

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Орловой Ольги Игоревны «хромато-масс-спектрометрическое определение аддуктов алкилирующих агентов с днк и ацетилцистеином в биопробах», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Разработка методов токсикологического скрининга и подтверждения факта интоксикации на уровне следовых и ультраследовых количеств, является **чрезвычайно актуальной задачей**, поскольку развитие и совершенствование методологии анализа позволяет не только существенно повысить производительность лабораторий в процессе тестирования, но и значительно повысить надежность проводимых исследований.

За последние 5 лет приборно-технический парк ряда токсикологических лабораторий претерпел существенное обновление, но используемые методы тестирования и интерпретации результатов, как правило, не соответствуют современным вызовам и требуют актуализации. Для решения данной проблемы необходимо детальное изучение механизмов действия как новых токсикантов, так и ранее описанных. Соискателем в качестве метода исследования, как наиболее информативного и надежного, позволяющего в более полной мере осуществить подобные исследования выбраны хромато-масс-спектрометрические методы анализа. В этой связи диссертационная работа Орловой О.И. полностью соответствует специальности 02.00.02 – аналитическая химия (химические науки).

Для достижения поставленной цели соискателем применен современный хроматографический и масс-спектрометрический приборный парк, обеспечивающий не только высокую чувствительность, но и разрешающую способность, позволяющую установить элементную композицию. Ею применены методы встречного синтеза для доказательства предложенных структур, что позволило повысить достоверность и корректность выводов, сделанных в диссертационной работе. Поэтому заявленная цель работы была достигнута в полной мере.

Научная новизна работы заключается в разработке методики совместного определения аддукта сернистого иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ) и белками (СБАЦЭ) в моче, позволяющей на молекулярном уровне установить биомаркеры воздействия сернистого иприта на ДНК и оценить повреждения организма, подборе условия анализа проб мочи, позволивших в эксперименте *in vivo* изучить кинетику экскреции N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ: определены масс-спектрометрические характеристики аналитов, установлена стабильность выявленного биомаркера. Показана возможность определения кинетических профилей аддуктов ДНК с лекарственными препаратами алкилирующего действия на примере ЦФА. Были определены основные продукты взаимодействия активного метаболита ЦФА с ДНК, получены их масс-спектральные характеристики и предложена аналитическая схема изучения кинетики выведения аддуктов ЦФА с ДНК в условиях терапии АЦЦ и в отсутствие терапии. Немаловажно также то, что в целях обеспечения надежности проводимых исследований, был синтезирован изотопно-меченный внутренний стандарт, приведена процедура его выделения из реакционной смеси и очистки, показано, что предполагаемая и фактическая структуры аналитов совпадают, проведена частичная валидация предложенных методик.

Практическая значимость. Предложенные методики анализа позволяют сделать выводы об объемах нанесенных сернистым ипритом повреждений. Это особенно важно при проведении терапии, а также позволяет установить примерные сроки применения химического оружия. Полученные сведения о кинетике выведения аддуктов также могут быть использованы в целях разработки персонафицированного подхода к терапии и детоксикации пострадавших.

Высокая точность и надежность определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и ацетилцистеином в моче позволили включить их в перечень рабочих процедур лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ

ГПЭЧ» ФМБА России и использовать их в международных профессиональных тестах ОЗХО по анализу биопроб.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и изложена на 105 страницах машинописного текста, включая 27 рисунков и 6 таблиц, список использованных источников содержит 149 наименований и полностью отражает текущее состояние рассмотренной в диссертационном исследовании темы.

В **первой главе**, являющейся литературным обзором, приведены сведения о способах выделения и анализа биомаркеров как с использованием методов хромато-масс-спектрометрии, так и других методов, таких как иммуноанализ и флуорисцентный анализ.

Вторая глава посвящена описанию получения изотопно-меченного стандарта, его очистке, оптимизации условий разделения и детектирования с использованием метода ВЭЖХ-МСВР.

Третья глава рассматривает особенности реализации метода с использованием различных матриц и апробацию предложенных методик.

