

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Актуальность работы.

Метаболомика является самой молодой из так называемых «омиксных» дисциплин, бурно развивающихся в пост-геномную эпоху. Метаболомика исследует совокупность низкомолекулярных соединений, присутствующих в тканях человека, животных и растений. Особенностью метаболома по сравнению с геномом, транскриптомом и протеомом является его высокая мобильность и изменчивость в зависимости от целого ряда внешних и внутренних факторов, включая генетические особенности, возраст, питание, экологическая обстановка, наличие заболеваний и т.д. Это открывает широкие возможности для практического использования метаболомики в медицине, в частности, в диагностических целях, а также для выявления эффективности применения лекарственных средств. Основными платформами для метаболомных исследований являются ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС). Метод ЖХ-МС является гораздо более чувствительным, и позволяет детектировать сотни соединений в типичном биологическом образце, однако полученные результаты, как правило, имеют полуколичественный характер (соотношение концентраций метаболитов в экспериментальном и контрольном образцах). Получение абсолютных значений концентраций требует либо использования изотоп-замещенных стандартов, либо построение калибровочных кривых для каждого исследуемого соединения. Метод ЯМР гораздо менее чувствителен, зато позволяет легко устанавливать количественные значения концентраций метаболитов в образце. Таким образом, развитие методов современной метаболомики предполагает повышение чувствительности, и, как следствие, идентификации и квантификации большого количества соединений.

Диссертация Черноносова А.А. направлена на разработку и оптимизацию масс-спектрометрических методов для количественного и/или качественного определения низкомолекулярных соединений в биологических образцах, а также применение этих методов для решения конкретных фундаментальных и прикладных задач. Эти задачи разделяются на два класса: прицельная метаболомика, направленная на максимально чувствительное и точное установление концентрации конкретного соединения или группы соединений в образце, и неприцельный подход, направленный на идентификацию и квантификацию максимального

числа метаболитов в ткани. Прицельный подход в данной работе применялся в первую очередь для исследования фармакокинетики лекарственных соединений (варфарина, нифедипина, тековиримата, атенолола и апиксабана) в образцах крови, а неприцельный – для установления панели метаболитов, концентрация которых в крови меняется с развитием психических заболеваний, а также для определения состава экстрактов растений. Таким образом, актуальность темы работы Черноносова А.А. не подлежит сомнению.

Научная новизна работы в первую очередь заключается в применении современных масс-спектрометрических подходов к решению задач медицины и фармакологии. Автору впервые удалось установить фармакокинетические параметры лекарственных соединений варфарина и нифедипина при различных способах доставки этих соединений, оптимизировать методы регистрации и квантификации препаратов тековиримат, НИОХ-14, атенолол и апиксабан в плазме крови, а также установить метаболомные профили экстрактов из листьев лекарственных растений, включая *M. bracteata*, *E. Longistipitata* и *S. hypericifolia*.

Научная и практическая ценность работы.

Разработанные в работе подходы могут быть успешно применены к доклиническим и клиническим фармакокинетическим исследованиям, а также использованы для оценки эффективности лекарственных препаратов и способов их доставки. Полученные в работе данные для тековиримата и его пролекарства, российского препарата НИОХ-14, весьма полезны для практического применения этих препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту, заключаются в следующем:

Разработаны методы масс-спектрометрического исследования биологических образцов, позволяющие с высокой степенью чувствительности и специфичности регистрировать эндогенные и экзогенные метаболиты даже в сверхнизких объемах плазмы крови. ЖХ-МС метод, развиваемый автором, успешно применен для решения задач как прицельной (регистрация и квантификация лекарств в крови), так и неприцельной (метаболомный профиль экстрактов листьев лекарственных растений) метаболомики.

Диссертационная работа хорошо оформлена, написана грамотным языком с небольшим количеством грамматических и стилистических ошибок, изложена на 54 страницах, состоит из Общей характеристики работы, Содержания работы, Выводов и Списка публикаций автора по теме диссертации в количестве 29 наименований. Работа включает 11 таблиц и 24 рисунка.

