

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.029.01 (Д002.034.01)  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО  
ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИАП РАН),  
Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**

**ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА  
НАУК**

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение Диссертационного совета от «24» марта 2023 г. №6

о присуждении Горбунову Александру Юрьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата технических наук.

Диссертация «Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «Лаборатория на мишени» по специальностям 1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 – Аналитическая химия принята к защите 23.12.2022 г., протокол № 20/1, Диссертационным советом 24.1.029.01 (Д002.034.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д.31-33, лит. А, приказ 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель: Горбунов Александр Юрьевич, 1986 года рождения, окончил в 2009 году Саратовский военный институт биологической и химической безопасности МО РФ по специальности «Химическая технология органических веществ», в 2021 г. окончил очную аспирантуру Института аналитического приборостроения по направлению 01.04.01 «Приборы и методы экспериментальной физики» по профилю 1.3.2 «Приборы и методы экспериментальной физики». В настоящее время работает в должности старшего научного сотрудника в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии Федерального государственного унитарного предприятия "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-

биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России). Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт аналитического приборостроения Российской академии наук» («ИАП РАН»), г. Санкт-Петербург и Федеральном государственном унитарном предприятии "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства.

#### **Научные руководители:**

Подольская Екатерина Петровна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ИАП РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории химической и токсикологической диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

Бабаков Владимир Николаевич – кандидат биологических наук, зав. лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

#### **Официальные оппоненты:**

1) Егоров Владимир Валерьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Институт экспериментальной медицины, представил на диссертацию и автореферат **положительный отзыв**, в котором содержатся следующие замечания:

1. В тексте работы имеются небольшие стилистические погрешности.
2. Надписи на Рисунке 2 не переведены на русский язык и не приведена ссылка на источник изображения.
3. В некоторых частях списка литературы присутствует сбой нумерации источников (например, ссылка 102, 137).
4. В разделе Материалы ... отсутствует описание использованных белков глобина и трипсина.
5. При описании центрифугирования используются обороты в минуту, а не ускорение (без упоминания ротора).

2) Поволоцкий Алексей Валерьевич, доктор физико-математических наук, доцент Института химии, кафедры лазерной химии и лазерного материаловедения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», представил на диссертацию и автореферат **положительный отзыв**, в котором содержатся следующие замечания:

1. В работе встречаются опечатки и неточные фразы. На странице 25 фраза: «...суспензия также подвергалась непрерывным импульсам ИК-лазера...», словосочетание непрерывные импульсы не имеет физического смысла. Подпись к рисунку б: «Фотокаталитические процессы в полупроводниках», на самом деле, на поверхности полупроводников. Термин «нейтрал» не является общепринятым в области исследования лазерной плазмы.
2. В п. 3.4.2 описываются результаты моделирования освещенности стенок лунки при реализации фотокаталитического окисления в зависимости от геометрии лунки и угловой диаграммы распределения интенсивности излучения УФ светодиода. При этом, процесс фотоокисления должен проходить при наличии раствора в лунке, форма поверхности которого на границе с воздухом не является плоской. Образуется мениск, который, в зависимости от краевого угла, может выступать в качестве дополнительной рассеивающей или фокусирующей линзы. Насколько сильно наличие линзы в виде мениска может повлиять на равномерность освещения стенки лунки планшета?
3. Облучение образцов УФ излучением, как правило, сопровождается нагревом этих образцов благодаря высокому коэффициенту поглощения. Судя по представленной в работе информации, светодиодный модуль установлен на охлаждающую систему, но данных о температуре охлаждающей системы, раствора в лунках и самого планшета во время фотокаталитического окисления не приведено. Проводились ли измерение или оценка температуры растворов в лунках?
4. Можно ли подход, предложенный в работе при создании «лаборатории на подложке» РСрR96, использовать для разработки МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) или ПАЛДИ (поверхностно-

активированная лазерная десорбция/ионизация) мишени, реализующих метод масс-спектрометрии с временным разрешением?

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук **в своем положительном заключении**, утвержденном заместителем директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, доктором физ.-мат. наук П. Н. Брунковым, подписанном доктором физ.-мат. наук, старшим научным сотрудником ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН В. Г. Павловым, указала, что диссертация Горбунова А. Ю. соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 1.3.2 и 1.4.2, и отметила следующие замечания:

1. Не в 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, нет обсуждения роли размера использованных частиц.
3. В работе имеются опечатки.

Соискатель имеет **12 (двенадцать)** публикаций, из них по теме диссертации **12 (двенадцать)**, в том числе **6 (шесть)** опубликованных работ в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ и Международные библиометрические базы SCOPUS и/или Web of Science, из которых **6 (шесть)** по теме диссертации, а также **6 (шесть)** публикаций в материалах всероссийских и международных научных конференций. К наиболее значительным работам, отражающим основное содержание диссертации, относятся:

1. **Горбунов А.Ю.** Применение электрофоретически модифицированной  $\text{TiO}_2$  МАЛДИ мишени для масс-спектрометрии с поверхностно-активированной лазерной десорбцией-ионизацией / Горбунов А.Ю. Зорин И.М., Ильюшонок С.К., Бардин А.А., Кельцьева О.А., Краснов Н.В., Бабаков В.Н., Подольская Е.П. // Научное приборостроение. – 2021. – Т. 31. – №. 1. – С. 44 – 58.

