



Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Федеральное государственное унитарное
предприятие

"Научно-исследовательский институт
гигиены, профпатологии и экологии человека"
Федерального медико-биологического агентства
(ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России)

188 663, Ленинградская область, Всеволожский район,
д.п. Кузьмолловский, ст. Капитолово, корп. №93
т/факс (812) 449-61-77; (812) 449-61-68; (812) 606-62-80;
(812) 606-62-83

E-mail: gpech@fmbamail.ru; niigpech@rihophe.ru

ИНН 4703008032, КПП 470301001 ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России филиал ОПЕРУ Банка ВТБ (ПАО)
в Санкт-Петербурге г. Санкт-Петербург, р/с 40502810236000000178 к/с 30101810200000000704
БИК 044030704 ОКПО: 11170739, ОКВЭД: 73.10, ОКФС 12, ОКОПФ 65241, ОКОГУ 1320760, ОКТМО 41612158

Выписка из протокола заседания Ученого Совета ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА России № 4 от 17.10.2022 г.

Председатель Ученого Совета – д.м.н., профессор А.С. Радилов
Секретарь – Матвеева К.В.
Присутствовали члены Ученого Совета – 20 человек

ПОВЕСТКА ЗАСЕДАНИЯ:

Апробация диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальностям 1.3.2 Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 Аналитическая химия на тему: «Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «Лаборатория на мишени».

Соискатель: Горбунов Александр Юрьевич, старший научный сотрудник ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

Научные руководители: кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ИАП РАН, Подольская Екатерина Петровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России Бабаков Владимир Николаевич.

Рецензент представленной диссертации: кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России Каракашев Георгий Васильевич.

СЛУШАЛИ:

С изложением основных итогов диссертационного исследования выступил соискатель Горбунов А.Ю. Он обосновал актуальность проблемы исследования: Масс-спектрометрия в сочетании с лазерной десорбцией/ионизацией (ЛДИ-МС) характеризуется высокой эффективностью ионизации и позволяет осуществлять высокопроизводительный анализ как низкомолекулярных аналитов, так и соединений пептидной природы. Однако, необходимость последовательного переноса образцов при многостадийной пробоподготовке приводит к значительной потере целевых соединений, может влиять на корректность полученных результатов, а также снижает производительность анализа. Решением этой проблемы может являться интегрирование последовательных этапов пробоподготовки непосредственно на МАЛДИ-мишени, за счет функционализации поверхности МАЛДИ-мишени и/или путём использования дополнительных устройств, обратимо закрепляемых на ней. Для обозначения такого формата был предложен термин "лаборатория на мишени" (lab-on-plate). "Лаборатория на мишени" позволяет осуществлять не только рутинные процедуры пробоподготовки, такие как очистка и концентрирование образцов, но и параллельно проводить различные химические реакции с последующим МС анализом полученных продуктов. Микрореакторные устройства на основе МАЛДИ мишени особенно актуальны для приложений, требующих высокопроизводительного анализа продуктов химических взаимодействий, таких как скрининг кандидатных соединений на раннем этапе разработки лекарственных средств (ЛС).

Биологические свойства ЛС в значительной степени определяются их метаболическими превращениями в организме (биотрансформацией). Преобразование ЛС в химически реактивные метаболиты (биоактивация) рассматривается как основной механизм побочных токсических эффектов, в первую очередь, таких как идиосинкратическая гепатотоксичность. Моделирование биотрансформации при разработке лекарственных средств (ЛС) позволяют предсказать побочные токсические эффекты в ходе ранних доклинических исследований и исключить из дальнейшего рассмотрения кандидатные соединения с нежелательным метаболизмом. Традиционные методы моделирования с использованием биологических систем (микросомы печени, гепатоциты, клеточные и органные модели печени, лабораторные животные) позволяют получить наиболее полную картину биотрансформации исследуемого ЛС, но при этом достаточно сложны и трудоёмки. Поскольку в большинстве случаев биоактивация ЛС происходит за счёт окислительных реакций, таких как дегидрогенирование и гидроксילирование, было предложено несколько простых, быстрых и

сравнительно недорогих методов неферментативного моделирования окислительной биотрансформации ЛС, которые являются чисто инструментальными и не требуют использования биоматериалов. Наибольшее распространение получили методы, основанные на электрохимическом окислении (ЭХО) и УФ-индуцированном фотокаталитическом окислении в присутствии наночастиц TiO_2 (УФ/ TiO_2 -ФКО), которые представляются перспективными, так как позволяют имитировать окислительный метаболизм ЛС *in vivo*.

Последовательными этапами моделирования являются получение реактивных метаболитов (продуктов окисления) и их аддуктов (например, конъюгаты с глутатионом или модельными белками) с дальнейшим МС анализом. Интегрирование всех этапов в рамках одной платформы на основе МАЛДИ мишени может значительно повысить производительность и эффективность исследований побочных токсических эффектов в рамках ранних доклинических исследований кандидатных соединений.

