. Метаболомное исследование клеточных культур, и в особенности пробоподготовка образцов, является заметно более сложной задачей, чем анализ биологических тканей. Во-первых, необходимо провести отделение клеточного материала от компонентов культуральной среды. Во-вторых, нужно осуществить лизис клеточных мембран и экстракцию метаболитов для их последующего анализа. В-третьих, для количественного анализа необходимо проводить нормировку клеточного материала, основанного либо на

счете клеток, либо на установлении количества белка в клеточном образце, либо на установлении содержания ДНК. Автором были протестированы различные варианты пробоподготовки образца, и был выбран способ, позволяющий получить наиболее широкое метаболомное покрытие. Этот способ был успешно применен для установления изменений в метаболомной композиции клеток человеческой меланомы под воздействием терагерцового излучения.

В заключении диссертации изложено подведение итогов по полученным результатам, а также обрисованы перспективы дальнейших исследований в данной области. Приведенные в конце диссертации выводы логически следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

Достоверность и надежность полученных результатов не вызывают сомнений. Все результаты данной работы были получены Басовым Н.В. лично или при его непосредственном участии. В целом, диссертационная работа Басова Н.В. производит хорошее впечатление, все выводы работы являются обоснованными.

Диссертация Басова Н.В. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят существенный вклад в изучаемую проблему. Результаты диссертации опубликованы в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК, и неоднократно обсуждались на российских и международных конференциях. Автореферат достаточно полно и правильно отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, рецензируемая работа вызывает несколько вопросов:

- Литературный обзор практически полностью посвящен методологическим вопросам метаболомного анализа с помощью метода ЖХ-МС, и совсем не затрагивает темы, касающиеся проведенных в работе практических применений разработанного метода – влияния ионизирующего и неионизирующего излучения на живые системы, метаболомные изменения в раковых клетках, особенности развития постоперационного делирия у пациентов. Вместо этого, каждая подглава результативной части диссертации (Глава 3) снабжается литературной справкой, которая является миниобзором по обсуждаемой в данной подглаве теме. Такая компоновка диссертации затрудняет ее чтение. На взгляд оппонента, было бы более уместно собрать все эти литературные справки вместе и поместить их в общий литобзор.

- Подглава 3.2.2 «Исследование содержания сфинголипидов в плазме крови пациентов с послеоперационным делирием с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС» выбивается из общего строя достаточно четких и логически обоснованных экспериментов. Во-первых, не совсем понятно мотивация этой работы – а какую гипотезу авторы хотели проверить или опровергнуть? Послеоперационный делирий (ПОД) – достаточно многофакторное

осложнение, и сделать выводы о механизме развития этого осложнения по изменениям в метаболоме крови очень непросто. Во-вторых, измерения плазмы крови были сделаны только для липидов в ОФХ моде. При этом теряются все преимущества разработанного метода – эти измерения вполне можно было бы сделать и на обычной ОФХ колонке. В-третьих, статистический анализ полученных данных выглядит не очень убедительно. Так, для сфингомиелина СМ(d18:1/22:2 ОН) значение уровня в крови пациентов с ПОД составляет $0,35 \pm 0,18$, а без ПОД – $0,40 \pm 0,27$. На Рисунке 11 графики box-plot для этого липида для пациентов с и без ПОД практически идентичны. Тем не менее, в работе утверждается, что между этими показателями есть статистически значимая разница ($p < 0.05$). Оппонент полагает, что это заключение является ложноположительным результатом, обусловленным отсутствием коррекции FDR.

- В подглаве 3.2.3 «Изучение особенностей метаболизма глиобластомы» приведено сравнение метаболомных профилей глиобластомы и тканей головного мозга, прилегающих к опухоли. Среди обнаруженных метаболитов различия отсутствуют энергетические метаболиты – глюкоза, лактат, АТФ, и другие. Однако хорошо известный эффект Варбурга приводит к изменениям именно в составе и концентрациях энергетических соединений. Не совсем понятно, почему автор не обнаружил этот эффект в своем анализе.

- В подглаве 3.4 «Исследование воздействия терагерцового излучения на метаболизм клеток меланомы человека SK-MEL-28» приведены метаболомные изменения, обнаруженные в клетках при воздействии терагерцового излучения и высказана гипотеза, что первичной мишенью излучения являются митохондриальные мембраны. Однако, к сожалению, не сделано никаких предположений о механизме взаимодействия терагерцового излучения с живой тканью, и почему именно митохондриальные мембраны подвержены влиянию этого излучения в первую очередь.

Несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа Басова Н.В. заслуживает высокой оценки, так как является самостоятельным, законченным научным исследованием, содержащим новые и важные научные результаты.

Считаю, что диссертационная работа Басова Н.В. «Разработка и применение подхода к целевому метаболомному анализу методом ВЭЖХ-МС/МС на монолитной колонке на основе 1-винил-1,2,4-триазола» по объему, уровню выполнения, новизне, надежности и актуальности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а её автор, а ее автор, Басов Никита Вячеславович, заслуживает

присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент

Центалович Юрий Павлович

Доктор химических наук, специальность 02.00.04 – физическая химия,
главный научный сотрудник лаборатории протеомики и метаболомики Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Институт «Международный
томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН),
630090. г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

Электронная почта: yura@tomo.nsc.ru

Телефон: +7(383)3303136

«04» сентября 2026 г.



Ю.П. Центалович

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

Подпись Ю.П. Центаловича заверяю.

Ученый секретарь МТЦ СО РАН

К.Х.Н., Н.С.



Л.В. Яньшолё