

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

На правах рукописи

Гребенкина Екатерина Викторовна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ КАТИНОНА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук,
профессор Изотов Борис Николаевич

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Классификация синтетических катинонов. Лекарственные средства, содержащие производные катинона.....	11
1.1.1 Краткая история и эпидемиология синтетических катинонов.....	11
1.1.2 Активные фармацевтические субстанции среди катинонов (амфепрамон и бупропион).....	15
1.2 Альфа-пирролидинопентиофенон и 3,4-метилендиоксипировалерон– токсикологически значимые синтетические производные катинона	17
1.2.1 Физико-химические свойства	17
1.2.2 Фармакодинамика и клинические эффекты	17
1.2.3 Фармакокинетика исследуемых объектов.....	21
1.2.4 Токсикологическая характеристика α -PVP и MDPV	27
1.3 Методы химико-токсикологических исследований	30
1.3.1 Иммунохроматографический метод анализа на этапе скрининга	32
1.3.2 Инструментальные методы анализа подтверждающего этапа ХТИ	39
1.4 Уровни порогового значения («cut-off») в системе ХТА.....	42
Выводы к главе 1	46
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1 Объекты исследования	47
2.2 Оборудование и материалы	47
2.2.1 Иммунохимический анализатор ИК 200609 и реагенты для обнаружения синтетических катинонов	49
2.2.2 Оптимальные условия изолирования и анализа исследуемых веществ...	52

2.3	Операционные характеристики диагностических методов исследования...	53
2.4	ROC-анализ как инструмент установления уровней пороговых значений...	59
2.5	Площадь под ROC-кривой. AUC – показатель качества модели.....	61
	Выводы к главе 2	63
	ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	64
3.1	Оценка иммунохроматографических реагентов для обнаружения синтетических катинонов, применяя ROC-анализ	64
3.1.1	Калибровка ИК 200609	65
3.1.2	Анализ результатов измерений, полученных на анализаторе ИК 200609	72
3.1.3.	Построение ROC-кривой согласно распределению по категориям решений.....	74
3.1.4.	Установление пороговых значений по данным ROC-анализа	76
3.1.5.	Анализ кривых распределения	78
3.2	Идентификация синтетических производных катинона и (или) их метаболитов методом ГХ-МС.....	83
3.2.1	Влияние гидролиза и дериватизации на сохранность исследуемых аналитов.....	88
3.3	Оценка экономической эффективности предложенной схемы проведения ХТИ синтетических производных катинона	90
	Выводы к главе 3	102
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	103
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	105
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	119
	БЛАГОДАРНОСТИ	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ежегодные доклады Управления ООН по наркотикам и преступности (UNODC) свидетельствуют о динамическом росте незаконного оборота новых психоактивных веществ (ПАВ). Материалы опросов и анкетирования больших групп населения различных стран подтверждают рост злоупотреблений ПАВ. В ежегодных докладах Европейского центра мониторинга наркотиков и наркозависимости (EMCDDA), согласно клиническим данным по лечению острых отравлений дизайнерскими наркотиками, отмечается повышение количества передозировок, в том числе и с летальными исходами [55, 100].

За последние годы многие наркозависимые перешли от употребления «классических» наркотиков к употреблению наркотических веществ из группы новых ПАВ. Возникновению данной ситуации способствовали несколько факторов: ложная «юридическая чистота», экономический фактор, а также фактор «новизны» производимых эффектов новых ПАВ [14]. Новые ПАВ, как правило, синтетического происхождения, разрабатываются и внедряются в незаконный оборот в качестве альтернативы контролируемых на международном уровне веществам. Новые ПАВ также известны как «дизайнерские наркотики».

Термин «дизайнерские наркотики» связан с понятием «drug design» – разработка новых лекарственных препаратов [29]. По химическому строению дизайнерские наркотики представляют собой аналоги или производные уже известных и (или) запрещённых наркотических средств (НС) и психотропных веществ (ПВ), обладающие сходной или более сильной фармакологической активностью.

На нелегальном рынке наркотиков наблюдается быстрый темп смены групп новых ПАВ, в частности, за последний год отмечен резкий рост изъятий и злоупотреблений синтетическими опиоидами из группы фентанила и синтетическими катинонами. Ранее же на теневом рынке преобладали синтетические каннабиноиды [16, 17].

О внедрении на нелегальный рынок большого числа синтетических

катинонов отмечается в отчетах UNODC (за период 2008-2015) [98–100]. В соке листьев растения кат (*Catha edulis*, семейство бересклетовые (*Celastraceae*)) содержится алкалоид катинон [32], обладающий наркотическим действием, и, тем самым, являющийся родоначальником целого ряда синтетических производных. К июлю 2015 года UNODC было известно о 97 синтетических катинонах.

После установления контроля за мефедроном в ряде стран в качестве альтернативы появились другие синтетические катиноны, такие как альфа-пирролидинопентиофенон (α -PVP) и 3,4-метилendioксипировалерон (MDPV) [40, 45, 73].

MDPV и α -PVP являются одними из самых популярных и доступных катинонов на теневом рынке [61]. Анализ динамики прироста новых ПАВ в России за последние годы показывает, что именно α -PVP и MDPV являются наиболее распространенными дизайнерскими наркотиками. Согласно исследованиям, MDPV поднимает уровень дофамина так же, как и кокаин, но в 10 раз сильнее [20]. В тоже время, в литературе все чаще сообщается о многочисленных случаях летального исхода после употребления α -PVP по всему миру.

Отчетные данные за последние годы бюро судебно-медицинской экспертизы и химико-токсикологических лабораторий наркологических диспансеров (больниц) во многих областях Российской Федерации показывают, что α -PVP вышел на первое место по числу его выявления при злоупотреблениях психоактивными веществами и смертельных случаев от передозировок новыми ПАВ.

С учетом вышеизложенного, разработка системы проведения химико-токсикологического исследования (ХТИ) для обнаружения токсикологически значимых синтетических катинонов в моче актуальна на сегодняшний день.

Степень разработки темы исследования

Внедрение системы количественной оценки контролируемых и запрещенных веществ является крайне важной задачей при проведении ХТИ. Однако до проведения настоящего исследования работа по экспериментальному определению уровня пороговых значений («cut-off») наркотических средств, психотропных

веществ и их метаболитов (в том числе для синтетических катинонов) Российской Федерации не проводилась.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка методик ХТИ для обнаружения наиболее часто встречающихся в судебно-химической и химико-токсикологической практике синтетических катинонов и их метаболитов в моче.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1) изучить свойства токсикологически значимых синтетических производных катинона и их метаболитов с применением программного обеспечения ACD/Labs и платформы ACD/Percepta и провести критический анализ литературных источников о методах их идентификации с учетом полученных данных;

2) рассчитать уровень порогового значения («cut-off») для методики иммунохроматографического исследования, используя ROC-кривые и статистический анализ кривых распределения с учетом преваленса синтетических катинонов для повышения достоверности их обнаружения в моче;

3) оптимизировать методику иммунохроматографического исследования с применением аналитического комплекса, включающего анализатор ИК 200609 и экспериментальные реагенты для иммунохроматографического анализа (ИХА) на синтетические катиноны, для проведения ХТИ и дать аналитическую оценку его применения в практике;

4) оптимизировать условия изолирования из мочи α -PVP и MDPV и их метаболитов, используя расчетные данные программного обеспечения ACD/Labs и платформы ACD/Percepta, и методику хромато-масс-спектрометрического анализа с учетом полученных данных ИХА изучаемых аналитов при проведении ХТИ;

5) оценить прогностическую и экономическую эффективность разработанных методик ХТИ на синтетические производные катинона.

Научная новизна

Впервые экспериментально установлен уровень порогового значения («cut-off») с применением ROC-анализа для иммунохроматографических реагентов с целью обнаружения синтетических катинонов в моче. Проведена оценка

диагностической эффективности исследуемых реагентов для анализатора ИК 200609. Для ИХА применён статистический анализ кривых распределения и установлен обоснованный уровень порогового значения («cut-off») с учетом статистики распространения синтетических катинонов в регионах Российской Федерации.

Разработана методика пробоподготовки и подобраны оптимальные условия для анализа α -PVP и MDPV и их метаболитов в моче методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) на уровне порогового значения 100 нг/мл по нативным соединениям. Дана оценка экономической эффективности предложенной схемы проведения ХТИ синтетических производных катинона.

Теоретическая значимость исследования

В настоящее время в Российской Федерации отсутствует система метрологического обеспечения получения достоверных результатов о количественном содержании в биообъектах контролируемых наркотических средств и их метаболитов, оборот которых запрещен на территории страны. На основании полученных результатов диссертационного исследования по установлению уровня порогового значения (содержания) «cut-off» для иммунохроматографических реагентов с учетом преваленса, выработан подход к обоснованию верификационных критериев оценки результатов предварительных и подтверждающих методов химико-токсикологического анализа психоактивных веществ в биообъектах, оборот которых запрещен на территории страны. Обосновано применение метода ГХ-МС для анализа α -PVP и MDPV на уровне порогового значения 100 нг/мл с целью оптимизации выявляемости контролируемых ПАВ из группы синтетических производных катинона.

Практическая значимость исследования

На основании проведенных исследований рассчитан уровень порогового значения («cut-off») для иммунохроматографических реагентов (100 нг/мл для синтетических производных катинона). Идентифицированы и охарактеризованы масс-спектры нативных соединений и основных метаболитов изучаемых веществ в

биобъектах. По значению S/N (отношение аналитического сигнала вещества к уровню шумов) для α -PVP и MDPV достигнут предел обнаружения методом хромато-масс-спектрометрии 30 нг/мл. Показано, что разработанные методики анализа могут использоваться при решении поставленных задач: установления факта потребления синтетических производных катинона, а также состояния опьянения ими. Доказана экономическая и прогностическая эффективность использования предложенной схемы химико-токсикологического анализа синтетических производных катинона.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Методика инструментального ИХА на анализаторе ИК 200609 с реагентами для обнаружения синтетических катинонов в моче при проведении ХТИ.
2. Результаты оценки диагностической эффективности исследуемых реагентов на основе экспериментальных данных проведенного ИХА.
3. Методика установления уровней порогового значения («cut-off») с применением ROC-кривых и анализа кривых распределения для иммунохроматографических реагентов на синтетические катиноны.
4. Оптимизированная методика пробоподготовки и хромато-масс-спектрометрического исследования α -PVP и MDPV (и их метаболитов) в моче на уровне порогового значения 100 нг/мл.
5. Результаты оценки экономической эффективности предложенной схемы проведения ХТИ синтетических производных катинона.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили труды зарубежных и российских ученых: М. Grapp, К. Hasegawa, N. Negreira, А.Б. Мелентьева, С.С. Катаева, А.Р. Асадуллина и др. в области анализа новых ПАВ. В работе учтены требования и рекомендации нормативных документов Министерства здравоохранения Российской Федерации, регламентирующих проведение ХТИ и судебно-химических экспертных исследований.

В диссертационной работе проведены выборочные и экспериментальные исследования, применялся иммунохроматографический анализ, метод газовой

хромато-масс-спектрометрии, математико-статистические методы исследования.

Достоверность научных положений и выводов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными физико-химическими методами исследования, выполненными на модификациях аналитического оборудования, разрешенного для применения в медицинской практике. Выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы и логичны; подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в постановке цели и задач исследования, выборе и сборе объектов для анализа, проведении всех этапов экспериментальной части работы. Автор самостоятельно проводила иммунохроматографические и хромато-масс-спектрометрические исследования образцов мочи. Диссертантом проведен ROC-анализ, анализ кривых распределения с учетом преваленса, рассчитан уровень порогового значения («cut-off») для исследуемых реагентов, а также написан ряд публикаций по теме исследования. Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно и непосредственно внедрены в практику.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в химико-токсикологической лаборатории ГБУ Республики Марий Эл «Республиканский наркологический диспансер» (акт внедрения от 25 июня 2018 года); в судебно-химическом отделении ОГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Томской области» (акт внедрения № 115 от 22 июня 2018 года) (прил. Г, Д).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа является прикладным исследованием для решения задач судебно-химического и химико-токсикологического анализов. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки). Результаты

проведённого исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 4 паспорта специальности.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры аналитической и судебно-медицинской токсикологии Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Исследования в области аналитической и биохимической токсикологии наркотических, сильнодействующих и ядовитых веществ» (№ государственной регистрации 01200110469).

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на II Международной научно-практической конференции «Современная химико-токсикологическая экспертиза» International scientific conference АСТЕ'2015 06 октября 2015 г., Москва. На XXI Международной выставке средств обеспечения безопасности государства «Интерполитех-2017» 18-20 октября 2017 г., Москва. Апробация работы проведена на заседании кафедры аналитической и судебно-медицинской токсикологии Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 26 февраля 2019 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, из них 1 статья опубликована в зарубежном издании, индексируемом в международной базе данных Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, общих выводов, списка литературы из 108 источников (78 из которых зарубежные), списка используемых сокращений и приложений.

Работа иллюстрирована 37 рисунками и включает 27 таблиц.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Классификация синтетических катинонов. Лекарственные средства, содержащие производные катинона

1.1.1 Краткая история и эпидемиология синтетических катинонов

Синтетические катиноны – класс дизайнерских наркотиков, появившийся в результате структурной модификации фенилэтиламина. Основой для синтеза многих дизайнерских синтетических катинонов является психоактивный протоалкалоид катин, который содержится в листьях вечнозеленого растения кат *Catha edulis* и обладает психостимулирующим и анальгезирующим свойствами, что и привело к широкому распространению жевания свежих листьев в регионе произрастания [9]. Употребление листьев и молодых побегов растения кат является многовековой традицией населения некоторых регионов Восточной Африки и Аравийского полуострова [10, 72]. Жевание листьев ката является неотъемлемой частью жизни в странах Аравийского полуострова. Листья принимают во время встреч в кафе, после работы, как средство релаксации, студенты употребляют их во время подготовки к экзаменам [51].

Растение кат запрещено к культивированию и обороту на территории Российской Федерации.

Основной интерес к кату на нелегальном рынке оборота наркотиков вызывает получение окисленной формы протоалкалода – катинона, структурная формула которого представлена на рисунке 1.

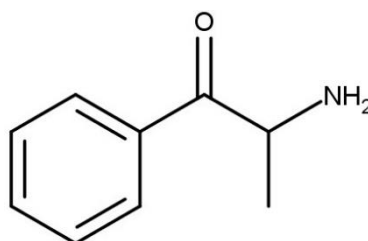


Рисунок 1 – Структурная формула алкалоида катинона (норэфедрон или β-кетоамфетамин)

Химическая структура природного катинона и развиваемые им эффекты после употребления близки к эфедрину и другим амфетаминоподобным стимуляторам: эйфория, повышение концентрации внимания, усиление моторной активности, психозы, однако при этом сила воздействия ниже в сравнении с амфетамином [54].

Первый синтетический катинон (меткатинон) синтезировали в начале XX века с целью разработки в качестве лекарственной субстанции, а схемы синтеза MDPV и мефедрона впервые были опубликованы в 1929 [55].

На рисунке 2 показана общая структура дизайнерских синтетических катинонов, а в таблице 1 представлены структуры веществ из этой группы, получивших наибольшее распространение [59].

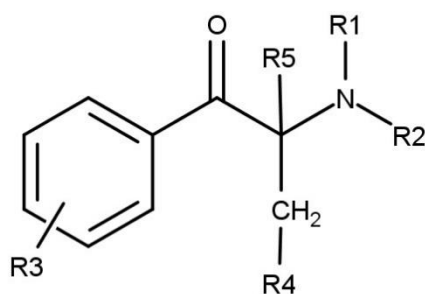


Рисунок 2 – Общая структурная формула катинонов

Соединения этого класса действуют как ингибиторы обратного захвата моноаминов [18].

Этот класс веществ во многих странах мира контролируется законом. Во избежание контроля государственных структур за реализацией новых ПАВ, они реализуются под маскирующими названиями «удобрения для растений», «репелленты», «пятновыводители», «корм для рыб» и др., обычно обозначены маркировкой «не предназначены для использования человеком внутрь», «несъедобно», «не проверено на предмет опасности и токсичности», «не для использования человеком». Зачастую дизайнерские наркотики, содержащие синтетические производные катинона, носят неформальное название «соли» или «соли для ванн» [8, 41].

