



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376
тел.: +7 (812) 234-6868; факс: +7 (812) 234-9489; e-mail: iem@iems.spb.ru; https://iems.spb.ru

«07» 07 2019

№ 424-1/8-372

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ «ИЭМ»
д.б.н, профессор РАН

А.В. Дмитриев

«07» 07 2019 г.



Отзыв

ведущей организации на диссертацию Уколова Антона Игоревича «Хроматомасс-спектрометрическая методология определения биомаркеров вредных химических веществ при расследовании обстоятельств острых и хронических отравлений», представленную в Диссертационный совет Д 212.101.16 при Кубанском государственном университете к защите на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

В диссертационной работе А.И.Уколова рассмотрен комплекс аналитических методов, подходов к анализу, аналитических методик и процедур, предназначенных для химико-токсикологического анализа в условиях действия химического фактора (отравлений) и реализованных на многочисленных примерах. Выбранная тема исследования представляется в высокой степени актуальной, что обусловлено, во-первых, необходимостью эффективного решения задач химической безопасности токсико-аналитическими лабораториями научных учреждений нашей страны и, во-

вторых, сложностью этих задач. Эта сложность связана как с многочисленностью отравляющих веществ, вредных химических соединений, токсикантов, присутствующих в техно- и оборонной сфере, окружающей среде, быту, так и проблемами аналитического определения таких соединений и их метаболитов/биомаркеров, прежде всего на уровне следов.

Актуальность темы исследований корректным образом сформулирована во вводной части диссертационной работы А.И.Уколова. Здесь же охарактеризованы цель, научная новизна и значимость работы, степень достоверности результатов, их апробация, а также положения, выносимые на защиту.

Обстоятельный литературный обзор (глава 1) посвящен биомаркерам, их классификации, методам и способам их аналитического определения. Существенное место занимает обсуждение метаболомики и процедур профилирования метаболитов/биомаркеров. Прослежена связь метаболомики и токсикологии. Литературный обзор также включает характеристику соответствующих инструментальных методов анализа, процедур пробоподготовки, способов и алгоритмов математической (статистической, хемометрической) обработки результатов аналитических экспериментов.

В Экспериментальной части (глава 2) подробно охарактеризованы примененные приборы и проведенные аналитические эксперименты (пробоподготовка, обнаружение аналитов, их качественное и количественное определение, скрининг и профилирование проб). Приведено детальное описание процедур обработки проб крови и мочи, дериватизации извлеченных аналитов (газовая хроматография – масс-спектрометрия, ГХ-МС), парофазного анализа образцов указанных жидкостей, всех использованных вариантов хроматомасс-спектрометрического анализа (в зависимости от природы определяемых соединений и цели анализа).

Результаты, полученные диссертантом, обсуждаются в главе 3, начиная с проблем токсиколого-аналитического скрининга (раздел 3.1). Конкретное обсуждение затрагивает определение маркеров алкогольной интоксикации и других ксенобиотиков в образцах биологических жидкостей. Отравление двух пациентов рассмотрено подробно. Отмечено участие автора работы в межлабораторных сличительных экспериментах.

Рассмотрены процедуры обнаружения и идентификации биомаркеров (метаболитов) различных групп токсикантов (раздел 3.2), начиная с фосфорорганических пестицидов (ФОП). Другие изученные соединения – алифатические углеводороды, гидроксиламин, один из новых хладонов (RL316). Подробно обсуждается метаболизм указанных соединений.

В диссертационной работе А.И.Уколова разработаны методики количественного определения многих биомаркеров в крови и моче (раздел 3.3): фосфорорганических соединений (пестицидов) и летучих органических загрязнителей (аллилхлорид, акрилонитрил, бутилхлорид, дисульфид углерода, хлороацетонитрил и др.). При этом детально исследованы и оптимизированы процедуры подготовки проб. Диссертант не ограничился разработкой, оптимизацией и валидацией указанных аналитических процедур, но дополнил их важным приложением – масштабным определением количественных токсикокинетических параметров соответствующих соединений на необходимом математическом уровне.

Еще одна группа методик количественного определения в крови и моче относится к отмеченным выше гидроксиламину и хладону RL316.

Самостоятельный раздел работы (раздел 3.4) – изучение возможностей идентификации изомерных алкилфенолов, одной из групп экотоксикантов, по их масс-спектрам и газохроматографическим индексам удерживания.

В разделе 3.5 обсуждаются общие вопросы нецелевого анализа (метаболического профилирования) биологических образцов, такие как

создание соответствующих баз данных, манипуляции с хроматограммами, идентификация пиков/аналитов, сопутствующее проведение количественного анализа и выбор внутренних стандартов. Рассмотрен пример углеводов и родственных соединений, сложных для идентификации вследствие обилия изомеров.

Раздел 3.6. базируется на полученных данных по изменению профилей эндогенных соединений («биомаркеров эффекта») в биологических пробах при действии отравляющих веществ (токсикантов), таких как фосфорорганические вещества, две группы предельных углеводов, гидроксилламин.

В заключительной части работы суммированы главные характеристики предложенной методологии и приведены основные выводы.

Характеризуя работу в целом, отметим ее научную новизну, касающуюся многих аспектов проведенного исследования. В первую очередь выделим:

- комбинации аналитических методов (газовая и жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией, в т.ч. тандемной масс-спектрометрией), применяемые в новых ситуациях;
- разработку новых методик анализа более 20 вредных химических соединений (пестициды, промышленные химикаты и др.) при оптимизации отдельных стадий анализа,
- изучение метаболизма многих токсикантов,
- оценку токсикокинетических характеристик 15 химических соединений.

