

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ
ГРИГОРЬЕВА АНДРЕЯ МИХАЙЛОВИЧА
«ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ
МЕТАБОЛИТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И
СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИМИМЕТИКОВ»,
ПРЕДСТАВЛЕННУЮ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА
ХИМИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 02.00.02 –
АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

официальный оппонент: Савельева Елена Игоревна, доктор химических наук по специальности 20.02.23, заведующая лабораторией аналитической токсикологии Федерального государственного унитарного предприятия "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России)

188 663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. №93

e-mail: savelieva@rihophe.ru

т/факс (812) 449-61-77 доб.240

В химико-токсикологическом анализе в качестве аналитов выступают либо сами токсичные и сильнодействующие вещества, либо их метаболиты. В совокупности они составляют панель, так называемых, биомаркеров экспозиции организма токсичными и сильнодействующими ксенобиотиками.

При определении биомаркеров психоактивных веществ нового поколения существует ряд объективных трудностей:

- информация о структуре этих веществ и формах их существования в цикле «абсорбция – распределение – метаболизм – экскреция» либо отсутствует, либо крайне ограничена;

- изначально низкие концентрации в системном кровотоке и стремительный метаболизм;

- различия в метаболизме у животных и человека;

- образцы сравнения не только для метаболитов, но и для самих веществ недоступны;

- эксперименты с участием добровольцев в этой области запрещены.

В рамках системы канонических требований, предъявляемых к химическому анализу, отвечать на вызовы и угрозы, связанные с немедицинским применением

психоактивных веществ, уже невозможно. По этой причине возникает острейшая потребность в разработке инновационных подходов к химическому анализу в токсикологии.

Актуальность работы

Химико-токсикологический анализ – раздел аналитической химии, который в наибольшей степени и даже исключительно ориентирован на социальный запрос. Одной из наиболее острых социальных проблем сегодняшнего дня является повсеместное распространение синтетических наркотиков. До недавнего времени каннабимиметики в составе курительных смесей называли легальными наркотиками и открыто продавали. По мере обнаружения и идентификации наркотических компонентов «спайсов» они попадают под запрет, но появляются другие – их структурные аналоги, беспрепятственно распространяемые до следующего запрета, и так до бесконечности. Методология химико-токсикологического анализа, существовавшая до настоящего времени, перестала отвечать социальному запросу, поскольку от появления нового синтетического наркотика, известного лишь производителю, и до включения его в группу запрещенных веществ и разработки методик его определения, проходит длительный период времени. Крайне важным также является то обстоятельство, что в биожидкостях сильнодействующие препараты могут обнаруживаться исключительно в виде метаболитов, структура которых и связь с исходным веществом должны быть оперативно установлены.

Разработка методологии определения в биообразцах обширной и постоянно пополняемой группы метаболитов сильнодействующих веществ отвечает решению крупной научной проблемы, социальное значение которой трудно переоценить.

Научная новизна.

Автором впервые проведены системные исследования метаболизма синтетических каннабимиметиков. Впервые идентифицировано 300 (!) метаболитов. Очень важным результатом работы является установление истинных форм каннабимиметиков (включая примеси, продукты конверсии), в которых они поступают в организм из курительных смесей. Выявлены закономерности метаболических превращений для основных групп соединений, проявляющих аффинность к каннабиноидным рецепторам, установлены направления фрагментации этих соединений в условиях масс-спектрометрического анализа. Совокупность полученных данных дает принципиальную возможность в случае обнаружения в биожидкостях ранее неопisanного метаболита предположить, к какой подгруппе может быть отнесен предполагаемый каннабимиметик, и ориентировочно установить его структуру. С другой стороны, в случае обнаружения новых синтетических каннабимиметиков в смесях для курения или иных объектах криминалистической

