

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

заведующего кафедрой химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук (15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия), профессора Кобелевой Татьяны Алексеевны по диссертации Дворской Оксаны Николаевны на тему «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук, по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность выполненного исследования.

На современном этапе рекреационного употребления различных лекарственных веществ и наркотических средств важной проблемой судебно-химического и химико-токсикологического анализа является разработка воспроизводимых, экономичных и реалистичных, с точки зрения имеющегося оборудования, методик пробоподготовки биологических объектов и их анализа. Выход новых приказов Минздрава России, где обозначена тенденция к повышению объективности, экспрессности и точности анализа биологических объектов, диктует необходимость в использовании максимально информативных и чувствительных методик пробоподготовки биоматериала, особенно, крови и последующего их анализа.

При исследовании биологических объектов стадия подготовки образца является наиболее трудоемкой, ответственной и в значительной степени определяющей конечный результат. Твердофазная экстракция является перспективным способом подготовки проб, она позволяет при использовании различных типов сорбентов осуществлять изолирование веществ с различной химической структурой из биоматериала и очистку, а также их фракционирование в рамках скрининговых исследований. Газовая хроматомасс-спектрометрия ввиду своей универсальности, высокой степени информативности, надежности и распространенности является наиболее востребованным для Российской Федерации скрининговым методом анализа биообъектов. Увеличивающееся число ненаправленных исследований в силу расширения спектра появляющихся в обороте новых психоактивных веществ, их практически полная биотрансформация в организме человека актуализирует необходимость скрининговых исследований, в том числе поиск метаболитов.

Следовые концентрации употребляемых соединений, необходимость поиска их метаболитов, специфика и трудности работы с биологическими объектами, особенно, с кровью, ее матричный эффект, отсутствие единых методик обнаружения психоактивных веществ и другие причины осложняют деятельность экспертных подразделений. Поэтому все вышеизложенное позволяет утверждать, что диссертационная работа Дворской Оксаны Николаевны, в которой представлена разработка научно-методологических

подходов к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологическом материале с применением твердофазной экстракции и газовой хроматомасс-спектрометрии, безусловно, является **своевременной и актуальной** для целей судебно-химического, химико-токсикологического анализа, фармации и медицины в целом.

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.

Результаты проведенного исследования, научные положения диссертации соответствуют формуле паспорта специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 4: «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, и приложений. Работа изложена на 373 страницах машинописного текста, содержит 149 рисунков и 48 таблиц.

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

Во введении представлена актуальность темы запланированного исследования, сформулированы цель и задачи, положения, выносимые на защиту, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость, личный вклад автора в работу, перечислены сведения об апробации и внедрении полученных результатов, обосновано соответствие диссертации паспорту специальности.

В первой главе обобщены сведения о методе твердофазной экстракции, приведены его характеристика, основные стадии, области применения, преимущества использования, классификация патронов и сорбентов. Представлен обзор публикаций по проведению пробоподготовки методом твердофазной экстракции биообъектов при определении различных токсикантов, контролируемых соединений, фармацевтических субстанций и биологически активных веществ для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа, допингового исследования и лекарственного мониторинга. Отмечена направленность исследований на определение конкретного вещества или группы веществ (опиаты, барбитураты и др.), многообразие используемых фаз сорбентов для твердофазной экстракции, множество разных элюентов, промывочных и буферных растворов и др.

Отражено значение скрининговых исследований, как наиболее востребованных в анализе биообъектов. Подчеркнута важность исследований, направленных на изучение биотрансформации новых психоактивных веществ в организме человека, получении аналитических характеристик их метаболитов.

В литературном обзоре диссертантом приводятся данные о метаболизме исследуемых «дизайнерских наркотиков»: синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов и алкилиндозол-3-карбоксамидов, производных амида валина. Показана универсальность, надежность и возможность применения для скрининговых исследований метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, а также актуальность использования этого оборудования в современных условиях.

Во 2 главе описаны объекты, методы и реактивы, используемые при выполнении диссертационной работы, методики осуществления пробоподготовки крови и мочи, варианты дериватизации, режимы работы приборов и программное обеспечение исследований, в том числе, метод математического планирования эксперимента.

Во 3 главе приведены 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 хроматомасс-спектрометрии. В работе использовалась наиболее сложная и важная матрица в отношении судебно-химического и химико-токсикологического анализа цельная и трупная кровь.

Диссертационные исследования, описанные в данной главе, включали следующие этапы:

1. Выбор модельных соединений по гидрофобно-гидрофильным и кислотно-основным свойствам с целью прогнозирования поведения широкого круга токсикологически значимых веществ в процедуре твердофазной экстракции на основе рассчитанных значений показателя константы диссоциации, коэффициентов адсорбции и распределения в среде октанол-вода.

2. Поиск оптимального буферного раствора и значений pH среды для проведения процедуры твердофазной экстракции.

3. Сравнение эффективности твердофазной и жидкость-жидкостной экстракции для модельных соединений.

