

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

профессора кафедры фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела, 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия), профессора Федосеевой Людмилы Михайловны на диссертацию Дворской Оксаны Николаевны на тему: «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции», представленную на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук, по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность выполненного исследования.

В настоящее время постоянно расширяющийся ассортимент контролируемых государством веществ рекреационного употребления как лекарственных, так и наркотических, возрастающие требования к объективности, экспрессности и точности анализа биологических объектов делают необходимыми использование информативных, воспроизводимых, чувствительных методик пробоподготовки биоматериала и последующего их анализа. В связи с этим возникает необходимость разработки и внедрения единых подходов анализа разных классов соединений одновременно.

Твердофазная экстракция в качестве метода пробоподготовки имеет значительный потенциал в отношении извлечения и фракционирования аналитов различной структуры, а газовая хроматомасс-спектрометрия - характеризуется высокой степенью информативности, надежности. Следует отметить, что метод является актуальным скрининговым методом для анализа биообъектов.

Однако исследований крови как биологического объекта методом твердофазной экстракция в литературе представлено недостаточно в силу сложностей, возникающих при работе с кровью, ее матричным эффектом, связи ксенобиотиков с белками и пр. Для получения достоверных данных кровь

является крайне востребованным биологическим материалом для забора у живых лиц и трупов.

Разработка научно-методологических подходов к унификации и оптимизации скрининга лекарственных и наркотических веществ в биологическом материале с применением твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, является актуальным направлением, востребовано на современном этапе судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Связь задач с проблемным планом фармацевтических наук.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Пермской государственной фармацевтической академии (номер государственной регистрации 01.9.50 007417).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследования специальности, указанным в п. 4 паспорта научной специальности: разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 главы), общих выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 424 источника, из них 353 иностранных, приложений.

Работа изложена на 373 страницах машинописного текста, содержит 148 рисунков и 48 таблиц.

Содержание работы соответствует цели исследования и отражает последовательность выполнения поставленных автором задач.

Во введении представлена актуальность темы запланированных исследований, сформулированы цель и задачи, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сведения об апробации диссертации и внедрении результатов диссертационного исследования, личный вклад автора

в исследованиях, обосновано соответствие исследования паспорту специальности, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе приведен обзор литературных данных, обобщены сведения о методе твердофазной экстракции: характеристика, основные стадии, области применения, преимуществ использования; классификация патронов и сорбентов.

Представлен обзор публикаций по проведению пробоподготовки методом твердофазной экстракции биообъектов при определении исследуемых токсикантов из групп лекарственных препаратов, наркотических средств, биологически активных веществ в ходе химико-токсикологического и судебно-химического анализа, допинговых исследований и лекарственном мониторинге. Отмечена «частность» исследований и их направленность на определение конкретного вещества или группы веществ (опиаты, барбитураты и др.), многообразие используемых фаз сорбентов для ТФЭ, элюентов, промывочных и буферных растворов, их различные объемы и т.п.

Отражено значение скрининговых исследований, как наиболее востребованных в рутинном анализе биообъектов. Доказана важность исследований по изучению биотрансформации новых психоактивных веществ в организме человека, получении аналитических характеристиках основных метаболитов с целью диагностики фактов их употребления.

Приведена общая характеристика и данные о метаболизме синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22) и алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA).

Отмечена универсальность, надежность и возможность использования для скрининговых исследований метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и актуальность этого оборудования в России.

Во 2 главе представлено описание объектов и методов, используемых при проведении экспериментальных исследований; перечислены реактивы, растворители, используемые для проведения анализа; методики проведения пробоподготовки крови и мочи, описаны варианты дериватизации, режимы

работы приборов и программное обеспечение исследований, например, метод математического планирования эксперимента.

В 3 главе для формирования методологии скрининга биологических объектов на достаточно большое количество токсикантов с использованием методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием изложены основные этапы исследований и результаты эксперимента по разработке унифицированной методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с использованием твердофазной экстракции на сорбентах со смешанным типом фазы и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Исследование проведено на примере цельной и трупной крови, как наиболее сложной и важной матрицы в отношении судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Этапы исследования включали:

