

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Физико-технического института
им. А.Ф.Иоффе РАН
доктор физ.-мат. наук
П.Н.Брунков
03 марта 2023 г



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

На диссертационную работу ГОРБУНОВА АЛЕКСАНДРА ЮРЬЕВИЧА
«Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое
моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате
«лаборатория на мишени», представленной на соискание ученой степени кандидата
технических наук по специальностям 1.3.2. – «Приборы и методы
экспериментальной физики» и 1.4.2 – «Аналитическая химия»

Актуальность темы и выполненной работы

Биологические свойства сложных биологических молекул, попадающих в организм человека (ксенобиотиков), в том числе и лекарственных средств, в значительной степени определяются их метаболическими превращениями в организме (биотрансформацией). Возможное преобразование ксенобиотиков в химически реактивные метаболиты (биоактивация) рассматривается как основной механизм побочных токсических эффектов, таких как, например, идиосинкратическая гепатотоксичность. Моделирование биотрансформации при разработке новых лекарственных средств является очень важным техническим приемом, позволяющим предсказать возможные побочные токсические эффекты без проведения биологических экспериментов, только на основании метода химических аналогий. Это можно сделать 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 лекарственного средства, но при этом достаточно сложны и трудоёмки. Поскольку в значительном большинстве случаев биоактивация лекарственных средств происходит за счёт окислительных реакций, таких как дегидрогенирование и гидроксילирование, было предложено несколько простых, быстрых и сравнительно недорогих методов неферментативного моделирования окислительной биотрансформации, которые являются чисто инструментальными и не требуют использования биоматериалов. УФ-индуцированное фотокаталитическое окисление в присутствии наночастиц TiO_2 (УФ/ TiO_2 -ФКО), представляется весьма перспективным методом моделирования биотрансформации и позволяет достаточно полно имитировать окислительный метаболизм *in vivo*.

Масс-спектрометрия (МС) в сочетании с матрично- и поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ/ПАЛДИ) 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 подхода 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.

Совмещение простоты и эффективности фотокаталитического моделирования окислительной биотрансформации лекарственных средств с высокой чувствительностью и скоростью МС-анализа с лазерной десорбцией–ионизацией позволяет повысить производительность и снизить себестоимость предварительного скрининга кандидатных лекарственных средств на предмет образования реактивных метаболитов в ходе ранних доклинических исследований. Таким образом, разработка высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени, интегрирующей моделирование биотрансформации ЛС и дальнейшую пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени», является актуальной задачей.

Научная значимость работы:

1. Предложено научное обоснование нового технического решения, позволяющего проводить высокопроизводительное моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков в формате «лаборатория на мишени». Разработана методика фотокаталитического окисления исследуемых соединений, образования их аддуктов с белком и последующей пробоподготовки в лунках-микрореакторах непосредственно на МАЛДИ мишени.

2. Установлено, что электрофоретическое осаждение наночастиц TiO_2 позволяет получать высококачественное многофункциональное покрытие с воспроизводимыми характеристиками, которое может быть эффективно использовано как в качестве фотокатализатора при УФ/ TiO_2 -ФКО, так и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе. Показано, что использование в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ гидрофобного композитного покрытия, полученного путём электрофоретического осаждения TiO_2 с последующей поверхностной модификацией полидиметилсилоксаном, обеспечивает формирование протонированных молекул аналита $[\text{M}+\text{H}]^+$ при отсутствии катионированных аддуктов $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $[\text{M}+\text{K}]^+$.

3. Разработана методика функционализации поверхности МАЛДИ-мишени металл-аффинным сорбентом на основе стеарата лантана (монослой Ленгмюра). Показано, что стадия металл-аффинной экстракции пептидных аддуктов с метаболитами хлорсодержащих ксенобиотиков может быть успешно включена в предложенную методику как дополнительный этап пробоподготовки.

4. Идентифицированы аддукты глобина человека с продуктами окисления амодиахина по остаткам α Cys104, β Cys93 и β Cys112, которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации. На примере аддуктов глобина человека с продуктами окисления амодиахина показана возможность их селективной экстракции методом металл-аффинной хроматографии.

