

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Уколова Антона Игоревича

«Хроматомасс-спектрометрическая методология определения биомаркеров вредных химических веществ при расследовании обстоятельств острых и хронических отравлений»,

представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности
02.00.02 – аналитическая химия

Актуальность темы исследования

Целью диссертационного исследования Уколова А.И. явилась разработка подходов к повышению надежности идентификации органических соединений и метаболического профилирования биологических образцов на основе хроматомасс-спектрометрических методов анализа (ГХ-МС и ВЭЖХ-МС), позволяющих определять пути биотрансформации ксенобиотиков и биоаналитического мониторинга при острых и хронических отравлений. Применение хроматомасс-спектрометрии в качестве единой аналитической платформы способствует объединению стратегии обнаружения и идентификации биомаркеров экспозиции и эффекта, что, в свою очередь, повышает надежность диагностики. На сегодняшний день в практике химико-токсикологических лабораторий процедуры биоаналитического мониторинга, основанные на подобных подходах, отсутствуют. Публикации по использованию метода ГХ-МС низкого разрешения для метаболического профилирования образцов крови или мочи с целью установления механизмов действия токсичных соединений также встречаются крайне редко.

Автору диссертации необходимо было предложить методологию определения биомаркеров ксенобиотиков, включающую расширенный токсиколого-аналитический скрининг, разработать методики определения экзогенных веществ и их метаболитов в биологических объектах; выявить возможности применения метода ГХ-МС низкого разрешения при анализе образцов крови, мочи и гомогенатов органов для изучения их метаболического профилирования. При этом полный набор компонентов метаболических профилей обычно недоступен, поэтому нецелевое метаболическое профилирование по сути происходило бы в режиме т.н. "безэталонной идентификации". Это позволило бы унифицировать подходы, применяемые и к метаболическому профилированию, и к расширенному токсиколого-аналитическому скринингу. Все вышесказанное свидетельствует об **актуальности** диссертационного исследования Уколова Антона Игоревича.

Соответствие научной специальности

Успешное решение таких важнейших задач как оценка аналитических возможностей метода хроматомасс-спектрометрии для определения биомаркеров вредных веществ;

идентификация метаболитов методами ГХ-МС паровой фазы, ГХ-МС экстрактов и ВЭЖХ-МС высокого разрешения; расширение аналитических возможностей идентификации токсикантов без использования стандартных соединений; выявление возможностей ГХ-МС низкого разрешения для метаболического профилирования образцов крови или мочи и др. полностью соответствуют научной специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Степень достоверности исследования достигнута применением современного аналитического оборудования и методов статистической обработки, валидированных и аттестованных методик, формированием групп сравнения и контроля. По результатам диссертационного исследования разработаны и опубликованы методические рекомендации ФМБА: МР ФМБА России 4.1.23-2014 и МР ФМБА России 12.038-2016. "Методика количественного хроматомасс-спектрометрического анализа пестицидов в биологических образцах крови и мочи человека" зарегистрирована в качестве секрета производства (ноу-хау). Аттестованы «Методика измерений массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии» и «Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием».

Диссертационная работа Уколова А.И. состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (6 разделов), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 255 страницах машинописного текста, содержит 63 рисунка и 82 таблицы, список использованных источников содержит 544 наименования.

Изложению собственных результатов предшествует обзор литературных данных (Глава 1), посвященный хроматомасс-спектрометрическим методам обнаружения и идентификации биомаркеров; инструментальным методам метаболического профилирования биологических образцов; обработке данных в нецелевом анализе и применению в токсикологии; методам токсиколого-аналитического скрининга, процедурам селективного определения ксенобиотиков и их метаболитов в биопробах, а также обоснованию концепций биомаркеров и биоаналитического мониторинга в химико-токсикологических исследованиях.

