

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Черноусова Александра Анатольевича «Развитие масс-спектрометрических подходов для решения задач целевой и нецелевой метаболомики», представленной в виде научного доклада на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Актуальность работы

В эпоху Big Data медицинские исследования во многом характеризуются широким применением системной биологии, основываются на глобальном анализе биологических образцов с использованием аналитических подходов биоинформатики. Проводится комплексная оценка эндогенных метаболитов с последующим систематическим выявлением и количественным определением метаболитов из конкретного биологического образца. Метаболиты представляют собой разнообразную группу низкомолекулярных структур, включающую липиды, аминокислоты, пептиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, витамины, тиолы и углеводы, что делает единовременный глобальный анализ сложной задачей. Из-за сложности метаболома и разнообразных свойств метаболитов ни одна аналитическая платформа не может быть применена для обнаружения всех метаболитов в биологическом образце. Только комбинированное использование современных инструментальных аналитических подходов позволило увеличить спектр изучаемых метаболитов. Длительное время в основе метаболомных исследования лежало хроматографическое разделение низкомолекулярных соединений, выделенных из биологических образцов, с последующим установлением структуры индивидуальных соединений методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Однако данный подход является чрезвычайно трудоемким. Существенного прогресса в метаболомных исследованиях удалось достигнуть с развитием масс-спектрометрии, особенно в сочетании с жидкостной хроматографией (ЖХ-МС). Масс-спектрометрический анализ в сравнении с ЯМР обладает гораздо более высокой чувствительностью и в сочетании жидкостной хроматографией позволяет детектировать сотни соединений из одного образца. В то же время применение данного метода затруднено в случае, когда требуется определение абсолютных концентраций конкретных соединений в исследуемых образцах, что является, например, крайне важным в случае изучения

фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов. Особенно это становится актуальным на начальных этапах доклинических испытаний, когда испытания проводятся на небольших лабораторных животных, что существенно ограничивает объем образцов забираемых для анализа.

В связи с выше сказанным, диссертационная работа Черноносова А.А. направленная на разработку и оптимизацию применения масс-спектрометрических методов для количественного и качественного определения низкомолекулярных соединений в биологических образцах, а также применение этих методов для решения конкретных задач в том числе в медицинских исследованиях, безусловно является актуальной.

Общая характеристика и содержание работы

Диссертационная работа Черноносова А.А. представлена в виде научного доклада, изложена на 52 страницах и состоит из введения, двух глав, описывающих полученные результаты, заключения, выводов и списка основных публикаций по теме диссертации, насчитывающий 29 работ. Представленные результаты иллюстрированы 24 рисунками и включают 11 таблиц.

В общей части автор обосновывает актуальность работы, формулирует цели и задачи исследования, научную новизну, значимость выполняемой работы, формулирует основные положения, выносимые на защиту, описывает личный вклад автора. Содержательная часть начинается с краткого введения, в котором автор рассмотрены объекты исследования, формулируя наиболее важные проблемы метаболомных исследований.

Первая глава исследований посвящена применению масс-спектрометрии для решения задач целевой метаболомики, в первую очередь количественному определению содержания лекарственных препаратов (варфаварин, нифидипин, тековиримататенолол, апиксабан, тековиримат и НИОХ-14) в плазме крови человека. В главе автор уделяется большое внимание оптимизации методов пробоподготовки, делая акцент на анализ содержания лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы/сыворотки крови. Приводит результатов ЖХ-МС измерений. Заключительная часть первой главы посвящена количественному определению аминокислот и ацилкарнитинов в биологических образцах. Особый интерес в данной части работы вызывает сравнительный анализ образцов плазмы крови здоровых

людей и пациентов с шизофренией, что может иметь важное значение как для диагностики, так и для изучения нарушений важных метаболических путей в случае патологии.

Вторая глава посвящена работам в области нецелевой метаболомики. В работе приводятся метаболомные профили экстрактов из листьев лекарственных растений с использованием тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения и масс-спектрометрии высокого разрешения. Описываются особенности пробоподготовки. Методы нецелевой метаболомики были также применены для сравнительного анализа образцов плазмы крови здоровых людей и пациентов, страдающих депрессией. Были установлены достоверные различия в этих двух группах. Для части метаболитов, с привлечением баз данных, были установлены структуры, для других были определены брутто-формулы.

В заключении диссертации сформулированы итоги проведенных исследований и перспективы дальнейших исследований в данном направлении.

