

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050

Телефон (3822) 53 04 23;

Факс (3822) 53 33 09

e-mail: office@ssmu.ru

http://www.ssmu.ru

ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251

ИНН 7018013613 КПП 701701001

08.10.2013 № 13
На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
И.о. ректора ФГБОУ ВО СибГМУ
Минздрава России
А.В. Ратькин
_____ 2019



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы Дворской Оксаны Николаевны на тему: «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции», представленной в диссертационный совет Д 208.068.02, созданный на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность проблемы

Разработка и совершенствование способов пробоподготовки для целей химико-токсикологического анализа токсикологически важных соединений и их метаболитов чрезвычайно востребованы на современном этапе производства химико-токсикологических и судебно-химических экспертиз.

Матричный эффект биоматериала, незначительные концентрации используемых новых психоактивных веществ, особенности их биотрансформации, требующие поиска метаболитов, отсутствие единых подходов к систематическому анализу новых групп соединений и др. требуют ответственного подхода к методу пробоподготовки, от которого в превалирующей степени зависит конечный результат исследования. Твердофазная экстракция является перспективным методом и достаточно часто используется для пробоподготовки биоматериала, однако

скрининговых системных исследований крови, а именно они являются наиболее востребованными в анализе объектов на сегодня, не проводилось.

Поэтому проведение системных исследований по выработке унифицированных подходов к скринингу токсикантов в биологическом материале на основе метода ГХ-МС с использованием твердофазной экстракции является чрезвычайно важным и перспективным направлением научного поиска

Диссертационная работа Дворской Оксаны Николаевны выполнена в обозначенном научном направлении, актуальность работы несомненна.

Соответствие содержания диссертации заявленной научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Конкретно представленный материал соответствует областям исследования, 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.

Диссертационная работа О.Н. Дворской выполнялась в соответствии с утвержденным планом НИР Пермской государственной фармацевтической академии; тема имеет номер государственной регистрации: 01.9.50 007417.

Научная новизна исследований, полученных результатов и выводов.

Автором в процессе выполнения диссертации выполнен большой массив экспериментов и получен ряд новых интересных научных результатов.

Разработана унифицированная методика скринингового исследования крови с использованием ТФЭ и ГХ-МС с целью определения широкого круга лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа биологических жидкостей.

В разработанную скрининговую методику на основе процедуры валидации «включено» количественное определение ряда наиболее токсикологически значимых НПВС в крови, позволяющее в одном исследовании оценить уровень концентрации «терапевтическая – токсическая доза».

Впервые в процедуре скрининга реальных образцов мочи с применением методов ТФЭ и ГХ-МС выявлены основные метаболиты и маркеры синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-SHMINACA, позволяющие установить факт их употребления.

Рассчитаны физико-химические и получены газохроматографические/масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA. Выявлены основные направления

метаболизма СК в организме человека. Изучена степень конъюгации метаболитов, установлено, что для гидролиза конъюгатов предпочтительным является ферментативный гидролиз.

Впервые в образцах посмертной мочи идентифицированы основные метаболиты и предложены маркеры у потребления синтетического опиоидного анальгетика ацетилфентанила; изучен метаболический профиль ацетилфентанила в моче, описаны основные пути его метаболизма; получены основные аналитические характеристики различных дериватов основных метаболитов ацетилфентанила.

Логичным завершением проведенных диссертантом разнохарактерных и многоплановых исследований и сформулированных научно-теоретических обобщений явилось создание научно-методологический подхода к скринингу токсикологически значимых веществ и их метаболитов в различных биологических объектах (после необходимой пробоподготовки) с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций.

Использованные в представленной диссертационной работе современные информативные методы изолирования и анализа, программного обеспечения исследований, валидационной оценки исследований, компьютерного моделирования и статистической обработки полученных результатов подтверждают достоверность полученных данных.

Однозначно положительно следует оценить применение диссертантом прогностического подхода к выбору модельных соединений на основе рассчитанных физико-химических констант, а также метода компьютерного моделирования Бокса-Бенкена при поиске оптимальных параметров этапов твердофазной экстракции на патронах со смешанной фазой для возможности скрининга широкого круга токсикологически значимых веществ, что свидетельствует о широком интеллектуальном и творческом потенциале соискателя.

По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, в числе которых 1 монография, 16 работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских диссертаций, из них 6 – в журналах, индексируемых реферативными базами SCOPUS и Web of Science.

Апробация фрагментов диссертационного исследования проведена на солидных всероссийских и международных конференциях и съездах.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, выводов и заключений

Диссертационная работа Дворской О.Н. по структуре, объему и построению соответствует общим требованиям: изложена на 373 страницах машинописного текста, содержит 148 рисунков и 48 таблиц, что говорит об

экспериментальной насыщенности работы и ее достаточной иллюстрированности. Список литературы включает 424 источника, из них 353 иностранных.

Работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 главы), общих выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и Приложений.

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

ГЛАВА 1. Анализ твердофазной экстракции как метода пробоподготовки биологических объектов для целей токсикологического анализа. характеристика отдельных групп токсикантов (обзор литературы).

Глава насчитывает 76 страниц текста и содержит 2 основных раздела, в первом обобщены сведения о методе твердофазной экстракции, его характеристике, основных стадиях, областях применения, преимуществах использования; приведена классификация патронов и сорбентов для ТФЭ и др. 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 лекарственном мониторинге. Эти сведения структурированы в виде таблицы, вынесенной в Приложение, где выделены цель и объекты исследования, применяемые для ТФЭ патроны, элюенты, используемые аналитические методы и ссылки на первоисточник.

Во 2 разделе приведена общая характеристика и известные данные о метаболизме исследуемых новых психоактивных веществ: 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). Глава заканчивается заключением.

ГЛАВА 2 Объекты и методы исследования 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.

ГЛАВА 3. Разработка методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с применением твердофазной экстракции и

газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Глава включает в себя 66 стр. В ней на примере цельной крови, как наиболее сложной и важной матрицы в отношении судебно-химического и химико-токсикологического анализа, 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.

– Приведены результаты оптимизации этапов ТФЭ с использованием метода математического планирования эксперимента, валидационная оценка количественного определения ряда НПВС в процедуре скрининга крови, исследования по сравнению эффективности экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок. При обобщении полученных результатов составлен алгоритм скрининга крови; проведена его апробация на большой выборке реальных образцов постмортальной крови и крови от живых лиц, при которой выявлено 111 лекарственных и наркотических веществ, а также их метаболитов, в том числе, новых психоактивных веществ: катинонов и синтетических каннабимиметиков. Глава заканчивается выводами и списком статей автора по данному разделу диссертации.

ГЛАВА 4. Выявление основных метаболитов синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина в моче изложена на 61 стр. текста. Глава посвящена выявлению основных метаболитов и маркеров употребления синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-SHMINACA в моче с использованием методов ТФЭ и ГХ-МС. Глава хорошо иллюстрирована полученными масс-спектрометрическими характеристиками, схемами фрагментации некоторых производных основных метаболитов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA. Приведены схемы метаболизма СК, результаты исследования степени конъюгации. Сделаны выводы о предпочтительном методе деконъюгирования метаболитов мочи.

Здесь же проведены сравнительные исследования нескольких методов пробоподготовки мочи с использованием различных вариантов гидролиза, экстракции и дериватизации. Для выявления метаболитов новых синтетических и природных каннабиноидов при совместном присутствии вывод сделан в пользу использования ТФЭ в сочетании с ферментативным гидролизом. Глава заканчивается выводами и списком статей автора по данному разделу диссертации.

ГЛАВА 5. Выявление основных метаболитов синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила в моче с использованием методов газовой и жидкостной хроматографии насчитывает 12 стр., но при этом является самодостаточной ввиду явного отличия структуры и фармакологического действия ацетилфентанила от рассмотренных в Главе 4 СК. В главе 5

приведены исследования по выявлению основных метаболитов ацетилфентанила в посмертных образцах мочи его потребителей с использованием методов ГХ-МС и ЖХ-МС, а также. Предполагаемые структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара и химической ионизацией при атмосферном давлении. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых дериватов (ацетилированных, пропионовых, пентафторпропионовых) метаболитов ацетилфентанила. Приведена предполагаемая схема биотрансформации АЦФ в организме человека, предложены маркеры употребления АЦФ. Глава заканчивается выводами и списком статей автора по данному разделу диссертации.

Экспериментальная часть диссертации заканчивается схемой сформулированного, на основе массива данных диссертационного исследования, научно-методологического подхода к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием ТФЭ и ГХ-МС. Далее следует Заключение, которым автор обобщает результаты проведенных исследований, делает выводы и указывает на перспективы использования полученных результатов; Список сокращений и условных обозначений на 3 стр.; Список литературы составлен грамотно, с преобладанием иностранных литературных источников. Последним в диссертации представлен блок Приложений, включающих вынесенные данные из литературного обзора (1), экспериментальной части (2), а также три Приложения, подчеркивающих практическую значимость работы: Акты внедрения в практическую деятельность и учебный процесс (3), Информационные письма РЦСМЭ, г. Москва (4), монографию (5).

