

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 212.101.16,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РФ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 18.06.2020 № 3

о присуждении Орловой Ольге Игоревне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация "Хроматомасс-спектрометрическое определение аддуктов алкилирующих агентов с ДНК и ацетилцистеином в биопробах" по специальности 02.00.02 – аналитическая химия принята к защите 28.01.2020 (протокол заседания №2) диссертационным советом Д 212.101.16, созданным на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Кубанский государственный университет" Министерства науки и высшего образования РФ, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149, приказ о создании № 420-368 от 14.03.2008 г. о подтверждении полномочий № 714/НК от 02.11.2012 г.

Соискатель Орлова Ольга Игоревна, 1981 года рождения, в 2003 году окончила химический факультет ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный университет" по специальности "Химия". С 2006 года и по настоящее время работает научным сотрудником лаборатории аналитической токсикологии ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства (ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА).

Диссертация выполнена в лаборатории аналитической токсикологии ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства России.

Научный руководитель – доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА России Савельева Елена Игоревна.

Официальные оппоненты:

Рыбальченко Игорь Владимирович – доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник 31 научно-исследовательского отдела федерального государственного бюджетного учреждения «27 научный центр» Минобороны РФ.

Темердашев Азамат Зауалевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник УНПК «Аналит» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный университет», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова**» (г. Москва) в своем положительном заключении, подписанном доктором химических наук, заместителем декана химического факультета по инновационной деятельности, старшим научным сотрудником Аналитического центра химического факультета, заведующим лабораторией хромато-масс-спектрометрии кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова Родиным Игорем Александровичем, указала, что диссертационная работа является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для развития теоретических представлений и расширения сферы практического применения жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, развития методологии использования хроматографических методов в изучении состава объектов биологического происхождения, а также для дальнейшего расширения методологии хроматографического анализа биологических объектов. Диссертационная работа соответствует критериям п. 9 "Положения о

порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, а ее автор, Орлова Ольга Игоревна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Соискатель имеет 8 публикаций, из которых по материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях, отнесенных к Перечню ВАК РФ, 8 тезисов докладов в материалах международных и всероссийских конференций, разработанные методики включены в сборник рабочих процедур «Лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования» как часть научно-методического обеспечения участия российских лабораторий в международных профессиональных тестах ОЗХО по анализу биопроб. В публикациях рассмотрены основные методы определения метаболитов сернистого иприта в биологических объектах, обусловлен выбор аддуктов сернистого иприта с ДНК в качестве перспективных биомаркеров воздействия иприта на организм человека и животных; опубликована методика, обеспечивающая определение наиболее значимого аддукта сернистого иприта с ДНК, а также совместная методика определения аддукта сернистого иприта с ДНК и АЦЦ, исследовано с помощью химического анализа утверждение о защитном действии АЦЦ. Анализ литературных данных, экспериментальная часть работы выполнены соискателем, научная интерпретация результатов проводилась совместно с соавторами. Все работы выполнены в соавторстве.

Наиболее значимыми опубликованными в профильных журналах работами являются:

1. Орлова О.И. Методы определения аддуктов сернистого иприта с ДНК./ Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В. // Журнал аналитической химии, 2017, Т 72, № 3, С. 209-217.

2. Орлова О.И. Методы обнаружения метаболитов сернистого иприта в объектах биологического происхождения. Аналитический обзор. /Орлова О.И.,

Савельева Е.И., Хлебникова Н.С. // Журнал аналитической химии, 2013, Т. 68, № 1, С.4-14.

3. Орлова О.И. Определение N7-[2-[(2-гидроксиэтил)-тио]-этил]-гуанина в моче крыс как маркера воздействия сернистого иприта./ О.И. Орлова, Г.В. Каракашев, В.И. Шмурак, В.В. Абзианидзе, Е.И.Савельева. // Вестник СПбГУ. Физика и химия, 2017, Т. 4 (62), Вып. 3, С. 313-325.

4. Савельева Е.И. Метод кассетного дозирования при оптимизации токсико(фармако)кинетических исследований. / Савельева Е.И., Сорокоумов П.Н., Орлова О.И., Корягина Н.Л. // Химико-фармацевтический журнал, 2016, Т. 50, № 8, С. 50-55.

На автореферат диссертации поступили 7 положительных отзывов.

В отзыве судебного эксперта (эксперта-химика) судебно-химического отдела ГБУЗ Московской области "Бюро судебно-медицинской экспертизы", доктора химических наук, Григорьева Андрея Михайловича имеются вопросы и замечания:

1. Непонятен рисунок 5 и пояснения к нему, обосновывающие особенности методики, (i) Если примесями, мешающими анализу, считаются два соединения с временами удерживания более 8 мин (Рис. 5А), то как они могут помешать определению N7-НЕТЕГ с временем удерживания 6.15 мин (Рис. 5Б)? (ii) Насколько близка точная величина m/z иона- предшественника примесей к m/z N7-НЕТЕГ, чтобы помешать определению в режиме MS^1 ? (iii) Присутствует ли в спектре MS^2 примеси ион-продукт с m/z 105.0369, чтобы помешать определению N7-НЕТЕГ в режиме MS^2 ? (iv) Какой диапазон допустимых m/z выбран для количественного метода? Судя по Рис. 5, он составляет 40 ppm. Если это так, то не является ли этот диапазон слишком большим для спектрометра типа QrbiTrap - ввиду снижения селективности без очевидных преимуществ?