4. Оптимизацию условий твердофазной экстракции в скрининге крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с использованием метода математического планирования эксперимента Бокса-Бенкена.

5. Экспериментальное изучение влияния 0,1 моль/л раствора уксусной кислоты на этапе промывки в процедуре твердофазной экстракции на эффективность ТФЭ модельных соединений с использованием оптимизированной методики скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества. Итогом оптимизации стало определение рациональных условий процедуры твердофазной экстракции для эффективного

извлечения из крови модельных соединений, обладающих различными физико-химическими свойствами.

6. Исследования по количественному определению часто встречающихся в биообъектах, в том числе у лиц с наркотической зависимостью, нестероидных противовоспалительных средств непосредственно в процедуре скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества, что позволило оценить уровень концентрации (терапевтическая – токсическая доза) НПВС при однократном исследовании. Результаты валидационной оценки по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность доказали пригодность разработанной скрининговой методики количественного определения НПВС в цельной крови для кетопрофена, индометацина, напроксена, ибупрофена и диклофенака.

Диссертантом в данной главе освещены результаты исследования по сравнению эффективности экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок. Исходя из показателей максимальных выходов анализируемых веществ и экономичности, к применению в анализе рекомендованы патроны двух марок: Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Agilent).

При обобщении полученных результатов составлен алгоритм скрининга крови, включающий основные этапы исследования с использованием твердофазной экстракции на патронах со смешанной фазой и газовой хроматомасс-спектрометрии. Предложенный алгоритм исследования апробирован на большой выборке реальных образцов постмортальной крови и крови от живых лиц. Это позволило диссертанту сделать вывод о том, что разработанный алгоритм исследования позволяет надежно идентифицировать широкий круг токсикологически значимых веществ в крови, в том числе, новые психоактивные вещества и их метаболиты (катионы и синтетические каннабимиметики).

Глава 4 посвящена установлению основных метаболитов синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина в моче с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматомасс-спектрометрии. После соответствующей пробоподготовки мочи лиц, употреблявших курительные смеси, с использованием разработанной скрининговой методики идентифицированы основные метаболиты синтетических каннабимиметиков и предложены маркеры, позволяющие установить факт их употребления.

Диссертантом рассчитаны и приведены физико-химические и аналитические характеристики основных метаболитов рассматриваемых синтетических каннабимиметиков, необходимые при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях. Составлены общие схемы образования маркеров изучаемых объектов. Показана важность применения ферментативного гидролиза на этапе предварительной пробоподготовки мочи

для деконъюгации метаболитов рассмотренных синтетических каннабимиметиков.

В главе 5 приведены данные исследования по выявлению основных метаболитов синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила в посмертных образцах мочи людей, употреблявших его, 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 ряда производных метаболитов ацетилфентанила и приведена схема биотрансформации его в организме человека.

В конце работы диссертантом представлена схема сформулированного научно-методологического подхода к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием методов твердофазной экстракции и газовой хроматомасс-спектрометрии. В заключении автор обобщает данные проведенных исследований, делает выводы и указывает на перспективы использования полученных результатов.

Новизна исследований и полученных результатов, их достоверность.

Новизна исследования и полученных результатов заключается в разработке диссертантом научно-методологического подхода к скринингу широкого круга токсикологически значимых веществ с использованием твердофазной экстракции на патронах со смешанной фазой и последующего анализа биологического материала методом газовой хроматомасс-спектрометрии.

Степень достоверности проведенных исследований и полученных результатов определяется достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных и чувствительных методов пробоподготовки объектов и анализа, математического планирования эксперимента, валидационной оценки и статистической обработки экспериментальных данных.

На примере модельных соединений с различными физико-химическими свойствами автором впервые разработана методика скринингового исследования крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с применением твердофазной экстракции на смешанной фазе и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диссертант, на основе проведенной процедуры валидации, доказала пригодность разработанной скрининговой методики с применением твердофазной экстракции и газовой хроматомасс-спектрометрии для количественной оценки содержания в крови часто встречающихся в биологических объектах, в том числе, у лиц с наркотической зависимостью, нестероидных противовоспалительных средств: индометацина, кетопрофена, напроксена, ибупрофена и диклофенака непосредственно в процедуре скрининга.

Впервые в разработанной процедуре скрининга образцов мочи потребителей наркотических средств с применением вышеуказанных методов выявлены основные метаболиты и маркеры ряда синтетических каннабимиметиков и нового наркотического анальгетика ацетилфентанила, позволяющие установить факт их употребления. Выявлены основные пути биотрансформации и предложены схемы их метаболизма.

Автором работы рассчитаны физико-химические и аналитические характеристики некоторых дериватов основных метаболитов исследуемых каннабимиметиков и ацетилфентанила. Установлено, что идентифицированные метаболиты данных наркотических средств выводятся из организма человека с мочой в значительной степени или частично в конъюгированном виде. Для гидролиза конъюгатов предпочтителен ферментативный гидролиз.

Диссертантом впервые разработан и предложен единый методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматомасс-спектрометрии, позволяющий применять его для различных биологических объектов и серийных исследований.