Таблица 1 – Заместители производных катинона [59]

Название	Заместители				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Катинон	H	H	H	H	H
Меткатинон (эфедрон)	-CH ₃	H	H	H	H
<i>N,N</i> -диметилкатинон (метамфепрамон)	-CH ₃	-CH ₃	H	H	H
<i>N</i> -этилкатинон (ЕС)	-CH ₂ CH ₃	H	H	H	H
Буфедрон	-CH ₃	H	H	-CH ₃	H
4-метил- <i>N</i> -этилкатинон	-CH ₂ CH ₃	H	4-CH ₃	H	H
Мефедрон (4-ММС; М-САТ)	-CH ₃	H	4-CH ₃	H	H
Амфепрамон*	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	H	H	H
Бупропион*	трет-бутил	H	3-Cl	H	H
Метилон (βk-MDMA)	-CH ₃	H	3,4-метилендиокси	H	H
Этилон (βk-MDEA)	-CH ₂ CH ₃	H	3,4-метилендиокси	H	H
Бутилон (βk-MBDB)	-CH ₃	H	4-CH ₃	-CH ₃	H
Метедрон (βk-PMMA)	-CH ₃	H	4-CH ₃	H	H
3-фторметкатинон (3-FMC)	-CH ₃	H	3-F	H	H
α-пирролидинопропиофенон (PPP)	{пирролидин}	H	H	H	
4-метил-α-пирролидинопропиофенон (MPPP)	{пирролидин}		4-CH ₃	H	H
4-метокси-α-пирролидинопропиофенон (MOPPP)	{пирролидин}		4-OCH ₃	H	H
4-метил-α-пирролидино-гексанофенон (MPHP)	{пирролидин}		4-CH ₃	пропил	H
Пировалерон*	{пирролидин}		4-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	H
4-метил-α-пирролидино-бутирофенон (MPBP)	{пирролидин}		4-CH ₃	-CH ₃	H
4-метил-α-пирролидино-α-метилпропиофенон	{пирролидин}		4-CH ₃	H	-CH ₃
3,4-метилендиокси-α-пирролидинопропиофенон (MDPPP)	{пирролидин}		3,4-метилендиокси	H	H
3,4-метилендиоксипировалерон (MDPV)	{пирролидин}		3,4-метилендиокси	-CH ₂ CH ₃	H

Примечание. * - активная фармацевтическая субстанция.

Такое название («соли для ванн») объясняется внешним сходством веществ с обычной солью для ванн, однако, химический состав, указанный на упаковке, ничего общего с ней не имеет. Смесь выглядит также, как и обычная соль для ванны – бесцветные или окрашенные кристаллы, она расфасована и упакована в яркие пакетики и носит название «Аура», «Ванильное небо», «Кристалиус» и др.

Один из представителей α -PVP был разработан немецкой фармацевтической компанией Boehringer Ingelheim в 1960-е как стимулятор центральной нервной системы [71]. Однако нелегальное использование в качестве рекреационного психостимулятора началось менее 10 лет назад в Японии, США и некоторых странах Европы.

MDPV впервые был обнаружен в 2006 г в Японии, в 2007 году в Германии. Первые случаи изъятия из незаконного оборота MDPV в некоторых российских городах пришлось на 2011-2012 гг.

Стоимость 1 грамма смеси составляет в среднем 2500 рублей, цена за количество ПАВ для однократного приема составляет от 90 до 200 рублей, что свидетельствует о его экономической доступности для злоупотребления по сравнению, например, с кокаином [9].

Для передачи наркотического средства непосредственно потребителю широко используются бесконтактные способы передачи через Интернет-ресурсы, в основном посредством мобильных приложений для мгновенного обмена сообщениями, так называемые «мессенджеры» (WhatsApp, Viber, Skype, Telegram). Чаще всего это происходит с использованием «закладок» – мест, где можно безопасно и незаметно спрятать наркотическое средство, чтобы потом его смог забрать покупатель, без передачи «из рук в руки» [27, 28].

В Соединенных Штатах Америки (США) мефедрон, метилон и MDPV на время были определены как контролируемые вещества и внесены в Список I в октябре 2011 г. Менее через год мефедрон и MDPV были включены в него уже на постоянной основе; метилон появился в Списке I контролируемых веществ США в 2013 [49, 86].

Во Франции в июле 2012 года Агентство национального комитета по контролю над наркотиками (ANSM) признало синтетические катиноны (и их производные) незаконными веществами в пределах своей страны [55].

В Российской Федерации Постановлением Правительства РФ № 112 от 25.02.2011 г. в отношении MDPV внесены изменения в Постановление Правительства Российской Федерации № 681 от 30.06.1998 г. «Об утверждении

перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации», которые запрещают оборот данного наркотического средства на территории страны, запрещен также оборот α -PVP, который не вынесен самостоятельной позицией, а относится к производным N-метилэфедрона вышеуказанного перечня [2]. Такая форма контроля как отнесение к позиции списка перечня используется для всех вновь выявляемых производных или аналогов дизайнерских наркотиков.

1.1.2 Активные фармацевтические субстанции среди катинонов (амфепрамон и бупропион)

Среди катинонов выделяют три соединения, обладающих фармацевтической активностью – амфепрамон, бупропион и пировалерон [59].

Амфепрамон – анорексигенное лекарственное средство, используемое для подавления аппетита (в виде гидрохлорида), по анатомо-терапевтической химической классификация (АТХ) амфепрамон входит в группу «A08 Препараты для лечения ожирения (исключая диетические продукты)», код A08AA03. Структурная формула амфепрамона представлена на рисунке 3.

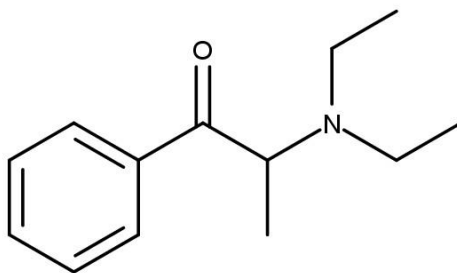


Рисунок 3 – Структурная формула амфепрамона

Амфепрамон оказывает психостимулирующее действие, возбуждает центр насыщения и угнетает центр голода. Стимулирует кору больших полушарий головного мозга, практически не обладает периферическим адреностимулирующим эффектом. Ускоряет обмен веществ (в незначительной степени). При ожирении способствует снижению массы тела. Терапевтическое действие развивается через 30-60 мин, длительность действия – 8 ч [26].

В США [96] и Канаде [44] амфепрамон (диэтилпропион) входит в список IV контролируемых субстанций, при этом в США амфепрамон является рецептурным препаратом. В Великобритании этот препарат относится к классу C [47].

В Российской Федерации амфепрамон входит в Список II (группа психотропных веществ) Перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации [2].

Единственным разрешенным к клиническому применению катиноном в Европе и США является бупропион [85, 88]. Структурная формула бупропиона представлена на рисунке 4.

Бупропион – атипичный антидепрессант, доказавший свою эффективность и при лечении никотиновой зависимости. Основным фармакологическим действием является селективное ингибирование обратного захвата норадреналина и дофамина [95]. Также он действует как антагонист никотиновых ацетилхолиновых рецепторов [92]. По АТХ бупропион входит в группу «N06A Антидепрессанты», код N06AX12.

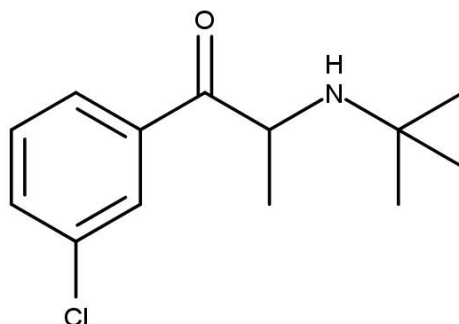


Рисунок 4 – Структурная формула бупропиона

Американским Управлением по контролю качества продуктов и лекарств (FDA) было изложено требование о том, чтобы на упаковке антидепрессантов, включающих бупропион, было помещено предупреждение в чёрной рамке (англ. black box warning) о том, что препарат может вызвать суицидальные наклонности у пациентов моложе 25 лет. Такое предупреждение основано на масштабном статистическом анализе, сделанном FDA, в котором обнаружено двукратное повышение суицидальных наклонностей у детей и подростков и полуторакратное – у молодых людей 18–24 лет [76].

В Российской Федерации до недавнего времени было зарегистрировано одно лекарственное средство с действующим веществом бупропион – Веллбутрин. Однако 22 августа 2016 года бупропион был исключен из государственного реестра лекарственных средств и не может продаваться в настоящее время как лекарственное средство в аптечной сети [12]; в США отпускается строго по рецепту.

1.2 Альфа-пирролидинопентиофенон и 3,4-метилendioксипировалерон–токсикологически значимые синтетические производные катинона

1.2.1 Физико-химические свойства

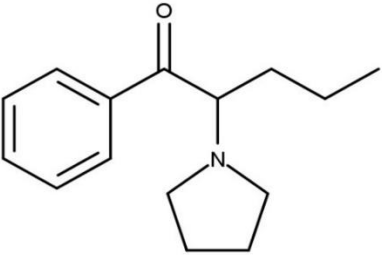
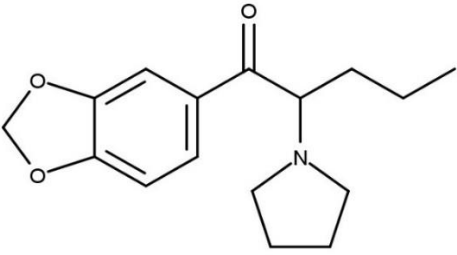
MDPV и α -PVP представляют собой хиральные молекулы, каждая из которых имеет два энантиомера. Хиральный атом углерода (хиральный центр) в молекулах связан с пирролидином. Третичный гетероциклический атом азота обуславливает основные свойства соединений. Исходя из значений рКа (табл. 2), можно сделать предположение, что MDPV и α -PVP будут изолироваться из биологических жидкостей при щелочных значениях pH. В дальнейшем данная гипотеза была подтверждена экспериментально.

1.2.2 Фармакодинамика и клинические эффекты

В литературных источниках действие синтетических катинонов на организм животных и человека описывается двумя механизмами (возможна также и их комбинация) – ингибирование механизмов обратного захвата и транспорта моноаминов с последующим усилением их выброса. Это позволяет сравнивать катиноны с «классическими» психостимуляторами.

Однако синтетические катиноны являются более мощными ингибиторами обратного захвата норадреналина, но в случаях с ингибированием обратного захвата дофамина и серотонина замечена разница, что объясняет различия в клинических проявлениях и их токсических эффектах [35, 56, 79, 88].

Таблица 2 – Физико-химические характеристики α -PVP и MDPV [18]

Название	α -PVP	MDPV
	Альфа-пирролидинопентиофенон (1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	3,4-метилендиоксипировалерон (1-(бензо-[d][1,3]диоксол-5-ил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он
Молекулярная масса	231,3 г/моль	275,3 г/моль
Брутто-формула	C ₁₅ H ₂₁ NO	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃
Структурная формула		
Внешний вид	В виде гидрохлорида представляет собой порошок белого цвета, в зависимости от степени очистки цвет может доходить до розового.	Порошок от белого до светло-коричного цвета.
Наименования, под которыми известны потребителям	«Flakka» (флакка), «Crystal love», «Gravel», «Pure NRG», «Vanilla sky», «Snow Blow».	«MTV», «MDPK», «Magic», «Super Coke» и «Peevee» «Cloud 9», «Ivory Wave», «Ocean», «Charge Plus», «White Lightning», «Scarface», «Hurricane Charlie», «Red Dove», «White Dove», «PV1» [50]. В России распространённым названием стало «СК (эс-ка)» и «Крисы».
Количество на однократный прием	10–400 мг	5–20 мг
T _{max}	30–90 мин [71]	15–30 мин [53]
t _{1/2}	22 ч	1,5 ч
LogP	3,4	2,7
pK _a	7,89	8,4 [84]

В одной всеобъемлющей статье сообщается о серии экспериментов *in vitro* и *in vivo*, исследующих механизмы действия MDPV в сравнении с другими стимуляторами, такими как кокаин, амфетамин, мефедрон и метилон [37].

В первых опытах, представленных в этой статье, были исследования *in vitro* с использованием синапсом крысиного мозга. Была оценена транспортная

активность у переносчиков дофамина (DAT), транспортеров норэпинефрина (норадреналина, NET) и серотонина (SERT), а MDPV сравнивали с кокаином, амфетамином, метилоном и мефедроном. Было показано, что MDPV является мощным блокатором DAT и NET, с более слабыми эффектами на SERT. MDPV, как и амфетамин, более селективен при ингибировании поглощения катехоламинов по отношению к DAT и NET, чем к SERT (табл. 3).

В настоящее время считают, что MDPV и α -PVP действуют в первую очередь как селективные (избирательные) транспортные блокаторы обратного захвата дофамина и норадреналина (без их высвобождения), в то время как они не действует как субстрат. 3,4-метилendioксигруппа MDPV, отсутствующая в α -PVP, влияет на ингибирование обратного захвата серотонина, воздействуя на SERT [37, 62].

Marusich et al. [79] в своем исследовании показали, что уменьшение длины углеводородной цепи синтетических катинонов приводила к снижению активности DAT и NET (табл. 4).

Таблица 3 – Эффекты пирролидинофенонов на ингибирование синоптосомальных транспортеров моноаминов [79]

IC ₅₀			
	DAT	NET	SERT
MDPV	4,1	25,9	3,305
α -PVP	12,8	14,2	>10,000
α -PBP	63,3	91,5	>10,000
α -PPP	196,7	444,7	>10,000

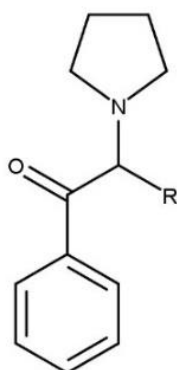
Примечание. DAT – транспортер дофамина, NET – норадреналина, SERT – серотонина, α -PBP – альфа-пирролидинобутиофенон, α -PPP – альфа-пирролидинопропиофенон, IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования, нМ

Основными фармакологическими эффектами синтетических катинонов являются: усиление произвольного внимания, эмпатия, эйфория, стремление к общению, ускорение темпа речи, усиление чувственного восприятия, сенсорная гиперacusия, снижение аппетита, повышение либидо, усиление моторной активности, повышение выносливости [37, 70, 103]. Максимальный

фармакологический эффект продолжается 30-45 минут, достигая $C_{\max}$ через 1,5 часа после приёма.

Результаты исследования Gannon В.М. обеспечивают доказательство того, что оба энантиомера MDPV и α -PVP фармакологически активные [60].

Таблица 4 – Влияние длины углеводородной цепи на способность пирролидинофенонов ингибировать синапсомальный захват DAT и SERT [62, 74]



IC50			
	R	NET	SERT
α -PHP	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	11,6	>10,000
α -PVP	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	17,5	>10,000
α -PBP	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	63,3	>10,000
α -PPP	$-\text{CH}_3$	196,7	>10,000

Примечание. R–радикал, NET – транспортер норадреналина, SERT – транспортер серотонина, α -PBP – альфа-пирролидинобутиофенон, α -PPP – альфа-пирролидинопропиофенон, α -PHP – альфа-пирролидиногексофенон, IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования, нМ

Основные эффекты исчезают примерно через 4 часа, общий эффект длится более 6-8 часов [71]. Вероятность отрицательных побочных эффектов увеличивается с более высокими дозами – спазм мышц челюсти, скрежет зубами (бруксизм), нарушение сна, непроизвольные движения тела, путаница в мыслях, желудочно-кишечные расстройства, мышечное напряжение, непроизвольные колебательные движения глаз высокой частоты (нистагм), тревога, нервозность, паранойя, очень высокий сердечный ритм, галлюцинации (при высоких дозах или при повторном использовании).

1.2.3 Фармакокинетика исследуемых объектов

Синтетические катиноны употребляют перорально в виде таблеток, порошок используют для интраназального употребления и для приготовления раствора для дальнейшего парентерального введения. Порошок втирают в десны, применяют ингаляции и используют ректальный путь введения. Некоторые синтетические катиноны представляют собой искусственно окрашенные кристаллические порошки (мимикрия под соли для ванн), при растворении которых образуются растворы яркого цвета (остатки ярко-голубого раствора обнаруживают в шприцах после инъекций).

За последние пару лет отмечается рост так называемых «нестандартных» форм потребления синтетических катинонов. Интраназальное употребление с помощью ключей от дверных замков носит название «кодирование», глотание порошка, завернутого в сигаретную бумагу – «бомбежка». Встречаются случаи интравагинального введения порошка с помощью марлевых тампонов. Как следует из самоотчетов пользователей, подобные способы употребления оказывают быстрый эффект и пролонгированное действие [48]. В литературе стали появляться сообщения о потреблении синтетических катинонов также в виде глазных капель [67].

В последнее время потребители синтетических катинонов все чаще используют различные сочетания с другими наркотическими средствами и (или) лекарственными препаратами, употребляя последние с немедицинскими целями. В Российской Федерации и Украине синтетические катиноны употребляют совместно с транквилизаторами бензодиазепинового ряда, барбитуратами, прегабалином; во Франции – прегабалином/оксибутиратом, кокаином; в Великобритании чаще всего с метамфетамином, в Германии совместно с силденафилом (виагра) для повышения сексуальной потенции и усиления ощущений во время сексуальных контактов.

Опросы среди молодых людей сообщают о том, что синтетические катиноны часто используются в ночных клубах с целью длительного нахождения в движении во время танцев, а также по коммуникативным причинам [42]. В таблице 5

приведены данные о необходимом количестве MDPV на однократный приём (по сообщениям от потребителей новых ПАВ) [56].

Авторы работы [31] провели анализ ряда судебных случаев и обнаружили концентрации α -PVP в крови в диапазоне от 1 до 98 нг/мл (при несмертельных интоксикациях). Концентрация в случаях с летальными исходами составила от 1 до 6200 нг/мл.