Практическая значимость работы:

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

2. Разработанная экспериментальная установка может быть использована в фармацевтических компаниях и научно-исследовательских учреждениях для моделирования окислительной биотрансформации и доклинической оценки потенциальной токсичности препаратов-кандидатов, а также для разработки аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с долгоживущими белками при ретроспективной диагностике интоксикаций.

Структура диссертации, публикации и апробация результатов

Диссертация состоит из введения, трех разделов, заключения, списка литературы и приложения. Она изложена на 143 страницах и включает 65 рисунков, 9 таблиц, 211 наименований списка литературы.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях:

1. 43-м Конгрессе ФЕБС (FEBS), Прага, Чехия, 2018 г.
2. Всероссийской молодежной медицинской конференции «Алмазовские чтения», Санкт-Петербург, 2018 г.
3. Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности», Санкт-Петербург, 2018 г.
4. 7-й ежегодной конференции Analytix, Берлин, Германия, 2019 г.
5. Республиканской конференции с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины», Минск, Беларусь, 2020 г.

5. Международной научнопрактической конференции «Системы контроля окружающей среды», Севастополь, 2021г.

6. Десятом съезде ВМСО «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» IX всероссийская конференция с международным участием, Москва, 2021 г.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 6 публикациях, из них 1 статья в научных журналах, рекомендованных ВАК, 5 статей в изданиях, индексируемых базами цитирования SCOPUS и Web of Science.

Во **введении** обоснованы актуальность темы диссертационной работы, выбор направлений исследований, сформулирована цель работы и решаемые задачи для её реализации. Во введении также определена научная новизна и

практическая значимость полученных результатов, изложены защищаемые положения.

Первый раздел представляет собой обзор литературы, посвященный биотрансформации ксенобиотиков, моделированию биотрансформации ксенобиотиков и методам идентификации продуктов биотрансформации на основе масс-спектрометрии. Описаны различные методы моделирования биотрансформации ксенобиотиков, отмечены преимущества неферментативных инструментальных методов. Отдельно рассмотрено моделирование окислительной биотрансформации путём электрохимического окисления и УФ/TiO₂-ФКО. Отмечена перспективность УФ/TiO₂-ФКО как метода моделирования окислительной биотрансформации ЛС для быстрого предварительного скрининга кандидатных ЛС в ходе ранних доклинических исследований. Описаны полупроводниковые свойства TiO₂, обеспечивающие эффективность наноструктурированного покрытия TiO₂ в качестве фотокатализатора при УФ/TiO₂-ФКО и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ. Подробно рассмотрено ЭФО наночастиц как простой и технологически гибкий метод получения фотокаталитических покрытий TiO₂. Описаны методы ионизации МАЛДИ и ПАЛДИ, отдельно обсуждается проблема ЛДИ-МС анализа низкомолекулярных аналитов. Обосновывается актуальность создания системы формата "лаборатория на мишени", обеспечивающей инструментальное сопряжение фотокаталитического моделирования биотрансформации с последующим масс-спектрометрическим анализом полученных продуктов.

Во **втором разделе** описаны условия проведенных экспериментов и способам обработки полученных данных. Представлены: а) методика проведения электрохимического окисления диклофенака; б) методика проведения УФ/TiO₂-ФКО диклофенака в суспензии; в) методика ВЭЖХ/МС/МС анализа продуктов окисления диклофенака; г) методика ИЦР ПФ анализа продуктов окисления диклофенака в режиме прямого ввода; д) методика проведения УФ/TiO₂-ФКО на модифицированной TiO₂ МАЛДИ-мишени; е) методика получения покрытия TiO₂ с использованием метода «сухих капель»; ж) методика получения покрытия TiO₂ с использованием метода электрофоретического осаждения; з) методики характеристики полученных покрытий; и) методика УФ/TiO₂-ФКО на МАЛДИ-мишени, модифицированной TiO₂; к) методики проведения ПАЛДИ/МАЛДИМС анализа; л) приведено описание прототипа многолучевого фотокаталитического микрореакторного устройства; м) методика моделирования светового потока; н) методики УФ/TiO₂-ФКО ЛС; о) методики получения аддуктов глобина человека с продуктами окисления ЛС; п) методика ферментативного гидролиза в присутствии трипсина.