Таким образом, разработка высокопроизводительной платформы, позволяющей проводить предварительный скрининг кандидатных ЛС за счет интегрирования этапов моделирования биотрансформации, оценки вероятности образования реактивных метаболитов, способных образовывать ковалентные аддукты с модельными белками и последующей пробоподготовки для МС анализа в формат «Лаборатория на мишени» является весьма актуальной.

В докладе А.Ю. Горбунов изложил практическую значимость работы и основные результаты диссертационного исследования, выполненные лично автором и вынесенные на защиту. После заслушанного сообщения соискателя Горбунову А.Ю. были заданы вопросы присутствующими. Соискатель ответил на все поставленные вопросы.

Научная значимость:

Разработан и изготовлен прототип многолучного фотокаталитического микрореакторного устройства, позволяющий проводить высокопроизводительный скрининг ЛС для оценки образования реакционноспособных метаболитов. Предложена методика фотокаталитического окисления исследуемых ЛС, образования их аддуктов с белком и последующей пробоподготовки в лунке-микрореакторе непосредственно на МАЛДИ мишени в формате «лаборатория на мишени».

Установлено, что электрофоретическое осаждение наночастиц TiO_2 на МАЛДИ мишень, позволяет получать многофункциональное высококачественное покрытие с воспроизводимыми характеристиками, которое может быть эффективно использовано как в качестве фотокатализатора при УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ мишени, так и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе. При этом показано, что использование гидрофобного композитного покрытия, полученного методом электрофоретического осаждения TiO_2 с

последующей обработкой слоя полидиметилсилоксаном. в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ. обеспечивает формирование протонированных молекул аналита $[M+H]^+$; при отсутствии катионированных молекул $[M+Na]^+$ и $[M+K]^+$.

Разработана методика модификации МАЛДИ мишени металл-аффинным сорбентом на основе стеарата лантана (монослой Ленгмюра). Показано, что стадия металл-аффинной экстракции аддуктов белковых соединений с метаболитами хлорсодержащих ксенобиотиков может быть успешно совмещена, с разработанным многолучным фотокаталитическим микрореакторным устройством как дополнительный этап пробоподготовки.

Идентифицированы аддукты глобина человека с продуктами окисления диклофенака, парацетамола и амодиахина по С-93 и С-112 бета-субъединицы, и С-104 альфа-субъединицы, которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации. На примере аддуктов глобина человека с продуктами окисления диклофенака и амодиахина показана возможность их специфичной экстракции методом металл-аффинной хроматографии. Основные положения, выносимые на защиту:

1. УФ/TiO₂-ФКО позволяет моделировать окислительную биотрансформацию диклофенака (ДФ) и обеспечивает высокий выход двух основных метаболитов, образующихся *in vivo* - 5-ОН-ДФ и 4'-ОН-ДФ. По сравнению с электрохимическим окислением, УФ/TiO₂-ФКО более полно воспроизводит окислительный метаболизм ДФ и характеризуется значительно большей степенью конверсии.

2. УФ/TiO₂-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим МС-анализом – простой и высокопроизводительный способ моделирования и анализа окислительного метаболизма ксенобиотиков. Продукты окисления ДФ, полученные предложенным способом и полученные путём стандартного УФ/TiO₂-ФКО в суспензии, хорошо согласуются между собой как по профилю, так и по относительному выходу. Глобин человека образует ковалентные аддукты с биологически значимыми реактивными продуктами окисления диклофенака, парацетамола и амодиахина полученными путём УФ/TiO₂-ФКО.

3. Электрофоретическое осаждение наночастиц TiO₂ приводит к формированию однородного и механически стабильного слоя наночастиц, прочно связанного с поверхностью подложки. Дополнительное силкоксиллирование придаёт покрытию сверхгидрофобные свойства и значительно увеличивает эффективность ПАЛДИ-МС анализа низкомолекулярных соединений при сохранении фотокаталитических свойств.

4. Прототип 96-лучного фотокаталитического микрореактора позволяющий последовательно осуществлять на МАЛДИ мишени УФ/TiO₂-ФКО ксенобиотиков, получение аддуктов белков с продуктами ФКО, ферментативный гидролиз модифицированных белков.

концентрирование и сокристаллизацию пептидов с матрицей для последующей идентификации полученных продуктов путём ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа.

5. Способ получения металл-аффинных сорбентов на основе монослоев Ленгмюра непосредственно на МАЛДИ мишени и процедура для специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов из многокомпонентных образцов непосредственно на мишени МАЛДИ. Стадия металл-аффинной экстракции аддуктов белковых соединений с метаболитами хлорсодержащих ксенобиотиков может быть успешно совмещена, с разработанным многолуночным фотокаталитическим микрореакторным устройством как дополнительный этап пробоподготовки, что приводит к значительному повышению эффективности анализа.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях: 43-м Конгрессе ФЕБС (FEBS) (Прага, Чехия, 2018); Всероссийской молодежной медицинской конференции «Алмазовские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2018); 7-й ежегодной конференции Analytix (Берлин, Германия, 2019); Республиканской конференции с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, Беларусь, 2020), Международной научно-практической конференции «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2021).