Глава 2 посвящена методологии расширенного токсиколого-аналитического скрининга и включает подготовку биологических образцов к анализу; проведение дериватизации и ГХ-МС анализ экстрактов образцов крови и мочи, а также обсуждение результатов парофазного анализа этих образцов. В качестве подтверждающих диссертантом использованы методы ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС. Значительное внимание уделено нецелевому метаболическому профилированию биологических жидкостей методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС с хемометрической обработкой полученных результатов. Рассмотрены пути экспериментального моделирования интоксикаций органическими соединениями. Специальные разделы посвящены определяемым экотоксикантам, арсенал которых весьма широк: фосфорорганические соединения (ФОС)

различных классов опасности, органические загрязнители атмосферного воздуха; неионогенные ПАВ класса алкилфенолов, обладающие токсическим действием на эндокринные системы человека и животных; промышленные загрязнители (смесь n-алканов C6-C10 и C1-C5; гидроксилламин; 1,4-дихлоргексафторбутен-2 и др.). Диссертантом выявлены и систематизированы неэтанольные маркеры алкогольной интоксикации.

В Главе 3 (*результаты и их обсуждение*) представлены основные результаты, разработки и внедрения в практику токсикологических исследований совокупности методов выявления чувствительных биомаркеров экспозиции и эффекта токсичных органических соединений. В отличие от традиционного подхода методология, предлагаемая автором диссертационной работы, включала способы обнаружения биомаркеров эффекта с помощью целевой и нецелевой метаболомики. Убедительно продемонстрированы примеры эффективного использования различных дериватирующих агентов, применение которых в токсиколого-аналитическом скрининге наряду с анализом экстрактов без дериватизации обеспечило диссертанту повышение эффективности обращения к базам данных. В стандартных схемах ГХ-МС скрининга анализ образцов без дериватизации, как правило, не предусмотрен, и некоторые ксенобиотики остаются невыявленными.

Высокая результативность применяемых автором диссертации подходов к выявлению биомаркеров экспозиции продемонстрирована на примере разработанной процедуры мониторинга воздействия фосфорорганических пестицидов (ФОП): определение нативной формы ксенобиотика с использованием образца сравнения и аттестованной методики в сочетании с безэталоным определением метаболитов хроматомасс-спектрометрическими методами.

Принципиальным моментом является включение в скрининг стадии парофазного анализа для выявления легколетучих соединений, а также дериватизации аналитов после экстракционного вымораживания. Уколовым А.И. существенно расширены аналитические возможности метода ГХ-МС низкого разрешения, главным достоинством которого является высокая воспроизводимость масс-спектров, строго аргументирована целесообразность создания оптимизированных библиотек хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений для повышения надежности метаболического профилирования биологических образцов. Наряду с этим получены и другие новые практически значимые результаты: идентифицированы биомаркеры эффекта смеси алифатических углеводородов C1-C5, гидроксилламина, разработаны методики определения 16 летучих промышленных загрязнителей в биологических пробах в диапазоне концентраций 1-20 нг/мл; пестицидов в моче и цельной крови. Для многих токсикантов диссертантом впервые установлены токсикокинетические характеристики и минимальные концентрации их возможного обнаружения в биологическом образце.

Таким образом, логика предлагаемого Уколовым А.И. алгоритма включает идентификацию *биомаркеров экспозиции* с количественным анализом аналитов; определение *биомаркеров эффекта* (изменения концентраций эндогенных низкомолекулярных соединений) посредством нецелевого профилирования методом ГХ-МС низкого разрешения; целевое определение свободных и жирных кислот плазмы крови

с выявлением наиболее чувствительных биомаркеров и, наконец, определение токсикокинетических параметров с последующим биомониторингом токсикантов.

Научная новизна.

Предложена методология хромато-масс-спектрометрического анализа биологических объектов, включающая метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга и метаболическое профилирование биологических образцов и позволяющая устанавливать пути биотрансформации и механизмы действия ранее не изученных токсикантов.

Обоснован и реализован метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга с применением газовой хроматомасс-спектрометрии и ВЭЖХ с tandemным масс-селективным детектированием высокого разрешения с автоматической обработкой масс-хроматограмм, с применением твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) и экстракционного вымораживания с последующей дериватизацией целевых аналитов для определения летучих соединений в паровой фазе.

