

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, заведующего лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации **Калёкина Романа Анатольевича** на диссертационную работу **Мельник Елизаветы Валерьевны** на тему **«Разработка методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС»**, представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы исследования

Российская Федерация является одной из немногих стран в мире, где разрешено к медицинскому применению лекарственное растительное сырье «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» (*Veratri Lobeliani rhizonata cum radicibus*), из которого производят лекарственный препарат «Чемеричная вода». На сегодняшний день в нашей стране не теряет актуальности проблема отравлений токсичными алкалоидами чемерицы, большая часть которых возникает вследствие употребления внутрь лекарственного препарата «Чемеричная вода». Несмотря на то, что данный препарат предназначен для наружного применения в качестве противопаразитарного средства, его принимают внутрь в качестве спиртосодержащего продукта, а также с целью самолечения в соответствии с предположением народной медицины о его антиалкогольном действии.

Лабораторная диагностика отравлений алкалоидами чемерицы осложнена отсутствием единого методологического подхода к их подтверждению инструментальными методами анализа. Трудности представляет выбор целевых аналитов, а также их присутствие в биологических объектах в следовых количествах. Помимо этого, в открытых источниках практически не представлены данные по статистике отравлений алкалоидами чемерицы в России. И не представлены они не потому, что

случаи отравления алкалоидами чемерицы единичны, а как раз ввиду отсутствия лабораторной диагностики таких отравлений.

Изучение качественного и количественного алкалоидного состава лекарственного препарата «Чемеричная вода» представляет отдельный интерес с целью его характеристики в качестве возможного токсиканта.

В связи с вышеизложенным, исследования, выполненные Мельник Е.В. в диссертационной работе, являются, несомненно, актуальными.

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

Научные положения диссертационной работы Мельник Елизаветы Валерьевны основаны на результатах проведенных экспериментов с использованием современных инструментальных методов анализа. Выводы диссертации вытекают из результатов исследования, подтверждены фактическим материалом, грамотно аргументированы.

Основные положения диссертации были представлены на международных конференциях, а результаты работы опубликованы в журналах из списка Высшей аттестационной комиссии и в изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, Chemical Abstracts.

Достоверность полученных результатов и научная новизна исследования

В диссертационной работе Мельник Е.В. использовались современные инструментальные методы анализа, испытательное и вспомогательное оборудование имело действительные свидетельства о поверке. Достоверность полученных результатов и применимость разработанных методик подтверждена их валидацией в соответствии с действующими международными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам.

В рассматриваемом исследовании впервые изучено качественное и количественное содержание алкалоидов в составе лекарственного препарата «Чемерицная вода». Разработана и валидирована методика количественного определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД, которую предложено использовать в контроле качества данного препарата. Случаи отравления алкалоидами чемерицы подтверждены лабораторной диагностикой при помощи разработанной и валидированной методики методом ВЭЖХ-МС/МС. Количественная оценка содержания иервина и протовератрина А в биологических образцах (плазма крови, моча), полученных от пациентов в динамике, отразила профиль элиминации алкалоидов чемерицы из организма человека. Впервые эксперимент по моделированию острого отравления лекарственным препаратом «Чемерицная вода» на лабораторных животных сопровождался количественным определением иервина и протовератрина А в плазме крови животных.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Значимость полученных результатов для науки, не только отечественной, но и мировой, подтверждается их публикацией в ведущем международном научном журнале в области аналитической токсикологии – «Journal of Analytical Toxicology». Выбранные в диссертационной работе целевые алкалоиды чемерицы, валидированная биоаналитическая методика, а также впервые описанные тренды элиминации аналитов из организма человека представляют ценность для токсикологов во всех странах, где произрастают растения рода *Чемерица* и, следовательно, возможны отравления ими.

Практическое значение полученных результатов также не вызывает сомнения: методологический подход к лабораторной диагностике отравлений алкалоидами чемерицы на основе валидированной методики методом ВЭЖХ-МС/МС успешно внедрен в практику нескольких из ведущих химико-токсикологических лабораторий г. Москвы (ГБУЗ «НИИ скорой помощи им.

Н.В. Склифосовского ДЗМ», ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ»). В качестве практической рекомендации предлагается внедрение разработанной методики в иные химико-токсикологические лаборатории и бюро судебно-медицинской экспертизы, имеющие требуемого оборудование.

Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, применяются в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармазии им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Структура и содержание диссертации

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и проиллюстрирована 24 рисунками. Работа построена в традиционной форме и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть с результатами собственных исследований, изложенную в 3 главах, общие выводы, практические рекомендации, список сокращений и список литературы. Список литературы включает 101 источник: 23 отечественные работы и 78 иностранных.

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, определены цели и задачи работы, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость, приведена информация о внедрении результатов исследования, личном вкладе автора.

Первая глава диссертации представляет собой литературный обзор, в котором обобщены физико-химические и токсические свойства основных алкалоидов чемерицы, рассмотрена проблема отравлений ими, проанализированы существующие методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственном растительном сырье. Подтверждена необходимость разработки методологического подхода к лабораторной диагностике острых отравлений чемерицей, а также разработка методики количественного определения индивидуальных алкалоидов в

составе лекарственного препарата «Чемеричная вода» для целей контроля качества.

