

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Черносова Александра Анатольевича «Развитие масс-спектрометрических подходов для решения задач целевой и нецелевой метаболомики», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

Современная масс спектрометрия (включая подходы, методы, инструментальное оснащение, специализированное программное обеспечение) играет центральную роль как самая мощная аналитическая методология в развитии наук о жизни, в частности, целого ряда возникших достаточно недавно так называемых «омикс»-наук (дисциплин и технологий). В исторически первой из этих дисциплин, геномике, основными аналитическими методами являются методы биохимического секвенирования, методами масс-спектрометрии (МС) решаются частные задачи анализа олигонуклеотидов, так наз. однонуклеотидный полиморфизм, анализ пост-трансляционных модификаций. Во всех остальных «омикс»-науках, а их уже несколько десятков (протеомика, пептидомика, метаболомика, липидомика, гликомика, интерактомика et cetera) - применение методов и подходов МС являются определяющими. По сравнению с более устоявшимися омическими науками, такими как геномика или протеомика, метаболомика имеет дело с гораздо более сложными и разнообразными объектами и менее проработана. Метаболомика позволяет составить подробный профиль метаболитов данного образца с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС), который обеспечивает непревзойденную чувствительность и динамический диапазон. Следует также упомянуть важность применения методов ЯМР-спектроскопии и ГЖХ/МС в решениях метаболомных задач при анализе высококонцентрированных и неполярных метаболитов. Метаболомика стала важным инструментом в биомедицинских исследованиях для анализа биологических жидкостей и/или для поиска биомаркеров, а также получила широкое распространение в исследованиях новых природных соединений и в экологии. В настоящее время охарактеризованы и задокументированы около 450 тыс. метаболитов. Метаболомика продолжает оставаться быстрорастущей областью исследований.

Рецензируемая диссертация в виде научного доклада посвящена развитию масс-спектрометрических подходов для решения задач целевой и нецелевой метаболомики. Автор, А.А. Черносов, проводит ряд биохимических и биомедицинских исследований по количественному определению лекарственных препаратов в плазме крови при проведении доклинических и клинических исследований, разрабатывает и оптимизирует

методы количественного анализа фармацевтических препаратов и их комплексов с арабиногалактаном для задач фармакокинетики, разрабатывает и валидирует методы масс-спектрометрического анализа лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови, развивает диагностические методы с использованием МС для метаболомных задач, проводит метаболомный анализ профилей нескольких лекарственных растений с целью выявления соединений с потенциальной биологической активностью и поиск в плазме крови биомаркеров психических заболеваний. При выполнении диссертационного исследования соискатель применил различные варианты масс-спектрометрии (МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) и методы тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Нужно отметить, что автор структурировал представление своей работы с точки зрения решения задач целевой и нецелевой (глобальной) метаболомики. Такое представление позволяет логично объединить в одно исследование несколько разноплановые по направлениям исследования и подчеркнуть важность и многообещающие перспективы применения методов новой научной дисциплины – метаболомики. В связи с вышеизложенным, диссертационное исследование А.А. Черносова «Развитие масс-спектрометрических подходов для решения задач целевой и нецелевой метаболомики» нельзя не признать важным и актуальным направлением в биохимии. Диссертационная работа в виде научного доклада написана на 52 стр., экспериментальные данные представлены в 12 таблицах и на 24 рисунках. Структурно автореферат диссертации состоит из вводного раздела «Общая характеристика работы» и основной части «Содержание работы», включающей введение и два основных раздела. Завершают автореферат заключение, выводы и список основных публикаций по теме диссертации.

Общая характеристика работы включает обоснование актуальности проблемы, цели и задачи исследования, обоснование научной новизны и практической и теоретической значимости работы, формулировки основных положений, выносимых на защиту, данные о публикациях (28 научных статей по теме работы и один патент перечислены в списке, приведенном в конце автореферата). В этом разделе даны также сведения о личном вкладе автора, об апробации диссертации и о вкладе в работу соавторов и коллег (благодарностей нет, странно). Этот раздел работы дает представление об актуальной и достаточно сложной проблеме качественного и количественного определения аналитов в сложных биологических матрицах, на решение которой были направлены усилия соискателя. Необходимо было показать и использовать возможности, которые представляют разные методы и подходы современной масс-спектрометрии в целевой и глобальной (нецелевой) метаболомике. Автор показывает эффективность

применения метаболомных методов в доклинических и клинических исследованиях лекарственных препаратов, многокомпонентном скрининге сложных образцов, в определении потенциальных биомаркеров различных заболеваний. Автор выделяет и решает на конкретных примерах проблему анализа проб малых и сверхмалых объемов (нанограммовые и пикограммовые количества вещества) путем улучшения эффективности существующих методов экстракции веществ из биологических жидкостей и оптимизации масс-спектрометрических подходов. С другой стороны, в рецензируемой работе описано применение методов нецелевой метаболомики для выявления потенциальных биомаркеров психических заболеваний и определения состава экстрактов лекарственных растений для поиска биологически активных метаболитов с помощью масс-спектрометрии высокого и низкого разрешения.