Таблица 5 – Количество MDPV на однократный приём

	Инсуффляция	Пероральный приём	Ректальное введение
Порог	1–3 мг	2–6 мг	1–5 мг
Легкий эффект	2–5 мг	4–10 мг	3–8 мг
Средний эффект	5–11 мг	8–15 мг	6–12 мг
Сильный эффект	10–20 мг	12–25 мг	10–25 мг

В работе Namera A. и соавторов показано изменение концентрации α -PVP в моче пациента в течение 1 месяца. Концентрация α -PVP в образце, собранном по меньшей мере через 32 ч после последней инъекции, составляла 1,2 мкг/мл и постепенно снижалась день ото дня, и после 10 дней концентрация препарата была ниже предела обнаружения. Используя данные, полученные в течение первых 5 дней после инъекции, период полувыведения из мочи был рассчитан как 22 ч для данного соединения [82].

Метаболиты MDPV, обнаруженные в моче человека, описаны и подтверждены в ряде исследований. Так, например, анализ экстрактов мочи, проведенный Grapp M. и соавторами [65], подтвердили содержание в пробах исходного соединения и основного метаболита – 2-оксо-MDPV, а также содержание иных метаболитов (рис. 5).

Meyer M.R. с коллегами провели *in vitro* исследование, в котором показано участие конкретных печеночных ферментов системы CYP 450 в способности катализировать реакцию деметилирования MDPV и образовывать исходный

метаболит – деметиленил-MDPV. Было сделано заявление, что такими ферментами являются CYP 2C19, CYP 2D6 и CYP 1A2 [80].

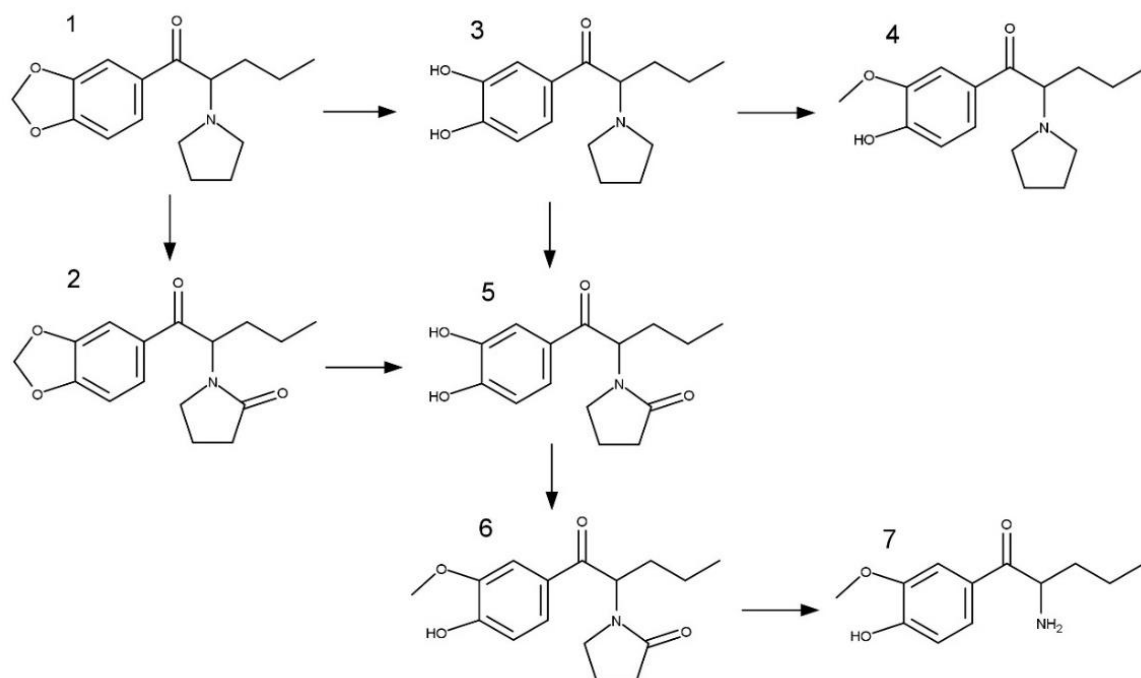


Рисунок 5 – Схема образования основных метаболитов MDPV в организме человека (названия соединений автором сохранены): 1 – MDPV, 2 – 2-оксо-MDPV, 3 – деметиленил-MDPV, 4 – деметиленил-метил-MDPV, 5 – деметиленил-оксо-MDPV, 6 – деметиленил-метил-оксо-MDPV, 7 – деметиленил-метил-N,N-деалкил-MDPV

Метаболизм α -PVP исследован *in vitro* с использованием микросом печени человека и *in vivo* с использованием крыс [83, 90]. Основные метаболиты α -PVP были идентифицированы и в образцах мочи его потребителей [97]. При исследованиях были выявлены два основных метаболита α -PVP (рис. 6):

- 1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-ол (ОН- α -PVP);
- 1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он (2-оксо- α -PVP).

Второй метаболит образуется предположительно через промежуточный метаболит 2-(2-гидрокси-1-фенилпентан-1-ил)пирролидин-1-он (2-ОН- α -PVP) [86, 102]. Реакция деалкилирования пирролидинового кольца до первичного амина – это общий метаболический путь для многих α -пирролидинофенонов, например, для MDPV и α -PVP [66].

Основными направлениями I фазы метаболизма α -PVP принято считать следующие:

- окисление пирролидинового кольца с образованием лактама;
- восстановление кетонной группы до спиртовой;
- раскрытие лактама;
- деалкилирование пирролидинового кольца с образованием первичного амина;
- окисление фенольного фрагмента молекулы;
- окисление алкильной цепи.

Высокая липофильность α -PVP определяет направление и интенсивность его биотрансформации в организме. Однако пути метаболизма α -PVP у крыс и у человека различаются. Поэтому в качестве маркеров употребления α -PVP следует лучше выбирать 3–4 метаболита для предоставления возможности более надежного обнаружения фактов употребления α -PVP у людей с различным типом метаболизма и в разные периоды времени, прошедшего после употребления α -PVP.

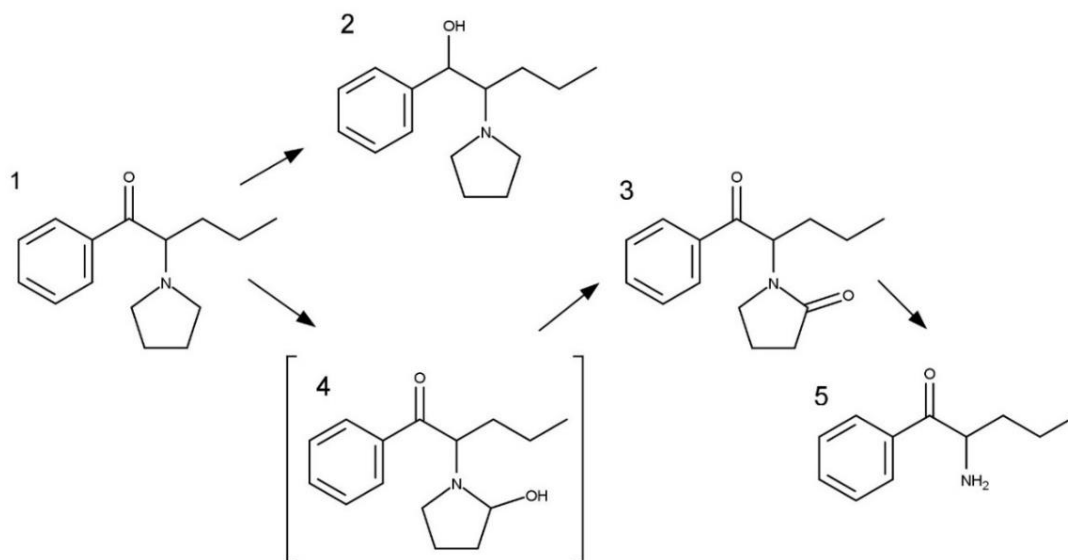


Рисунок 6 – Схема образования основных метаболитов α -PVP в организме человека (названия соединений автором сохранены): 1 – α -PVP, 2 – гидроксид- α -PVP, 3 – 2-оксо- α -PVP, 4 – 2-гидроксид- α -PVP, 5 – N, N-деалкил- α -PVP

Метаболиты, имеющие гидроксильные и карбоксильные группы, выводятся в большинстве своем в виде глюкуронидов и сульфатов [18].

Кроме основных метаболитов при частом употреблении больших доз α -PVP в моче идентифицируются метаболиты, некоторые из которых совпадают с метаболитами MDPV (рис. 7).

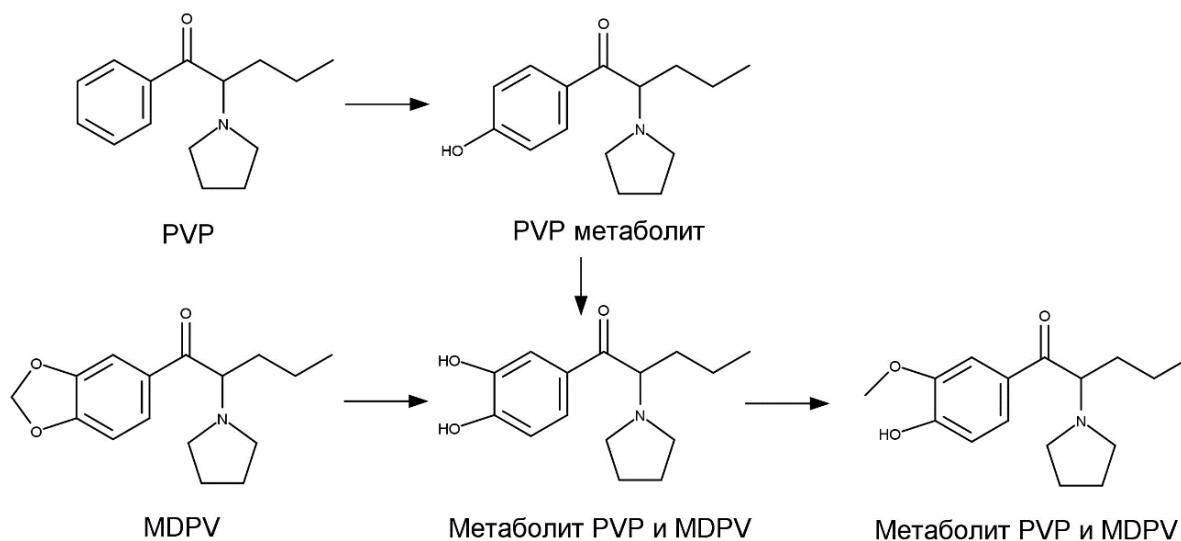


Рисунок 7 – Процессы образования общих метаболитов α -PVP и MDPV

Автоматическая идентификация некоторых метаболитов MDPV при наличии в пробе метаболитов α -PVP не доказывает факта совместного приема. Для доказательства приема MDPV (наряду с приемом α -PVP) на хроматограммах следует идентифицировать метаболиты, имеющие метилendioкси-фрагмент, так как данные метаболиты не могут образоваться в результате биотрансформации α -PVP. Следует также учитывать тот факт, что для α -PVP метаболиты, гидроксированные по фенольному кольцу, как правило, минорные, а в моче потребителей MDPV пики таких метаболитов, имеют значительную интенсивность.

Наличие метилendioкси-фрагмента в молекуле MDPV существенно изменяет направление основных путей метаболизма по сравнению с рассмотренным ранее соединением. Помимо окисления пирролидинового кольца, характерного для биотрансформации α -PVP, наблюдается интенсивный процесс деалкилирования метилendioкси-фрагмента с последующим метилированием одного из образовавшихся гидроксильных групп.

Относительно короткий период полувыведения MDPV (77,8–97,9 минут) объясняет, почему через 8 часов после дозирования MDPV присутствует на низком уровне концентрации, эквивалентный 1% от $C_{\max}$, а метаболиты по метилendioкси-фрагменту можно идентифицировать ВЭЖХ-МС/МС через 8 часов в концентрации примерно 40% от их $C_{\max}$ [34]. Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболиты MDPV присутствуют намного дольше, чем нативный MDPV в системном кровообращении; эти результаты показывают, что направленный анализ метаболитов может быть более информативным, чем направленный анализ MDPV в связи с расширением окна обнаружения

Обнаруживаются также метаболиты, деалкилированные по пирролидиновому кольцу и окисленные по алкильной цепи. Как и в случае с α -PVP, в экспертных образцах мочи потребителей MDPV идентифицированы метаболиты с восстановленной до спирта кетонной группой. Важно отметить, что при анализе образцов мочи (при высоких дозах употребления) на хроматограмме часто обнаруживается интенсивный пик нативного соединения.

Основными метаболитами MDPV в моче при скрининге мочи с использованием метода ГХ-МС принято считать соединения на рисунке 8.

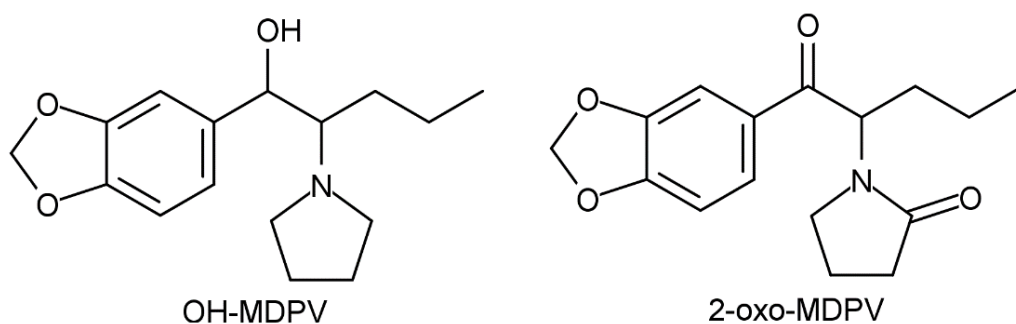


Рисунок 8 – Основные маркеры MDPV в моче

Для идентификации большего количества метаболитов необходим ферментативный или гидролиз в кислых условиях [18].

1.2.4 Токсикологическая характеристика α -PVP и MDPV

Первые случаи злоупотребления синтетическими катинонами (мефедрон) стали известны в 2007–2008 гг. в ряде европейских стран. Данные исследований о механизмах токсичности и действия синтетических катинонов на организм человека разрозненны и немногочисленны.

Интересен тот факт, что среди начинающих потребителей синтетических катинонов наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью является ажитация.

Среди соматических осложнений, связанных с употреблением синтетических катинонов, при возникновении которых наиболее часто обращаются за медицинской помощью, выделяют кардиологические, неврологические и психиатрические осложнения [102].

Wright T. и Harris C. [105] в своей работе описывают ряд случаев употребления синтетических катинонов водителями транспортных средств. Согласно данным лаборатории судебной химии Западной Виргинии, у 18 водителей в пробах крови концентрация α -PVP составляла 5–90 нг/мл. (средняя концентрация – 30 нг/мл). В некоторых пробах были обнаружены комбинации синтетического катинона с оксикодоном, диазепамом, оксазепамом, тетрагидроканнабинолом, амфетамином. У трех погибших лиц концентрации α -PVP варьируются от 30 до 20000 нг/мл, в двух из трех смертельных случаев установлено рекреационное употребление «соли для ванн».

Имеются данные после проведения количественного анализа уровня MDPV в сыворотке крови. Результат составил в диапазоне от 4 нг/мл до 576 нг/мл (среднее значение 118 нг/мл) [65].

Это соответствует предыдущим отчетам Spiller et al. [93] об уровнях MDPV в образцах сыворотки крови, при анализе 13 случаев интоксикаций с несмертельным исходом (24–241 нг/мл со средним значением 58 нг/мл). В сообщении из Швеции говорится о серии наблюдений концентраций MDPV в сыворотке крови от 1 нг/мл до 1509 нг/мл (в среднем 63,6 нг/мл) [38].

В случае смерти, концентрации MDPV составили 82 нг/мл в сыворотке крови

и 39 нг/мл в цельной крови [81], в другом случае 130 нг/мл и 46 нг/мл, соответственно [77]. В периферической крови при смертельном отравлении концентрация MDPV составила 1000 нг/мл [106].

Гарр М. и соавторы [65] утверждают, что самая высокая концентрация MDPV, измеренная в их исследовании, была 576 нг/мл, которая в комбинации с фентанилом и героином способствовала наступлению смерти.

Другие смертельные случаи интоксикации MDPV были описаны Wright T. H. и др. [104]: случай 1 – бедренная кровь (39 нг/мл); случай 2 – бедренная кровь (130 нг/мл); диапазон концентраций в крови составил 0,13–1630 нг/мл (среднее значение – 108 нг/мл) [57]. Почти во всех случаях, описанных в публикациях выше, помимо MDPV, были обнаружены другие ПАВ.

В смертельных случаях, в которых достоверно установлен α -PVP, концентрация в крови составила 174–486 нг/мл у трех умерших лиц [68, 87, 89].

MDPV имеет равномерное распределение в тканях [78], хотя в органах, ответственных за детоксикацию и экскрецию (почки, печень и желчь), были обнаружены более высокие концентрации MDPV [106].

В литературных источниках имеются данные посмертного распределения синтетических катинонов в органах и тканях умерших лиц. Так, например, Sawtse и др. указывает в своей работе концентрации MDPV в трупном материале женщины (21 год): сердечная кровь (470 нг/мл), печень (530 нг/г), почки (490 нг/г) и желчь (580 нг/мл) [46].