экспертизы с учетом установленных автором метаболических и масс-спектрометрических закономерностей может быть сформирована гипотеза о структуре наиболее долгоживущих метаболитов (биомаркеров) этих каннабимиметиков в биожидкостях. Процедура ГХ-МС скрининга, утилизирующая не фиксированные времена, а индексы удерживания, является одним из весомых преимуществ. Предложенный способ коррекции линейных индексов удерживания с учетом термодинамических характеристик (энтропийных вкладов) является новым. Разработанный А.М.Григорьевым алгоритм пересчета величин индексов удерживания с учетом вариаций в условиях хроматографического анализа позволяет пересчитать справочную величину индекса для своих экспериментальных условий, а также повысить надежность идентификации за счет дополнительных хроматографических характеристик.

Практическая значимость

Цель работы сформулирована автором как «Создание системы скрининга биообразцов для целей химико-токсикологического анализа, включающей методики подготовки проб, алгоритмы выявления и определения структурных характеристик, а также обновляемые поисковые ГХ-МС и ЖХ-МС/МС (газовые и жидкостные ХМС) библиотеки для автоматизированного обнаружения аналитов. Выявление предполагаемых метаболитов (далее – метаболитов), продуктов деградации токсикантов, лекарственных средств и синтетических каннабимиметиков, определение их структурных характеристик и разработка методов их обнаружения в биологических жидкостях». Формулировка цели работы отражает содержание новой методологии химико-токсикологического анализа, разработанной автором, а также результаты внедрения этой методологии в практику, что обеспечило прорыв в технологии обнаружения и идентификации сильнодействующих веществ и продуктов их превращений в биологических пробах. Диссертационная работа А.М.Григорьева является прекрасным методическим пособием в области химико-токсикологического анализа. Практическая ценность методологии А.М.Григорьева значительно перекрывает рамки рецензируемой диссертационной работы. Авторские библиотеки ХМС характеристик токсичных и сильнодействующих веществ активно используются в целом ряде учреждений разных министерств и ведомств и позволяют значительно повысить эффективность работы этих учреждений. Работоспособность авторских библиотек А.М.Григорьева была подтверждена в лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИГПЭЧ» в рамках межлабораторного эксперимента. В тестовой пробе были обнаружены хлорпромазин и два его метаболита, галоперидол и его метаболит, пировалерон, пропофол, диазепам, и синтетический каннабиноид имидазольного ряда «АВ-СНМІNАСА». Все внесенные аналиты были определены верно. Ни ложноположительных,

ни ложноотрицательных результатов допущено не было. А.М.Григорьев оказывает консультативную помощь широкой сети химико-токсикологических лабораторий. Даже в тексте диссертации указано, что дополнительная информация может быть получена на сайте (www.sudmed.ru) или предоставлена автором по электронной почте.

Научные и практические задачи работы решены на аналитической платформе хроматомасс-спектрометрии. Автором внесен существенный вклад в теорию и практику таких процессов как выделение аналитов из биоматриц, их химическая модификация, определение методами хроматомасс-спектрометрии и идентификация на основе исчерпывающей интерпретации хроматографической и масс-спектрометрической информации. Таким образом, диссертационная работа А.М.Григорьева в полной мере **отвечает специальности «Аналитическая химия».**