2. **Gorbunov A.Yu.** TiO<sub>2</sub>-modified MALDI target for in vitro modeling of the oxidative biotransformation of diclofenac / Gorbunov A.Yu., Krasnov K.A., Bardin A.A., Keltsieva O.A., Babakov V.N., Podolskaya E.P. // *Mendeleev Commun.* – 2020. – V.30. – P. 220-221.

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

4. **Gorbunov A.** Multiwell photocatalytic microreactor device integrating drug biotransformation modeling and sample preparation on a MALDI target / Gorbunov A., Bardin A., Ilyushonok S., Kovach J., Petrenko A., Sukhodolov N., Krasnov K., Krasnov N., Zorin I., Osbornev A., Babakov V., Radilov A., Podolskaya E. // *Microchemical Journal.* – 2022. – V.178. – P. 107362.

5. Gladchuk A.S. 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 / Gladchuk A.S., Silyavka E.S., Shilovskikh V.V., Bocharov V.N., Zorin I.M., Tomilin N.V., Stepashkin N.A., Alexandrova M.L., Krasnov N.V., **Gorbunov A.Yu.**, Babakov V.N., Sukhodolov N.G., Selyutin A.A., Podolskaya E.P. // *Thin Solid Films.* – 2022. – V.756. – 139374.

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

#### **На автореферат диссертации поступили следующие отзывы:**

1. От Савчука Сергея Александровича, доктора химических наук, судебного эксперта-химика ГБУЗ города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы».

#### **Замечания и вопросы:**

1. Полная последовательность этапов моделирования и анализа окислительной биотрансформации (фотокаталитическое окисление, оценка реакционной способности продуктов окисления, последующая пробоподготовка, МС-

анализ) с использованием разработанного микрореакторного устройства показана лишь для одного модельного соединения - амодиахина. Однако, выбор метода моделирования обоснован с использованием диклофенака в качестве модельного соединения, тогда как преимущества силикопирования  $TiO_2$ -покрытия продемонстрированы на примере амиодарона.

2. Автор отмечает, что разработанное устройство позволяет использовать для моделирования окислительной биотрансформации различные фотокатализаторы помимо  $TiO_2$ . В связи с этим представляет интерес сравнительный анализ продуктов окисления, полученных на разных металлооксидных фотокатализаторах с использованием разработанного устройства.

2. От Соловьева Андрея Ивановича, PhD in microbiology, научного сотрудника Национального исследовательского центра эпидемиологии, микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи.

Замечания и вопросы:

1. Проводились ли сравнительные эксперименты с идентификацией продуктов испытуемых ксенобиотиков, полученных «классическими» методами моделирования *in situ* и *in vivo*?

3. От Брауна Аркадия Владимировича, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации.

Замечания и вопросы:

1. В пункте 2 заключения в автореферате указано, что «разработан простой, быстрый и высокопроизводительный подход...», однако количественные характеристики этих преимуществ не приведены.
2. На рисунке 5 автореферата приведены значения  $m/z$  ионов с тремя знаками после запятой. С учетом разрешающей способности масс-анализатора являются ли эти значения значащими?

4. От Смирнова Игоря Павловича, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА.

Без замечаний.

5. От Столяровой Валентины Леонидовны, доктора химических наук, академика РАН, профессора Санкт-Петербургского государственного университета.

Замечания и вопросы:

1. Какие именно манипуляции из всей последовательности стадий эксперимента непосредственно относятся к формату «Лаборатория на мишени»?
2. По-видимому, в дальнейшей работе при описании методологии исследования этим деталям стоит уделять больше внимания.

6. От Костюкевича Юрия Иродионовича, доктора химических наук, доцента Сколковского института науки и технологий.

Замечания и вопросы:

1. Мне непривычно видеть структуру автореферата, когда содержание глав излагаются в несколько абзацев, а потом приводится изложение сути работы без разбивки на главы. Но, вероятно, это допустимо или принято в совете, где предполагается защита.
2. В автореферате никак не комментируется, какие физико-химические процессы приводят к окислению ксенобиотиков в результате взаимодействия с лазерным излучением.

7. От Шаройко Владимира Владимировича, PhD, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника научно-образовательного института биомедицины ФГБУ ВО ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова МЗ.

Замечания и вопросы:

1. Известно, что фаза I биотрансформации ксенобиотиков не ограничивается реакциями окисления. Может ли ФКО считаться достаточным для моделирования?
2. Какие требования с точки зрения физико-химических свойств предъявляются к соединениям (в том числе лекарственным средствам), которые изучаются с использованием микрореакторного устройства?

