

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации Орловой Ольги Игоревны «Хроматомасс-спектрометрическое определение аддуктов алкилирующих агентов с ДНК и ацетилцистеином в биопробах», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия (химические науки)

Диссертация О.И. Орловой посвящена совершенствованию методического обеспечения в области определения в объектах биологического происхождения продуктов взаимодействия сернистого иприта (СИ) и циклофосамида (ЦФА) с пуриновыми основаниями, входящими в состав ДНК, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Данное направление признано перспективным как для решения практических задач, например, установления факта воздействия СИ на организм в результате контакта с отравляющим веществом, так и для исследования уникальных биохимических процессов, определяющих мутагенное действие на ДНК со стороны ксенобиотиков и некоторых лекарственных препаратов. С позиций аналитической химии к методикам, используемым в этой области, предъявляются крайне высокие требования, а именно, установление точной структуры образующихся аддуктов при обеспечении пределов их количественного определения с нижней границей на уровне единиц нанограмм в миллилитре биологической жидкости. Всё это требует создания методов контроля, отличающихся высокой точностью и надежностью, что, с учетом сложности биологических матриц, предполагает применение уникальных способов пробоподготовки и аналитических приборов последнего поколения. При этом автор берётся за решение ещё более сложной задачи – разработки методик, обеспечивающих совместное определение в биопробах как веществ (СИ, ЦФА), оказывающих алкилирующее действие на азотистые основания, выделенные из ДНК, так и скавенджера – ацетилцистеина (АЦЦ), предположительно вступающего с ними в конкурирующее взаимодействие. В данной постановке решение аналитической задачи приобретает общее значение как для медицинской диагностики поражений, так и для коррекции схем применения некоторых лекарственных препаратов. В связи с этим тема диссертации и поставленная соискателем цель, заключающаяся в разработке аналитической схемы хроматомасс-спектрометрического анализа биологических образцов (кровь, моча), содержащих алкилирующие агенты (СИ или ЦФА), в присутствии скавенджера (АЦЦ) является **актуальной**.

Сформулированные автором во введении положения **научной новизны** в большей своей части представляются обоснованными и отражают последующее содержание работы.

В области новых **научных положений** следует выделить выявленные автором с помощью разработанных методик анализа особенности формирования состава трехкомпонентной системы алкилатор-скавенджер-ДНК и закономерности кинетики выведения исследуемых аддуктов в биологическом эксперименте с использованием лабораторных животных. Аналитическое исследование поведения указанной системы *in vivo* в рамках комплексного биологического эксперимента осуществлено впервые.

Достоверность результатов рассматриваемой работы подтверждается использованием современного химико-аналитического оборудования, аттестованных реактивов и материалов, приемлемыми данными статистической обработки результатов измерений, а также данных биологических экспериментов.

Диссертационная работа прошла достаточную **апробацию**. Её результаты доложены на 8-ми международных, российских и ведомственных конференциях. По материалам исследования опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Работа изложена на 105 страницах, содержит 27 рисунков и 6 таблиц, список использованных источников - 149 наименований; диссертация включает введение (стр. 6-10), литературный обзор (стр. 10-47), экспериментальную часть (стр. 47-55), обсуждение результатов (стр. 55-82), заключение (стр. 82-86), выводы (стр. 86-88) и список литературы (стр. 89-105).

Литературный обзор в значительной своей части посвящен, и, возможно, даже перегружен рассмотрением медико-биологических аспектов биомониторинга с подробным обсуждением различных видов биомаркеров. Однако во второй части обзора (начиная с раздела 1.3, стр. 20) автор обстоятельно рассматривает, обсуждает и систематизирует методы определения ДНК-аддуктов, что непосредственно относится к теме и специализации работы. Последовательно обсуждены радиоизотопные, иммунологические, флуоресцентные и хроматомасс-спектрометрические методы определения ДНК-аддуктов в биологических жидкостях. Особое внимание уделено высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения, а также способам пробоподготовки для выделения ДНК-аддуктов.

В **экспериментальной части** приведены исчерпывающие данные о составе и квалификации использованных реактивов, о типе, характеристиках и режиме работы использованной ультра-ВЭЖХ-МС/МС системы. Значительное место (как в диссертации, так и в автореферате) уделено описанию способа синтеза стандартного образца N7-НЕТЕГ, в то же время в работе приводятся ссылки на зарубежные источники, где данный синтез ранее описан ([126, 127]). Под заголовком «Оптимизация условий масс-

спектрометрического детектирования N7-НЕТЕГ. Определение характеристичных продукт-ионов» (раздел 2.1.3) приводятся точные значения m/z двух характеристичных ионов для N7-НЕТЕГ. Под заголовками «Разработка методик...» (п. 2.2 и п. 2.3) приводится краткое изложение методик определения N7-НЕТЕГ в моче и крови соответственно.

В разделе 3 «Обсуждение результатов» автор вновь возвращается к описанию синтеза стандартного образца N7-НЕТЕГ, включая процедуру его очистки с использованием ВЭЖХ. Подраздел 3.2 «Разработка методик определения N7-НЕТЕГ в моче и крови» по названию совпадает с подразделами 2.2 и 2.3, однако, в отличие от них, в нем уже представлены результаты оптимизации методик. Далее следует описание апробации разработанных методик в рамках биологического эксперимента, которая привела к положительным результатам. Ключевым в этой части работы является подраздел 3.4, где представлена разработка и апробация методики совместного определения аддуктов СИ с ДНК и АЦЦ в моче. Именно с помощью этой методики авторам удалось в заключительной части работы исследовать кинетику выведения N7-НЕТЕГ из организма в рамках биологического эксперимента в отсутствие и присутствии АЦЦ, а также адаптировать её для проведения биологического эксперимента с использованием ЦФА.