В качестве замечания можно поспорить с фразой, появившейся в итоговой версии диссертации после ее переработки. Далее цитата: *«следует подчеркнуть то, что случай употребления любого ксенобиотика нельзя считать полностью доказанным лишь на основании данных, полученных в результате обнаружения его предполагаемых производных, для этого необходимо проведение комплексных процедур, которые – со стороны аналитика – требуют использования полностью охарактеризованных стандартных соединений, хотя в ряде наших ранних работ для установления факта употребления предлагалось считать достаточным обнаружение предполагаемых производных (частично охарактеризованных соединений), выявленных в биообъектах».* По-видимому, процитированная фраза появилась вследствие критики на основе попыток перевести дискуссию в юридическую плоскость, что, как нам кажется, неправомерно при обсуждении работы, представляемой к защите по специальности «аналитическая химия». По существу проблемы можно сказать, что признание в качестве достоверных только результатов идентификации, подтвержденной полностью охарактеризованными образцами сравнения, было правомерным в прошлом, когда доступные аналитические технологии не обеспечивали необходимого объема информации для подтверждения безусловной связи продукта трансформации с исходным веществом. Если некое психоактивное вещество (или в общем смысле ксенобиотик) в биопробах обнаруживается только в форме метаболитов, является ли необходимым условием доказательства факта поступления в организм этого ксенобиотика точная структурная идентификация метаболитов? Рискнем сказать, что нет. Не является. Обязательным должно быть доказательство, что данные метаболиты образуются исключительно в результате биоконверсии этого ксенобиотика, а не вследствие других причин. Например, даже подтвержденная образцом сравнения идентификация диметиламиноэтанола (ДМАЕ) не доказывает факт употребления димедрола, поскольку

ДМАЕ хоть и является его основным метаболитом, но может обнаруживаться в биопробах в силу других причин (автором идентифицировано еще 22 метаболита димедрола – важный результат, табл.3.6, стр.98). В качестве биомаркеров экспозиции (под этим понятием мы подразумеваем ксенометаболиты) могут выступать аддукты с белками, ферментами, ДНК. Сайты связывания остатков молекул ксенобиотиков с такими мишенями воздействия установить достаточно сложно. В этих условиях требование синтезировать и полностью охарактеризовать образец сравнения неправомерно. Доказательная база факта воздействия ксенобиотика на организм не может быть жестко регламентирована, как вполне справедливо отмечается в главе 1 диссертации. Например, если идентифицированы два специфичных биомаркера, то достаточно одного аналитического метода, если один биомаркер, то требуется два независимых метода. Сложившаяся балльная система оценки достоверности идентификации биомаркеров в рамках сбалансированных критериев ВАДА, ОЗХО и Комиссии Европейского союза предполагает свободу в выборе биомаркеров экспозиции и методов их идентификации, но регламентирует уровень надежности идентификации (не менее 4-х или 5-ти баллов в разных системах). Общеизвестной практикой является использование в качестве образцов сравнения биопроб, полученных при исследовании конверсии ксенобиотика в биоаналитических экспериментах.

На фоне успешно решенной автором проблемы федерального значения - разработки научно-обоснованных рекомендаций по определению биомаркеров синтетических каннабимиметиков, раздел, посвященный новым подходам к определению бенсультапа, дротаверина, кветиапина и димедрола на первый взгляд выглядит необязательным. Казалось бы, без большого ущерба им можно было бы и пожертвовать. С другой стороны, основным элементом методологии химико-токсикологического анализа, предложенной автором, является, так называемый, нецелевой скрининг. Известно, что в рамках такого скрининга, могут быть потеряны лабильные аналиты, особенно в том случае, если более стабильные продукты их превращений просто не включены в базы данных. В рамках научной специальности «аналитическая химия» принадлежность определяемых соединений к синтетическим каннабимиметикам, лекарственным средствам или пестицидам решающего значения не имеет, важно то, что все эти соединения практически не определяются в исходном виде, а структура производных еще подлежит установлению. Таким образом, в целом можно согласиться с выбором целевых соединений для подробного рассмотрения, равно как и отдельных методических моментов в общей процедуре скрининга, но и то и другое, возможно, нуждается в более подробном обосновании.

