

## ОТЗЫВ

официального оппонента Сенченко Сергея Петровича на диссертационную работу Крючкова Василия Борисовича на тему: «Исследование цефоперазона в биологических объектах методами электрофореза», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в диссертационный совет Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Актуальность избранной темы.** В современной практической медицине среди антибактериальных средств важное место занимают антибиотики цефалоспоринового ряда, в том числе и цефоперазон. Как монокомпонентные, так и комбинированные препараты цефоперазона широко применяются и включены в список ЖНВЛП в виде лекарственной формы «порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения».

Несмотря на то, что цефоперазон, в целом, хорошо переносится пациентами, при определенных условиях, таких как патология внутренних органов, индивидуальная непереносимость, он может вызывать серьезные побочные эффекты, в том числе и приводящие к летальному исходу. Кроме того, для исключения послеоперационных раневых осложнений необходим контроль за уровнем содержания цефоперазона в тканях операционного поля.

В связи с этим для целей химико-токсикологического анализа, а также для контроля терапевтической концентрации необходимо наличие надёжных методик, которые позволят достоверно обнаружить и количественно определить цефоперазон в биологических объектах.

Решение указанных вопросов возможно с помощью современных физико-химических методов. Среди них особое место занимают электрофоретические методы, которые имеют ряд преимуществ по сравнению

с традиционными хроматографическими методами. Поэтому поставленные автором цели и задачи по изучению возможности применения электрофоретических методов для анализа цефоперазона в биологических объектах для целей аналитической токсикологии и клинической лабораторной практики являются актуальными.

**Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Диссертационная работа Крючкова В.Б. выполнена с применением современных методов физико-химического анализа. Исследования проведены на сертифицированном оборудовании, предложенные методики валидированы по основным параметрам, полученные результаты подвергнуты необходимой статистической обработке. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на достаточном объеме экспериментального материала, являются достоверными, логически вытекают из результатов проведенных исследований.

**Достоверность и новизна исследований, полученных результатов.** Выполненные соискателем исследования не вызывают сомнений, так как они подтверждены обширным экспериментальным материалом и последующей статистической обработкой полученных данных с использованием современных компьютерных программ, в том числе «Microsoft Office Excel», 2007.

Новизна научного исследования состоит в том, что Крючковым В.Б. впервые показана возможность использования электрофоретических методов, как для скринингового обнаружения, так и для качественного и количественного определения цефоперазона в биологических объектах. При этом условия пробоподготовки и анализа цефоперазона теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены.

**Значимость для науки и практики полученных автором результатов.** Использованное сочетание электрофоретических методов, как для скринингового обнаружения цефоперазона, так и для его качественного и

количественного определения, может быть положено в основу системного подхода при исследовании цефалоспориновых антибиотиков биологических объектах.

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что разработанные соискателем методики количественного определения цефоперазона в биологических объектах отличаются экономичностью, доступностью и экспрессностью, а проведенная валидационная оценка подтверждает их надёжность и применимость, о чем свидетельствуют акты внедрения, представленные в приложении к диссертационной работе.

Кроме того, на основе материалов диссертационного исследования Крючковым В.Б. составлен проект информационного письма «Химико-токсикологический анализ цефоперазона в моче методом капиллярного электрофореза» для использования в практике химико-токсикологических лабораторий бюро судебно-медицинской экспертизы РФ.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 206 страницах машинописного текста, иллюстрирована 37 таблицами и 36 рисунками. Она состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложений. Список литературы включает 244 источника, в том числе 101 – на иностранных языках.

### **Общая характеристика работы**

**Во введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость, выделены основные положения, выдвигаемые на защиту, представлены сведения по апробации результатов, указан личный вклад автора.

**Глава 1 (обзор литературы).** Содержит характеристику цефоперазона с химической и фармакологической точки зрения. Приведён анализ отечественных и зарубежных литературных источников по аналитическим методам исследования антибиотиков цефалоспоринового ряда. Описаны

возможности методов электрофореза на бумаге и капиллярного электрофореза в анализе лекарственных средств различного химического строения в биологических объектах.

**Глава 2 (Объекты и методы исследования).** Содержит характеристику объектов исследования, условий проведения анализа, используемых методов и методик и специального оборудования, включающего систему капиллярного электрофореза.

**Глава 3.** В ней приводится изучение условий скринингового обнаружения и идентификации цефоперазона в группе цефалоспориновых антибиотиков методом электрофореза на бумаге. Применены такие эмпирические характеристики, как величины длин пути фореза (ДПФ) и рассчитанного на их основе внутреннего коэффициента ( $R_i$ ). Проведены исследования, как на растворах антибиотиков, так и на моделях, содержащих созкстрактивные вещества. При этом показана применимость предложенных этапов электрофореза – скрининга в анализе исследуемых антибиотиков.

**Глава 4.** Посвящена изучению возможности использования капиллярного электрофореза для идентификации и количественного определения цефоперазона. При разработке методики изучено влияние рН и состава электролита на электрофоретическое поведение цефоперазона. Представленная методика была подвергнута процедуре валидации по всем необходимым параметрам. При этом было показано, что разработанная методика характеризуется высокой чувствительностью, селективностью и экспрессностью.

**Глава 5.** Содержит результаты разработки и валидации методик качественного и количественного определения цефоперазона в биологических объектах (модельных смесях) с использованием капиллярного электрофореза. Автором описан выбор условий экстракции цефоперазона, подробно изучены валидационные характеристики методики для каждого из объектов (моча, кровь, печень). В ряде случаев (например, при исследовании

на крови и печени) проведены сравнительные исследования для нескольких вариантов пробоподготовки.