Предложен алгоритм масштабирования токсикокинетических параметров, повышающих информативность результатов биоаналитического мониторинга. Впервые проведена оценка токсикокинетических характеристик *E*-1,4-дихлор-2-бутена, дисульфида углерода, метакрилонитрила, метилпаратиона, пентахлорэтана, аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, хлорацетонитрила, этилметакрилата, метилакрилата, метилметакрилата, нитробензола, 2-нитропропана и гексахлорэтана.

Обоснованы критерии включения соединений в базы данных по типам биологических образцов: плазма крови, моча, гомогенаты головного мозга и печени, составляющих метаболические профили.

Методом хромато-масс-спектрометрии идентифицированы продукты взаимодействия гидроксилamina с альдегидами и кетонами и установлен ранее неизученный путь его метаболизма с образованием оксимов. Установлено, что непрерывное ингаляционное воздействие смеси предельных углеводородов C1-C5 с концентрацией 1250 ± 52 мг/м³ приводит к достоверному повышению концентрации ацетона и *n*-бутанола в образцах крови. Важным результатом диссертационного исследования явилось обнаружение изменения профилей жирных кислот плазмы крови при интоксикации фосфоорганическими отравляющими соединениями и метаболических профилей головного мозга и печени крыс при хронической интоксикации алифатическими углеводородами C6-C10.

Предложен новый способ определения положения алкильного заместителя в фенолах: протонированные молекулы *para*-замещенных алкилфенолов C4-C9 в отличие от других изомеров образуют характеристические ионы $[M+H-H_2O]^+$.

Практическая значимость.

Разработаны методики хроматомасс-спектрометрического определения в биологических образцах ДХГФ, фосфорорганических пестицидов (дихлофоса, диазинона,

метилпаратиона, диметоата, фозалона и хлорпирифоса), летучих промышленных загрязнителей (*E*-1,4-дихлор-2-бутена, дисульфида углерода, метакрилонитрила, пентахлорэтана, аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, хлорацетонитрила, этилметакрилата, диэтилового эфира, метилакрилата, метилметакрилата, нитробензола, 2-нитропропана и гексахлорэтана) и гидроксиламина, для определения которого в плазме крови и моче предложена двухстадийная дериватизация бензальдегидом и БСТФА.

Выявлены возможности метода ГХ-МС низкого разрешения при нецелевом метаболическом профилировании биологических образцов и предложен новый подход, заключающийся в использовании оптимизированных баз хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений. В итоговую версию базы данных включены аминокислоты, моно-, ди-, три-, гидроксид- и кето-карбоновые кислоты, фосфаты, азотсодержащие соединения, N-производные глицина, азотсодержащие кислоты, дисахариды, стеролы, моносахариды, многоатомные спирты и альдоновые кислоты, что позволяет существенно расширить аналитические возможности ГХ-МС низкого разрешения и проводить метаболическое профилирование различных биологических образцов.

Разработана методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биопробах методом ГХ-МС/МС. Установлено, что метаболиты ФОП в ряде случаев являются более надежными маркерами в сравнении с нативными формами этих соединений.

Методика расширенного токсиколого-аналитического скрининга внедрена в практику отдела токсикологии НИИ ГПЭЧ и апробирована в отделении токсикологии НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе.

Разработаны хромато-масс-спектрометрические методики определения гидроксиламина в плазме крови и моче с двухстадийной дериватизацией бензальдегидом и БСТФА.

