

ОТЗЫВ

официального оппонента профессора кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук (15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия), профессора Шорманова Владимира Камбулатовича 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

1. Актуальность выполненного исследования

Разработка и совершенствование способов пробоподготовки для целей химико-токсикологического анализа биологически активных соединений и их метаболитов имеет особое значение.

Основой многих современных схем пробоподготовки достаточно часто является метод твердофазной экстракции. Важное место при проведении химико-токсикологических и судебно-химических исследований занимает скрининг токсичных соединений. В последнее время большую популярность приобрели скрининговые схемы на основе метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Следует отметить, что различные аспекты применения твердофазной экстракции в системах скрининга на основе использования ГХ-МС изучены недостаточно и не носят системного характера.

Проведение системных исследований по выработке подходов к скринингу токсичных соединений на основе метода ГХ-МС с использованием твердофазной экстракции (ТФЭ) является важным и перспективным направлением научного поиска.

В обозначенном научном направлении выполнена докторская диссертация Дворской Оксаны Николаевны. Тема диссертации является актуальной и своевременной.

2. Научная новизна исследований, степень достоверности результатов работы

В процессе выполнения диссертации автором выполнен весьма значительный объем экспериментов и получен целый ряд интересных научных результатов. Для оптимизации процесса научного поиска по ряду основных направлений диссертации автором использован принцип модельных соединений и применено математическое планирование эксперимента.

Одним из результатов проведенных исследований явилась разработка унифицированной методики скринингового исследования крови на основе методов ГХ-МС с использованием твердофазной экстракции в стадии пробоподготовки.

Автором подчеркиваются и научно обосновываются преимущества

твердофазной экстракции в сравнении с жидкость-жидкостной экстракцией.

Диссертантом впервые разработана и валидирована оригинальная методика количественного определения ряда токсикологически значимых нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) на основе применения методов ГХ-МС и твердофазной экстракции.

Важнейшим результатом работы явилось выявление основных метаболитов и маркеров отдельных синтетических каннабимиметиков в моче употребляющих смеси для курения.

Проведено системное изучение различных физико-химических, газохроматографических и масс-спектрометрических свойств дериватов выявленных структур метаболитов, что позволило оптимизировать и теоретически обосновать условия определения их методом ГХ-МС.

Диссертантом впервые выявлены основные метаболиты ацетилфентанила и предложены маркеры для доказательства его присутствия по результатам исследования посмертных образцов мочи; определены важнейшие характеристики производных данных соединений.

Логичным итогом проведённых диссертантом многоплановых экспериментальных исследований и сделанных научно-теоретических обобщений явилась разработка научно-методологического подхода к скринингу больших групп токсикологически важных соединений методом ГХ-МС с применением твердофазной экстракции на стандартных патронах со смешанной неподвижной фазой.

В процессе выполнения диссертации автором применены современные высокотехнологичные физические и физико-химические методы анализа. Для получения и обработки экспериментальных данных широко использовался ряд математических методов и компьютерных программ. Полученные данные достоверны и не вызывают сомнения.

3. 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.

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

Теоретическая значимость работы заключается в методологическом обосновании скрининга биологических объектов с применением твердофазной экстракции и ГХ-МС с целью определения широкого круга 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 нового 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, которые могут быть использованы для прогнозирования метаболизма их гомологов и аналогов, появляющихся в нелегальном обороте.

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 ТФЭ и ГХ-МС позволяет оптимизировать деятельность экспертных учреждений, так как сочетает возможность проведения серийной подготовки проб и, соответственно, сокращение сроков проведения экспертных исследований при одновременном определении широкого круга токсикологически значимых веществ в одной пробе образца.

Многие положения диссертационной работы имеют очевидную перспективу использования экспертными организациями, научными учреждениями и учебными заведениями в своей практической деятельности.

Обращает на себя внимание высокий уровень внедрения результатов выполненной диссертации. Так, Российским центром СМЭ МЗ РФ утверждено, зарегистрировано и рекомендовано к использованию 4 информационных письма, подготовленных диссертантом.