В третьем разделе представлены и обсуждены результаты работы.

1. Разработано и изготовлено микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующую пробоподготовку в рамках одной высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени в формате «лаборатория на мишени». С использованием разработанного устройства были получены и идентифицированы продукты окисления амодиахина и их аддукты с глобином человека (по остаткам αCys104, βCys93 и βCys112), которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации.

2. Разработан простой, быстрый и высокопроизводительный подход для моделирования окислительного метаболизма, основанный на проведении УФ/TiO₂-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим масс-спектрометрическим анализом. Установлено, что УФ/TiO₂-ФКО является более предпочтительным методом моделирования окислительного метаболизма диклофенака, чем ЭХО.

3. Выявлено, что ЭФО наночастиц TiO₂ на подложку из нержавеющей стали с последующей модификацией осажденного слоя ПДМС позволяет получать высококачественное композитное покрытие с двойственной функциональностью, которое может быть использовано в качестве фотокатализатора при УФ/TiO₂-ФКО и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС.

4. Разработаны способ получения мультимолекулярных структур на основе коллапсированных монослоев стеарата лантана (FLa), обладающих свойствами металл-аффинных сорбентов, и процедура для специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов из многокомпонентных образцов непосредственно на МАЛДИ-мишени. Продемонстрировано, что сорбент на основе FLa обладает развитой поверхностью и механической стабильностью. Селективное обогащение образцов целевыми хлорсодержащими аналитами значительно повышает чувствительность МС анализа. Металл-аффинная экстракция хлорсодержащих аддуктов может быть успешно введена в качестве дополнительного этапа пробоподготовки при использовании разработанного РСμR96.

5. Ключевыми преимуществами предложенного подхода являются значительное увеличение производительности анализа, возможность параллельного моделирования биотрансформации множества различных ксенобиотиков, а также возможность синтеза стандартных образцов метаболитов ЛС при минимальных расходах реагентов.

По диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов:

1. Нев полной мере обсужден механизм УФ стимулированного окисления и недостаточно обоснован выбор используемого технического решения.

2. Нет данных о стабильности наночастиц из оксида титана на поверхности МАЛДИ мишени, не обсуждения роль размера использованных частиц.

3. В работе имеют опечатки.

Сделанные замечания не изменяют общую положительную оценку диссертационной работы соискателя, не снижают научной и практической значимости диссертации. Принимая во внимание полученные результаты и объем проведенных исследований, можно заключить, что диссертация является весомым научным трудом, содержащим в себе важные практические результаты.

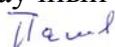
Заключение по работе

Диссертационная работа Горбунова А.Ю. является законченной, самостоятельной научно-исследовательской работой, обладающей актуальностью и новизной и имеющей практическую и научную значимость. Работа выполнена на высоком научном уровне, полученные результаты и выводы достоверны и обоснованы, что подтверждается публикациями и докладами по материалам диссертации.

По своему содержанию и исполнению диссертационная работа Горбунова А.Ю. «Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени», полностью отвечает требованиям предъявляемым к диссертациям в соответствии с пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Горбунов Александр Юрьевич присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальностям 1.3.2. – «Приборы и методы экспериментальной физики» и 1.4.2 – «Аналитическая химия».

Отзыв составлен на основании ознакомления с текстом диссертации, автореферата и доклада Горбунова А.Ю., обсужден и одобрен на научном семинаре лаборатории физики адсорбционно-десорбционных процессов ФТИ им. А.Ф.Иоффе РАН (протокол № 3 от 07.02.2023 г.).

доктор физико-математических наук,
старший научный сотрудник ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН

 Павлов Виктор Георгиевич

Сведения об организации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук
194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26
Тел./факс: 8 (812) 297-22-45
<https://ioffe.ru/ru/>
e-mail: post@mail.ioffe.ru