Тот факт, что аналитические методы и процедуры применялись в комбинации и в сочетании с современными способами обработки экспериментальных данных (статистика, хемометрия, др.), обеспечил достоверность полученных научных результатов. Поэтому многие полученные данные имеют несомненную научную значимость для теоретических разделов

аналитической химии и токсикологии. К таким данным можно отнести характеристики выделения и концентрирования аналитов; структуры метаболитов и схемы метаболических превращений; особенности масс-спектров и параметров удерживания выбранных для исследования соединений и продуктов их превращений; токсикокинетику этих веществ. Практическая значимость диссертационной работы А.И.Уколова очевидна: разработанные методики анализа применялись в практическом здравоохранении, в реальных случаях отравлений.

Способы и методики анализа, предложенные диссертантом, могут быть использованы различными химико-токсикологическими лабораториями научно-исследовательских организаций и промышленных предприятий, включающих химически опасные производства, в т.ч. в оборонной сфере, при решении задач охраны труда, выявлении профпатологий, предотвращении и расследовании отравлений, чрезвычайных ситуаций и т.п.

Результаты диссертационного исследования широко опубликованы, в т.ч. в 21 статье в журналах, рекомендованных ВАК, и 2 главах монографий, апробированы в 25 докладах на Всероссийских и международных конференциях и симпозиумах. Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

В тексте диссертации А.И.Уколова содержатся некоторые неточности.

1. В разделе 3.5 «Совершенствование методики нецелевого метаболического профилирования биологических образцов с использованием газовой хроматомасс-спектрометрии низкого разрешения» материал работы изложен недостаточно четко. Заранее заданы соединения, которые будут определяться в изучаемых пробах (с. 168 диссертации). Исходя из этого, анализ нельзя назвать полностью *нецелевым*. Следовало бы привести здесь полный перечень соединений, заранее включенных в упомянутую базу данных – чтобы быстро отличить их от аналитов, идентифицированных впоследствии. Далее, не

всегда понятно, как были идентифицированы некоторые биомаркеры. Лишь один пример – хроматограмма на рис. 55 (с. 188). Читателю диссертации предложено увидеть на ней пики идентифицированных липидов. Сделать это проблематично: присутствует очень широкий пик, растянувшийся на минуты и охватывающий, как можно предполагать, неизвестное число пиков индивидуальных соединений, идентичность которых не продемонстрирована.

2. На с. 57 при обсуждении «расширенного токсиколого-аналитического скрининга» (а также на с. 66) констатируется применение «высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием высокого разрешения». Однако в диссертации обнаруживаются лишь небольшие следы применения именно *тандемного* варианта масс-спектрометрии высокого разрешения (определение пестицидов, с. 130). Но именно этот метод мог быть полезным во многих случаях, например, при определении сахаров (раздел 3.5.2), где возможности использования газохроматографических индексов удерживания не столь велики. Наиболее современная стратегия нецелевого анализа (см.: Milman B.L., Zhurkovich I.K. The chemical space for non-target analysis // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2017. Т. 97. С. 179-187) строится как раз на использовании тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения.

3. Процедуры идентификации описаны во многих разделах работы, но, как правило, отсутствуют сведения об общих или частных критериях идентификации – допустимых мерах несходства масс-спектров, масс отдельных ионов в масс-спектрометрии высокого разрешения, индексов удерживания в газовой хроматографии.

4. Не во всех случаях проработана используемая терминология. Например, для указания ошибок обнаружения и идентификации можно использовать две пары терминов: ошибка I/II рода или ложный положительный/отрицательный результат. В работе А.Уколова используются

все эти термины. Это может запутать читателя диссертации, особенно, если иметь ввиду неоднозначное соответствие между терминами разных пар.

5. На с.83 утверждается, что «нет общедоступных и полноценных баз данных аналитических характеристик химических соединений в токсикологии и экологии». Между тем ситуация в хемоинформатике резко изменилась в последние годы, и сейчас, например, на общедоступном информационном портале PubChem можно найти спектральную информацию о 616 тыс. биологически важных химических соединений [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/classification/#hid=72>].

Следует подчеркнуть, что отмеченные выше неточности и сделанные замечания не являются для диссертации определяющими (их общее число невелико) и не сказываются на общем положительном впечатлении от рассмотренной диссертационной работы. Диссертация А.И. Уколова является законченной научно-квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения и получены экспериментальные данные, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение, имеющее важное значение для аналитической химии и смежных областей (токсикология, здравоохранение).

По актуальности, новизне, практической значимости и научному уровню выполненных исследований, их объему, достоверности полученных результатов; репрезентативности и содержательности положений, выдвигаемых автором для публичной защиты; количеству публикаций в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, диссертационная работа «Хроматомасс-спектрометрическая методология определения биомаркеров вредных химических веществ при расследовании обстоятельств острых и хронических отравлений» соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Уколов Антон Игоревич,

заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Отзыв на диссертацию составил заведующий Лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ «ИЭМ» доктор химических наук Борис Львович Мильман.

Отзыв обсуждался и был поддержан на общем собрании Лаборатории биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии и Отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», протокол 6/19 от 14.06.2019.

Заведующий лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
доктор химических наук

«01» июля 2019 г.

Б.Л. Мильман

Подпись доктора химических наук Б.Л. Мильмана заверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ «ИЭМ»
Д.б.н.
01 июля 2019 г.



Н.Н. Пшенкина

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины».

Сокращенное название: ФГБНУ «ИЭМ».

Почтовый адрес: 197376, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12.

Телефон: 8(812)234-68-68; факс: 8(812)234-94-89; e-mail: iem@iemspb.ru ;

Сайт: <https://iemspb.ru> .