По оформлению работы и стилю изложения существенных замечаний нет. С точки зрения оппонента, некоторые фразы в более удачной редакции позволили бы избежать их

двусмысленного толкования. В частности, к распространению спайсов привели не «достижения последних десятилетий», а как раз отставание возможностей химико-токсикологических лабораторий от того уровня, который обеспечивал бы парирование нарастающей угрозы. В этом же ряду отметим «сторонние величины удерживания, сторонних работников, высоко линейные зависимости, гидролизные смеси, ГХ дериватизацию, газовые и жидкостные ХМС библиотеки». В отличие от автора, оппонент не относит биомаркеры к косвенным признакам (стр.6 и далее) при установлении факта воздействия ксенобиотика на организм, а «обнаружение» не считает эквивалентным ни «identification», ни «targeting analysis» и уж точно тому и другому одновременно (стр.25). Подраздел «основные термины» (1.3, стр. 25-26), содержащий толкование таких понятий как обнаружение, подтверждение, выявление, идентификация, - является вынужденной мерой, поскольку, как справедливо отмечено автором, терминология в данной области не сложилась. Имело бы смысл еще оговорить такие характеристики анализа как обзорный, скрининговый, верификационный и избегать далее в тексте таких выражений как «основной» и «дополнительный» анализ. Нуждается в толковании и ключевой термин «каннабимиметики» и его отличие от термина «каннабиноиды» ввиду различающихся определений в разных источниках.

Схема 1.1, приведенная в диссертации и автореферате, по существу является графическим образом предложенной методологии, поэтому к ней особое внимание и ряд вопросов и замечаний. В частности, вместо «анализ сыворотки крови и слюны», наверное, правильнее было бы «анализ проб, предположительно содержащих неизменный токсикант». В крови (сыворотка не всегда доступна) токсикант может быть полностью метаболизирован, но важны и другие объекты для анализа: смывы с кожи и различных поверхностей, фрагменты одежды и т.д. Извлечение ацетонитрилом (высаливание, вымораживание) также является прямой экстракцией. Что такое «исходные метаболиты» и как «измерение профилей экскреции» поможет подтверждающей идентификации? Почему на этапе обнаружения (поиска) аналитов для ЖХ-МС/МС анализа предложено ограничиться системой тройных квадруполей, а разнообразные более сложные и дорогие техники применять на подтверждающем этапе? Как известно, при обнаружении и идентификации ранее не описанных соединений наиболее трудоемкой является стадия формирования исходной гипотезы об их структуре.


Хотелось бы уточнить, как именно происходит выявление целевых аналитов при обработке масс-хроматограмм в автоматическом режиме: по масс-спектрам с последующим подтверждением по пересчитанным величинам индексов или одновременно по масс-спектрам и индексам? По нашему опыту в последнем случае велика опасность

ложно-отрицательных ответов. Возможно, автор нашел способ преодоления этой проблемы.

Все высказанные замечания носят исключительно рекомендательный характер, а вопросы обусловлены желанием исчерпывающего внедрения методологии А.М.Григорьева в практику лаборатории. Без преувеличения диссертационную работу А.М.Григорьева можно отнести к разряду выдающихся. Важно отметить также высокий уровень цитирования научных публикаций автора не только в международных научных журналах, но и в докладах ведущих ученых на конференциях химико-токсикологического профиля. Результаты работы поддержаны 2-мя монографиями и 20-ю статьями в рецензируемых изданиях. В настоящее время публикационная активность автора продолжается. Диссертация А.М.Григорьева является законченным исследованием, в котором представлено научно обоснованное решение важнейшей социальной проблемы федерального значения и, в то же время, разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Содержание диссертационной работы соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

По актуальности, объему проведенной работы, научной новизне и практической значимости диссертация А.М. Григорьева «Хроматомасс-спектрометрические методы выявления метаболитов лекарственных средств и синтетических каннабимиметиков», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия, отвечает критериям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (утвержденного Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Заведующая лабораторией аналитической токсикологии
Федерального государственного унитарного предприятия
"Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и
экологии человека" Федерального медико-биологического
агентства, доктор химических наук по специальности 20.02.23 –
поражающее действие специальных видов оружия, средства и
способы защиты, заслуженный химик РФ

 Е.И.Савельева

подпись Савельевой Елены Игоревны удостоверяю,
ученый секретарь, доктор медицинских наук, профессор

 В.П.Козяков

20.01.2017 г.