По диссертационной работе возник ряд вопросов и замечаний:

1. Один из главных выводов диссертационного исследования заключается в «...совершенствовании методики нецелевого метаболического профилирования биологических образцов с использованием газовой хроматомасс-спектрометрии низкого разрешения...» Однако требуется уточнение: что совершенствуется и по сравнению с чем? Что предшествовало данному исследованию?
2. Проверяться ли степень конверсии при дериватизации различными дериватирующими агентами и воспроизводимость?
3. Автор диссертации отмечает существенную особенность предлагаемой методологии: включение стадии парофазного анализа. Разве парофазный анализ при токсиколого-аналитическом скрининге раньше не использовался?
4. Чем объяснить такое расхождение в пределах обнаружения для ацетона и 2-гексанона? (стр. 90, табл. 20.)
5. Как устранялся матричный эффект?

6. Остается неясным почему гексанол-1 накапливался в мозге, а октанол-1 - в плазме крови? Казалось бы, из соображений липофильности должно было бы быть наоборот

7. Есть целый ряд замечаний оформительского плана. Необходима расшифровка англоязычных аббревиатур, используемых в тексте диссертации; есть неудачные выражения: *...двое методических рекомендаций..* (стр. 13); *... недействующих уровней воздействия...*; *...по сравнению с подходом, полагающимся на методы...*(стр. 20); *...диаграмма, показывающая покрытие различными инструментальными методами* (стр. 43);*... при использовании метода ГХ-МС многие сахара не «сахара», а «производные сахаров»* (стр. 35, автореферат). и т.д.; ссылка 68 цитируется не по назначению; в табл. 1 не все обозначения расшифрованы; название Рис. 4 (стр.43) не соответствует содержанию (здесь нет указаний на методы); в табл. 65 (стр. 173) названия ряда соединений и соотнесенные с ними формулы не соответствуют друг другу.

8. Подраздел 1.3. обозначен как «Хроматомасс-спектрометрические методы обнаружения и идентификации биомаркеров эффекта». Но соответствующая информация здесь практически отсутствует. При этом в данном разделе слишком много и неоправданно уделяется внимание терминологии, хотя терминологическим аспектам были специально посвящены предыдущие разделы диссертации.

9. Утверждение (стр. 205) *... полученные предварительные результаты безусловно нуждаются в количественной оценке с точки зрения селективности (специфичности) и чувствительности обнаруженных биомаркеров как диагностических показателей* требует пояснений

Возникшие вопросы и замечания не сказываются на высокой оценке диссертационной работы Уколова А.И. Сформулированные в работе выводы строго аргументированы, новы и носят обобщающий характер. Полученные результаты могут быть включены в курсы аналитической химии, органического анализа для бакалавров и магистров на химических факультетах университетов МГУ, СПбГУ, НГУ, в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (Технический университет).

Заключение.

Диссертация Уколова А.И. является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий. Положения, выносимые на защиту, выводы, сформулированные в диссертации, строго аргументированы и соответствуют экспериментальным данным.

По материалам диссертационного исследования соискателем опубликованы 27 статей в журналах, рекомендованных ВАК, а также две главы в монографиях.

Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям действующих нормативных документов. Работа хорошо изложена, практически не содержит опечаток, прошла широкую апробацию. Результаты исследований прошли широкую апробацию на международных и всероссийских конференциях. Содержание автореферата и опубликованных трудов диссертанта полностью отвечает содержанию диссертации.

На основании вышесказанного считаю, что диссертационная работа Уколова Антона Игоревича «Хроматомасс-спектрометрическая методология определения биомаркеров вредных химических веществ при расследовании обстоятельств острых и хронических отравлений» соответствует требованиям пункта 9-11,13,14 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к докторским диссертациям, как научно-квалификационная работа, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области хроматомасс-спектрометрического анализа биологических объектов и метаболического профилирования. Автор работы достоин присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия

27.09 2019 г.

Карцова Людмила Алексеевна,
профессор, доктор химических наук
по специальности 02.00.02 - Аналитическая химия
профессор кафедры органической химии
Института химии

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
198504, Россия, Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр. 26, Институт химии
СПбГУ; тел.: (812) 428 40 44; e-mail: kartsova@gmail.com

Подпись Карцовой Л.А. заверяю:

Личную подпись заверяю
начальник отдела кадров
Н. И. МАШТЕЛА

