

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук Калёкина Романа Анатольевича на диссертационную работу Константиновой Полины Сергеевны на тему «Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ» представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки)

Актуальность выполненного исследования

Повышение качества химико-токсикологических, судебно-химических исследований и в целом результатов судебно-медицинской экспертизы и клинической лабораторной диагностики является серьезной задачей аналитической токсикологии. Приказы Министерства здравоохранения (здравоохранения и социального развития) РФ № 40 от 27.01.2006 г. и № 933н от 18.12.2015 г. по проведению медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического) регламентируют требования к данной процедуре для определения состояния лиц, подозреваемых в употреблении алкоголя, наркотических средств (НС), психотропных (ПВ) и других токсических веществ (ТВ), и определен порядок клинической лабораторной диагностики (КЛД) биообъектов. Указано, что исследование должно выполняться в два этапа: предварительный иммунохимическими методами (ИХМ) и подтверждающий методами газовой (ГХ-МС) и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ МС/МС).

При использовании иммунохроматографических (ИХ) тест-полосок для проведения предварительных исследований есть вероятность получения ложноположительных результатов, в частности из-за возможных кросс-реакций, которые возникают в случае присутствия в биообъектах лекарственных препаратов или их метаболитов, которые не относятся к НС

или ПВ, но имеют в своей структуре характерные фрагменты, вступающие во взаимодействие с антителами, нанесенными на тест-полоски.

Ложноположительные результаты могут дискредитировать человека и даже привести к ограничению в правах. Кроме того, люди, страдающие зависимостью от НС и ПВ, могут маскировать факт употребления оных приемом лекарственных препаратов, также вызывающих положительные результаты анализа.

Изучение токсикокинетики ряда лекарственных веществ (ЛВ), применение которых может привести к появлению перекрестных реакций при освидетельствовании на состояние алкогольного или наркотического опьянения, разработка систематизированного подхода к исследованию биоматериала для предотвращения получения ложноположительных и недостоверных результатов медицинского освидетельствования, является актуальным и перспективным направлением исследования.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках научного направления «Разработка, изучение и стандартизация потенциально активных фармацевтических субстанций и лекарственных средств для лечения различных патологических состояний, в том числе интоксикаций и радиационных поражений» (номер государственной регистрации 124044150002-9).

Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность

Научная новизна диссертационного исследования состоит в том, что впервые было проведено систематизированное исследование влияния нативных молекул и метаболитов ряда лекарственных веществ, которые могут вызывать перекрестные реакции при иммунохроматографическом анализе и ложноположительные результаты клинической лабораторной диагностики на факт употребления психоактивных веществ.

Впервые разработаны частные методики изолирования и обнаружения мебеверина в биологических объектах (моча, кровь, волосы), исключаящие

возможность возникновения недостоверных результатов клинической лабораторной диагностики. Установлено, что для исключения ошибок как предварительных, так и подтверждающих исследований необходимо проводить пробоподготовку крови и волос методикой ферментативного гидролиза селективным ферментом гиалуронидазой с последующей экстракцией органическим растворителем при $pH=3-4$ (из мочи прямой экстракцией при $pH=3-4$), анализ полученных извлечений необходимо проводить только методом высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ МС/МС). Указанные условия позволят исключить химическую (при экстракции из щелочной среды) или термическую (при исследовании методом газовой хроматографией с масс-селективным детектированием) деградацию нативной молекулы мебеверина и повысить достоверность всей лабораторной диагностики.

На основе разработанных селективных методик впервые доказана возможность совместного обнаружения нативной молекулы мебеверина и фенилалкиламинов (на примере фенилэфрина) в биообъектах для исключения получения недостоверных результатов лабораторной диагностики.

Впервые проведено систематизированное исследование по установлению сроков давности последнего приема изучаемых ЛВ, и выявлена закономерность токсикокинетики, которая позволит существенно повысить качество лабораторной диагностики на ряд токсикантов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. 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.