Wyman J. и соавторы [106] сообщают в своей работе уровни концентраций MDPV в биологических образцах от умершего 39-летнего мужчины (бедренная кровь – 440 нг/мл, сердечная кровь – 500 нг/мл, желчь – 880 нг/мл, легкие – 600 нг/г, почки – 840 нг/г, печень – 980 нг/г и мышцы – 560 нг/г) [75].

Strange L. и соавторы провели исследование на мышах с целью оценить тератогенность использования «солей для ванн» во время беременности [94]. Беременным мышам вводили внутривентрально коктейль, содержащий 3 синтетических катинона – метилон (5 мг/кг), мефедрон (10 мг/кг) и исследуемое в данной работе соединение – MDPV (3 мг/кг), растворенных в стерильном

физиологическом растворе. Материнский мозг, материнскую плазму, плаценту и мозг плода собирали через определенные промежутки времени после инъекции. Интересно, что все 3 катиона достигли измеримых концентраций в плаценте, а также в мозге плода; фактически, для MDPV максимальная концентрация ($C_{\max}$) была самой высокой в головном мозге плода, в то время как самое высокое значение $C_{\max}$ для мефедрона было достигнуто в плаценте. Кроме того, суммарное количество всех 3 соединений было выше в матрице плода (плацента и мозг), чем в материнских матрицах (материнский мозг и плазма), а период полувыведения для наркотических средств были дольше.

Стабильность образцов

В ряде экспериментов проводилась оценка влияния концентрации, pH, температуры и самой структуры катиона на стабильность в моче человека. По результатам исследований были сделаны выводы о том, что катионы являются щелочнолабильными и термолабильными соединениями (увеличение скорости деградации с повышением pH и температуры). Катионы были значительно более стабильными в кислой моче (pH 4) при низких температурах. В щелочной моче (pH 8) при 32°C значительные потери (> 20%) наблюдались в течение нескольких часов для большинства соединений из этой группы. Напротив, все аналиты были стабильны в замороженной и охлажденной моче при pH 4.

Катионы, содержащие третичный амин (пирролидиновая группа), были значительно более стабильными, чем их аналоги, содержащие вторичный амин. Метилендиоксигруппа также оказывала значительное стабилизирующее действие как на третичные, так и на вторичные амины.

Стабильность синтетических катионов при pH 8 варьировалась от 9 ч (3-фторметкатион) до 4,3 месяцев (MDPV), тем самым демонстрируя зависимость стабильности аналита от его структуры. Главный стабилизирующий эффект оказывают пирролидиновое кольцо и метилендиокси-группа, для сравнения α -PVP был стабилен в течение 1,3 месяца при pH 8 [63, 64].

Johnson и Botch-Jones [69] показали, что MDPV будет стабилен в крови при комнатной температуре, +4°C и -20°C до 14 дней.

Оптимальные условия хранения – это хранения пробы с фторидом натрия/оксалатом калия при температуре -20°C [43].

MDPV и его метаболиты стабильны в плазме крови при комнатной температуре (24 часа), 4°C (72 часа), и после трех циклов замораживания-оттаивания [52].

Проверена стабильность мочи, содержащей катиноны, в течение 3 месяцев при температуре -20°C ; большинство катинонов были стабильны (78,3–106%) за исключением буфедрона, 4-FMC и пентилонна (36,3–62,1%) [33].

Эти результаты подчеркивают необходимость соблюдения надлежащих условий при хранении и транспортировке биообъектов с целью сохранности аналитов.

1.3 Методы химико-токсикологических исследований

Отличительной особенностью химико-токсикологического анализа (ХТА) является определение экзогенных веществ в объектах, представляющих собой сложные многокомпонентные биоматрицы. В основе методологии анализа на содержание ПАВ положен метод скрининга, используемый при ненаправленном анализе. При направленном анализе, как правило, применяются частные методики определения аналитов.

Выбор аналитических методов для скрининга определяется, в первую очередь, целью анализа – минимизировать количество отрицательных и получить максимальное количество положительных результатов, и связан с такими важными параметрами исследования, как чувствительность и специфичность.

Основными документами, регламентирующими деятельность врачей химико-токсикологических лабораторий при выполнении химико-токсикологических исследований в Российской Федерации, являются два ведомственных приказа:

- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека

алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» от 27 января 2006 года № 40) [3].

- Приказ Министерства здравоохранения «О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)» от 18 декабря 2015 г. № 933н (далее Приказ Минздрава России от 18.12.2015 № 933н) [4].

В соответствии с вышеуказанными нормативными документами для обнаружения наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов применяется научно обоснованная и принятая в мировой практике схема лабораторных исследований, выполняемых в две стадии. На первой стадии применяются методы иммунохимического анализа, позволяющие выявлять образцы биологического материала, в которых предполагается наличие контролируемых веществ или их метаболитов (маркеров потребления наркотических средств и психотропных веществ). Результаты, полученные на первой стадии анализа, имеют доказательное значение только при отсутствии целевых токсикантов и их метаболитов в пробе. Доказывание наличия наркотических средств, психотропных, сильнодействующих веществ и их метаболитов (или их отсутствие) осуществляется на второй стадии анализа, на которой исследуются образцы, имеющие положительный результат, полученный на первой стадии. Для этого применяются методы газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС). Для идентификации наличия целевых аналитов в биологическом материале используются также специализированные библиотеки масс-спектров, входящие в состав программного обеспечения, указанных аналитических комплексов.

В таблице 6 приведена сравнительная оценка иммунохимических и хроматографических методов исследования.

В качестве основных скрининговых методов анализа при проведении ХТИ применяются иммунохимические методы, а в качестве подтверждающих методов исследования используются ВЭЖХ/МС-МС, ГХ-МС.

Подтверждающие методы должны быть выше или равными по чувствительности, чтобы уменьшить количество ложноотрицательных результатов, но обязательно должны быть выше по специфичности, для того чтобы снизить количество ложноположительных результатов [30].

Таблица 6 – Сравнительная оценка методов анализа

Преимущества	Недостатки
Иммунохимические методы	
1. Объективность результатов. 2. Хорошая чувствительность. 3. Полуколичественная оценка. 4. Простота выполнения. 5. Умеренная стоимость реагентов. 6. Быстрота анализа.	1. Перекрестно реагирующие вещества могут дать ложноположительный результат. 2. Групповой метод не различает индивидуальных соединений внутри группы.
Хроматографические методы	
1. Хорошая чувствительность. 2. Высокая специфичность. 3. Количественное определение.	1. Требуется высококвалифицированный персонал. 2. Относительная длительность анализа. 3. Иногда зависит от субъективной интерпретации результатов.

1.3.1 Иммунохроматографический метод анализа на этапе скрининга

Иммунохроматографический анализ (ИХА) как скрининговый метод получил широкое применение в различных областях медицины и народного хозяйства (медицинская диагностика, терапевтический мониторинг, банки крови и плазмы, судебная медицина, экологический мониторинг, продукты питания, сельское хозяйство, самодиагностика и др).

Тест-полоски для ИХА являются чрезвычайно удобными и простыми в использовании, однако они имеют сложное строение и процесс разработки каждого вида ИХА является чрезвычайно трудоемким и высокотехнологичным.

ИХА является самым распространенным методом скрининга при выявлении ПАВ и заслуживает пристального внимания. Преимущества метода:

- быстрота и легкость в использовании;
- малые объемы образца, отсутствие пробоподготовки;

- дешевизна для производителя и потребителя;
- возможность производства тестов в больших объемах;
- простота чтения и интерпретации результата;
- высокая чувствительность и воспроизводимость;
- возможность количественного определения в ряде анализов;
- возможность использования портативных ридеров;
- возможность мультианализа.

ИХА-тест (иммунохроматографическая полоска) включает в своем составе следующие основные элементы: пластиковая подложка, на которую наклеены все остальные компоненты теста, фильтра (прокладки для образца), мембрана с конъюгатом, хроматографическая мембрана, содержащая одну или несколько зон захвата иммунных комплексов и контрольную зону захвата, впитывающая прокладка (абсорбирующая мембрана) (рис. 9). Часто, особенно в случаях, когда недоступны большие количества биообразца для анализа, например, для определения наркотических веществ в слюне, тест-полоска может быть закреплена в пластиковом корпусе, у которого имеются приемное и тестовые «окна». При анализе на несколько групп ПАВ одновременно, для удобства применяют мульти-кассеты, в корпус которых помещены сразу несколько тест-полосок.



Рисунок 9 – Схематическое изображение иммунохроматографической тест-полоски

ИХА основан на принципе тонкослойной хроматографии и специфической реакции антиген-антитело. Антитела (иммуноглобулины) являются относительно крупными (~150 кДа – IgG) гликопротеинами, продуцируемые В-лимфоцитами (плазматическими клетками) и имеющими сложное строение. Состоят из двух

идентичных тяжёлых (H-цепи) из двух идентичных лёгких (L-цепей) полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью. Эти цепи имеют константные (C) и переменные (V) участки. К тяжёлым цепям ковалентно присоединены олигосахариды. При помощи протеазы папаина антитела можно расщепить на два Fab-фрагмента (англ. fragment antigen binding – антигенсвязывающий фрагмент) и один Fc-фрагмент (англ. fragment crystallizable – фрагмент, способный к кристаллизации). По типу тяжелой цепи различают 5 классов иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Общий план строения антител (иммуноглобулинов) представлен на рисунке 10.

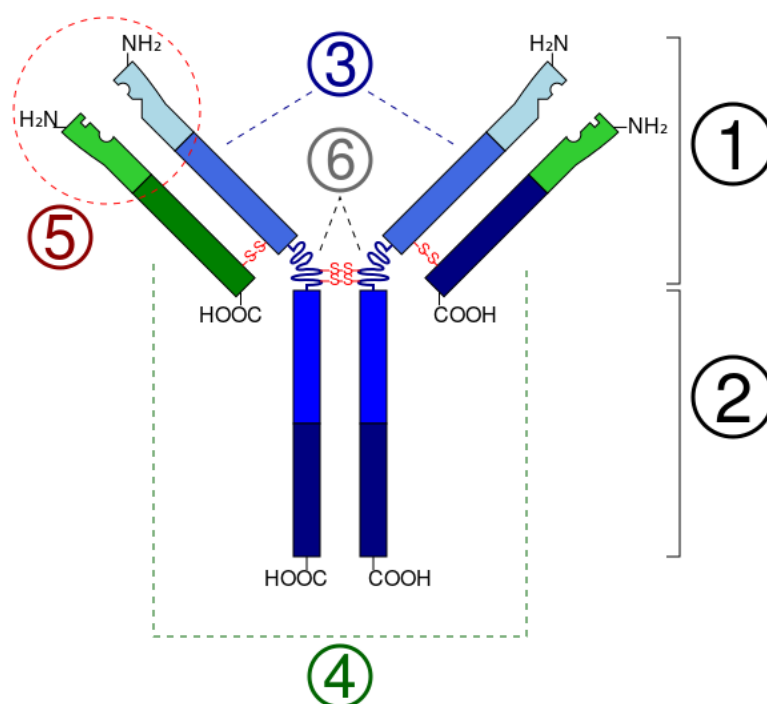


Рисунок 10 – Общий план строения иммуноглобулинов: 1) Fab-фрагмент; 2) Fc-фрагмент; 3) тяжёлая цепь; 4) лёгкая цепь; 5) антиген-связывающийся участок; 6) шарнирный участок

Антитела распознают не отдельные химические группы, а пространственную форму антигенов. Было установлено, что каркасные участки Fab-фрагмента молекул антител, обычно не принимающие участие в связывании антигена, имеют существенное значение для укладки домена, которая обеспечивает адекватную конформацию (комплементарность) антиген-связывающего центра антитела (паратоп) с антигенной детерминантой (эпитопом). Домены антител –

компактные структуры, скрепленные дисульфидной связью. А множество нековалентных связей с антигеном образуют отдельные аминокислотные остатки гипервариабельных участков, сосредоточенных на концах Fab-ветвей [23]. Fc-фрагмент может связывать комплемент, взаимодействует с мембранами клеток и участвует, например, в переносе IgG через плаценту.

Активный центр антитела отвечает за распознавание и связывание комплементарного антигена, формируется за счет пространственного взаимодействия VH- и VL-доменов. Специфичность антитела при этом определяется аминокислотным строением полипептидной цепи V-доменов обеих цепей.

Взаимодействие антиген-антитело обратимо и скорость диссоциации комплекса зависит от аффинности (аффинитета) антитела (связь одного антигенсвязывающего центра с индивидуальным эпитопом антигена, т.е. сродство антител к антигенам) и его авидности (прочность связи антитела с антигеном и количество связанного антигена антителами). Реакциям антиген-антитело свойственна высокая специфичность. Однако в некоторых случаях может возникать феномен, называемый перекрестной реактивностью (реагирование). Этот феномен возникает в том случае если антиген А имеет общие эпитопы с антигеном Б, тогда часть антител, специфичных к А, будет реагировать также с Б [13].

Наиболее распространенными методами в ИХА являются прямой (сэндвичный) и непрямой (конкурентный) методы исследования.

В схеме прямого (сэндвичного) ИХА используется конъюгат специфических антител с красящей меткой (в случае визуальной оценки результата), нанесенный на мембрану для конъюгата. На тестовой линии иммобилизованы антитела, специфические к данному анализу, а на контрольной линии – антивидовые антитела, специфические к первичным антителам. При попадании образца, содержащего анализируемое вещество, на мембрану с конъюгатом происходит связывание анализа с конъюгатом Ат-метка. Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он связывается со специфическими антителами, образуя

«сэндвич» Ат-Аг-Ат-метка. Избыток не связавшегося конъюгата связывается с антивидовыми антителами на контрольной линии. Таким образом, выявление 2-х линий на тест-полоске является положительным результатом теста. При отсутствии аналита в образце конъюгат связывается с антивидовыми антителами только на контрольной линии, образуя одну линию на тест-полоске.

Метод прямого ИХА используется для выявления высокомолекулярных соединений – вирусов, в т.ч. ВИЧ; различных гормонов (например, в тестах на беременность), возбудителей инфекционных заболеваний.

Схема сэндвичного ИХА не подходит для определения низкомолекулярных веществ, т.к. для образования сэндвича Ат-Аг-Ат антиген должен иметь, по крайней мере, две антигенные детерминанты (т.е. центра связывания с антителами). Кроме того, из-за стерических затруднений образование такого двойного комплекса с низкомолекулярным антигеном маловероятно. Низкомолекулярные соединения обычно имеют одну антигенную детерминанту и, соответственно, антитела имеют один центр связывания с антигеном, который будет «занят» аналитом в случае присутствия последнего в образце. Поэтому для анализа небольших молекул, в том числе наркотических средств и их метаболитов, используется другая схема – непрямой конкурентный ИХА.

Метод конкурентного ИХА основан на конкуренции аналита и иммобилизованного конъюгата (ковалентно-связанный аналит с белком-носителем) за ограниченное количество центров связывания специфических антител, содержащихся в конъюгате Ат-метка. Образец, содержащий аналит и (или) его метаболиты, движется по пористой мембране тестовой полоски с фронтом жидкости за счет капиллярных сил. При прохождении стартовой линии компоненты вступают в реакцию с конъюгатом Ат-метка, образуя иммунокомплекс «антиген-антитело». Далее иммунокомплекс проходит через тестовую зону (Т), где иммобилизован конъюгат и конкурирующее вещество. Иммунокомплекс не может связаться и вступить в реакцию с этим конъюгатом из-за стерических затруднений. Окрашенная полоса на уровне маркировки Т (тест) не выявляется, что свидетельствует о наличии аналита в пробе (рис. 11). Далее

иммунный комплекс связывают антивидовые антитела, находящиеся в контрольной зоне (К). Появление окрашенной полосы розового цвета в зоне контроля свидетельствует о правильности проведения анализа и правильности работы компонентов полосок.

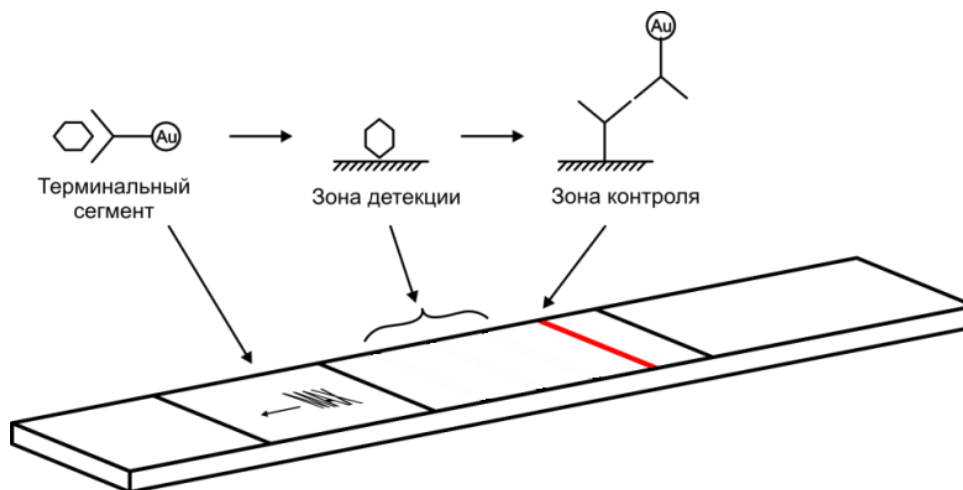


Рисунок 11 – Результат реакции при наличии в образце анализируемого вещества

Когда концентрация ниже порогового уровня или аналит (или его метаболиты) отсутствуют в анализируемом образце мочи, антиген, иммобилизованный в тестовой зоне (конъюгат), вступает в реакцию с антителами, меченными коллоидным золотом (конъюгат Ат-метка), в результате чего выявляется окрашенная полоса на уровне маркировки тестовой зоны. Таким образом, наличие двух окрашенных линий (тестовой и контрольной) является отрицательным результатом исследования. (рис. 12).

