

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Басова Никиты Вячеславовича

на тему **«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 учёной степени кандидата химических наук по специальности

1.5.4 - биохимия

Диссертационная работа Басова Никиты Вячеславовича посвящена разработке подхода к целевому метаболомному анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), сочетающего гидрофильное и обращённо-фазовое разделение. Разработанная аналитическая схема апробирована при исследовании плазмы и сухих пятен крови, тканей и клеточных культур, а также применена для выявления метаболических различий, связанных с воздействием ионизирующего и терагерцового излучения, послеоперационным делирием и глиобластомой.

Актуальность исследования обусловлена химическим разнообразием низкомолекулярных соединений, которое ограничивает охват целевого набора метаболитов при использовании одного механизма хроматографического удерживания. Гидрофильная и обращённо-фазовая хроматография взаимно дополняют друг друга, однако их совместное применение обычно требует смены колонок и условий анализа, что повышает трудоёмкость и может затруднять сопоставление результатов. Это делает актуальной разработку единой аналитической системы, сочетающей оба режима. Существенное значение имеет и проверка применимости такого подхода к биологическим объектам различной природы.

Научная новизна диссертации состоит в экспериментальном обосновании возможности последовательного анализа одной пробы в режимах гидрофильной и обращённо-фазовой хроматографии на монолитной колонке с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола без её замены и с использованием одной пары элюентов. Автор сопоставил охват целевого набора с результатами, полученными на коммерчески доступных колонках с октадецильной, пентафторфенилпропильной и аминопропильной фазами. При анализе плазмы крови предложенная схема позволила детектировать 398 переходов мониторинга множественных реакций (MRM), соответствующих 390 индивидуальным соединениям: 289 переходов в режиме гидрофильной и 109 - в режиме обращённо-фазовой хроматографии. Число детектированных соединений превышало соответствующие значения для каждой из сопоставленных коммерческих колонок.

Научная и практическая значимость работы определяется расширением охвата целевого метаболомного скрининга при суммарной продолжительности анализа одной пробы менее 30 мин. Предложенная схема может быть адаптирована к различным наборам MRM переходов и типам биологических образцов. Разработанный протокол пробоподготовки адгезивных клеточных культур обеспечивает воспроизводимое извлечение полярных метаболитов и липидов; для исследованных линий меланомы оптимальный охват достигался при использовании 400 000-500 000 клеток на пробу. Выявленные в клинических и экспериментальных образцах метаболические признаки могут быть использованы при планировании их дальнейшей проверки в расширенных независимых выборках.

Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка, 11 таблиц и 2 приложения. Она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Библиографический список включает 230 источников. Структура работы логична, а содержание соответствует заявленной теме, цели и сформулированным задачам.

Обзор литературы составляет примерно четвертую часть диссертации. В нём последовательно рассмотрены предпосылки развития метаболомики, современные аналитические методы, особенности хроматографического разделения метаболитов при ВЭЖХ-МС-анализе, физико-химические факторы удерживания и селективности в режимах гидрофильной и обращённо-фазовой хроматографии, а также существующие способы их объединения. Обзор подводит к постановке задачи и обосновывает выбор монолитного сорбента с дуальным механизмом удерживания.

Экспериментальная часть занимает около 10 % объёма диссертации. Материалы и методы изложены ясно; приведены условия, необходимые для понимания работы и воспроизведения основных экспериментов. Изложены все параметры как масс-спектрометрического детектирования и хроматографического разделения на монолитной колонке, допускающей работу в режимах гидрофильной и обращённо-фазовой хроматографии, так и методы пробоподготовки образцов плазмы, сухих пятен крови, тканей и клеточных культур; описаны статистическая обработка одномерными и многомерными методами, коррекция множественных сравнений и анализ метаболических путей.

Обсуждение результатов составляет около половины текста диссертации и охватывает как аналитические закономерности удерживания и детекции метаболитов, так и применение разработанного подхода к биомедицинским задачам. Автор характеризует поведение аминокислот, ацилкарнитинов, церамидов, фосфатидилхолинов и фосфатидилинозитолов в

двух режимах хроматографии и обосновывает их комплементарность. При анализе сухих пятен крови мышей после рентгеновского облучения выявлены 12 метаболитов, содержание которых изменялось во все исследованные сроки. В предоперационной плазме пациентов, у которых впоследствии развился послеоперационный делирий, обнаружено снижение содержания четырёх сфингомиелинов. При сравнении ткани глиобластомы и перитуморальной ткани выделены 22 потенциальных сигнатурных метаболита, включая церамиды и соединения, связанные с обменом кофермента А. Разработанный протокол клеточной пробоподготовки апробирован на линиях B16 и SK-MEL-28; при воздействии терагерцового излучения на клетки SK-MEL-28 выявлены изменения содержания 40 метаболитов, преимущественно связанных с пуриновым и пиримидиновым обменом. Автор обсуждает выявленные различия с учётом дизайна экспериментов и сопоставляет их с данными литературы.