Отдельного внимания заслуживает умелое и рациональное введение в работу токсикологического описания механизма воздействия сернистого иприта в первой главе, что позволяет не только убедиться в правильности методологического подхода автора, но и оценить системность работы с литературными источниками. Особого внимания заслуживают таблицы 1 и 2, а также блок-схема, представленная на рис. 6, позволяющие, в совокупности с кратким текстовым пояснением, оценить широкую вариативность существующих процедур анализа.

Предлагаемые методологические решения, разработанные методики анализа, представленные в экспериментальной части, **обоснованы** и объективно обсуждены автором. **Достоверность полученных данных** и их интерпретация подтверждается не только применением их в практике лаборатории, но и публикацией результатов исследований в рецензируемых научных изданиях: 6 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и 8 тезисах

докладов, представленных и обсужденных на международных и всероссийских конференциях.

Работа выполнена с использованием современных химико-аналитических методов, приборов и систем обработки данных. Представленные выводы согласуются с результатами исследований, приведенных в статьях, а автореферат отражает основное содержание диссертационной работы.

Несмотря на это, имеется ряд **незначительных вопросов и замечаний** по представленной работе:

1) В автореферате указано, что работа велась при разрешении масс-спектрометра 60000, в то время как в диссертации, в табл. 3 указано заданное разрешение 70000. Какое же разрешение было на самом деле? Исходя из указанного прибора (LTQ Orbitrap Velos), максимальным разрешением которого является 60000, именно оно и верно, но, если в распоряжении соискателя имелся прибор в версии Velos XL – возможно и 70000. Стоит внести ясность.

2) Несмотря на применение масс-спектрометрии высокого разрешения, стоит ли указывать 5 знаков после запятой?

3) На рис. 16 диссертации в схеме фрагментации, приведена схема возможной локализации протона в процессе образования протонированного молекулярного иона, приведенного в исходной структуре, но не играет особого значения при фрагментации, и показан лишь один фрагмент, соответствующий, по факту, процессу α -разрыва, что не объясняет механизма фрагментации. Вероятно, название не совсем корректно объясняет механизм образования продукт-иона.

4) В работе стоило указать, что фрагментация исходных молекул является расчетной и смоделированной с использованием программно-аппаратного комплекса Mass Frontier, опирающегося на ряд эмпирических правил, а не является предположениями Автора.

5) На рис. 18 приведена хроматограмма по выделенному иону-прекурсору, имеющему массу 256,08, в то время как массы ионов-продуктов указаны с существенно большей точностью и, как следствие, фоновый сигнал не оказывает такого мешающего влияния. Возможно, стоило привести хроматограммы по выделенным ионам, полученным в сопоставимых по разрешению условиях, тем более, если анализ проводился в режиме зависимого сканирования.

6) В случае применения ионной ловушки в качестве масс-анализатора говорить о MRM-переходах не совсем корректно, поскольку механизм формирования MS^2 и MS/MS – отличается и не является эквивалентом.

7) Из текста диссертации и рисунка 19 следует, что калибровка построена по 3 точкам. Насколько такой подход представителен, если изучаемый диапазон находится от 1 до 100 нг/мл. Чем обусловлен выбор количества точек для калибровки в условиях относительно небольшого количества повторностей ($n=3$).

8) Согласно рекомендациям FDA в отношении валидации биоаналитических методик, погрешность при определении концентрации, лежащей на уровне нижнего предела определения не должна превышать 20%, в случае предлагаемого метода погрешность на уровне LLOQ находится на уровне 30%. С чем это связано?

9) Исходя из рекомендаций FDA, стоит использовать сочетание «матричный эффект». Насколько он постоянен на всех уровнях концентраций?

10) В тексте диссертации отсутствуют основные валидационные параметры разработанных методик, не ясно, в течение какого времени стабильны образцы, как меняется СКО при анализе тех же проб в разные дни.

Сделанные замечания не снижают общую положительную оценку представленной к защите диссертации и связаны, в первую очередь, со сложностью выбранной задачи и определяемых веществ.

По научному уровню, значимости полученных результатов и объему исследований, диссертационная работа соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. от 01.10.2018), а её автор – Орлова Ольга Игоревна, присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Официальный оппонент,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
университет», 350040, г. Краснодар,
ул. Ставропольская, 149
89528371935, TemerdashevAZ@gmail.com



Темердашев А.З.

10.03.2020

Темердашев Азамат Зауалевич