**Глава 6.** В ней приводятся результаты идентификации и количественного определения цефоперазона в клинических объектах (ткани операционного поля) методом капиллярного электрофореза. Диссертантом указывается, что разработанная методика позволяет контролировать уровень цефоперазона во всех исследуемых объектах в течение 60 мин после введения препарата, что обуславливает возможность использования методики для объективного контроля уровня цефоперазона в тканях операционного поля.

Общие выводы диссертационной работы полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

**Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.** Отмечая достаточный объем выполненных исследований, и, оценивая, в целом, положительно диссертационную работу Крючкова В.Б., хотелось бы высказать ряд пожеланий и остановиться на некоторых вопросах и замечаниях.

1. На сегодня метод ВЭЖХ достаточно широко используется не только в контроле качества субстанций и лекарственных препаратов на основе цефоперазона, но и существует достаточно много публикаций посвященных применению метода ВЭЖХ для анализа цефоперазона в биологических объектах. Поэтому соискателю следовало бы на практике показать преимущества метода капиллярного электрофореза по сравнению с ВЭЖХ, что существенно повысило бы значимость полученных результатов.

2. В случае электрофореза на бумаге не совсем ясна необходимость выделения электрофоретических групп по расстоянию, пройденному веществами. О чём свидетельствует информация, что цефоперазон входит в 3 группу, если на втором этапе все равно необходимо строить электрофоретические спектры, причём для всех групп схема аналогична?

3. При проведении исследований методом электрофореза на бумаге необходимо было также установить влияние сопутствующих веществ не только на электрофоретическое поведение цефалоспориновых антибиотиков, но и на их извлечение из образцов биологических жидкостей, органов и тканей. При этом ЭФГ на бумаге, даже схематично, в работе не представлены.

4. В главе 4 выбор состава электролита проводится на растворе цефоперазона. При этом в качестве параметров пригодности предложены эффективность (не менее 100 000 т.т), относительное стандартное отклонение (не более 5%) и коэффициент асимметрии пика (не более 1,5). Однако не ясно, почему применены именно эти значения. Оценить сравнительный результат довольно сложно, поскольку ЭФГ в фосфатном электролите в работе также не представлены. При анализе сложных биологических проб, прежде всего, нужно учитывать и сравнивать разрешение с сопутствующими компонентами пробы и чувствительность методики в выбранных условиях (буферные растворы различного состава и pH). Кроме того, в данной главе автором приводится валидация некой методики, но не понятно в чём определяется цефоперазон (субстанция, препарат, биологическая проба или др.). Валидации необходимо подвергать только конечную методику, с применением модельных смесей на образцах используемой матрицы, что и сделано автором, но в последующих главах.

5. В главе 5 при валидационной оценке не указано, как рассчитывались концентрации цефоперазона в модельных смесях – по раствору стандартного образца или по калибровочному графику. Если по раствору стандартного образца, то требуют пояснений результаты оценки прецизионности и правильности методики, поскольку они не коррелируют со степенью экстракции цефоперазона. В этой же главе несколько смущают значения относительного стандартного отклонения для ряда методик (определение цефоперазона в моче, печени) на уровне 0,4 %-0,5 %, тогда как при валидации «методики анализа цефоперазона методом капиллярного

электрофореза» («в чистом виде» без влияния матрицы) получены значения на уровне не менее 1,5 %.

6. В главе 6 на ЭФГ при обнаружении цефоперазона в клинических объектах (ткани операционного поля) через 20 мин после внутривенного введения препарата видно, что в моче его концентрация выше и диссертант об этом упоминает при описании результатов. Однако, согласно инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата (например, «Цефоперазон, ОАО «Красфарма»), концентрация цефоперазона через 30 мин после внутривенного введения 1 г препарата снижается примерно на 25 %. Кроме того, согласно той же инструкции, с почками выводится примерно 20-30 % от введенной дозы. В этой связи необходимы какие-либо пояснения причин полученных существенных различий. При этом, динамику изменения концентрации в тканях операционного поля нагляднее было бы представить в виде фармакокинетических кривых.

7. Также хотелось бы пояснений по поводу используемых образцов биологических жидкостей, органов и тканей человека для приготовления модельных биологических смесей. Имелись ли необходимые разрешения на их использование в научных целях (заклучения этических комитетов, согласие здоровых добровольцев, согласие родственников людей, погибших от травм, для использования их органов и тканей и т.д.)? Какова была выборка объектов исследования?

8. К работе имеется также ряд редакторских замечаний, связанных с оформлением, опечатками, неудачными оборотами и представленными рисунками. Кроме того, некоторые из литературных источников требуют правок согласно соответствующему ГОСТу.

**Заключение.** Таким образом, диссертация Крючкова Василия Борисовича на тему: «Исследование цефоперазона в биологических объектах методами электрофореза» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по разработке

электрофоретических методик анализа цефоперазона в биологических объектах для целей химико-токсикологического и клинического лабораторного анализа, имеющей существенное значение для специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, что соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), а ее автор, Крючков Василий Борисович, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

доктор фармацевтических наук (14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия), доцент, начальник отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопей и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

«04» июня 2019 г.



Сенченко Сергей Петрович

Почтовый адрес:

127051 г. Москва, Петровский бульвар д. 8, стр.2.

тел.: 8 (495) 625-43-48

e-mail: Senchenko@expmed.ru

Подпись Сенченко С.П. заверяю,

Ученый секретарь

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,

к.м.н., зам. директора Центра планирования  
и координации научно-исследовательских работ

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Климов В.И.