Схема оценки результатов ИХА наркотических веществ представлена на рисунке 13. Результат теста является недействительным при отсутствии контрольной линии, т.к. этот факт может свидетельствовать о незавершенной процедуре анализа, либо о том, что иммунохимическая реакция не прошла должным образом по какой-либо причине (из-за испортившихся иммунореагентов или несоблюдения инструкции по применению теста).

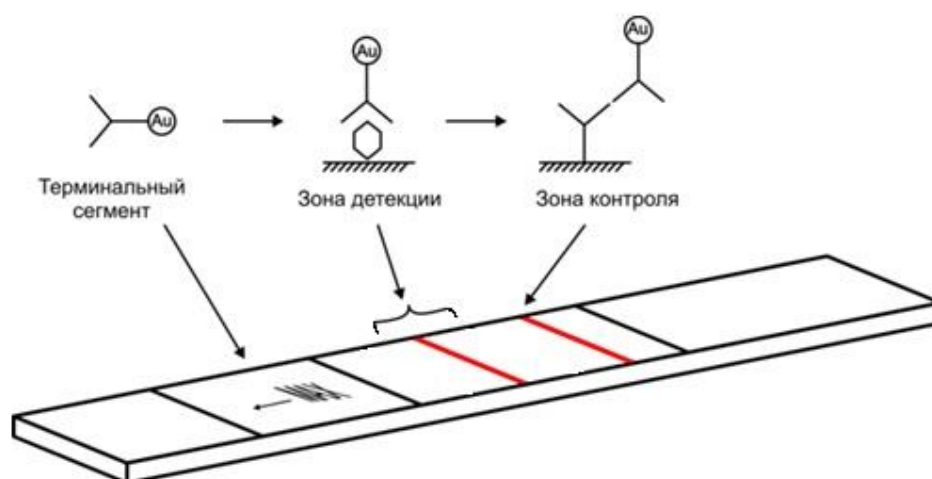


Рисунок 12 – Результат реакции при отсутствии в образце анализируемого вещества

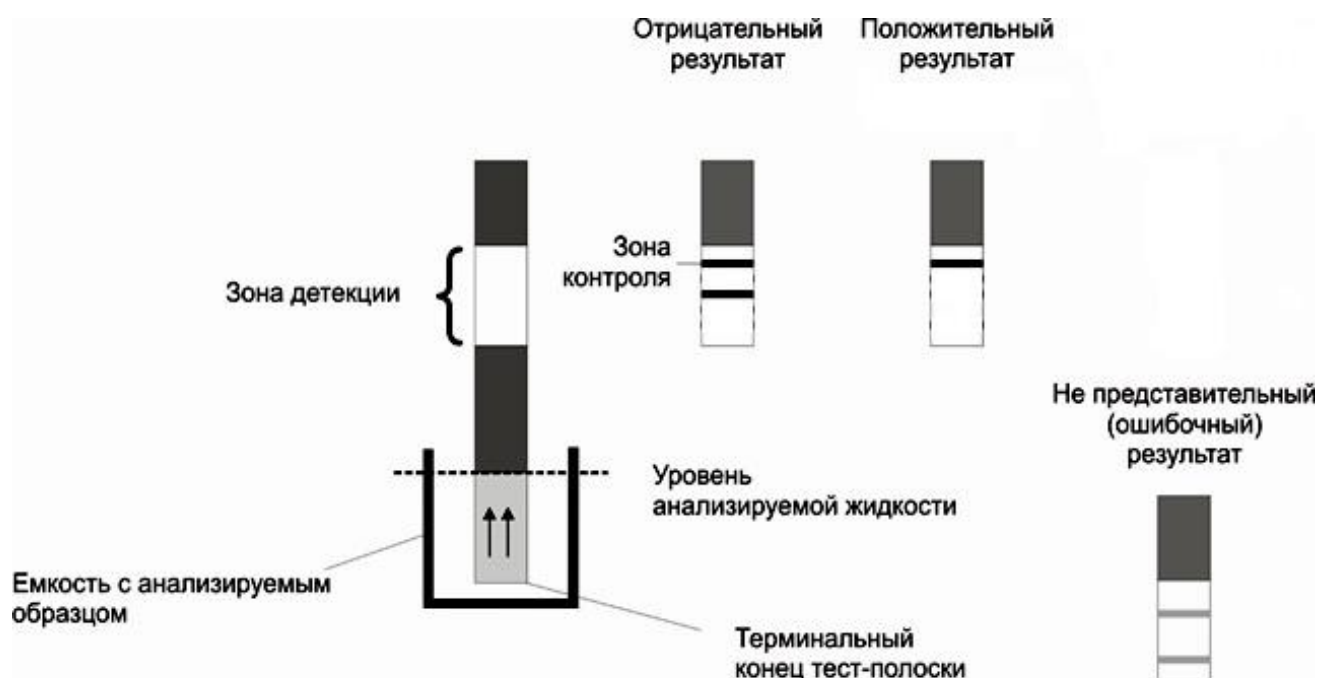


Рисунок 13 – Схема оценки результатов конкурентного метода ИХА

Наиболее часто используемой меткой в ИХА является частицы коллоидного золота диаметром от 5 до 50 нм, которые образуют линии темно-бурого (или темно-розового) цвета [19].

Иммунохроматография не требует дополнительных реагентов в отличие от других методов иммуноанализа, поскольку все необходимые компоненты уже заранее нанесены производителем на мембрану. Контакт абсорбирующей мембраны тест-полоски с образцом инициирует всю последовательность процессов, описанную выше. Возможность в кратчайшие сроки получить

результаты в виде детектируемой качественной «да-нет» информации на этапе скрининга объясняет причину столь интенсивного развития данного направления и коммерческого производства доступных тестов [101].

На сегодняшний день существуют коммерчески доступные цифровые оптические детекторы для иммунохроматографических тестов [107]. Целесообразность использования портативной фотометрической регистрирующей техники при проведении анализов определяется исключением элемента субъективности, позволяет сохранять результаты тестирования в виде первичного документа и (или) обработанных на компьютере данных.

1.3.2 Инструментальные методы анализа подтверждающего этапа ХТИ

Хромато-масс-спектрометрия является основным методом в диагностике потребления наркотических средств, сильнодействующих и психотропных веществ (и/или их метаболитов) в современном ХТА благодаря высокой специфичности метода, позволяющей идентифицировать аналит.

ГХ-МС – комбинированный метод, основанный на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии (возможность селективного разделения веществ) и метода масс-спектрометрии (возможность селективного и чувствительного детектирования и идентификации компонентов). Наиболее информативные результаты получают в режиме полного сканирования с регистрацией масс-спектра. Использование режима мониторинга выбранных ионов позволяет повысить чувствительность определения (на порядок величины).

Методика ГХ-МС анализа при ХТИ основана на идентификации определяемых веществ, выделенных из биологических образцов жидкость/жидкостной или твердофазной экстракцией с последующей дериватизацией (при необходимости) и хромато-масс-спектрометрическим детектированием. Определяемые вещества идентифицируют по двум аналитическим параметрам: время хроматографического удерживания и масс-спектр.

С использованием методики ГХ-МС анализа полная ионная хроматограмма (TIC) и масс-спектр с ионами m/z 126, 84, 121, 149 характерен для MDPV, а

типичные ионы масс-спектра m/z 140, 98 и 206 характерны для 2-оксо-MDPV (рис. 14).

Деграция пирролидинового кольца до первичного амина, по-видимому, является общим метаболическим путем для α -пирролидинофенонов, как это было ранее показано для α -PVP [66].

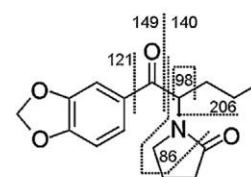
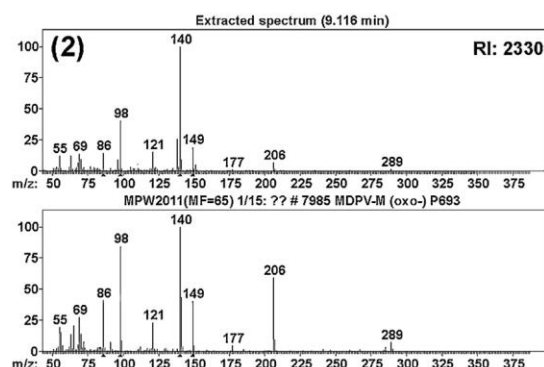
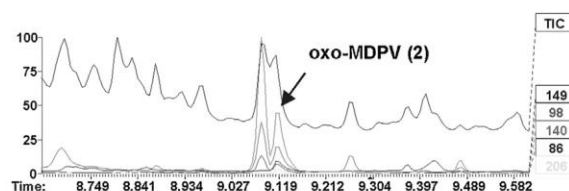
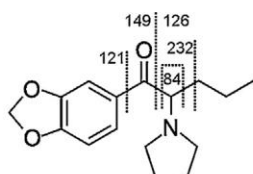
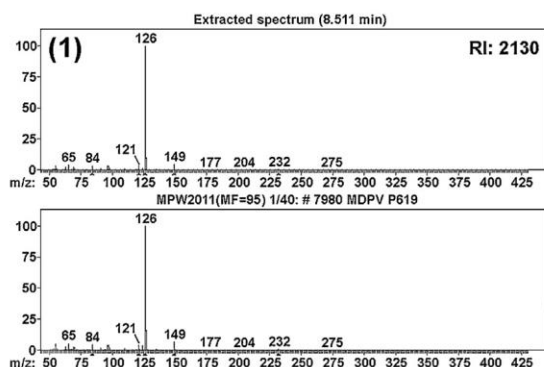
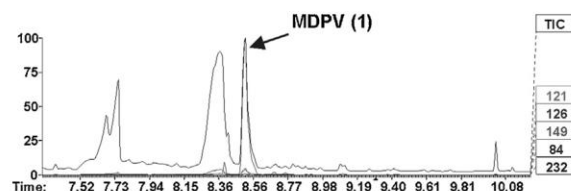
Анализ экстрактов методом полного сканирования ГХ-МС выявил наличие α -PVP и его метаболитов: 2-оксо- α -PVP и ОН- α -PVP.

TIC и ионы масс-спектра m/z 77, 105, 126 и 188 характерны для α -PVP (целевая библиотека MPW 2011).

TIC и типичные ионы масс-спектра m/z 77, 86, 98, 105 и 144 говорят о наличии метаболита 2-оксо- α -PVP (рис. 15).

Описанные процедуры систематического токсикологического анализа (systematic toxicological analysis, STA) ГХ-МС показывают, что масс-спектрометрия с выбранными ионами m/z 126 и 140 указывают на наличие MDPV и его метаболитов. Ион m/z 126 при мониторинге указывает на присутствие компонентов с неизменным кольцом пирролидина, а с m/z 140 для соединений со структурой 2-оксо [65]. Таким образом, среди широко применяемых в химико-токсикологическом анализе методов только масс-спектрометрия позволяет проводить идентификацию вещества в биологическом материале.

A



B

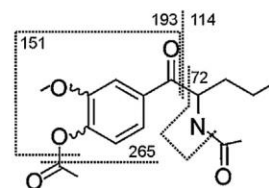
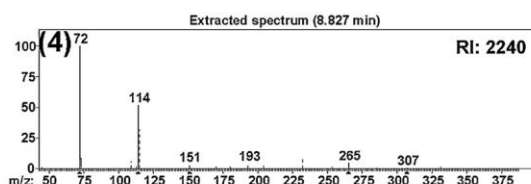
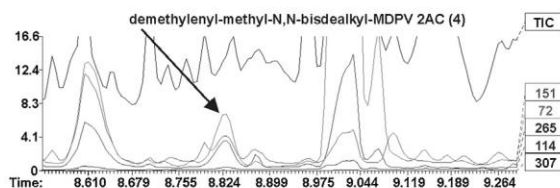
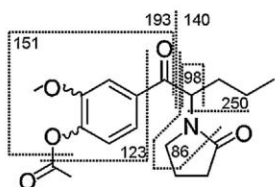
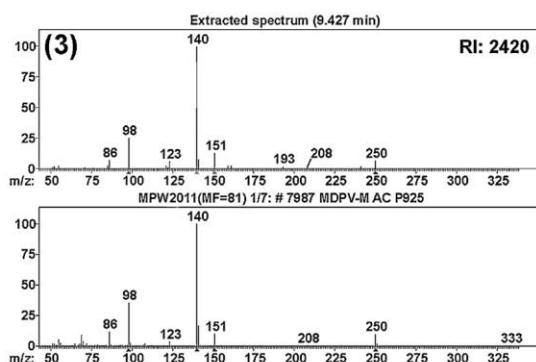
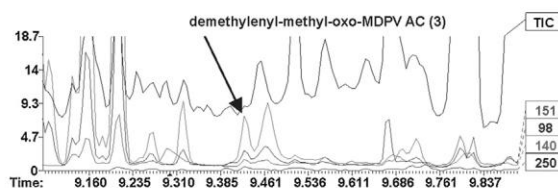


Рисунок 14 – Результаты анализа образца мочи человека, содержащие MDPV и его метаболиты. Полные ионные хроматограммы (сверху), масс-спектры (внизу) и предлагаемая структура с фрагментацией. А) спектры 1 и 2 показывают данные анализа мочи после щелочного извлечения жидкость-жидкостной экстракцией. В) Спектры 3 и 4 показывают данные ацетилированных метаболитов после кислотного гидролиза (25% соляная кислота) и щелочной экстракции мочи [65]

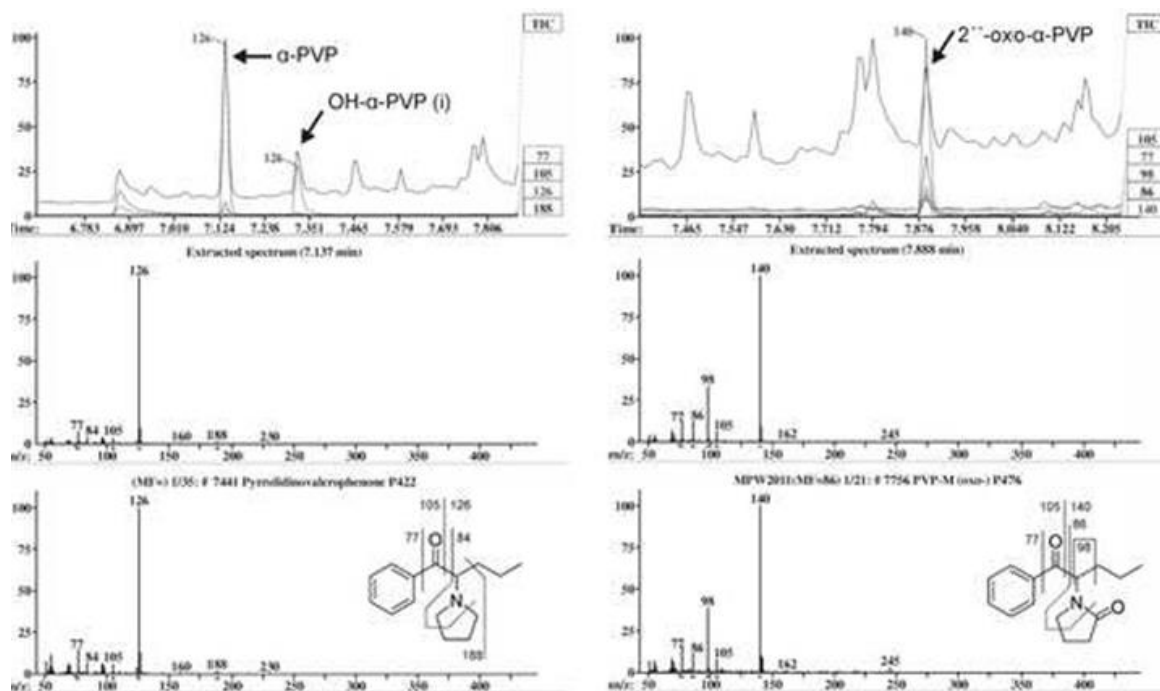


Рисунок 15 – Результаты анализа образца мочи человека, содержащие α-PVP и его метаболиты [66]

1.4 Уровни порогового значения («cut-off») в системе ХТА

Порог обнаружения в методе представляет собой нижний предел чувствительности метода, позволяющего с высокой степенью вероятности дифференцировать объекты, содержащие и не содержащие искомый аналит, и который характеризуется его концентрацией в объекте, например, для методов хроматографического разделения, а вот уже для иммунохимических технологий при исследовании биологических объектов на наличие наркотиков он же уже выражен уровнем «функциональной чувствительности» («cut-off»), т.е. уровнем, так называемой достоверно определяемой отсечки возможности влияния биологической матрицы, сопутствующих аналитов и даже минимальных концентраций исследуемого компонента. Следовательно, уровень порогового значения служит точкой принятия решения для предварительного или подтверждающего метода и вынесения заключения о наличии или отсутствии вещества в пробе. В зависимости от установленной в объекте исследования концентрации вещества должно быть вынесено одно из двух возможных заключений: результат проведенного анализа положительный или отрицательный

[21]. Таким образом, уровень порогового значения («cut-off») – минимальный установленный уровень концентрации вещества, при превышении которого в объекте анализа результат исследования считается положительным. На практике это позволяет говорить, что отрицательный результат не отрицает возможности использования или воздействия на человека ПАВ [25], но это относительно и недостоверно, так как в этих пределах высоко влияние биоматрицы и сопутствующих веществ. Положительный результат исследования может быть использован для подтверждения факта того, что человек подвергался воздействию контролируемого вещества.