- выбор модельных соединений с различными показателями гидрофобности/гидрофильности и кислотности/основности с целью прогнозирования поведения токсикологически значимых соединений методом твердофазной экстракции на основе рассчитанных физико-химических характеристик: константы диссоциации, коэффициента распределения октанол/вода и коэффициента адсорбции;
- поиск оптимального буферного раствора и рН для проведения метода твердофазной экстракции;
- сравнение эффективности твердофазной и жидкость-жидкостной экстракции для модельных соединений;
- оптимизация условий для метода твердофазной экстракции в скрининге крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с использованием метода математического планирования эксперимента Бокса-Бенкена;
- экспериментальное изучение влияния 0,1 М раствора уксусной кислоты на этапе промывки в методе твердофазной экстракции на эффективность извлечения модельных соединений с использованием оптимизированной методики скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества. В результате исследований определены рациональные условия использования

метода твердофазной экстракции для эффективного извлечения из крови модельных соединений с различными физико-химическими свойствами;

– исследования по количественному определению часто встречающихся в биообъектах, в том числе у лиц с наркотической зависимостью, нестероидных противовоспалительных средств непосредственно в ходе скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества для оценки уровня концентрации (терапевтическая – токсическая доза). По результатам валидационной оценки по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость) доказана пригодность разработанной скрининговой методики количественного определения нестероидных противовоспалительных средств в цельной крови для кетопрофена, индометацина, напроксена, ибупрофена и диклофенака;

– исследования по сравнению эффективности экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок. Выбор сделан в пользу патронов Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Agilent);

– алгоритм скрининга крови, включающий основные этапы исследования с использованием твердофазной экстракции на патронах со смешанной фазой и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, который апробирован на значительной выборке реальных образцов постмортальной крови и крови от живых лиц (и 8 объектах гнилостной жидкости), результатом чего стало выявление 111 лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов в крови, в том числе, катионов метилendiоксипировалерона, пирролидиновалерофенона и метаболитов синтетических каннабимиметиков АВ-PINACA и AMB, MDMB(N)-2201, АВ-FUBINACA, 5-F-AB-PINACA, АВ-SHMINACA, XLR-11.

В главе 4 отражены исследования по выявлению основных метаболитов синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22 и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов производных амида валина АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-SHMINACA с использованием разработанной скрининговой методики (после соответствующей предварительной пробоподготовки) в моче с использованием методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-

спектрометрическим детектированием. Описаны основные метаболиты, предложены маркеры, позволяющие установить факт употребления синтетических каннабиоидов. Предполагаемые структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара. Рассчитаны физико-химические и аналитические характеристики основных метаболитов исследуемых веществ. Изучена степень конъюгации метаболитов, сделан вывод в пользу применения ферментативного гидролиза.

В главе 5 приведены исследования по выявлению основных метаболитов синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила в посмертных образцах мочи его потребителей с использованием методов газовой и жидкостной хроматографии. Предполагаемые структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара и химической ионизацией при атмосферном давлении. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых производных (ацетилированных, пропионовых, пентафторпропионовых) метаболитов ацетилфентанила. Приведена схема биотрансформации ацетилфентанила в организме человека.

Представлена схема сформулированного научно-методологического подхода к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

В заключении представлены результаты проведенных исследований, выводы и перспективы использования полученных в результате исследований данных.

Новизна исследований и полученных результатов, их достоверность.

Новизна исследования и полученных результатов заключается в разработке научно-методологического подхода к унификации и оптимизации скрининга широкого круга токсикологически значимых веществ с использованием твердофазной экстракции на патронах со смешанной фазой и последующего анализа биологического материала методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Разработана унифицированная методика скринингового исследования крови с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с целью определения широкого круга лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа биологических жидкостей; представлены результаты валидации методики количественного определения некоторых токсикологически значимых нестероидных противовоспалительных средств в крови непосредственно при проведении процедуры скрининга; выявлены основные метаболиты ряда синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA в моче потребителей курительных смесей; предложены маркеры для установления факта их употребления; получены и описаны физико-химические, газохроматографические и масс-спектральные характеристики их дериватов; установлено, что основные метаболиты данных каннабимиметиков выводятся с мочой в конъюгированном виде; идентифицированы основные метаболиты и предложены маркеры ацетилфентанила в образцах посмертной мочи; изучен метаболический профиль ацетилфентанила в моче, описаны основные пути его метаболизма; получены основные аналитические характеристики различных дериватов основных метаболитов ацетилфентанила.

Степень достоверности проведенных исследований и полученных результатов определяется достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных и чувствительных методов пробоподготовки объектов, метода математического планирования эксперимента Бокса-Бенкена, валидации методик исследований и статистической обработки полученных результатов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций основана на значительном объеме литературного и экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследований. Выводы и рекомендации логично вытекают из полученных автором

диссертации результатов. Результаты исследований обладают статистической достоверностью.