Разработанные методики апробированы и внедрены в работу судебно-химических отделений и химико-токсикологических лабораторий ряда республик Ближнего Зарубежья, а также экспертных учреждений отдельных административных единиц Российской Федерации.

По результатам исследований имеются внедрения в учебный процесс ряда учебных заведений нашей страны.

Заслуживает внимание выход в свет интересной и практически значимой монографии «Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах» с авторским участием диссертанта.

5. 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).

6. Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема и содержание диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно п. 4 – разработка

методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

7. Оценка содержания диссертации

Построение диссертационной работы Дворской О.Н. традиционно. Работа 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 5 Приложений. Работа изложена на 373 страницах машинописного текста, содержит 148 рисунков и 48 таблиц.

Во введении чётко представлена актуальность темы запланированных исследований, сформулированы цель и задачи, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, внедрение результатов и личный вклад автора в исследованиях.

Глава 1 представляет собой обзор литературных данных, в котором приведена характеристика метода твердофазной экстракции, основных ее стадий, области применения, преимуществ использования; приведена классификация патронов и сорбентов для ТФЭ. Представлен обзор публикаций по проведению пробоподготовки методом ТФЭ биообъектов при определении различных токсикантов, контролируемых веществ, лекарственных препаратов и биологически активных веществ для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа, допинговых исследований и лекарственного мониторинга. Отмечена направленность исследований на определение конкретного вещества или группы веществ (опиаты, барбитураты и др.), многообразие используемых фаз сорбентов для ТФЭ, множество разных элюентов, промывочных и буферных растворов, их различные объемы, сочетание с дополнительными видами очистки (иногда многостадийной) и т.п.

Подчеркнута важность исследований, направленных на изучение биотрансформации новых психоактивных веществ в организме человека, получение аналитических характеристик основных метаболитов с целью диагностики фактов их употребления. Приведена общая характеристика и известные данные о метаболизме исследуемых «дизайнерских наркотиков»: 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 для РФ.

2 глава включает в себя описание объектов и методов, используемых при проведении экспериментальных исследований; реактивы, растворители, используемые для проведения анализа; методики проведения пробоподготовки крови и мочи, варианты дериватизации, режимы работы приборов и программное обеспечение исследований.

В 3 главе в рамках формирования общей методологии скрининга биологических объектов на широкий круг токсикантов с использованием ТФЭ и ГХ-МС изложены основные этапы исследований и приведены результаты эксперимента по разработке унифицированной методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с использованием ТФЭ на сорбентах со смешанным типом фазы и ГХ-МС. 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: (1) выбор модельных соединений с различными показателями кислотности/основности и гидрофобности/гидрофильности с целью прогнозирования поведения широкого круга токсикологически значимых соединений в процедуре ТФЭ на основе рассчитанных физико-химических характеристик: константы диссоциации (pK_a), коэффициента распределения октанол/вода и коэффициента адсорбции (K_{oc}); (2) поиск подходящего буферного раствора и pH для проведения процедуры ТФЭ; (3) сравнение эффективности твердофазной и жидкость-жидкостной экстракции для модельных соединений; (4) оптимизацию условий ТФЭ в скрининге крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с использованием метода математического планирования эксперимента Бокса-Бенкена; (5) экспериментальное изучение влияния 0,1 М раствора уксусной кислоты на этапе промывки в процедуре ТФЭ на эффективность ТФЭ модельных соединений с использованием оптимизированной методики скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества. Итогом оптимизации стало определение рациональных условий процедуры ТФЭ для эффективного извлечения из крови модельных соединений, обладающих различными физико-химическими свойствами.

Далее приведены исследования по количественному определению часто встречающихся в биообъектах нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) непосредственно в процедуре скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества, что позволило оценить уровень концентрации (терапевтическая – токсическая доза) НПВС. По результатам валидационной оценки условий количественного определения по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость) доказана пригодность разработанной скрининговой методики количественного определения НПВС в цельной крови для кетопрофена, индометацина, напроксена, ибупрофена и диклофенака.

Проведены исследования по сравнению эффективности экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок. Учитывая показатели наибольших выходов аналитов и экономичности, к применению рекомендованы патроны двух марок: Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Agilent).