Личный вклад автора.

Настоящая диссертация обобщает результаты научной деятельности автора в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии ИАП РАН. Все эксперименты, разработка методов и прототипов с последующим изготовлением проводились лично автором диссертации. Автор диссертации принимал непосредственное участие в постановке задач и обсуждении новых научных данных. Обработка экспериментальных результатов осуществлялась лично автором.

Основные публикации по теме диссертации:

1. **А. Ю. Горбунов**, И. М. Зорин, С. К. Ильюшонок, А. А. Бардин, О. А. Кельцьева, Н. В. Краснов, В. Н. Бабаков, Е. П. Подольская Применение электрофоретически модифицированной TiO₂ МАЛДИ мишени для масс-спектрометрии с поверхностно-активированной лазерной десорбцией-ионизацией. // Журнал научное приборостроение. – 2021. – Т. 31. – N. 1. – С. 44 – 58.
2. **Alexander Yu. Gorbunov**, Konstantin A. Krasnov, Alexander A. Bardin, Olga A. Keltsieva, Vladimir N. Babakov, Ekaterina P. Podolskaya TiO₂-modified MALDI target for in vitro modeling of the oxidative biotransformation of diclofenac. // Mendeleev Commun. – 2020. – N.30 – С. 220-2221.

3. **A. Y. Gorbunov**, Y. A. Dubrovskii, O. A. Keltsieva, V. N. Babakov, E. P. Podolskaya. Identification of covalent adducts of hemoglobin with diclofenac metabolites. // FEBS Open Bio V.8 (Suppl. S1). 2018. p. 348.

4. **Alexander Gorbunov**, Alexander Bardin, Semyon Ilyushonok, Jacob Kovach, Artem Petrenko, Nikolai Sukhodolov, Konstantin Krasnov, Nikolai Krasnov, Ivan Zorin, Alexander Osbornev, Vladimir Babakov, Andrey Radilov, Ekaterina Podolskaya. Multiwell photocatalytic microreactor device integrating drug biotransformation modeling and sample preparation on a MALDI target. // Microchemical Journal. – 2022. – N.178. P. 107362.

5. Alexey S. Gladchuk, . Elena S. Silyavka, Vladimir V. Shilovskikh, Vladimir N. Bocharov, Ivan M. Zorin, Nikolai V. Tomilin, Nikita A. Stepashkin, Marina L. Alexandrova, Nikolai V. Krasnov, **Alexander Yu. Gorbunov**, Vladimir N. Babakov, Nikolai G. Sukhodolov, Artem A. Selyutin, Ekaterina P. Podolskaya Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment. // Thin Solid Film, – 2022. – V. 756.

6. **А. Ю. Горбунов**, Е. П. Подольская Формирование наноразмерных мультимолекулярных структур стеарата лантана с использованием монослоев Ленгмюра для масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией. // Письма в ЖТФ. – 2022. – Т. 48. – № 21. – С. 35 – 39.

ОБСУЖДЕНИЕ:

В ходе обсуждения выступали: д.м.н., профессор Радиллов А.С., д.х.н. Савельева Е.И., к.м.н. Киселев Д.Б., д.б.н. Гончаров Н.В., к.м.н. Дулов С.А., к.м.н. Петунов С.Г., к.х.н. Уколов А.И., к.б.н. Бабаков В.Н..

УЧЕНЫЙ СОВЕТ ПРИНЯЛ ЕДИНОГЛАСНОЕ РЕШЕНИЕ:

Диссертацию А.Ю. Горбунова специальностям 1.3.2 Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 Аналитическая химия на тему: «Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «Лаборатория на мишени» считать законченным научным трудом, в котором изложены научно обоснованные решения и рекомендации, внедрение которых позволит использовать разработанную экспериментальную установку в фармацевтических компаниях и научно-исследовательских учреждениях для моделирования окислительной биотрансформации и доклинической оценки потенциальной токсичности пренаратов-кандидатов, а также для разработки аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с долгоживущим белками при ретроспективной диагностике интоксикаций.

Полученные результаты были внедрены и используются в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, а также в лабораториях химической и медицинской диагностики и медицинских проблем химической безопасности ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Работа соответствует профилю Диссертационного Совета 24.1.029.01 при Институте аналитического приборостроения РАН по специальностям 1.3.2 Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 Аналитическая химия.

1. Рекомендовать диссертацию Горбунова А.Ю. «Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «Лаборатория на мишени» к публичной защите в Диссертационном Совете Д 24.1.029.01 при Институте аналитического приборостроения РАН по специальностям 1.3.2 Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 Аналитическая химия.

Председатель Ученого Совета

д.м.н., профессор

Ученый секретарь

д.м.н., профессор



А.С. Радилов

Д. С. Медведев