Выводы диссертации логично вытекают из результатов проведенных исследований и соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна работы заключается в применении современных масс-спектрометрических методов в решении медицинских фармакологических задач в рамках проведения доклинических испытаний лекарственных препаратов (варфаварин, нифидипин, тековиримататенолол, апиксабан, тековиримат и НИОХ-14). Показана перспектива применения методов целевой и нецелевой метаболомики для диагностики заболеваний, связанных с нарушением работы головного мозга. Установлены метаболомные профили экстрактов из листьев лекарственных растений *Myricaria Bracteata*, *Rhododendron*, *Eranthis longistipitata*.

Научная и практическая значимость работы.

Разработанные в ходе работы подходы (в первую очередь разработанные методы пробоподготовки) могут быть использованы для изучения фармакокинетики и фармакодинамики в рамках доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов. Полученные результаты для препарата НИОХ-14 могут иметь практическое значение для разработки и внедрения отечественного аналога тековиримата. Полученные результаты по фармакокинетики варфарина и нифедрипина при различных способах доставки также может послужить основой

для создания новых форм этих лекарственных препаратов. Практическая значимость также подтверждается наличием патента по результатам проведенных исследований.

Достоверность и обоснованность результатов.

Достоверность результатов обусловлена применением современных масс-спектрометрических методов не вызывает сомнения. Основные результаты исследований опубликованы в 29 статьях в авторитетных международных и российских изданиях рекомендованных ВАК и неоднократно обсуждались на российских и международных конференциях.

Замечания

Работа лишена принципиальных недостатков, тем не менее, хотелось бы высказать следующие замечания. Начиная с формулировки целей и задач и далее по тексту автор постоянно использует выражения «разработка методов масс-спектрометрии...», «разработка масс-спектрометрических подходов...». Безусловно, пробоподготовка играет важную роль в метаболомных исследованиях методом масс-спектрометрии, что автор и продемонстрировал в своей работе, но можно ли разработку методик пробоподготовки называть «разработкой метода масс-спектрометрии»? То же самое можно сказать и о «разработке масс-спектрометрических подходов». По-видимому, в самом начале изложения стоило конкретизировать, что подразумевается под разработкой методов и подходов.

В работе автор большое внимание уделяет анализу лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови, при котором достигается большая чувствительность по сравнению с анализом непосредственно в плазме крови. При этом автор не объясняет возможных причин. В работе автор приводит объем наносимой на подложку плазмы крови (30 мкл) и диаметр вырезаемого образца (3,2 мм), что по утверждению автора соответствует 1,6 мкл плазмы. То есть берется приблизительно чуть больше 1/20 от площади пятна. Поскольку в качестве подложки используется бумага, для низкомолекулярных соединений при нанесении, безусловно, будет наблюдаться неравномерное распределение за счет хроматографического эффекта. Учитывал ли автор это в своей работе? Не происходила ли концентрация исследуемого препарата за счет того же эффекта? Как будет влиять на точность измерения местоположение отбора образца?

Несмотря на некоторые вопросы, диссертационная работа Черноносова А.А. заслуживает высокой оценки.

Заключение

Представленная на соискание ученой степени доктора химических наук диссертация Черноносова Александра Анатольевича «Развитие масс-спектрометрических подходов для решения задач целевой и нецелевой метаболомики», выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой, совокупность результатов которой может быть охарактеризована как существенный вклад в такую область биоорганической химии как применение целевой и нецелевой метаболомики в биомедицинских целях. Диссертационная работа по объему, качеству выполнения, актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертационная работа в виде научного доклада оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Черноносов Александр Анатольевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией органического синтеза Института химической биологии и Фундаментальной медицины СО РАН,

Д.х.н., г.н.с.,

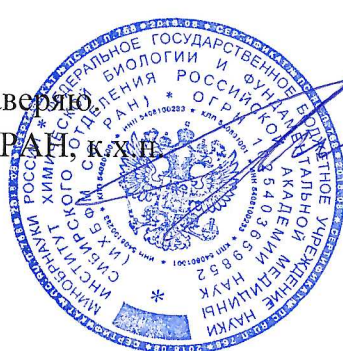


В.Н. Сильников

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН) 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8. Тел.: (383)363-51-82 E-mail: silnik@niboch.nsc.ru

Подпись В.Н. Сильникова заверяю

Зам. директора ИХБФМ СО РАН, к.х.н.



П.Е Пестряков