В Общей характеристике работы обосновывается актуальность проблемы, формулируются цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая

значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, а также описывается личный вклад автора и приводится список конференций, на которых работа была апробирована в виде устных докладов.

Раздел «Содержание работы» начинается с краткого введения, в котором автор описывает наиболее важные методологические проблемы в метаболомных исследованиях, обусловленные разнообразием как самих метаболитов и их физико-химических свойств, так и их концентраций в различных тканях.

Первая глава данного раздела посвящена в первую очередь измерению концентрации лекарственных препаратов в плазме человеческой крови. В главе приводятся результаты оптимизации методов пробоподготовки и ЖХ-МС измерений для целого ряда лекарств различного действия (варфарина, нифедипина, тековиримата, атенолола, апиксабана, НИОХ-14 и тековиримата) в плазме крови, а также результаты фармакокинетических исследований для этих соединений. Особый интерес вызывает часть работы, связанная с различными способами доставки лекарственных препаратов: либо в чистом виде, либо в комплексе с арабиногалактаном. Показано, что концентрация варфарина в комплексе с арабиногалактаном возрастает более плавно, чем в случае свободного варфарина, что является более безопасным с точки зрения снижения риска развития кровотечений и накопления варфарина в организме. Для другого лекарства, гипотензивного препарата нифедипина, установлено, что его доза, необходимая для снижения артериального давления, может быть минимизирована при использовании его комплекса с арабиногалактаном.

Во второй части первой главы приведены результаты масс-спектрометрического анализа лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови. Главным достоинством этого метода является простота транспортировки образцов от места забора крови к месту анализа, не требующая использования криогенной техники. Особенностью метода является очень низкий объем исследуемого образца: по оценке автора, при используемом размере вырезаемого из бумаги диска объем образца соответствовал 1.6 мкл плазмы. В данной работе, основной упор был сделан на оптимизацию процесса пробоподготовки и получения МС-спектров для надежной регистрации и квантификации препаратов атенолол и апиксабан. В результате были достигнуты значения аналитической чувствительности метода в 0.43 пг и 0,85 пг для атенолола и апиксабана, соответственно.

Последняя часть первой главы описывает работы по количественному измерению содержания аминокислот и ацилкарнитинов в биологических образцах, а также сравнению метаболомных профилей образцов, отличающихся по избранному признаку. В качестве объектов исследования выступали два типа биологических образцов: биомасса гороха и плазма человеческой крови. В первом случае проводилось сравнение биомасса гороха и

гидролизата биомассы гороха. Показано, что хлебобулочные изделия с использованием гидролизата содержат гораздо более высокое количество свободных аминокислот, что позволяет разрабатывать рецепты готовых продуктов лечебно-профилактического питания с питательными веществами в легкоусвояемой форме. Масс-спектрометрический анализ был также применен к поиску биомаркеров психических заболеваний в плазме крови. С этой целью проводился сравнительный анализ образцов крови здоровых людей и пациентов с шизофренией. Установлены статистически достоверные различия в концентрациях ряда аминокислот и ацилкарнитинов между группами, свидетельствующие о нарушениях в специфических метаболических путях, важных для нормального функционирования головного мозга.

Вторая глава раздела посвящена работам в области нецелевой метаболомики, направленной на экстракцию, идентификацию и квантификацию максимально возможного количества метаболитов в образце. В работе приводятся результаты метаболомного профилирования экстрактов из листьев лекарственных растений с использованием двух подходов: тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения и масс-спектрометрии высокого разрешения. Показано, что оба метода позволяют проводить как качественное детектирование метаболитов в растительных экстрактах, так и их количественный анализ. Последняя процедура требует наличия стандартов сравнения.

Нецелевой подход был также применен для сравнительного анализа образцов крови здоровых доноров и пациентов, страдающих депрессией. Были установлены метаболомные различия в этих двух группах, и установлены структуры или брутто-формулы для части метаболитов различия. Показано, что по совокупности результатов метаболомного анализа можно предполагать диагноз заболевания.

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 Черноносовым А. А. лично или при его непосредственном участии. Выводы работы являются обоснованными.