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

Положения и выводы диссертационной работы Константиновой Полины Сергеевны основываются на достаточном объеме экспериментальных данных, а достоверность полученных результатов обеспечивается применением комплекса хроматографических (высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография масс-спектрометрическим детектированием) и использованием программного обеспечения для обработки результатов хроматографических исследований (Chemstation Data Analysis, AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System), MassHunter Quantitative Analysis (США), библиотек масс-спектров (NIST MS Search 2.2, Pmw_TOX3.1, вероятность совпадения не ниже 85 %). Полученные экспериментальные данные обработаны с использованием программного обеспечения MS Office в соответствии с требованиями ГФ РФ XV издания. Экспериментальная часть исследования выполнена на поверенном аналитическом оборудовании.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе систематизированного исследования составлен перечень лекарственных веществ, нативные молекулы и метаболиты которых могут вызывать перекрестные реакции и влиять на результаты предварительного иммунохроматографического анализа.

Разработаны и валидированы частные методики определения в биообъектах мебеверина, фенилэфрина (пробоподготовки, идентификация и количественного определения), а также подход к совместному обнаружению веществ в биожидкостях и волосах. Данные методики положены в основу разработки алгоритма исследований в случае кросс-реакций при диагностике факта употребления психоактивных веществ.

Разработаны и валидированы частные методики изолирования и обнаружения сертралина и производных ГАМК (габапентина и прегабалин), позволяющие повысить достоверность клинико-лабораторной диагностики и

проводить анализ, в том числе ретроспективный, волос и биологических жидкостей.

Предложен алгоритм проведения систематизированного исследования с целью предотвращения недостоверных результатов клинико-лабораторной диагностики.

Полученные автором результаты используются в учебном процессе на фармацевтическом факультете программы специалитета 33.05.01 «Фармация» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России по учебной дисциплине «Современные аспекты химико-токсикологического анализа наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» (акт внедрения от 23.05.2024), в учебный процесс на фармацевтическом факультете программы ординатуры по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России по учебной дисциплине «Организация проведения химико-токсикологических экспертиз» (акт внедрения от 23.05.2024), в учебно-методические материалы Центра повышения квалификации ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках программ профессиональной переподготовки «Химик-эксперт медицинской организации» и «Судебный эксперт-химик» (акт внедрения от 04.06.2024), в учебный процесс ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (акт внедрения от 27.05.2024).

Результаты данного диссертационного исследования послужили основой для создания «Алгоритм проведения лабораторной диагностики с учетом возможных перекрестных взаимодействий». Получены акты внедрения в практику работы химико-токсикологических лабораторий НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (г. Санкт-Петербург) (акты внедрения от 21.05.2024, 20.02.2025), ГБУЗ «Городская наркологическая больница № 1» (г. Санкт-Петербург) (акты внедрения от 21.05.2024, 20.02.2025) и ГБУ «КОНД» (г. Курган) (акт внедрения от 20.02.2025).

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автором лично проведен поиск отечественной и зарубежной литературы, разработаны и выполнены все стадии эксперимента на базе ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, химико-токсикологических лабораторий СПб ГБУЗ Городской наркологической больницы №1, и НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, проанализированы результаты исследований. Доля участия автора составляет не менее 90%.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, главы об объектах и методах исследований, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя. Работа изложена на 212 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 70 рисунками и 55 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (4 главы) и заключения, списка литературы, включающего 147 наименований (60 источников зарубежной литературы) и приложения.

Во введении диссертант обосновала актуальность выбранной темы исследования, сформулировала цель и задачи, показала научную новизну и отразила теоретическую и практическую значимость, а также представила положения, выносимые на защиту.

В главе 1 проведен обзор литературы, изложена подробная характеристика иммунного анализа, описаны достоинства и недостатки этого метода, выявлены причины возникновения перекрестных реакций при использовании иммунохроматографических тест-полосок, а также возможные варианты фальсификации биологических образцов. Приведены основные рекомендации по валидации методик химико-токсикологического и судебно-химического анализа. Дана характеристика выбранных для исследования лекарственных веществ.