Основные результаты исследований приведены в первом, самом большом разделе диссертационной работы «Использование масс-спектрометрии для решения задач целевой метаболомики». В первой главе этого раздела автор разрабатывает проблему количественного определения лекарственных препаратов при проведении доклинических и клинических исследований, а именно, подбор и оптимизацию масс-спектрометрических методов для анализа аналитов в плазме крови. Были разработаны методы определения фармакокинетического профиля варфарина, изучено влияние генотипа (мутаций генов CYP2C9 и C+1173T VKORC1) пациентов на метаболизм варфарина. Определение варфарина производилось методом прямого ввода (вкола – авт.) на масс-спектрометре с тройным квадруполом Agilent 6410 в режиме мониторинга выбранного иона (selected ion monitoring, SIM) с регистрацией депротонированной молекулы варфарина [M-H]⁻ при m/z 307. С помощью описанного метода были проанализированы образцы плазмы крови пациентов ($n = 18$), которые отбирали через 1, 2, 3, 8, 24, 36 и 48 ч после приема 5 мг варфарина перорально. Аналогичный, но несколько модифицированный подход с учетом снижения объемов образца плазмы крови в 10 раз, был использован автором для изучения способов доставки варфарина в виде его комплексов с арабиногалактаном. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM, переходы m/z 307→161, m/z 341→161 внутр. стандарт). Было показано, что введение варфарина в виде комплекса с арабиногалактаном является более безопасным с точки зрения снижения риска развития кровотечений и накопления варфарина в организме. Аналогичной была задача по разработке количественного масс-спектрометрического метода анализа для сравнения фармакокинетических профилей препарата нифедипина и его комплекса с арабиногалактаном. Анализ проводили методом прямого ввода в режиме мониторинга нескольких реакций (MRM), регистрировали

переходы отрицательно заряженных ионов с m/z 345,1→222 для нифедипина и m/z 387,1→263,9 для нисолдипина (внутренний стандарт). В результате было показано различие в гипотензивном действии свободного нифедипина и его комплекса с арабиногалактаном на линиях крыс НИСАГ и установлено, что доза приема нифедипина может быть минимизирована при использовании его комплекса с арабиногалактаном.

В главе «Применение масс-спектрометрического метода для анализа препарата тековиримат при проведении доклинических и клинических исследований его пролекарства НИОХ-14» автор решает несколько важных и нестандартных задач пробоподготовки и разработки чувствительных методов количественного анализа препарата НИОХ-14, который был разработан исследователями из Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН и ГНЦ ВБ «Вектор» и является аналогом тековиримата, первого препарата в мире для лечения натуральной оспы, и обладает сравнимой с ним активностью в отношении ортопоксвирусов. Автор приходит к естественной и интересной идее анализа НИОХ-14 по его первичному метаболиту – тековиримату. Первоначально анализ проводился в режиме регистрации отрицательных ионов на масс-спектрометре с тройным квадруполом, используя метод SIM с регистрацией ионов m/z 375 (тековиримат) и m/z 337 (N-98, внутренний стандарт), затем, для увеличения селективности метода и надежности, был применен метод MRM, с регистрацией переходов m/z 375→283 (тековиримат), m/z 337→245 (N-98). Оптимизация метода привела к улучшению аналитической чувствительности с 5 до 0,47 нг. Сравнение фармакокинетики НИОХ-14 и тековиримата показало, что фармакокинетические профили при приеме субстанции НИОХ-14 соответствовали профилям самого тековиримата. Для клинических исследований потребовалась переработка метода анализа в части снижения диапазона анализируемых концентраций, а также проведение его валидации. Для увеличения чувствительности метода добавили хроматографическое разделение, кроме того, для каждого аналита количество переходов в режиме MRM было увеличено до трех. В итоге, метод был полностью валидирован в соответствии с рекомендациями Европейского агентства по лекарственным средствам для валидации биоаналитических методов. На следующем этапе был разработан более чувствительный метод мониторинга параллельных реакций (PRM) препаратов НИОХ-14, тековиримата и внутреннего стандарта N-98. Важно отметить, что аналитическая чувствительности нового метода (17 пг) была эквивалентна чувствительности для разработанного ранее MRM метода, что является существенным достижением.