Исходя из обобщенных результатов проведенных исследований, составлен алгоритм скрининга крови, включающий основные этапы исследования с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой и ГХ-МС. Предложенный алгоритм исследования апробирован на реальных образцах

посмертной крови и крови от живых лиц. В результате было выявлено 111 лекарственных и наркотических веществ, а также их метаболитов, что позволило диссертанту сделать вывод: разработанная схема исследования позволяет надежно идентифицировать широкий круг веществ, имеющих судебно-химическое значение, в том числе катионы метилendioксипировалерон, пирролидиновалерофенон и метаболиты синтетических каннабимиметиков АВ-PINACA и AMB, MDMB(N)-2201, АВ-FUBINACA, 5-F-AB-PINACA, АВ-CHMINACA, XLR-11.

Глава 4 посвящена 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-CHMINACA в моче с использованием методов ТФЭ и ГХ-МС.

При исследовании реальных образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси с использованием разработанной скрининговой методики (после соответствующей пробоподготовки мочи) впервые идентифицированы основные метаболиты синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-CHMINACA. Описаны основные метаболиты, предложены маркеры, позволяющие установить факт употребления синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-CHMINACA, АВ-FUBINACA. 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 синтетических каннабимиметиков рассматриваемых групп. Показана важность применения ферментативного гидролиза, как этапа предварительной пробоподготовки мочи, для разрушения конъюгированных форм метаболитов рассмотренных «дизайнерских» наркотиков.

В главе 5 приведены исследования по выявлению основных метаболитов синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила в 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.

В конце диссертации представлена **схема** научно-методологического подхода к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

Диссертация завершается **заключением**, которым автор обобщает результаты проведенных исследований, делает выводы и указывает на перспективы использования полученных результатов.

Результаты диссертации хорошо опубликованы в открытой печати в виде 30 печатных работ, среди которых 16 публикаций в журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации материалов докторских диссертаций, 6 из которых в изданиях, индексируемых реферативными базами SCOPUS и Web of Science.

8. Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению работы

Представленный в диссертационной работе материал изложен последовательно и аргументировано.

В результате ознакомления с представленной к защите диссертацией к ее автору возник ряд вопросов.

1. Рассматривались ли варианты жидкость-жидкостной экстракции с использованием гидрофильных экстрагентов и применением высаливателей?
2. Чем объяснить тот факт, что среди модельных веществ-токсикантов нет вещества из группы каннабимиметиков?
3. В какой мере предлагаемые подходы и методики можно применять к исследованию гнилостно изменённых тканей трупных органов?
4. Замечены отдельные фрагменты, которые требуют дополнительного пояснения:
 - на странице 164 главы 4 два рисунка подряд имеют один и тот же порядковый номер (4.3);
 - при описании апробации методики сообщается о 8 использованных образцах гнилостной жидкости. Не вполне ясно, что это за объект и почему он не вынесен в обсуждение.

В тексте работы изредка встречаются опечатки и не вполне удачные в стилистическом отношении выражения.

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

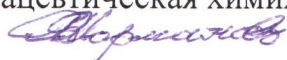
9. Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»

Таким образом, диссертационная работа Дворской Оксаны Николаевны «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 завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований предложено решение важной проблемы фармацевтической науки в области химико-токсикологического и судебно-химического анализа, состоящей в разработке методологических подходов к оптимизации и унификации

скрининга широкого круга токсикологически значимых веществ, а также их метаболитов в биологических объектах. 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 фармацевтической, токсикологической и аналитической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия), профессор



Шорманов Владимир Камбулатович

Адрес: 305004, г. Курск, ул. К. Маркса, д. 3,
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Телефон: 8-(4712)-58-13-23
Факс: 8-(4712)-56-73-99
R-WLADIMIR@yandex.ru

Подпись профессора Владимира Камбулатовича Шорманова удостоверяю –
начальник управления кадров Курского государственного медицинского
университета _____ Наталья Николаевна Сорокина

« 27 » сентября 2019 г.