В главе 2 дана характеристика методов и объектов исследования, а также результаты разработки, валидационной оценки и обоснование выбора методик определения изучаемых веществ, которые использовались в последующем эксперименте. Изучена возможность применения методов ГХ-МС и ВЭЖХ МС/МС для обнаружения мебеверина в извлечении из биологических объектов и показано, что метод ГХ-МС не позволяет провести обнаружение нативной молекулы мебеверина из-за термодеструкции в инжекторе хроматографа. Возможно обнаружение нативного мебеверина только с применением метода ВЭЖХ МС/МС.

Глава 3 посвящена разработке методик обнаружения мебеверина в биологических объектах. Изучен метаболический состав мочи лабораторных животных, полученной после однократного введения мебеверина в различных дозировках и установлено, что основными метаболитами являются п-метоксиамфетамин, п-метоксиэтиламфетамин и мебевериновая кислота, однако в моче присутствует и нативная молекула мебеверина. Разработана частная методика изолирования мебеверина из биологических объектов.

Разработана частная методика пробоподготовки волос с ферментативным гидролизом и показано, что мебеверин накапливается в волосах в количествах позволяющих провести его идентификацию и количественное определение. Наиболее селективным является фермент гиалуронидаза.

В главе 4 показана возможность обнаружения при совместном присутствии в организме освидетельствуемого лица мебеверина и производных фенилалкиламина (на примере, фенилэфрина) как нативные молекулы, так и их основные метаболиты. В ткани волоса обнаруживаются только нативные молекулы обоих веществ.

Представлена разработка частных методик обнаружения производных ГАМК и сетралина, которые позволят повысить достоверность лабораторной диагностики.

В главе 5 приведен эксперимент по оценке сроков давности употребления веществ на основе анализа волос для решения проблемы кросс-реакций и ложноположительных результатов клинической лабораторной диагностики. Проведенные исследования подтвердили полученные ранее результаты и показали, что в ткани волоса вещества накапливаются только в виде нативных молекул, что позволяет рекомендовать данный биологический материал для решения вопроса о кросс-реакциях лекарственных веществ при проведении предварительного этапа клинической лабораторной диагностики иммунохроматографическими тест-полосами и исключения ошибок при интерпретации результатов.

Завершается глава подробным изложением алгоритма лабораторной диагностики для решения вопроса перекрестных реакций при выполнении предварительных исследований иммунохроматографическими тестами.

В заключении обобщены основные результаты исследования.

Диссертация завершается общими выводами, списком литературы и приложениями. В приложении представлен иллюстративный материал и исчерпывающий объем валидационных данных по разработанным методикам, а также акты внедрения.

Автореферат отражает основное содержание диссертации.

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, среди которых 4 статьи в издании, включенном в международные базы Scopus и PubMed.

Достоинства, недостатки по содержанию и оформлению работы, общая оценка диссертации.

Следует отметить хороший научный язык и стиль изложения результатов проведенного исследования. Объем выполненной работы и полнота представленных фактических данных не позволяют усомниться ни в достоверности полученных результатов, ни в личном вкладе диссертанта в выполнение данной работы.

При общей положительной оценке диссертационного исследования в процессе её рецензирования возникли вопросы и замечания:

1. На стр.71 в таблице № 8 указаны характеристики масс-спектров исследуемых веществ (m/z), почему для некоторых соединений приведены три, для некоторых десять значений?
2. В таблице № 9 на стр. 74 указаны литературные данные по методикам с дальнейшим модифицированным методикам. Метод №3 далее в качестве модифицированного фигурирует как №1, отличимых различий не обнаружено. В составе метода фигурирует наличие триэтиламина в количестве 143 мкл, видимо в качестве модификатора. Такое количество достаточно сложно отмерять, возможно нужно было модифицировать данный метод с учетом реалий потоковых исследований и соотношений изменить в сторону более целых значений компонентов?
3. В качестве замечаний в данных полученных результатов лучше указывать статистические значимые цифры, например, в таблице 12 приведены тысячные доли времени удерживания (минут), которые не актуальны.
4. В таблице 15 указаны вперемешку у некоторых соединений торговые названия, а у некоторых по МНН.
5. В разделе 3.1. приведены данные (таблица 17) по расчёту суточных доз, по какой формуле производились расчеты? Почему по некоторым веществам разница при перерасчете с человека на животное является $\div 10$, а у некоторых $\div 15$?
6. На странице 101 автор использует формат идентификации как совпадение по масс-спектрам не менее 85%, хотя общепринято не менее 80%. В связи с чем повышен порог идентификации?
7. В разделе «3.4 Разработка методики экстракции мебеверина из волос» произведено деление волос по окрасу на белые и рыжие. Почему не изучались другие окрасы волос? В связи с чем предполагаете, как

исследователь, что результат с использованием разных ферментов отличается в некоторых случаях в два раза?

8. В разделе 4.4.1 изучали оценку пригодности хроматографической системы на концентрации 0,1 мг/мл, хотя суточные дозы исследуемых веществ отличаются в некоторых в 80 раз. В связи с чем подобрана данная концентрация?
9. На стр. 5.1 указано о сборе суточной мочи. Как она отбиралась у животных - в течение суток и перемешивалась или через каждые 24 часа?
10. В «Глава 2. Объекты, материалы и методы исследования» описано использование элюента подвижной фазы со скоростью от 0,30 мл/мин до 0,32 мл/мин в зависимости, а для анализа мебеверина используете скорость 1,2 мл/мин и для анализа сертралина 1,4 мл/мин. В связи, с чем связано разное использование этого параметра при хроматографировании?
11. В разделе 5.1 изучается динамика изменения концентрации в моче и крови после прекращения регулярного приема терапевтической дозы тропикамида берется первое исследование через 6 часов, а его период полувыведения составляет 4 часа. Почему не были взяты более короткие диапазоны времени после приема и в связи с чем исследование начинается от 6 часов после приема?
12. В связи с чем при валидационной оценке разработанной методики автором при исследовании селективности не использовались вещества, обязательные к исследованию, из приказа №1021 МЗ СССР?
13. На сколько целесообразно в современном и высокотехнологичном исследовании, представленном в диссертации, использование литературного источника 1975 года (№79)?

Все высказанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают научную новизну и практическую значимость диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования в науке и практики

Результаты диссертационного исследования имеют важное значение для химико-токсикологического анализа и могут использоваться при токсикокинетических исследованиях лекарственных веществ, для повышения объективности доказательства отравлений наркотическими и психотропными соединениями и для предотвращения получения ложноположительных и недостоверных результатов медицинского освидетельствования.

Заключение

В диссертации решена важная научная задача, состоящая в разработке подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных веществ при клинической лабораторной диагностике употребления психоактивных веществ. Учитывая все вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что диссертационная работа Константиновой Полины Сергеевны на тему: «Разработка подходов к выявлению перекрестных влияний лекарственных средств при диагностике употребления психоактивных веществ» является завершенным квалификационным научным исследованием, выполненным на актуальную тему на достаточно высоком научном уровне, обладает научной новизной и практической значимостью и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 от № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 г. № 1382), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Константинова Полина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени

кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети "Интернет" моих персональных данных, необходимых для работы диссертационного совета 21.2.063.01.

Официальный оппонент
Заведующий лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки))

Адрес: 125284, Российская Федерация,
г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13

Телефон: +7 (495) 945 21-69

e-mail: info@rc-sme.ru



Калёкин Роман Анатольевич

Подпись Калёкина Романа Анатольевича заверяю

Начальник ОК ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России



Кухоль Т.Н.

« 04 » июня 2025 г.