В заключении суммированы и обсуждены результаты, полученные при выполнении всего исследования.

Выводы, состоящие из 5 пунктов, достаточно корректно отражают полученные результаты.

Автореферат и публикации в целом соответствуют содержанию диссертации, а также паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

По содержанию диссертации и автореферата имеется ряд вопросов и замечаний.

1. В целевой установке работы и в формулировке научной новизны указывается на разработку методического обеспечения, способного осуществить биомониторинг генотоксичного действия алкилирующих агентов и даже «оценить повреждения организма». Не является ли это некоторым преувеличением практической значимости и области применения разработанных методик анализа?
2. В разделе «научная новизна» говорится о разработке методики «совместного определения наиболее значимого аддукта сернистого иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ) и белками (СБАЦЭ) в моче». Возникает впечатление о наличии некоего одного универсального аддукта СИ с ДНК и белками, хотя на самом деле это не так.

3. В разделе «практическая значимость» указывается на включение разработанных автором методик в сборник рабочих процедур «Лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования» как части «научно-методического обеспечения участия российских лабораторий в международных профессиональных тестах ОЗХО по анализу биопроб», однако в списке литературы данный документ отсутствует. Доступен ли он для других лабораторий – участников тестов ОЗХО?
4. Литературный обзор по объему занимает около половины объема текстовой части диссертации, что представляется избыточным. Значительную его часть представляют рассуждения о концептуальных медико-биологических аспектах биомониторинга, и типах биомаркеров, что не так уж актуально для избранной специальности. Вместе с тем, в обзоре отсутствует какое-либо заключение с обоснованием плана собственных исследований с учетом результатов ранее выполненных работ по данной теме (например, публикации по ссылкам [67, 68, 74, 75]).
5. В представленных в работе MRM переходах в одних случаях значения m/z иона прекурсора указываются с точностью до второго знака, в других – до пятого знака после запятой. Возникает вопрос, способен ли прибор в режиме MRM выделять ион прекурсора с таким точным значением m/z ?
6. Что понимает автор под вводимыми им терминами «матричный фактор аналита» и «матричный фактор внутреннего стандарта»? Не имеются ли в виду просто площади соответствующих хроматографических пиков?
7. В схемах и описаниях процедур пробоподготовки растворы обозначаются без указания растворителя, например, «10% ацетонитрил», «5% муравьиная кислота», «раствор серного иприта», что представляется некорректным.
8. Большое количество замечаний, относится к неточностям и оформлению работы:
 - начиная с титульного листа и далее по тексту работы повсеместно отсутствуют интервалы между словами, что, по-видимому, относится к издержкам компьютерного форматирования pdf-файла, представленного на сайте, однако это подлежало исправлению при заключительной корректировке текста;
 - одна и та же аббревиатура по тексту работы чередуется в виде N7-НЕТЕГ и N7-НЕТЕГ; в числовых характеристиках доли от целых значений повсеместно отделяются где точкой, где запятой; предел определения аналитов в выводе 1 указан 5 нг/мл, в то время как в описании методики (стр. 73) его значение представлено как 10 нг/мл; на стр. 14 автореферата режим центрифугирования указан 14 об/мин (?!); на стр. 60 диссертации ссылка на рис. 7 ошибочна; в оглавлении диссертации

отсутствует раздел 1; имеет место повторение одной и той же фразы (стр.17 автореферата) и т.д.

- присутствуют неудачные выражения: «С позиций аналитики важно отметить...» (стр. 27 автореферата); «N7-НЕТЕГ успешно детектировался...» (стр. 12 автореферата); «...аналитический мониторинг повреждающего воздействия...» (стр. 22 автореферата, стр. 88 диссертации); «..как качественного, так и количественного содержания ДНК-аддуктов...» (стр. 20 диссертации); «...не используют токсичный сернистого иприта...» (стр. 57 диссертации) и др.

Несмотря на указанные замечания в целом диссертационная работа О.И. Орловой заслуживает положительной оценки. Сформированные ею научные подходы могут быть использованы в аналитической и медицинской практике для выявления фактов и установления степени генотоксического воздействия алкилирующих агентов на организм человека, а также для корректировки схем применения некоторых лекарственных препаратов.

Диссертационная работа Орловой Ольги Игоревны «Хроматомасс-спектрометрическое определение аддуктов алкилирующих агентов с ДНК и ацетилцистеином в биопробах» по объему и качеству выполненных исследований, актуальности, новизне, достоверности и научной обоснованности полученных ею лично результатов соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года, а ее автор, Орлова Ольга Игоревна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Официальный оппонент д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник 31 научно-исследовательского отдела ФГБУ «27 научный центр МО РФ», 105005, г. Москва, Бригадирский переулок, 13.

e-mail: rivrus@mail.ru

Тел. +7(916)133 51 36

«10» марта 2020 г.

Рыбальченко Игорь Владимирович

Я, Рыбальченко Игорь Владимирович, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой лиссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись И.В. Рыбальченко заверяю
Секретарь научно-технического совета
кандидат химических наук



М.А. Гольшев