В следующей главе «Разработка методов масс-спектрометрического анализа лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови» автор переходит от анализа

варфарина в плазме крови к определению варфарина в сухих пятнах плазмы крови, что привело к необходимости разработки соответствующего метода количественного определения. Для стандартизации измерений из сухого пятна плазмы крови вырезали диск диаметром 3,2 мм, что соответствует 1,6 мкл плазмы крови, тогда как ранее для анализа использовали 100 мкл плазмы крови. Проводили хроматографическое разделение с общим временем анализа 5 минут. Анализ проводили на масс-спектрометре с тройным квадруполем в режиме регистрации отрицательных ионов, регистрируя MRM переходы m/z 307→161 (варфарин) и m/z 341→161 (внутренний стандарт). Разработанный метод был валидирован согласно рекомендациям Европейского агентства по лекарственным средствам для валидации биоаналитических методов. Данный метод позволяет оперировать небольшими объемами плазмы крови, а аналитическая чувствительность метода составила 5 пг вещества, что делает данный метод более чувствительным, чем вышеописанные методы по определению варфарина в плазме крови.

В главе «Комбинация методов tandemной масс-спектрометрии высокого и низкого разрешения при разработке и валидации методов анализа на примере препаратов атенолол и аписабан» автор использует сочетание методов масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения. Сначала детально подбирались условия экстракции препаратов из сухих пятен плазмы крови на МС с тройным квадруполем, а затем оптимальные условия использовались для разработки и валидации количественного определения препаратов методом МС высокого разрешения в режиме параллельного мониторинга реакций (PRM). Для аписабана наблюдался интересный факт – масса фрагмента (m/z 461.1795) была больше массы целой молекулы (m/z 460.1975). С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения было показано, что происходит отрыв NH_3 группы с одновременным присоединением молекулы воды. Методы были валидированы согласно рекомендациям Европейского агентства по лекарственным средствам, что позволяет использовать эти методы в различных клинических исследованиях.

В главе «Расширение применимости подходов масс-спектрометрического анализа аминокислот и ацилкарнитинов» описаны разработанные автором методы количественной оценки свободных аминокислот в продуктах и готовых блюдах, при разработке лечебно-профилактического питания с питательными веществами в легкоусвояемой форме. Были подобраны условия экстракции аминокислот и ацилкарнитинов из жидких и твердых образцов и разработан соответствующий МС анализ (MRM режим, прямой ввод). В результате были разработаны рецепты готовых продуктов лечебно-профилактического питания, анализ которых подтвердил существенное увеличение концентрации свободных аминокислот. Установлено, что рост концентрации интересующих свободных

аминокислот составлял от 1,5 до 20 раз в продуктах, обработанных специальным образом, и в приготовленных из них блюдах. Новые образцы продукции рекомендуется употреблять людям с аллергической реакцией на белок бобовых, а также в рационе здоровых людей для повышения доли усвоения растительного белка.

МС анализ аминокислот и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови первоначально разрабатывался для определения ряда наследственных заболеваний. Автор использует модификацию этого метода для поиска биомаркеров психических заболеваний. Были проанализированы сухие пятна плазмы крови 37 пациентов с шизофренией и 36 здоровых добровольцев для определения концентрации 13 и 30 ацилкарнитинов. Было установлено, что у больных шизофренией снижена концентрация аминокислот валина, аспартата, цитруллина, глицина, аргинина и орнитина, а также ряда ацилкарнитинов и повышена концентрация ацилкарнитина C4DC по сравнению с контрольной группой. Используя метод анализа метаболических путей на онлайн-ресурсе, автором была обнаружена связь найденных нарушений с активностью карнитинпальмитилтрансферазы I. Изменения активности данного фермента наблюдаются при неврологических и психических заболеваниях, в основном связанных с нарушением баланса инсулина в головном мозге, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и шизофрения. Принимая во внимание данные исследования и результаты других научных групп, было высказано предположение, что короткоцепочечные ацилкарнитины могут играть особую роль в регуляции энергетического обмена у больных параноидной шизофренией

Глава «Масс-спектрометрические подходы для решения задач нецелевой метаболомики» посвящена разработке методик анализа метаболомного профиля растений с помощью тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения с целью идентификации и сравнения фенольного состава листьев двух популяций растения *M. bracteata*, произрастающих в разных географических регионах. Было найдено и подтверждено 17 соединений.