Во второй главе диссертации приведены сведения о материалах и методах экспериментальной части исследования, дизайне эксперимента по моделированию острого отравления лекарственным препаратом «Чемеричная вода».

Третья глава содержит основные результаты исследования: описан статистический анализ острых отравлений алкалоидами чемерицы в 5 субъектах Российской Федерации, представлены параметры методики качественного определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС, результаты валидации методик количественного определения иервина в лекарственном препарате «Чемеричная вода» методом ВЭЖХ-ДАД, иервина и протовератрина А в биологических объектах методом ВЭЖХ-МС/МС.

В четвертой главе рассматриваются результаты апробации разработанных методик на биологических объектах пациентов, госпитализированных с подозрением на отравление алкалоидами чемерицы, а также полученных от лабораторных животных при введении им лекарственного препарата «Чемеричная вода».

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа построена логично, поставленные задачи исследования выполнены полностью, общие выводы обоснованно вытекают из полученных результатов работы. Все таблицы, рисунки, представленные в работе, информативны, сопровождаются соответствующими комментариями.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, при ее рассмотрении возник ряд вопросов и замечаний:

Вопросы:

1. В таблице 1 указан состав по алкалоидам различных видов Чемерицы и указана классификация данных алкалоидов. Данная информация не несет смысловой нагрузки. Для чего она была указана?

2. На рисунках 10 и 11 представлены хроматограммы с временами удерживания алкалоидов до 10 минут. Для чего в таблице 5 указан разработанный градиентный режим для 14 минутного анализа? И почему не использовался укороченный режим до 10 минут, хотя было указано на такую возможность?
3. В пункте 3.2.2. указана информация по оптимизации параметров масс-спектрометрического детектирования. Какие параметры были первоначальные и какие из них были оптимизированы?
4. На стр. 53 указаны параметры источника ионизации. На сколько температура газов достаточна для достижения уровня степени ионизации в предложенной методике?
5. В пункте 3.3.1 предложено проводить количественную оценку содержания по иервину и протOVERATРИНУ А в ЧВ, хотя ранее было указано на стр. 30 в последнем абзаце, что иервин не обнаруживается, а обнаруживаются протOVERATРИНЫ А и В. Как это согласовывается с предложенными Вами алкалоидами для определения в предложенной методике?
6. Для чего в таблице 11 указаны данные по степени извлечения протOVERATРИНА В, если предлагается методика по протOVERATРИНУ А и иервину?
7. Почему берется в качестве объекта исследования плазма крови, а не цельная кровь?
8. Калибровочные кривые по алкалоидам были построены в определённых диапазонах. Как эти диапазоны коррелируются с токсическими и летальными концентрациями/дозами Чемеричной воды?
9. Предложенная пробоподготовка подразумевает перевод алкалоидов из соли в основание. В каком виде исследуемые алкалоиды находятся в биологических объектах?

Замечания:

10. На многих рисунках, например на рис. 9, не указаны данные по оси абсцисс и оси ординат, данные приведены под рисунками и на английском языке, что затрудняет понимание представленной информации.
11. На стр. 64 есть предложение, которое начинается с цифр 11,9 и на стр. 73 во втором абзаце. Было бы лучше начинать предложение со слов.
12. На рисунках 13 (и на некоторых других рисунках) не читабельные данные по абсциссам и ординатам.

Все вышеперечисленные замечания и вопросы не носят принципиального характера, не снижают ценность проделанной работы и не оказывают существенного влияния на положительную оценку диссертационного исследования.

Содержание диссертационной работы Мельник Е.В., представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, полностью соответствует паспорту специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Заключение


Таким образом, диссертация Мельник Елизаветы Валерьевны на тему «Разработка методики определения алкалоидов чемерицы в биологических объектах и лекарственных препаратах методом ВЭЖХ-МС/МС», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач по лабораторной диагностике отравлений алкалоидами чемерицы, а также разработке подхода к контролю качества лекарственного препарата «Чемеричная вода».

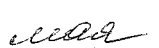
Диссертационная работа Мельник Е.В. полностью соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

(Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора № 0094/Р от 31.01.2020, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Мельник Елизавета Валерьевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

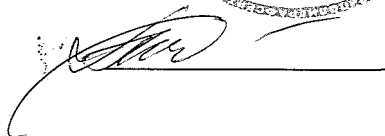
Доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия),
заведующий лабораторией судебно-химических и
химико-токсикологических исследований
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский центр судебно-медицинской экспертизы»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации


Калёкин Роман Анатольевич

«18»  2021 г.

Подпись д.фарм.н. Калёкина Р.А. «Заверяю»
Начальник ОК ФГБУ «РЦСМЭ»
Минздрава России




Кухоль Татьяна Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский центр судебно-медицинской экспертизы»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13
Тел.: +7 (495) 945-21-69
Электронная почта: mail@rc-sme.ru