2. На Рис. 3 (Схема пробоподготовки мочи для определения N7-НЕТЕГ) указано, что при твердофазной экстракции N7-НЕТЕГ патрон Oasis HLB с загруженной пробой промывали раствором ацетонитрила (10%) в воде, после

чего элюировали 50%-ным водным ацетонитрилом. Далее, в Табл. 4 (Оптимизация условий ТФЭ при определении N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ) указано, что при элюировании N7-НЕТЕГ с этого же патрона 10%-ным ацетонитрилом площадь пика N7-НЕТЕГ составляет 7400 у.е. Какой примерно доле N7-НЕТЕГ, загруженного на патрон, соответствует эта площадь? И, если эта доля велика, то почему она не элюируется с патрона при его промывке по методике, приведенной на Рис. 3 (т.е. до штатного элюирования 50%-ным ацетонитрилом)?

3. Что такое фаза «Diol» в Табл. 4? Возможно, это ошибочное указание фазы «Sep-Pack C18», упоминаемой в тексте?

В отзыве Зенкевича Игоря Георгиевича, доктора химических наук, профессора Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» отмечено следующее:

Из критических моментов стоит отметить несколько чрезмерный объем автореферата, что, правда, не стоит считать особо принципиальным. Слишком большой акцент сделан на разработку методик, прежде всего в научной новизне и выносимых на защиту положениях. Здесь лучше было бы говорить о новых подходах, новых аналитических решениях и т.п., на основании которых автор и разрабатывает конкретные методики. На стр. 12 и далее автор упоминает и использует такой критерий, как матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт. Учитывая достаточно принципиальный характер этого критерия, его стоило бы пояснить более подробно (возможно, это содержится в тексте самой диссертации).

На стр. 10 для характеристичного для N7-НЕТЕГ иона указана масса 236.08627 Да (речь идет о MRM переходе 256.08627 -> 105.03690). Однако на стр. 16 для этого же соединения и для этого же иона указана масса 256.07924 (при этом масса второго иона в MRM переходе 256.07924 -> 105.03690 остается неизменной). Нужны пояснения, почему различаются массы этого иона. В Табл. 2 (стр. 16) указана операция «Центрифугирование 10 мин при 14 об/мин», что воспринимается как опечатка.

Отзыв кандидата химических наук, заведующей лабораторией токсикологической химии органических соединений химико-аналитического отдела Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства России” Журкович Инны Константиновны содержит следующие замечания:

1. В качестве замечания следует отметить, что элементы валидации вновь разработанных аналитических методик выбраны произвольным образом без учета отечественных и зарубежных руководящих документов, например, ОФС. 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» или “ASEAN Guidelines for Validation of Analytical Procedure”.

2. Кроме того, с точки зрения ионогенной природы исследуемых аддуктов, было бы интересно оценить эффективность их твердо-фазной экстракции с применением не только нейтральных, но и ионообменных сорбентов.

В отзыве Морозика Юрия Ивановича, профессора, доктора химических наук и Галяева Григория Викторовича, доцента, кандидата химических наук, являющихся сотрудниками ФГКВООУ ВО «Военная академия радиационной, химической и биологической защиты им. Маршала Советского Союза С.К. Тимошенко», приводятся следующие замечания:

1. На страницах 7 и 8 автореферата два раза и в сходных выражениях упоминается, что обоснован выбор аддукта N7-НЕТЕГ в качестве биомаркера воздействия сернистого иприта на ДНК. К сожалению, автор в обоих случаях не упоминает, на чем основывался этот выбор. Если основная причина состоит в том, что N7-НЕТЕГ является основным продуктом взаимодействия иприта с ДНК (стр. 6), то это необходимо указать.

2. На стр.9 автореферата указывается, что содержание основного вещества в очищенном образце биомаркера N7-НЕТЕГ было установлено методом ЯМР и составляло 90 %. Не вполне понятно, как это количественное определение могло быть проведено, потому желательны достаточно подробные комментарии автора с учетом того, что при использовании какой-либо модификации ЯМР-спектроскопии сигнал дают только соединения, содержащие ядра соответствующего типа, а также очень близкого сходства

спектров ЯМР!Н аддуктов N7-НЕТЕГ и, например, N3-НЕТЕА (стр. 6) и т.д.