В главе «Исследование метаболомного профиля растений с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения для выявления соединений с потенциальной биологической активностью» приведены данные по определению состава экстрактов растений рода *Rhododendron* и видов *Spiraea hypericifolia* (Rosaceae), *Eranthis longistipitata* (Ranunculaceae), которые выполнялись с использованием МС высокого разрешения. Поиск и идентификация метаболитов осуществлялась по базе данных mzCloud (<https://www.mzCloud.org>) и поисковой системе ChemSpider. Масс-спектры экстрактов были получены в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов с использованием метода полного сканирования с датазависимым тандемным

режимом (FS-dd-MS2). В результате для *Rhododendron* sp. удалось обнаружить 132 соединения, из которых 88 были идентифицированы по базе данных. Двадцать семь из 132 соединений были обнаружены впервые. В листьях *Eranthis longistipitata* (Ranunculaceae) было обнаружено более 160 соединений, из которых 72 идентифицированы на уровне класса и 58 – на уровне отдельных соединений. Из них 49 соединений были определены по базе данных mzCloud, а остальные с помощью поиска «ChemSpider» и подтверждались литературными данными или стандартами сравнения. Обнаружено, что концентрация гликозидов кверцетина, гиперозида и рутина в листьях *E. longistipitata* была выше, чем соответствующих агликонов. При изучении *Spiraea hypericifolia* (Rosaceae) акцент был сделан на определении кверцетина и его производных. В результате было обнаружено 10 соединений, из которых 8 были определены по базе данных mzCloud, а остальные с помощью стандартов сравнения.

Заключительная глава посвящена поиску потенциальных биомаркеров заболеваний в плазме крови с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения для выявления пациентов, страдающих депрессией. Были проанализированы образцы плазмы крови 60 человек, из которых 30 входили в группу сравнения (здоровые доноры), а 30 были пациентами с диагнозами F3211 и F3311. Проведя фильтрацию элементов и последовательный анализ данных, автору удалось разделить группы больных с диагнозами депрессии и здоровых доноров. Такого разделения удалось достичь, сократив число сравниваемых соединений до 32 (из 1072 первоначально), из которых только 4 были определены по точной массе и фрагментам в базе данных, 14 были предварительно определены по точной массе, для 10 соединений была определена только возможная брутто-формула, а 4 соединения определить не удалось. Концентрации этих индивидуальных соединений достоверно отличались между группами пациентов и здоровых доноров ($p < 0.05$). У групп пациентов с диагнозами F3211 и F3311 значимых различий не было обнаружено. Автор делает вывод, что, применяя такой подход, в принципе, можно выявлять наборы метаболитов (панели биомаркеров), которые могут быть использованы в целях диагностики (для постановки или уточнения диагноза заболеваний).

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

Замечания

Существенных недостатков в представленной диссертационной работе нет. Однако есть ряд замечаний, на которые хотелось бы обратить внимание.

К сожалению, автор не приводит в начале реферата расшифровку хотя бы основной части используемых сокращений (MRM, SRM, PRM SIM, например) и их русских аббревиатур. В итоге он сам в нескольких случаях неточно их использует. Так, на стр.11 вместо SIM режима у автора SRM режим.

Иногда по тексту автор использует интуитивно понятные, но все-таки не точные формулировки и термины. Например, «ион целой молекулы» вместо правильного «депротонированная или протонированная молекула», «режим положительных ионов» вместо правильного «режим регистрации положительных ионов».

Редко, но встречаются опечатки по тексту, например, стр.14, третья строка снизу вместо нифедипина у автора атенолол.

В случае с тековириматом и НИОХ-14 для увеличения чувствительности использовали ВЭЖХ, почему не использовали ВЭЖХ для этих же целей в случае варфарина и нифедипина?

Автор слишком часто по тексту приводит полное название используемого прибора, создается впечатление, что автор его рекламирует. На мой взгляд, достаточно указать тип.

Высказанные замечания и небольшие недостатки не снижают общего положительного впечатления от диссертации и не вызывают сомнений в достоверности полученных А.А. Черносовым результатов и обоснованности его выводов.

Заключение

Представленная на соискание ученой степени доктора химических наук диссертация Черносова Александра Анатольевича 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 докторским диссертациям, а её автор, Черносов Александр Анатольевич, заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

Официальный оппонент,

Дмитренко Павел Сергеевич

Доктор химических наук, специальность 1.4.9 – биоорганическая химия, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанского

института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Контактные данные

Почтовый адрес: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова 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

«15 » августа 2023 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. , н.с.



К.Л. Борисова

«15 » августа 2023 г.