Диссертация Черноносова А. А. 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.

Вместе с тем, рецензируемая работа вызывает несколько вопросов:

- По всему тексту диссертации автор злоупотребляет выражением «разработан метод». На взгляд рецензента, это выражение применимо либо к совершенно новому методу, либо при применении принципиально новых компонентов к существующим методам. Подбор соотношения компонентов экстрагирующего раствора или элюентов для хроматографии, оптимизация параметров хроматографического разделения или масс-спектрометрического детектирования для конкретных соединений должны называться «оптимизация разработанных ранее методов» или «разработка лабораторных протоколов».

- При сравнении результатов метаболомного анализа плазмы крови и сухих пятен плазмы чувствительность второго метода оказалась заметно выше, чем первого. На стр. 32 автор утверждает, что «Значение уровней сигналов при экстракции из сухих пятен плазмы/сыворотки крови выше, а погрешность измерения – ниже, чем при экстракции из самой плазмы/сыворотки крови». Для рецензента это непонятно. Добавление процедур высушивания плазмы на бумаге, вырезания сухого пятна и экстракция метаболитов из этого пятна должны привести только к дополнительной потере метаболитов, т.е. снижению чувствительности, и увеличению разброса полученных результатов, т.е. повышению погрешности. Автору следовало бы предложить разумное объяснение, почему в эксперименте наблюдается прямо противоположный эффект. Возможно, этот эффект обусловлен некорректным определением количества плазмы крови (1.6 мкл) в вырезаемом пятне диаметром 3.2 мм. Косвенным подтверждением этого предположения являются данные Таблицы 9, а также более полной таблицы в публикации автора [13], в которых большинство значений концентраций аминокислот в плазме крови примерно в 2-3 раза ниже типичных для человеческой крови значений.

- На стр. 5 в качестве одного из свидетельств новизны работы приведено: «Проведен поиск различий в метаболомных профилях больных шизофренией с помощью количественного масс-спектрометрического анализа аминокислот и ацилкарнитинов». Само по себе проведение поиска не является научным результатом, автору следовало отметить новизну результатов, полученных в ходе поиска.

- На стр. 14 (нижний абзац) вместо «нифедипин» написано «атенолол».

- При установлении биомаркеров психических заболеваний (стр. 33-35) анализ крови проводился только для набора из 13 аминокислот и 30 ацилкарнитинов. При этом за бортом исследования остались важные соединения, относящиеся к генерации клеточной энергии, к циклу Кребса, к нейромедиаторам, концентрация которых может значительно меняться при развитии психических заболеваний. Хотелось бы, чтобы подобные исследования проводились для более широкого круга метаболитов.

- В Таблице 9 не указано, в каких единицах приведены значения концентраций метаболитов.

- Работа, связанная со сравнением метаболомных профилей образцов крови здоровых доноров и пациентов, страдающих депрессией, производит впечатление незавершенной: не идентифицированы многие метаболиты отличия, не приведены бокс-плоты для этих соединений. Для демонстрации предсказательной ценности полученных данных было бы хорошо показать ROC-кривые (кривые диагностической ценности) для найденных метаболитов отличия.

- Выражение «созданы масс-спектрометрические подходы» (стр. 47) на взгляд рецензента является неудачным, поскольку непонятно, что именно имеется ввиду под словом «подход».

- 3й вывод диссертации сформулирован плохо. Во-первых, тандемная масс-спектрометрия с использованием стандартов для установления концентраций аминокислот использовалась и ранее. Во-вторых, непонятно, применимость какого метода расширяет тандемная масс-спектрометрия. В-третьих, непонятно, какое отношение тандемная масс-спектрометрия имеет к фазовому состоянию исследуемых образцов.

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

Считаю, что диссертационная работа Черноносова А. А. *«Развитие масс-спектрометрических подходов для решения задач целевой и нецелевой метаболомики»* по объему, уровню выполнения, новизне, надежности и актуальности полученных результатов соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.4 – биохимия, а также соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Черноносов Александр Анатольевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора 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

«13» 07 2023 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.



19.07.2023

Л.В. Яньшолё