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 автором диссертации с применением современных статистически достоверных методов. 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 практике экспертных учреждений.

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

Диссертационная работа имеет теоретическую значимость, которая заключается в методологическом обосновании скрининга биологических объектов с применением твердофазной экстракции и газовой хроматомасс-спектрометрии. Это дает возможность определять широкий круг токсикологических соединений в биологических жидкостях, органах, тканях при осуществлении судебно-химического и химико-токсикологического анализа. Полученные данные по изучению метаболизма и путей биотрансформации нового наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков могут быть применены для прогнозирования метаболизма их гомологов и аналогов, появляющихся в нелегальном обороте. Положения диссертационной работы могут быть использованы в учебных и научных учреждениях при изучении вопросов и проведении исследований по проблеме анализа объектов на наличие токсикологически значимых веществ и их метаболитов.

Диссертация представляет несомненный интерес для практического здравоохранения и фармации в рамках проведения химико-токсикологических и судебно-химических исследований биологического материала. Предлагаемый диссертантом научно-методологический подход к скринингу биообъектов на наличие лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов с использованием твердофазной экстракции и газовой хромато-масс-спектрометрии позволяет оптимизировать деятельность экспертных учреждений за счет проведения серийной подготовки проб. Это дает возможность сократить сроки выполнения экспертных исследований при одновременном определении широкого круга токсикологически значимых веществ в одной пробе образца.

Результаты диссертационного исследования апробированы и имеют солидное внедрение в практическую деятельность судебно-химических отделений и химико-токсикологических лабораторий Белоруссии и Казахстана, а также экспертных учреждений городов Санкт-Петербурга, Самары, Ярославля, Новосибирска, что подтверждено актами внедрения. В Белоруссии разработанная методика скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов.

Материалы диссертации внедрены в учебный процесс ряда ВУЗов, реализующих программы специалитета по специальности «Фармация» и дополнительного профессионального образования по направлению подготовки «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», «Судебно-химический и химико-токсикологический анализ биологических объектов и вещественных доказательств».

По результатам диссертационного исследования Российским центром судебно-медицинской экспертизы Минздрава России изданы и рекомендованы к использованию в судебно-химическом анализе четыре информационных письма. Диссертантом в соавторстве опубликована монография «Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах», в которой представлены современные способы пробоподготовки биообъектов, в том числе, с применением разработанных автором методик 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 реферативных базах SCOPUS и Web of Science. Всего по теме диссертации опубликовано 30 печатных работ.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению работы.

Диссертационная работа и автореферат оформлены в соответствии с текущими требованиями. Представленный в диссертации материал изложен

последовательно и аргументировано. Однако при общей положительной оценке работы Дворской Оксаны Николаевны, возникли следующие замечания и вопросы:

1. В главе 3 на стр. 149 приведен Рисунок 4.34 – Алгоритм ..., правильно следовало пронумеровать как Рисунок 3.35.

2. На стр. 164 в четвертой главе приведены два рисунка под одним и тем же номером - Рисунок 4.3. В связи с этим общее количество рисунков в диссертации составляет 149, а не 148, как трактует автор работы во введении и автореферате.

3. Чем Вы объясняете проведение валидации количественного определения в процедуре скрининга крови для выбранных вами нестероидных противовоспалительных средств?

4. Несмотря на ряд преимуществ твердофазной экстракции перед жидкость-жидкостной экстракцией, применение ТФЭ затруднительно вследствие отсутствия оборудования в лабораториях. Закупать оборудование в настоящее время возможно только у иностранных производителей. Как объяснить, что методом выбора является твердофазная экстракция?

5. Для дериватизации Вами предложены метилирование и ацетилирование в разработанном научно-методологическом подходе, однако в главах 4 и 5, где рассматриваются метаболиты новых синтетических каннабимиметиков и ацетилфентанила, используются также другие виды дериватизации: образование триметилсилильных и других производных. С какой целью?

6. В связи с тем, что синтетические каннабимиметики и производные фентанила в организме человека подвержены активному метаболизму, как активно участвуете Вы в работе по созданию банка данных по биотрансформации и аналитическим характеристикам метаболитов?

7. Рассматривали ли Вы использование разработанной скрининговой методики для других объектов: органов, тканей; возможно ли применение нетрадиционных объектов: ногтей, волос?

Высказанные замечания не принципиальны, а вопросы носят только дискуссионный характер и не снижают ценности выполненного диссертантом исследования.

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 решена важная проблема судебно-химической и наркологической экспертизы, касающаяся скрининга биологического материала на наличие широкого круга токсикологически значимых веществ. Диссертационная работа

Дворской Оксаны Николаевны соответствует требованиям пунктов 9 - 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор фармацевтических наук (15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия), профессор

 Кобелева Татьяна Алексеевна

Адрес: 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, д.54.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

8(3452) 20-89-65

kobeleva@tyumsmu.ru

Подпись профессора Кобелевой Т.А. заверяю:

Ученый секретарь

« 25 » сентября 2019 г.



С.В. Платицына