В Российской Федерации не установлены уровни порогового содержания, позволяющие специалистам и экспертам принимать решение о наличии наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов в физиологических жидкостях. Данное обстоятельство вносит серьезные трудности в работу химико-токсикологических лабораторий, а также судебно-химических отделений БСМЭ [25].

В целом ряде стран, включая США, страны Европейского Союза, Австралию, уже давно приняты и законодательно закреплены пороговые значения для запрещенных и контролируемых веществ. Это значительно упрощает процедуру освидетельствования. На территории Российской Федерации не зарегистрированы государственные стандартные образцы (ГСО) наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов, а без использования ГСО невозможно разработать и утвердить валидированные методики по количественному обнаружению подконтрольных веществ в биообъектах [25].

В нормативно-правовых документах, регулирующих деятельность БСМЭ, не содержится термина «пороговые значения» («cut-off») или термина эквивалентного по значению. Однако при проведении судебно-химической экспертизы достоверным и аналитически значимым считается любое количество (концентрация) анализируемого вещества, что в свою очередь является основанием для вынесения заключения об обнаружении вещества в пробе [1, 5].

Термин «уровни», аналогичного термину «cut-off» содержит Приказ № 933,

регулирующий деятельность ХТЛ, но без расшифровки понятия и установления (утверждения) цифровых значений. Более того, приказ, предписывает проведение второго этапа ХТИ подтверждающими методами при положительном результате предварительного исследования на наличие НС, ПВ, лекарственных препаратов, вызывающих нарушение физических и психических функций, которые могут повлечь неблагоприятные последствия при деятельности, связанной с источником повышенной опасности, без оценки их количественного содержания [4]. Количественная оценка, полученная с помощью предварительного метода ХТА, не имеет аналитической значимости без проведения исследования подтверждающими методами и служит для принятия внутреннего решения о положительном или отрицательном ответе иммунохимического метода. Подтверждающие методы исследования не дают количественной оценки, следовательно, количественный результат, полученный с помощью предварительного метода исследования, является неприменимым для вынесения какого-либо заключения о количественной оценке содержания контролируемых веществ в пробе в рамках текущего законодательства.

Из-за отсутствия установленных уровней порогового содержания НС, ПВ и их метаболитов, а также методов их количественного анализа, в нашей стране часто возникают конфликтные ситуации, например, при наказании водителей автотранспортных средств. Необоснованные действия вызывают социальную напряженность в обществе и подрывают доверие к органам судебной и исполнительной власти [25].

Практическая ценность введения уровней пороговых значений состоит в том, что это позволит создать строго систематизированную систему оценки результата проведенного ХТИ. Наличие в организме человека ПАВ не может однозначно свидетельствовать о факте умышленного употребления или нахождении в состоянии опьянения, а может быть следствием случайного попадания таких веществ из внешних источников. И в данном случае уровень пороговых значений служит регламентированной точкой принятия решения, отражающей консенсус экспертного сообщества в отношении минимальной концентрации ПАВ в

биологической жидкости, отражающей факт злоупотребления. Также, введение обоснованных уровней пороговых значений значительно сократит число ложноположительных результатов на предварительной стадии исследования. Это снизит общие издержки на проведение анализа и позволит избежать вынесения положительных результатов, не отражающих факт злоупотребления ПАВ, после подтверждающей стадии исследования [25].

Введение уровней пороговых значений в практику работы химико-токсикологических лабораторий и судебно-химических отделений БСМЭ позволит создать однозначные, чёткие и научно обоснованные критерии оценки состояния освидетельствуемых лиц в Российской Федерации.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. На основании полученных результатов литературного поиска было установлено, что α -PVP и MDPV являются наиболее распространенными и токсикологически значимыми представителями дизайнерских наркотиков из группы синтетических катинонов.

2. Анализ отчетных данных бюро судебно-медицинской экспертизы и химико-токсикологических лабораторий наркологических диспансеров (больниц) показал, что α -PVP занимает первое место по числу его выявления при злоупотреблениях психоактивными веществами и смертельных случаев от передозировок новыми ПАВ в разных регионах Российской Федерации.

3. Приведена сравнительная оценка методов идентификации наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ и их метаболитов.

4. Обоснована практическая ценность введения уровней пороговых значений («cut-off») наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов в химико-токсикологическом анализе.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Данные эксперимента, представленные в настоящей работе, получены на клинических образцах мочи, содержащие и не содержащие исследуемые и иные наркотические вещества (или их метаболиты) от лиц, проходивших освидетельствование в ГБУ РМЭ «Республиканский наркологический диспансер» (Республика Марий Эл), БУЗ ВО «Воронежский областной клинический наркологический диспансер», в кабинетах наркологических экспертиз Отделения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (ОМОСО) НКБ № 17 ДЗ г. Москвы, собранные и проанализированные за период зима-весна 2017 года (130 образцов мочи).

2.2 Оборудование и материалы

Для создания щелочного значения pH образцов мочи использовали карбонат натрия $\geq 99\%$ и гидрокарбонат натрия 99,5–100,5% «Sigma-Aldrich» (США), а для высаливания – хлорид натрия $\geq 99,5\%$ «Sigma-Aldrich».

Приготовление смеси солей: взвесить 100 г гидрокарбоната натрия и 50 г карбоната натрия, перемешать и перетереть в ступке.

Соляную кислоту (37%) «Sigma-Aldrich» использовали для проведения гидролиза мочи в кислых условиях на стадии пробоподготовки. Для нейтрализации использовали гидроксид натрия $\geq 97\%$ «Sigma-Aldrich».

Приготовление 40% масс. раствора гидроксида натрия: к 40 г гидроксида натрия добавить 60 мл дистиллированной воды и перемешать.

В качестве экстрагентов при проведении пробоподготовки использовали следующие органические растворители: изопропиловый спирт «Fluka» (США), хлористый метилен и гексан «PanReas AppliChem» (Германия) в соотношении 1:7:2.

Приготовление смеси органических растворителей: смешать дихлорметан (70 мл), гексан (20 мл), изопропиловый спирт (10 мл).

В качестве внутреннего стандарта при анализе методом ГХ-МС использовали раствор дифениламина $\geq 99\%$ «Sigma-Aldrich» с концентрацией 1 мг/мл в метаноле.

Приготовление раствора дифениламина (с концентрацией 1 мг/мл): 50 мг дифениламина перенести в мерную колбу объемом 50 мл, заполненную примерно на $\frac{3}{4}$ метанолом, и перемешивать путем переворачивания закупоренной колбы. Затем с помощью пипеточного дозатора довести объем раствора до метки метанолом и снова перемешивать путем переворачивания закупоренной колбы. Затем раствор перелить во флакон для хранения полностью заполняя емкость, и плотно закупорить.

Дериватизацию проводили путем ацилирования с помощью N-метил-бис-трифторацетамида (MBTFA). Этилацетат «PanReac AppliChem» и метанол «J.T.Baker» применяли для реконструирования проб.

Дозирование проб, рабочих растворов и реактивов осуществляли дозаторами пипеточными одноканальными переменного объема Pipetman со сменными наконечниками на 20–100 мкл или на 100–1000 мкл Gilson (Франция). Дозирование MBTFA осуществляли микрошприцем для хроматографии Hamilton (США).

Для контроля pH образцов мочи использовали универсальную индикаторную бумагу (Чехия).

В работе использовали следующее оборудование:

- pH-метр S470 «Mettler Toledo» (Швейцария);
- весы аналитические AX-204 «Mettler Toledo» (Швейцария);
- шейкер MSV-3500 «BioSan» (Латвия);
- центрифуга CM-6.03 «ELMI» (Латвия);
- сушижаровой шкаф FD 115 «Binder GmbH» (Германия);
- выпариватель Reacti-Therm TS 18824/TS 18826 (Thermo Scientific);
- анализатор для химико-токсикологических исследований IK 200609 (серийный номер 1633).

На этапе предварительной стадии исследования использовали экспериментальный реагент диагностический – иммунохроматографический тест R1-AMP, катионы – MDPV, α -PVP, α -PHP от 20 нг/мл до 1000 нг/мл и выше (лот

15120003); искусственную мочу, содержащую MDPV с концентрациями (калибраторы) 20, 60, 100, 120, 300, 500, 800, 1000 нг/мл (BTNX Inc, Canada); калибраторы, содержащие α -PVP с концентрациями 20, 60, 100, 120, 300, 500, 800, 1000 нг/мл (BTNX Inc, Canada); калибраторы, содержащие амфетамин с концентрациями 8000, 3000 и 1000 нг/мл (BTNX Inc, Canada); аналитический стандарт мочи (негатив) – Detectabuse® Urine Control Negative (50ml) Biotechnical Diagnostics, Inc., Edgewood, (США), лот B00036; пробирки пластиковые типа «Eppendorf» (объем – 2мл).

Для подтверждения результатов анализа, полученных на предварительной стадии исследования, использовался газовый хромато-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010Ultra (Япония).

2.2.1 Иммунохимический анализатор ИК 200609 и реагенты для обнаружения синтетических катинонов

Разработанный вариант ИХА основан на широко применяемой в мировой практике технологии конкурентного, гетерогенного анализа, выполняемого на нитроцеллюлозной мембране. В составе тестов используются антитела, меченные частицами коллоидного золота. Научная обоснованность выбора данной технологии подтверждена критическим анализом литературных данных и результатов многолетнего практического применения различных тест-систем в медицинской практике.

Регистрация результатов осуществляется с помощью анализатора для химико-токсикологических (далее анализатор) ИК 200609 (T&D Innovationen GmbH, Германия). Анализатор разработан на основе последних достижений в области оптико-механических технологий, используемых в ИХА. Применяемый метод ИХА обеспечивает обнаружение и количественную оценку содержания ПАВ и их метаболитов.

Количественный анализ основан на фотометрической регистрации изменений интенсивности окрашивания зон детекции реагента. Интенсивность сигнала, измеряемая в милливольтках, сравнивается с данными калибровочной кривой, полученной при анализе сертифицированного международного стандарта.

Калибровка выполняется изготовителем прибора и параметры калибровочной кривой, построенной для каждой партии иммунохимических сенсоров, хранятся в электронном виде на магнитном чипе, нанесенном на тубу, в которой содержатся иммунохимические реагенты (тест-полоски). Специальные калибраторы, представляющие собой растворы наркотических средств и психотропных веществ, в состав разработанной тест-системы не входят.

Блок управления (процессор) анализатора позволяет проводить самоконтроль прибора перед каждым измерением. Анализатор имеет встроенную память и позволяет сохранять 100 результатов выполненных измерений, после чего файлы можно перенести на персональный компьютер. Новые результаты измерений будут записываться после использования функции «очистка памяти» (рис. 16).

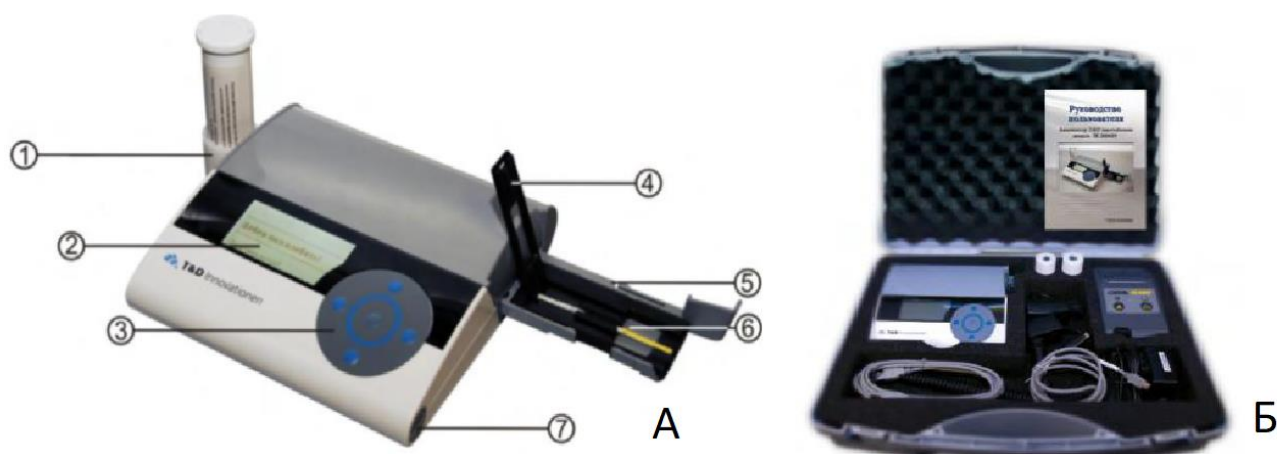


Рисунок 16 – Общий вид анализатора ИК 200609 [24]

А. 1. Подставка для тубы (с установленной тубой). 2. Дисплей. 3. Панель управления. 4. Фиксатор лотка для биосенсоров. 5. Лоток для биосенсоров. 6. Место для установки биосенсора. 7. Отсек для аккумуляторных батарей типа АА.

Б. Кейс для хранения и транспортировки анализатора и его составных частей

Время выдерживания реагента (по инструкции) в моче не менее 12 минут. Реагенты упакованы в пластиковые тубы по 50 штук в каждой. На каждую тубу наклеена этикетка, на которой указаны название, количество реагентов в тубе, пределы количественного определения с указанием групп определяемых веществ, серия (лот) реагентов, срок годности, информация об изготовителе [24].

На обратной стороне этикетки находится магнитный чип, содержащий информацию о количестве и параметрах реагентов, методе анализа и калибровочные характеристики (рис.17).



Рисунок 17 – Реагенты для обнаружения синтетических катинонов в моче, лот 15120003

Для ИХА доказательное значение имеет результат, при котором отсутствуют контролируемые соединения в пробе. Отрицательный результат, получаемый на первом этапе исследования, имеет важное значение в практике диагностического исследования, так как дальнейшие анализы не выполняются, и дается заключение об отсутствии контролируемых веществ в пробе, что свидетельствует об отсутствии факта потребления НС, психотропного или другого токсического вещества. Для подтверждения обоснованности полученных результатов на всех реагентах имеется специальный детектирующий участок (зона контроля). Отсутствие окрашивания зоны контроля свидетельствует о том, что в данном биологическом материале невозможно иммунохимическое взаимодействие и полученные результаты являются непредставительными или была нарушена процедура проведения анализа.

При работе с анализатором аккумуляторные батареи типа АА (3 шт.) позволяют использовать анализатор с подключенным принтером несколько часов без подключения к сети (220 В). Реагенты в комплекте с портативным детектором и компьютером могут использоваться как в лабораторных условиях, так и для проведения анализа на местах сбора и регистрации проб.

2.2.2 Оптимальные условия изолирования и анализа исследуемых веществ

Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от pH среды ($\log P$, $\log D$), значений pK_a для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов, влияющих на выбор параметров методики пробоподготовки биологических объектов, произведены с применением программы ACDLabs и платформы ACD/Percepta 14.0.0 (Build 2726) и представлены в Приложении А-В.

В аналитической практике ХТЛ пробоподготовка для анализа исследуемой группы соединений включает получение «щелочных» извлечений, при этом pH среды объекта устанавливают 9-10 по лакмусовому индикатору кислотности. Учитывая представленные теоретические расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от pH среды предположение о том, что нативные соединения α -PVP, MDPV и их основные метаболиты будут изолироваться из мочи при щелочных значениях pH, подтверждается. Однако ряд метаболитов этих соединений проявляют свойства амфолитов, а у некоторых pH не влияет на процесс извлечения из биологических объектов. Этим также может объясняться различие хроматографических профилей и интенсивность откликов основных метаболитов α -PVP в экспертных образцах при передозировке [18]. В дальнейших экспериментальных исследованиях с установлением различных по щелочности pH среды мочи и анализе полученных данных по изолированию из них исследуемых веществ было установлено, что требуется ограничить диапазон pH и снизить его уровень до интервала 8-9.

Методика пробоподготовки мочи

В вials на 10 мл с завинчивающейся крышкой вносят 3 мл мочи, добавляют 100 мг смеси карбоната натрия и гидрокарбоната натрия в соотношении 1:2 (уровень pH в пределах 8–9), а также 1–2 г хлорида натрия, перемешивают 10 секунд на вортексе. С помощью шприца для газовой хроматографии добавляют 10 мкл раствора внутреннего стандарта – дифениламин в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. К полученному раствору добавляют 2 мл смеси изопропанол-дихлорметан-гексан (1:7:2). Встряхивают на вортексе в течение 5 минут. Центрифугируют 3

минуты при 1200g (1700 об/мин.). В вials объемом 2 мл переносят верхний органический слой и упаривают досуха в токе сухого воздуха при нагревании 50°C. Затем сухой остаток перерастворяют в 100 мкл смеси этилацетат-метанол (1:1) и переносят во вставку для вials, позволяющей использовать автоматический инжектор для ввода пробы в газовый хроматограф, закрывают вial крышкой и анализируют [21].

