

05.12.2022 № 10341-460/101

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
аналитического
приборостроения Российской
академии наук (ИАП РАН)
доктор технических наук



А.А. Евстапов

« 2 » 12 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института аналитического приборостроения РАН
по диссертационной работе 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»

Информация о соискателе и диссертационной работе

В 2009 г. Горбунов Александр Юрьевич окончил Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский военный институт биологической и химической безопасности» Министерства обороны Российской Федерации по направлению «Химическая технология органических веществ». В 2018-2021 гг. соискатель проходил обучение в аспирантуре на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институте аналитического приборостроения Российской академии наук» (ИАП РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Горбунов Александр Юрьевич работал в должности научного сотрудника в Федеральном государственном унитарном предприятии "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России) в лаборатории Молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии.

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.

Работа выполнена в ИАП РАН и ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

Актуальность темы 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 значительном большинстве случаев биоактивация ЛС происходит за счёт окислительных реакций, таких как дегидрогенирование и гидрокселирование, 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 диссертации предложена конструкция многолуночного фотокаталитического микрореакторного устройства, позволяющего 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».

Кроме того, получен ряд научно значимых результатов, приведенных в диссертации, а также их обсуждение и выводы.

Основные научные результаты и их новизна

Научная новизна:

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 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 $[M+K]^+$.
3. 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 многолуночным фотокаталитическим микрореакторным устройством как дополнительный этап пробоподготовки.
4. 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.

Практическая значимость:

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.

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 долгоживущим белками при ретроспективной диагностике интоксикаций.

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

Апробация результатов диссертационного исследования

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).

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

Основные публикации соискателя 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.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационная работа Горбунова А.Ю. посвящена разработке и реализации устройства, позволяющего проводить моделирование биотрансформации ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств в рамках их разработки и тестирования. Получаемые метаболиты, образующиеся в ходе биотрансформации молекул, во многих случаях способны образовывать ковалентные аддукты с макромолекулами, которые могут быть причиной различных наблюдаемых токсических эффектов. Изучение биотрансформации ксенобиотиков необходимо для получения модельных соединений для выявления их потенциальной токсичности, что особенно важно при разработке новых лекарственных средств. В связи с этим актуальность рассматриваемой диссертационной работы не вызывает

сомнений. Автором разработана, оттестирована система пробоподготовки и создана экспериментальная фотокаталитическая микрореакторная установка, реализующая подход «лаборатория на мишени», поскольку все стадии пробоподготовки и биотрансформации ксенобиотиков проводят непосредственно на поверхности МАЛДИ мишени, выступающей не только подложкой для масс-спектрометрического анализа, но и центром пробоподготовки. Это дает возможность последовательно осуществлять в микрореакторе фотокаталитическое окисление лекарственных средств, получение аддуктов белков с продуктами окисления, ферментативный гидролиз модифицированных белков и их концентрирование на МАЛДИ мишени с последующими измерениями молекулярного состава методом ПАЛДИ/МАЛДИ-масс-спектрометрии. В работе также показан ряд новых экспериментальных результатов, значимых в научном плане.

Указанная выше тематика исследований полностью согласуется с формулой специальности 1.3.2 и 1.4.2.

Представленная диссертация соответствует паспорту специальности 1.3.2 по следующим пунктам:

1. Разработка и создание научной аппаратуры и приборов для экспериментальных исследований в различных областях физики.

2. Разработка и создание лечебно-диагностических методик и аппаратурных комплексов для биомедицинских исследований.

На основании этого можно заключить, что диссертационная работа соответствует выбранной специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики».

Представленная диссертация соответствует паспорту специальности 1.4.2 по следующим пунктам:

1. Методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.)

2. Теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии.

3. Анализ лекарственных препаратов.

На основании этого можно заключить, что диссертационная работа соответствует выбранной специальности 1.4.2. «Аналитическая химия».

По результатам проделанной работы принято решение рекомендовать диссертацию Горбунова Александра Юрьевича «Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени» к защите на соискание ученой степени кандидата

технических наук по специальности 1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики» и 1.4.2. «Аналитическая химия» в диссертационном совете 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения РАН.

Заключение принято на заседании Научного Семинара ИАП РАН (протокол №7 от 27.06.2022 г.). Присутствовали 23 участника, в том числе 9 докторов наук по рассматриваемым специальностям.

Председатель
главный научный сотрудник
доктор физико-математических наук



Явор М.И.

Секретарь



Хорошавина Л.П.