**Все отзывы на автореферат диссертации положительные.**

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации** обосновывается их большим опытом работы в областях физической электроники, масс-спектрометрии, разработки и конструирования масс-спектрометров и их применения для проведения исследований, биохимии и аналитической химии, что подтверждается публикациями, в которых рассматриваются вопросы, связанные с тематикой диссертационного исследования соискателя.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**предложено** научное обоснование нового технического решения в формате «Лаборатория на мишени», **позволяющее** проводить высокопроизводительное моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики);

**разработана** методика фотокаталитического окисления исследуемых соединений, образования их аддуктов с белком и последующей пробоподготовки в лунках-микрореакторах непосредственно на МАЛДИмишени (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики).

**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 (УФ-индуцированное фотокаталитическое окисление в присутствии наночастиц  $TiO_2$ ), так и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе;

**показано**, что использование в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ гидрофобного композитного покрытия, полученного путём ЭФО  $TiO_2$  с последующей поверхностной модификацией полидиметилсилоксаном, **обеспечивает** формирование протонированных молекул аналита  $[M+H]^+$  при отсутствии катионированных аддуктов  $[M+Na]^+$  и  $[M+K]^+$  (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 – Аналитическая химия).

**Разработана** методика функционализации поверхности МАЛДИ-мишени металл-аффинным сорбентом на основе стеарата лантана (монослой Ленгмюра) (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики).



**Показано**, что стадия металл-аффинной экстракции пептидных аддуктов с метаболитами хлорсодержащих ксенобиотиков может быть успешно включена в предложенную методику как дополнительный этап пробоподготовки (1.4.2 – Аналитическая химия).

**Идентифицированы** аддукты глобина человека с продуктами окисления амодиахина по остаткам  $\alpha$ Cys104,  $\beta$ Cys93 и  $\beta$ 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 (1.4.2 – Аналитическая химия).

**Теоретическая значимость** исследования обоснована тем, что применительно к проблематике диссертации эффективно, с получением обладающих новизной результатов: на примере модельных лекарственных средств **показано**, что применение метода УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО позволяет эффективно имитировать их окислительную биотрансформацию.

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

Разработанная экспериментальная установка, использующая предложенное соискателем техническое решение (Экспериментальная установка ... с фотокаталитическим реактором на основе МАЛДИ мишени, акт внедрения 1-09 от 09.09.2021 г., Приложение Г диссертации соискателя) внедрена и используется в лабораториях химической и токсикологической диагностики и медицинских проблем химической безопасности ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, а также в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

Этот результат может быть использован 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.

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» (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики). С использованием разработанного устройства были получены и идентифицированы продукты окисления амодиахина и их аддукты с глобином человека (по остаткам  $\alpha$ Cys104,  $\beta$ Cys93 и  $\beta$ Cys112), которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации (1.4.2 – Аналитическая химия).

Разработан простой, быстрый и высокопроизводительный подход для моделирования окислительного метаболизма, основанный на проведении УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим масс-спектрометрическим анализом. Установлено, что УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО является более предпочтительным методом моделирования окислительного метаболизма диклофенака, чем ЭХО (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 – Аналитическая химия).

Выявлено, что ЭФО наночастиц TiO<sub>2</sub> 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/TiO<sub>2</sub>-ФКО и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики).

Разработаны способ получения мультимолекулярных структур на основе коллапсированных монослоев стеарата лантана (FLa), обладающих свойствами металл-аффинных сорбентов (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики), и процедура для специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов из многокомпонентных образцов непосредственно на МАЛДИ-мишени (1.4.2 – Аналитическая химия). Продемонстрировано, что сорбент на основе FLa обладает развитой поверхностью и механической стабильностью (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики). Селективное обогащение образцов целевыми хлорсодержащими анализатами значительно повышает чувствительность МС анализа (1.4.2 – Аналитическая химия). Металл-аффинная экстракция

хлорсодержащих аддуктов может быть успешно введена в качестве дополнительного этапа пробоподготовки при использовании разработанного РСμR96 (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики).

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 (1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики и 1.4.2 – Аналитическая химия).

**Оценка достоверности результатов исследования выявила**, что научные положения, выводы и результаты, содержащиеся в диссертационной работе, подтверждаются использованием общеизвестных, апробированных и обоснованных методов на основе хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения. Результаты эксперимента согласуются с данными, полученными другими научными группами исследователей, где возможно сравнение.

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), десятом съезде ВМСО «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» IX всероссийская конференция с международным участием (Москва, 2021).

**Личный вклад соискателя** заключается в следующем:

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, а также в подготовке публикаций по результатам диссертационного исследования. Обработка экспериментальных результатов осуществлялась лично автором.

На заседании 24 марта 2023 года Диссертационный совет принял решение присудить Горбунову Александру Юрьевичу ученую степень кандидата технических наук.

Для проведения тайного голосования Диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 15 докторов наук, участвовавших в заседании, из 21 человека входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 4 человека, проголосовали: за – 19, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель Диссертационного совета,  
д.т.н., профессор

В. Е. Курочкин

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
д.ф.- м.н.

А. Л. Буляница

Дата оформления заключения

24 марта 2023 г.

М. П.