В отзывах доктора химических наук, доцента ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ» Алексенко С.С.; доктора химических наук, главного научного сотрудника отдела специальных инновационных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России Савчука С. А.; кандидата химических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории функциональной протеомики и метабомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Вирюса Э.Д. замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью в области научных исследований, выполненных соискателем, и подтверждается сферой их профессиональной деятельности, наличием публикаций в данной сфере, в том числе профильных монографий и статей в соответствующих рецензируемых журналах, а также их согласием выступить в качестве ведущей организации и официальных оппонентов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны:

- методики определения метаболита сернистого иприта, N7-НЕТЕГ, в моче и крови методом ВЭЖХ-МС/МС;

- методика совместного определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в моче методом ВЭЖХ-МС/МС;

предложено:

- методический подход по определению аддуктов алкилирующих агентов с ДНК для целей биомониторинга;

- методический подход для ретроспективного установления факта воздействия токсичных веществ на организм;

доказаны:

- возможность оценки степени повреждения/репарации ДНК при воздействии алкилирующих агентов по данным анализа проб мочи;
- обоснованность применения разработанной методики определения аддуктов лекарственных препаратов с ДНК в биологических образцах;
- работоспособность модели для подбора схемы лечения с применением и без применения скавенджера.

введены:

- алгоритм оценки повреждающего действия сернистого иприта на ДНК;
- аналитические решения оценки защитного действия скавенджеров на ДНК при экспозиции цитостатиками.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны:

- перспективность использования методик биомониторинга и установления факта воздействия токсичного вещества на организм;
- применимость разработанных аналитических решений для оценки влияния скавенджеров на сроки выведения метаболитов отравляющих веществ алкилирующего действия из организма;

применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные методы хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения, которые обеспечили возможность определения аналитов с различающимися физико-химическими свойствами в рамках одной методики.

изложены:

- химико-аналитические основы выбора биомаркеров воздействия и эффекта в качестве целевых аналитов;
- аналитические стратегии определения аддуктов цитостатиков с ДНК и скавенджерами;

раскрыты:

- принципы применения тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения для определения биомолекулярных аддуктов ксенобиотиков в биологических матрицах;

- методические особенности определения аддуктов ксенобиотиков с ДНК в биологических пробах, способы их извлечения из сложной матрицы;

изучены:

- способы извлечения и концентрирования аддуктов сернистого иприта с ДНК из биоматриц;

- условия оптимизации методик определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и ацетилцистеином для разработки унифицированной методики определения аналитов в моче.

- особенности совместного определения метаболитов сернистого иприта (СБАЦЭ) и аддукта сернистого иприта с ДНК в моче в ходе эксперимента *in vivo*;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены:

- методики определения аддукта сернистого иприта с ДНК в моче и крови, совместного определения аддукта сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в моче включены в сборник рабочих процедур «Лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования».

определены:

- возможность оценки повреждения ДНК вследствие воздействия алкилирующего агента, а также влияния скавенджера на объем наносимых повреждений и кинетику выведения аддуктов ксенобиотиков с ДНК;

- основные продукты взаимодействия ЦФА с ДНК, установлены сроки их выведения;

создана:

– унифицированная схема анализа проб мочи для определения аддуктов алкилирующих агентов с ДНК;

представлена:

- методические рекомендации по определению аддуктов сернистого иприта с ацетилцистеином и ДНК, которые включены в научно-методическое

обеспечение российских лабораторий в международных профессиональных тестах ОЗХО по анализу биопроб.

Оценка достоверности результатов исследований выявила, что результаты получены на сертифицированном современном оборудовании. Воспроизводимость результатов проверена в различных условиях анализа. Все результаты определений статистически обработаны, а для разработанной методики проведена оценка метрологических характеристик.

теория базируется на известных подходах хроматографического определения отравляющих веществ, согласуется с опубликованными теоретическими и экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе основных методик определения отравляющих веществ алкилирующего действия в различных биопробах;

использовано сравнение авторских и литературных данных, полученных другими исследователями по рассматриваемой теме;

установлено, что результаты, полученные в ходе выполнения работы, не противоречат независимым литературным данным, относящимся к области определения биомаркеров отравляющих веществ;

Личный вклад соискателя состоит в участии соискателя на всех этапах процесса: анализе литературных данных по состоянию проблемы извлечения и анализа аддуктов ДНК с алкилирующими агентами из биологических матриц; постановке целей и решении задач исследования, постановке и выполнении экспериментальных работ при определении аддуктов сернистого иприта и циклофосамида в крови и моче лабораторных животных методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, практической апробации методик определения аддуктов алкилирующих агентов с ДНК в биопробах, интерпретации данных, подготовке публикаций по выполненной работе, подготовке докладов и их представлении на конференциях. Теоретические исследования в области строения, синтеза, кинетики выведения аддуктов отравляющих веществ с ДНК выполнены самостоятельно.

На заседании 18 июня 2020 года диссертационный совет принял решение присудить Орловой Ольге Игоревне ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель диссертационного совета

д-р хим. наук, профессор



З.А. Темердашев

Ученый секретарь диссертационного совета

канд. хим. наук, доцент



Н.В. Киселева

18.06.2020