Представленные выводы обоснованы полученными результатами, соответствуют цели и задачам исследования и отражают объём экспериментального материала. Достоверность результатов обеспечивается использованием биологических и аналитических повторов, контролем качества, статистической обработкой и сопоставлением с опубликованными данными. Автор выполнил основной объём хроматографических и масс-спектрометрических экспериментов, обработку и интерпретацию данных, участвовал в работе с биологическими образцами и подготовил текст диссертации.

В процессе ознакомления с диссертацией возникли следующие замечания и вопросы, которые требуют пояснения автора:

1. На странице 51 в разделе 2.8 при ссылке на условия хроматографирования вместо номера таблицы оставлен редакционный маркер «ААА».
2. На рисунке 5 оси и их подписи практически не читаются, что затрудняет оценку представленных хроматограмм. Целесообразно также указать соответствующие MRM-переходы для приведённых соединений.
3. В подписи к рисунку 8 на странице 69 после сокращения «Рис» отсутствует точка.
4. В подписи к рисунку 11 следует уточнить способ нормировки: указать, что площади пиков для каждого сфингомиелина нормировали по максимальному значению.
5. При оценке метаболомного охвата клеточных образцов в анализ включали пики с отношением сигнал/шум не менее 5. Чем обоснован выбор именно этого порога, а не значений 3 или 10, обычно используемых соответственно для качественной и количественной оценки? Каким образом этот критерий следует переносить на другие биологические матрицы, приборы и наборы данных?

6. Чем обусловлен выбор теста Куккони для оценки различий между тканью глиобластомы и перитуморальной тканью при наличии ряда более распространённых статистических критериев? Какие особенности распределения полученных данных делают тест Куккони предпочтительным для данной выборки и как его чувствительность одновременно к положению и масштабу распределений влияет на биологическую интерпретацию результатов?
7. Можно ли на основании полученных *in vitro* данных сделать вывод о безопасности терагерцового излучения для живых организмов и человека? Если такой вывод выходит за пределы использованной модели, то какой общий биологический вывод об эффектах терагерцового излучения можно сформулировать в рамках исследованных параметров воздействия и клеточной линии SK-MEL-28?

Перечисленные замечания относятся преимущественно к оформлению и обоснованию отдельных методических решений. Они не снижают общей положительной оценки работы и не влияют на достоверность её основных результатов.

Диссертационная работа Басова Н. В. представляет собой завершённое самостоятельное исследование, выполненное на современном научно-методическом уровне. Разработанный подход сочетает два комплементарных режима хроматографического разделения на одной монолитной колонке и обеспечивает расширенный охват целевого набора метаболитов. Его работоспособность показана на биологических образцах различного происхождения, а полученные данные имеют научную и практическую значимость для дальнейших метаболомных исследований.

По материалам диссертации опубликованы 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и тезисы 12 докладов. Результаты представлены в 5 устных докладах на следующих конференциях: Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2019); «Ломоносов» (Москва, 2022); «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2022 и 2023) и International Symposium «Medicinal Chemistry and Biomedical Materials Science» (Самарканд, 2025). Публикации и апробация достаточно полно отражают основные результаты исследования.

Всё вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объёму и новизне полученных результатов, их научной и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН для диссертаций, представленных на соискание учёной степени кандидата наук, а также критериям, определённым пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Институте

химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН. Автор диссертации Басов Никита Вячеславович заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 - биохимия.

Ведущий научный сотрудник, руководитель ЦКП
«Центр масс-спектрометрического анализа»
ИХБФМ СО РАН, доктор химических наук

Черноносков А. А.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8
Телефон: (383) 363-51-50
Факс: (383) 363-51-53
Эл. адрес: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись Черноносова Александра Анатольевича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук, к.б.н.



Е.Б. Логашенко

10 сентября 2026 г.