В работе выполнен комплекс исследований, позволяющих использовать разработанный научно-методологический подход для скрининга лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в рутинной практике экспертных учреждений.

Значимость результатов исследований для науки и практики, возможные пути их применения.

Теоретическая значимость работы заключается в методологическом обосновании скрининга биологических объектов с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с целью определения токсикологически значимых веществ. Сформулированный методологический подход к процедуре скрининга биологических жидкостей позволяет использовать его как для традиционных (жидкости, органы, ткани), так и для альтернативных (волосы, ногти) объектов судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

В процессе изучения метаболизма наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22) и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA) выявлены пути биотрансформации данных веществ. Эти данные, а также данные по изучению масс-фрагментации производных метаболитов могут быть использованы для прогнозирования метаболизма их гомологов и аналогов, появляющихся в нелегальном обороте, и идентификации их при анализе в объектах.

Полученные автором результаты представляют несомненный интерес для практического использования их в современной медицине и фармации в рамках проведения химико-токсикологических и судебно-химических исследований биологического материала. Разработанный научно-методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов с использованием методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием позволяет оптимизировать

деятельность экспертных учреждений: представляет возможность проведения серийной подготовки проб, соответственно, сокращение сроков проведения экспертных исследований при одновременном определении токсикологически значимых веществ в одной пробе образца.

Положения диссертационной работы могут быть использованы экспертными организациями и научными учреждениями для внедрения в учебный процесс, а также при проведении научных исследований по проблеме анализа объектов на наличие токсикологически значимых веществ и их метаболитов.

Результаты диссертационного исследования апробированы и внедрены в практическую деятельность судебно-химических отделений и химико-токсикологических лабораторий Республики Беларусь и Казахстана, а также экспертных учреждений РФ гг. Санкт-Петербурга, Самары, Ярославля, Новосибирска, что подтверждено 14 Актами внедрения. В Беларуси разработанная методика скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов РБ, что, несомненно, подчеркивает степень важности полученного результата для практического использования.

Материалы диссертационного исследования внедрены в учебный процесс ряда учебных учреждений.

По результатам исследования ФГБУ Российским центром судебно-медицинской экспертизы Минздрава России утверждены, выпущены типографским способом и рекомендованы к использованию в судебно-химическом анализе 4 Информационных письма. С участием автора выпущена монография для использования специалистами в области судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Соответствие публикаций к диссертационному исследованию требованиям ВАК РФ

Основное содержание диссертационного исследования отражено в 16 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских диссертаций, из них 6 – в журналах с международным цитированием в базах SCOPUS и Web of Science. Всего по теме диссертации опубликовано 30 печатных работ.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению работы

Представленный в диссертационной работе материал изложен последовательно и аргументировано, однако при его прочтении возникли следующие замечания и вопросы:

1. Чем обоснован выбор модельных соединений для исследований?
2. По какому принципу расположены выявленные при скрининговом исследовании трупной и цельной крови вещества в таблицах с рассчитанными физико-химическими характеристиками?
3. В Таблице 3.21 на стр. 150-151 «Соединения кислотного характера» приведены обнаруженные (при использовании разработанной скрининговой методики) в крови маркеры синтетических каннабимиметиков. Были ли при этом выявлены нативные формы синтетических каннабимиметиков?
4. Почему для идентификации структур каннабимиметиков и ацетилфентанила использовали только масс-спектрометрию и не применяли другие спектральные методы или радио спектральный анализ?

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают ценности проведенного исследования, достоверности и несомненных достоинств данной диссертационной работы.

Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»

Таким образом, диссертационная работа Дворской О.Н. «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции», представленная на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук, по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная проблема фармацевтической науки в области химико-токсикологического и судебно-химического анализа, состоящая в разработке методологических подходов к скринингу биологического материала на наличие широкого круга токсикологически значимых веществ и их метаболитов. Диссертационная работа Дворской Оксаны Николаевны соответствует требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 года № 335), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Дворская Оксана Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

профессор кафедры фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела, 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия)

профессор

Федосеева Людмила Михайловна

«7» октября 2019 г.

Адрес: 656038, г. Барнаул, проспект Ленина, д.40
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
+7 3852 566893
ludmila@agmu.ru

Подпись профессора Федосеевой Людмилы Михайловны заверяю:



Начальник управления кадров

Т.И. Якименко