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Теоретическая значимость работы заключается в методологическом обосновании скрининга биологических объектов с применением твердофазной экстракции и ГХ-МС с целью определения широкого круга токсикантов. Представленный 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 после их предварительной пробоподготовки.

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 новых гомологов и аналогов, периодически появляющихся в нелегальном обороте.

Важнейшим положительным аспектом данного диссертационного исследования является то, что полученные научные результаты доведены до

практической реализации. Разработанный алгоритм скринингового исследования апробирован на значительной выборке реальных образцов цельной и посмертной крови (более 1000 образцов) при проведении судебно-химических исследований, при которых выявлено 111 токсикологически важных веществ, а также их метаболитов. **Практическая значимость** исследования представлена солидным внедрением в деятельность ряда экспертных учреждений Российской Федерации, Беларуси и Казахстана с включением методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного Комитета судебных экспертиз Республики Беларусь. Для целей практического использования всем экспертным сообществом выпущены 4 информационных письма Федерального уровня внедрения. Особого внимания заслуживает монография с авторским участием диссертанта, выпущенная типографским способом для использования практическими работниками в области химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Материалы диссертационного исследования внедрены в учебный процесс ряда учебных заведений РФ при реализации программ специалитета по специальности 33.05.01 «Фармация», а также программ дополнительного профессионального образования по фармацевтическому и токсикологическому анализу.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные автором результаты имеют несомненные **перспективы 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 за счет возможности проведения серийной подготовки проб, и, соответственно, сокращения сроков проведения экспертных исследований при одновременном определении широкого круга 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 широкого круга токсикантов и их метаболитов.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор – Дворская О.Н., исходя из информации, представленной в диссертации, приложениям к ней и автореферате, участвовала во всех действиях и этапах исследования, направленных на выполнение

диссертационной работы. Все исследования, вопросы апробации и внедрения проведены с ее непосредственным участием.

При общем положительном впечатлении, полученном при ознакомлении с диссертационной работой О.Н. Дворской, возникли следующие замечания и вопросы:

1. Более 30 % объема экспериментальных глав занимают рисунки (первичные данные и схемы масс-ионного распада), значительную часть которых было бы более уместно разместить в приложении к диссертации.
2. На рисунке 3.25 – 3.30 концентрации аналитов выражены в единицах измерения массы (мкг), чем это обусловлено?
3. Каким образом была установлена структура основных метаболитов и маркеров РВ-22F?
4. В тексте главы 3 указано, что эксперименты проводились в трех параллелях, соответственно, результаты какого эксперимента приведены в таблице 3 приложения 2, где $n=2$?
5. С чем связано различное количество значащих цифр после запятой в результатах определения эффективности экстракции (приложение 2)?
6. Чем можно объяснить значительное увеличение RSD (%) при экстракции модельных соединений кислотной и слабоосновной природы в элюате I при pH 4,0?
7. В работе автором использован метод математического планирования эксперимента Бокса-Бенкена, почему и с какой целью взят именно этот метод?
8. В разделе 3.1.1. не указано, какие методы были применены для расчета физико-химических констант модельных соединений – pK_a , $K_{ос}$, $\log P$. Чем была вызвана необходимость расчета pK_a для таких хорошо изученных протолитов как, например, салициловая кислота?
9. Требуется пояснения автора применение им величины показателя константы кислотности pK_a для оценки основных свойств некоторых модельных соединений-оснований (диазепам, изониазид и др.). При этом для соединений, имеющих в своей структуре одновременно кислотные и основные центры, их показатели констант ионизации все также обозначаются pK_a .

Высказанные замечания и вопросы не критичны и не умаляют ценности представленной диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Дворской Оксаны Николаевны на тему: «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и

наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции» является самостоятельным, законченным, в рамках поставленных задач, научно-квалификационным исследованием по актуальной проблеме, результаты которой имеют весомое значение для развития фармацевтической науки и практики в области химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

В диссертационных исследованиях О.Н. Дворской решена серьезная проблема токсикологического анализа, заключающаяся в разработке методологических подходов к унификации и оптимизации скрининга биологических объектов на наличие широкого круга токсикантов и их метаболитов.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности, уровню публикаций и степени апробации полученных результатов, а также обоснованности выводов диссертационная работа Дворской Оксаны Николаевны соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335), предъявляемым к докторским диссертациям. Автор – Дворская Оксана Николаевна – заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв на диссертационную работу обсужден на заседании кафедры фармацевтического анализа федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18.09.2019 г., протокол № 02/19.

Заведующий кафедрой фармацевтического анализа
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Сибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор фармацевтических наук
(15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия;
14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология
(фармацевтические науки)

Михаил Валерьевич Белоусов