Условия хроматографирования: колонка капиллярная GsBP-5MS 30м×0,25 мм, фаза – 0,25мкм, начальная температура колонки 70°C, выдержка 2 мин, нагрев со скоростью 20°C/мин до 280°C, выдержка 15 мин; газ-носитель – гелий, инжектор – splitless, скорость потока газа-носителя 1 мл/мин, температура квадрупольного анализатора 150°C; температура ионного источника – 230°C. Время включения катодов и анализатора («задержка на растворитель») – через 3,51 мин после ввода пробы, интервал сканируемых масс 50–550 m/z. Режим работы детектора установлен по стандартной программе «Autotune». Детектирование производили путем сравнения масс-спектра исследуемого пика с масс-спектром из библиотек масс-спектров. При анализе использовали программу автоматизированной системы масс-спектральной деконволюции и идентификации (AMDIS) и библиотеки масс-спектров NIST 14 и SWGDRUG (версия 3.2, октябрь 2017). Для идентификации образцов мочи с относительно низкой концентрацией аналитов или при недостаточном количестве биологического объекта был выбран режим регистрации масс-спектров по выбранным ионам (SIM).

Были выбраны следующие ионы: 84 m/z, 121 m/z, 126 m/z, 149 m/z для MDPV и 77 m/z, 84 m/z, 105 m/z, 126 m/z, 188 m/z для α -PVP [8, 20].

2.3 Операционные характеристики диагностических методов исследования

Существуют различные способы оценки параметров производительности в качественном анализе. Для характеристики информативности диагностических методов исследования служат объективные параметры, именуемые операционными характеристиками исследования (теста). Операционные характеристики показывают насколько правильно и с какой точностью работает данная тест-система. С помощью операционных характеристик можно рассчитать

необходимый уровень порогового значения.

К важнейшим операционным характеристикам метода диагностики относятся:

- чувствительность;
- специфичность.

К вспомогательным критериям информативности относятся:

- точность;
- прогностичность положительного и отрицательного результатов;
- отношение правдоподобия положительного и отрицательного результатов.

При анализе любого исследования (теста) в практической медицине могут встретиться только четыре варианта ответов:

- 1) **TP** (англ. True Positives, истинно положительные результаты) – верно классифицированные положительные примеры;
- 2) **TN** (англ. True Negatives, истинно отрицательные результаты) – верно классифицированные отрицательные примеры;
- 3) **FP** (англ. False Positives, ложноположительные результаты) отрицательные - примеры, классифицированные как положительные (ошибка I рода, α -ошибки, «ложные тревоги»). Это ложное обнаружение, т.к. при отсутствии события (потребления катинонов) ошибочно выносится решение о его присутствии (ложноположительные случаи);
- 4) **FN** (англ. False Negatives, ложноотрицательные результаты) положительные примеры, классифицированные как отрицательные (ошибки II рода, β -ошибки). Это так называемый «ложный пропуск» – когда интересующее нас событие ошибочно не обнаруживается.

Чувствительность (англ. **Sensitivity, Se**) – это пропорция правильных положительных результатов теста среди всех положительных, обследованных референтным методом.

Это способность диагностического метода давать правильный результат, который определяется как доля истинно положительных результатов среди всех

проведенных тестов.

Чувствительность показывает, какова будет доля выявления, например, катионов у освидетельствуемых лиц, для которых данное исследование даст положительный результат. Определяется по формулам:

$$Se = \frac{TP}{D^-} \times 100\%, \text{ где (1)}$$

TP – истинно положительные результаты исследования;

D^- – количество всех положительных результатов у протестированных;

D^- – представляет собой сумму истинно положительных и ложноотрицательных результатов исследования, поэтому формула для расчета специфичности приобретает следующий вид:

$$Se = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\%, \text{ где (2)}$$

TP – истинно положительные результаты исследования;

FN – ложноотрицательные результаты исследования.

Чем выше чувствительность теста, тем чаще и точнее с его помощью будет выявляться злоупотребление, тем, следовательно, он более эффективен. В тоже время, если такой высокочувствительный тест оказывается отрицательным, то наличие факта потребления катионов маловероятно и исключает все дальнейшие процедуры анализа. В силу этого высокочувствительные методы нередко называют идентификаторами, их рекомендуется применять на ранних этапах диагностического процесса, когда требуется сузить круг предполагаемых ПАВ, используемых для злоупотреблений. Необходимо также отметить, что высокочувствительный тест должен давать умеренное количество «ложных тревог», чтобы не увеличивать затраты на исследование.

Оцениваемые результаты исследования проверяются инструментальным (лабораторным) методом исследования, принятого в качестве референтного метода («золотого стандарта»). При этом данные метода «золотого стандарта» являются критерием установления факта наличия или отсутствия вещества в биообъекте.

Специфичность (англ. **Specificity, Sp**) – это пропорция правильных отрицательных результатов теста среди всех отрицательных результатов

освидетельствования референтным методом. Определяется по формуле:

$$Sp = \frac{TN}{FP + TN} \times 100\%, \text{ где (3)}$$

TN – истинно отрицательные результаты исследования;

FP – ложноположительные результаты.

Специфичность предполагает, какова будет доля лиц, у которых исследование даст отрицательный результат. Чем выше специфичность метода, тем надежнее с его помощью подтверждается положительный результат, и тем, следовательно, он является более эффективным. Высокоспецифичные методы называются в диагностике дискриминаторами. Исследование эффективно на втором этапе диагностики, когда круг предполагаемых ПАВ для злоупотреблений сужен и необходимо с большой уверенностью доказать наличие факта потребления или состояния опьянения. Отрицательным фактором высокоспецифичного метода диагностики является факт «невывявления» достоверного злоупотреблений ПАВ.

В медицинской диагностике оптимален метод исследования, который как высокоспецифичен, так и высокочувствителен. Однако в реальности это труднодостижимо, т.к. повышение чувствительности теста неизбежно будет сопровождаться потерей его специфичности и наоборот, повышение специфичности связано со снижением его чувствительности.

Методики диагностики с высокой чувствительностью редко «пропускают» освидетельствуемых, в пробах которых содержатся НС и ПВ, а методики с высокой специфичностью не допускают вынесения «ложного» заключения об обнаружении ПАВ при отсутствии их потребления человеком. Отсюда следует вывод: чтобы создать оптимальную диагностическую систему нужно найти компромисс между показателями чувствительности и специфичности, при которых финансовые затраты на обследование будут оптимально отражать баланс между рисками «ложных тревог» и пропуска факта злоупотреблений.

Точность (англ. Accuracy, Ac) – это доля правильных результатов теста (т.е. сумма истинно положительных и истинно отрицательных результатов) среди всех обследованных референтным методом. Определяется по формулам:

$$Ac = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \times 100\% \quad (4)$$

$$Ac = \frac{TP + TN}{D + D^-} \times 100\% \quad (5)$$

Таким образом, точность показывает, сколько всего правильных результатов получено в ходе применения данного метода исследования. Иногда этот критерий называют показателем диагностической эффективности и обозначают как De – diagnostic efficiency, диагностическая эффективность.

Точность диагностического метода зависит от самого метода, используемого оборудования, популяции, в которой данный тест используется.

С практической точки зрения, для правильного понимания диагностической эффективности методов исследования важную роль играет прогностичность положительного и отрицательного результатов. Именно эти критерии показывают, какова вероятность злоупотребления ПАВ (или его отсутствия) при известном результате исследования.

Прогностическая ценность (англ. Predictive value) теста – вероятность наличия заболевания при условии известного результата диагностического исследования (теста), рассчитывается на основании данных о чувствительности и специфичности.

Прогностическая ценность – это характеристика не только самого метода. Она зависит как от его чувствительности и специфичности, так и от распространенности злоупотреблений ПАВ в исследуемой популяции, т.е. доли лиц злоупотребляющих, например, катиноны в определенной популяции в данный момент времени. Распространенность – априорная (или предтестовая) вероятность, т.е. это вероятность выявления злоупотреблений до того, как стали известны окончательные результаты исследования.

Прогностичность положительного результата (PV+, диагностическая ценность) – это пропорция истинно положительных результатов среди всех положительных значений теста. Это вероятность факта потребления ПАВ при положительном (патологическом) результате диагностического исследования (теста). Данный показатель определяется по формуле:

$$PV+ = \frac{TP}{TP + FP} \times 100\% \quad (6)$$

Прогностичность отрицательного результата (PV–) – это пропорция истинно отрицательных результатов теста среди всех отрицательных значений. Это вероятность отсутствия факта потребления ПАВ при отрицательном (нормальном) результате диагностического исследования (теста).

Показатель определяется по формуле:

$$PV- = \frac{TN}{TN + FN} \times 100\% \quad (7)$$

Чем чувствительнее тест, тем выше прогностическая ценность его отрицательного результата (т.е. возрастает уверенность в том, что отрицательные результаты исследования отвергают наличие злоупотребления ПАВ). Наоборот, чем специфичнее тест, тем выше прогностическая ценность его положительного результата (т.е. специалист может с большей уверенностью считать, что положительные результаты подтверждают предполагаемый факт злоупотребления ПАВ). Поскольку распространенность злоупотреблений ПАВ влияет на прогностическую ценность диагностического метода, последняя неизбежно зависит и от условий его выполнения. Если положительные результаты даже высокоспецифичного метода получены в популяции с низкой вероятностью злоупотребления ПАВ, то они будут преимущественно ложноположительными.

Если операционные характеристики – чувствительность и специфичность не зависят от частоты злоупотреблений ПАВ, то прогностичность – положительная и отрицательная напрямую будет связана с преваленсом (события в популяции). Чем выше преваленс, тем выше прогностическая значимость положительного результата, т.е. выявления случаев злоупотреблений ПАВ среди освидетельствуемых лиц.

Отношение правдоподобия диагностических тестов

Теорема Байеса (или формула Байеса) – одна из основных теорем элементарной теории вероятностей, которая позволяет определить вероятность какого-либо события при условии, что произошло другое статистически взаимосвязанное с ним событие, т.е. отражает влияние дополнительной

информации на изменение вероятности. Теорема Байеса вычисляет вероятность получения правильного результата (положительного или отрицательного), когда он действительно верен, $P(a/p)$.

Отношение правдоподобия (англ. Likelihood ratio, Lr) – отношение вероятности наличия злоупотребления ПАВ на основании полученного результата диагностического теста к вероятности отсутствия злоупотреблений ими среди освидетельствуемых лиц.

Отношение правдоподобия положительного результата (Lr+) показывает, во сколько раз положительный результат теста более вероятен у злоупотребляющего ПАВ лица по сравнению со здоровым. Определяется по формуле:

$$Lr+ = \frac{Se}{1 - Sp} \quad (8)$$

Отношение правдоподобия отрицательного результата (Lr-) показывает, во сколько отрицательный результат теста более вероятен у здорового по сравнению с злоупотребляющим ПАВ. Определяется по формуле:

$$Lr- = \frac{1 - Se}{Sp} \quad (9)$$

Отношение правдоподобия особенно удобно использовать для определения вероятности наличия злоупотреблений ПАВ, когда применяется несколько диагностических тестов последовательно. Отношение правдоподобия (LR+) от 5 до 10 и отношение правдоподобия (LR-) от 0,1 до 0,2 дает умеренные основания для диагностического решения, а в случае больше 10 и меньше 0,1 (соответственно) дает практически окончательное диагностически значимое решение.

2.4 ROC-анализ как инструмент установления уровней пороговых значений

Идеальный диагностический тест схематично отображается в виде двух кривых распределения результатов, полностью отделенных друг от друга. В таком случае это будет 100% чувствительность и специфичность теста. В реальной клинической практике положительные и отрицательные результаты теста частично

накладываются друг на друга. Чем больше это наложение, тем хуже работает тест (рис. 18).

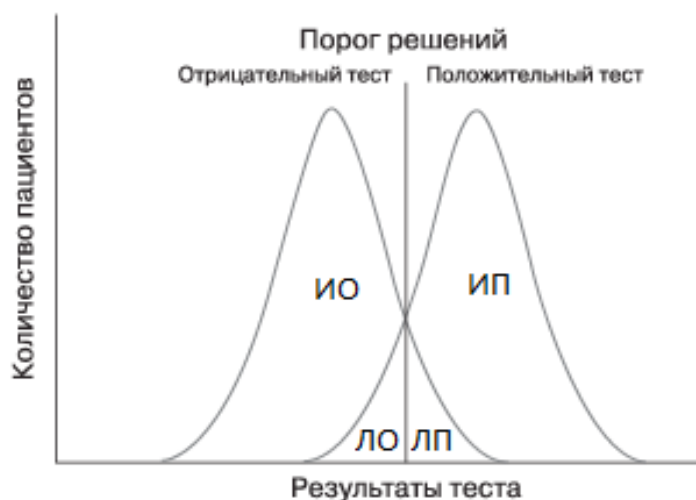


Рисунок 18 – Связь между результатами теста и критериями принятия решений.

ИП – истинно положительные результаты, ИО – истинно отрицательные, ЛП – ложноположительные, ЛО – ложноотрицательные

Таким образом, существует взаимная связь изменений чувствительности и специфичности: повышение чувствительности теста неизбежно сопровождается снижением его специфичности и, наоборот, при снижении чувствительности теста повышается его специфичность. Такие закономерности необходимо учитывать при выборе программ скрининговых обследований/исследований.

Уровни пороговых значений могут значительно отличаться в зависимости от анализируемых веществ и времени их выведения (окно детектирования). Следует выбирать такой пороговый уровень, который бы однозначно говорил о нахождении человека в состоянии опьянения.

В настоящее время лаборатории работают по различным методикам и имеют отличное друг от друга аналитическое оборудование, а, следовательно, чувствительность и предел обнаружения. Поэтому при установлении уровней пороговых значений необходимо скорректировать их расчётную теоретическую величину с учётом различных практических факторов: наличие и вид лабораторного оборудования, фоновая обстановка, контингент обследуемых и ряд других факторов, оказывающих влияние на уменьшение или увеличение значений

уровней пороговых значений. Надлежаще построенная математическая модель на основе статистически репрезентативной выборки и подобранные на её основе уровни пороговых значений, позволяют минимизировать количество ошибок первого и второго рода (числа ложноположительных и ложноотрицательных результатов) и достичь максимальной информативности, чувствительности, селективности и прогностичности метода исследования для выбранной биологической матрицы.

Статистические инструменты для использования в установлении уровней пороговых значений для диагностических методов хорошо изучены.

В настоящее время для статистической обработки данных и установления, в том числе, уровней пороговых значений, часто используют информативный метод анализа ROC-кривых – операционных кривых наблюдателя (Receiver Operation Characteristic curves). ROC-анализ представляет собой исследовательский инструмент, позволяющий анализировать взаимоотношения чувствительности и специфичности метода исследования в бинарной классификации [15].

ROC-кривые представляют собой график, отображающий в прямоугольной системе координат взаимоотношение истинно положительных (чувствительность, ось ординат) решений и ложноположительных (1–специфичность, ось абсцисс) решений, получаемых наблюдателем при оценке результатов исследования [11, 15].

2.5 Площадь под ROC-кривой. AUC – показатель качества модели

Визуальное сравнение ROC-кривых не всегда позволяет выявить наиболее эффективную модель. Своеобразным методом сравнения ROC-кривых является оценка площади под кривыми. Эта оценка может быть получена непосредственно вычислением площади под многогранником, ограниченным справа и снизу осями координат и слева вверху – экспериментально полученными точками. Численный показатель площади под кривой называется AUC (Area Under Curve).

Показатель AUC является точным цифровым критерием информативности метода диагностики (табл.7). В литературе иногда приводится следующая экспертная шкала для значений AUC, по которой можно судить о качестве модели.

Таблица 7 – Критерии качества модели

Интервал AUC	Качество модели
0.9–1.0	Отличное
0.8–0.9	Очень хорошее
0.7–0.8	Хорошее
0.6–0.7	Среднее
0.5–0.6	Неудовлетворительное

С большими допущениями можно считать, что чем больше показатель AUC, тем лучшей прогностической силой обладает модель. Однако следует знать, что AUC не содержит никакой информации о чувствительности и специфичности модели.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2

1. Описаны материалы, оборудование и аналитический комплекс – анализатор ИК 200609 и экспериментальные реагенты для иммунохроматографического анализа на синтетические катионы в моче, используемые в работе.

2. Выбраны операционные характеристики диагностических тестов и метод ROC-анализа, с помощью которых можно рассчитать необходимый уровень порогового значения.

3. Теоретически обоснованы оптимальные условия изолирования токсикологически значимых синтетических производных катиона и их метаболитов с применением программного обеспечения ACD/Labs и платформы ACD/Percepta.

4. Оптимизирована методика пробоподготовки мочи и подобраны условия анализа исследуемых веществ методом ГХ-МС.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка иммунохроматографических реагентов для обнаружения синтетических катинонов, применяя ROC-анализ

Отбор и доставку клинических образцов мочи производили в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 27.01.2006 № 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» [3].

Тестирование образцов мочи проводили при следующих параметрах:

- температура окружающей среды (t°) от 20 до 25°C;
- относительная влажность воздуха – до 65%;
- атмосферное давление – от 750 до 770 мм рт. ст. (87–107 кПа).

ИХА отобранных образцов мочи осуществлялся при использовании анализатора для химико-токсикологических исследований ИК 200609 и комплекта реагентов.

Экспериментальная оценка иммунохроматографических реагентов в аппаратно-программном исполнении была осуществлена в соответствии с ГОСТ Р 51352–2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний» (п. 5.4.7). Проведение исследования на анализаторе осуществлялось согласно инструкции производителя.

500 мкл мочи добавляли в пробирку типа «Эппендорф» номинальной емкостью 2 мл (для выполнения 1-го исследования требуется 60–100 мкл мочи). Реагенты извлекались из тубы и погружались терминальным концом в исследуемые образцы (рис. 19). При этом учитывалось основное правило работы с иммунохимическими реагентами: реагент не должен быть погружен в жидкость выше уровня контрольной линии.

Время реакции (согласно инструкции) – не менее 12 минут. После инкубации каждый диагностический реагент вкладывали в выдвижной лоток и плотно зажимали встроенным фиксатором, после закрытия лотка прибор автоматически

начинал сканирование, время сканирования – 12 секунд.

В обычных условиях для начала работы тубу с реагентами необходимо вставить в подставку, расположенную на левой стороне анализатора. На дисплее отображается информация: перечень веществ, определяемых реагентом и их количество в тубе. Анализ инициируется нажатием оператором центральной кнопки на панели управления анализатора. После считывания магнитного чипа прибор каждый раз запрашивает реагент. Результаты анализа (суммарная концентрация обнаруживаемых соединений, нг/мл) выводятся на дисплей анализатора и могут быть напечатаны на принтере.

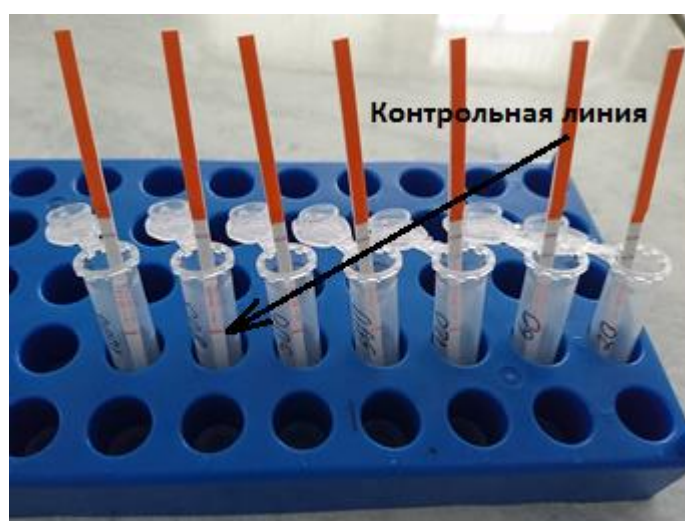


Рисунок 19 – Инкубация реагентов во время калибровки

Как исключение, только в рамках данных исследований, запуск анализатора осуществлялся благодаря доступу к специальной программе. Результаты считывания анализатора выводились на экран монитора персонального компьютера, в том числе интенсивность сигнала, измеряемая в милливольтках. В обычных условиях доступ к такой программе работы с анализатором невозможен и для оператора в этом нет необходимости.

3.1.1 Калибровка ИК 200609

Анализатор для химико-токсикологических исследований ИК 200609 поставляется с заводской калибровкой от производителя по соединению MDPV, записанной на микрочипе. Микрочип закреплен на тубе, содержащей внутри реагенты для обнаружения катинонов. Для проведения научного исследования

прибор был перекалиброван по образцам с заведомо известной концентрацией MDPV, представленными производителем, на всем диапазоне измерений (20, 60, 120, 300, 500, 800, 1000 нг/мл). Результаты калибровки приводятся в таблице 8 и на рисунке 20.

Таблица 8 – Результаты калибровки

Концентрация, нг/мл	Результат измерения, нг/мл	Среднее значение, нг/мл	Результат измерения, мВ	Среднее значение
Blank иск. моча	2,2		773,4	825,6
Blank иск. моча	negative		877,7	
20	8,1	8,06	681,0	681,6
	6,5		704,4	
	9,6		659,5	
60	15,5	29,7	588,0	481,4
	24,6		501,2	
	49,0		355,1	
120	80,8	60,1	253,3	320,5
	42,2		387,1	
	57,5		321,1	
300	195,2	188,1	117,7	122,4
	196,5		116,9	
	172,8		132,5	
500	387,3	352,4	55,7	62,8
	356,1		61,6	
	313,9		71,2	
800	652,0	585,3	27,5	32,9
	499,9		40,2	
	604,1		30,9	
1000	932,2	751,4	14,8	22,9
	669,9		26,4	
	652,0		27,5	

Как следует из результатов измерений, наблюдается линейная зависимость, выражаемая уравнением:

$$\lg C_t = 0.848 \lg C_m + 0.539, \text{ где (10)}$$

C_m – средние результаты измерений с заводской калибровкой;

C_t – истинные значения тестового раствора.

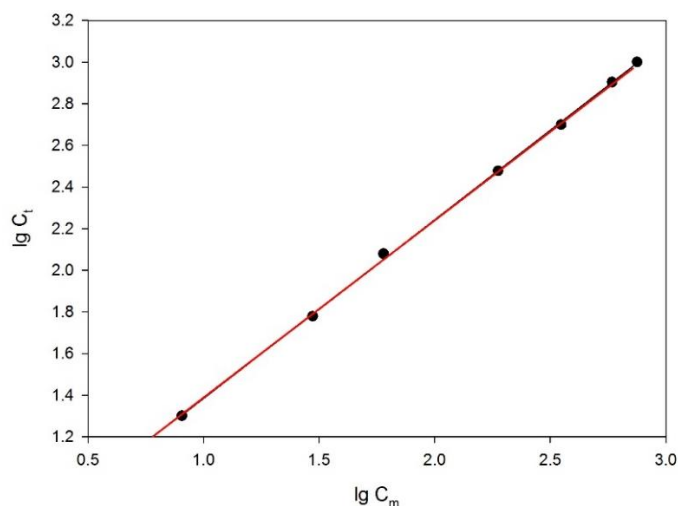


Рисунок 20 – Калибровочная кривая для MDPV (по результатам тестирования). C_m – средние результаты измерений с заводской калибровкой, C_t – истинные значения тестового раствора. Красная линия – линейная регрессия

Важно отметить видимую из рисунка 20 логарифмическую зависимость от концентрации. Однако данная зависимость свидетельствует о значительной коррекции измеряемых результатов. Как следствие, прибор был перекалиброван на этапе компьютерной обработки считываемого сигнала милливольт. Далее прибор был повторно протестирован по большей статистике измерений. Результаты повторного тестирования перекалиброванного прибора показаны в таблице 9 и на рисунке 21.

Как следует из рисунка 21, наблюдаемая линейная регрессия в логарифмической шкале концентраций близка к точной воспроизводимости истинных концентраций; показанная линия соответствует уравнению:

$$\lg C_t = 0.93 \lg C_m + 0.126 \quad (11)$$

Однако данные таблицы 9 свидетельствуют о заметной дисперсии (в $\lg C$ 3σ составляет ± 0.1). В дальнейшей обработке результатов использовались данные измерения перекалиброванного прибора.

Таблица 9 – Результат измерений концентрации, нг/мл

№ п/п	Концентрации MDPV, нг/мл				
	1000	500	250	125	60
1	1148,0	910,0	270,0	178,0	68,9
2	1066,0	503,6	392,0	168,8	63,5
3	1521,1	785,1	344,0	120,4	66,1
4	1033,5	811,4	419,6	203,8	28,4
5	996,8	632,5	411,0	176,3	57,8
6	1017,8	693,4	372,2	80,8	57,9
7	1086,4	676,5	232,4	94,2	86,2
8	1018,0	710,3	290,4	113,7	44,1
9	943,1	587,2	169,6	63,8	40,8
10	757,9	403,0	222,9	77,9	23,5
Среднее значение	1058,9	671,3	312,4	127,8	53,7

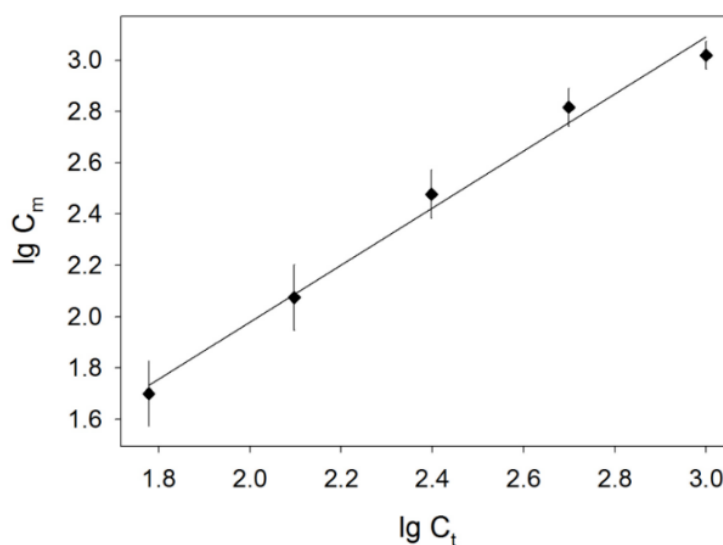


Рисунок 21 – C_m – результаты измерений с новой калибровкой, C_t – истинные значения тестового раствора. Черная линия – линейная регрессия. Доверительные интервалы 95%

Линейная регрессия также свидетельствует о логарифмической природе зависимости от концентрации в рассматриваемых процессах. Важно отметить, что ошибка измерений входит в статистику наряду с влиянием сходных веществ или иных веществ (метаболитов). Предполагается одинаковая измерительная ошибка для одинаковых

приборов. Кроме того, следует отметить, что результаты обработки статистики измерений могут применяться для заводской калибровки по причине хорошей линейной регрессии (рис. 20), но с поправкой на эту линейную зависимость.

Влияние на результаты измерения родственных соединений из группы синтетических катинонов исследовалось на примере α -PVP. Результаты сравнения тестовых и средних измеренных концентраций показаны на рисунке 22.

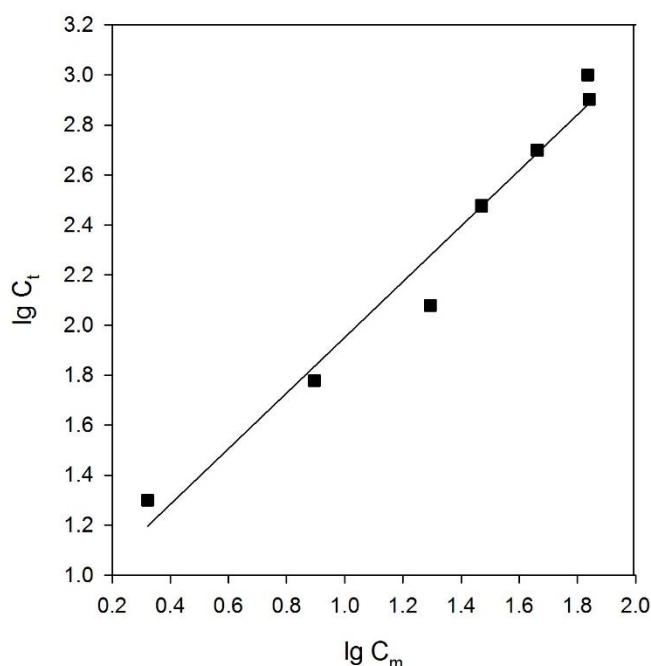


Рисунок 22 – C_m – средние результаты измерений вещества α -PVP (исследовательская калибровка по MDPV), C_t – истинные значения тестового раствора α -PVP.
Черная линия – линейная регрессия

Несмотря на линейную зависимость в логарифмической шкале концентраций, выражаемую уравнением 12, видно, что измеренные концентрации отличаются почти на порядок. Это иллюстрирует специфичность метода к сходному соединению.

$$\lg C_t = 1.135 \lg C_m + 0.812, \text{ где (12)}$$

C_m – средние результаты измерений вещества α -PVP;

C_t – истинные значения тестового раствора α -PVP.

Кросс-реактивность соединений из других фармакологических групп – явление ложноположительного результата в ИХА, происходящее в силу недостаточно высокой специфичности первоначальной реакции между объектом

исследования и специфичным к нему антителом, при которой антитела, тропные к объекту исследования, также способны связываться и с другими веществами со сходным или иным химическим строением [25].

Кросс-реактивность (перекрестная активность, КР) выражается в процентах и рассчитывается по формуле [38]:

$$\% \text{ КР} = \frac{\lg(C_{\text{в-ва}})}{\lg(C_{\text{ст}})} \times 100\%, \text{ где (13)}$$

$C_{\text{в-ва}}$ – концентрация кросс-реактивного вещества;

$C_{\text{ст}}$ – определяемого вещества (стандарта).

В формуле использовано отношение логарифмов концентраций в силу отмеченной логарифмической природы зависимости от концентраций. Как видно из рисунка 23 (табл. 10), для высокой концентрации наблюдается большая кросс-реактивность исследуемого вещества.

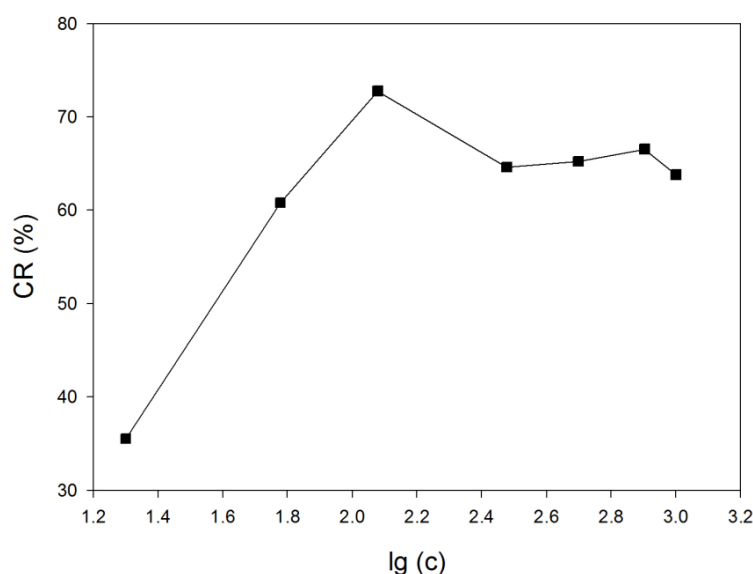


Рисунок 23 – Кросс-реактивность α -PVP

В ходе дальнейших исследований был выполнен тест на кросс-реактивность с амфетамином (АМР) – родственного, в целом, по химической структуре соединения, а также отнесения этих веществ к укрупненной группе фенилалкиламинов. Результаты тестирования показаны в таблице 11. В исследовании использовались калибраторы мочи, содержащие АМР (8000 нг/мл, 3000 нг/мл, 1000 нг/мл) и контрольный образец, не содержащий в своем составе АМР, представленные производителем анализатора.

Таблица 10 – Значения кросс-реактивности α -PVP на разных концентрациях

Исходная концентрация MDPV, нг/мл	Среднее измеренное значение, нг/мл	Исходная концентрация α -PVP, нг/мл	Среднее измеренное значение, нг/мл	Кросс-реактивность, %
20	8,06	20	2,1	35,3
60	29,7	60	7,86	60,5
120	60,1	120	19,7	72,5
300	188,1	300	29,5	64,8
500	352,4	500	45,9	65,4
800	585,3	800	69,4	66,4
1000	751,4	1000	68,4	63,8

Таблица 11 – Кинетика реагентов. Результаты теста на кросс-реактивность с AMP

0 нг/мл AMP												
Время (мин)	Тест	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Сигнал (мВ)	T ₁	755	792	817	831	840	844	849	851	852	853	855
	T ₂	663	674	681	688	691	694	698	700	701	701	704
	T ₃	747	759	765	771	775	779	783	783	785	786	786
Среднее значение		722	742	754	763	767	772	776	778	779	780	782
8000 нг/мл AMP												
Время (мин)	Тест	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Сигнал (мВ)	T ₁	668	710	729	751	765	771	772	783	792	796	798
	T ₂	662	675	682	695	712	727	734	739	742	744	746
	T ₃	706	718	729	738	745	746	749	755	756	757	759
Среднее значение		679	701	713	728	741	748	752	759	763	766	768
3000 нг/мл AMP												
Время (мин)	Тест	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Сигнал (мВ)	T ₁	582	620	664	691	710	722	729	734	736	739	741
	T ₂	612	665	690	702	705	716	726	731	733	735	736
	T ₃	619	644	670	688	700	706	709	712	713	716	718
Среднее значение		604	643	675	694	705	715	721	726	727	730	732
1000 нг/мл AMP												
Время (мин)	Тест	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Сигнал (мВ)	T ₁	723	738	746	758	766	770	773	775	777	777	779
	T ₂	622	679	703	721	729	734	736	737	738	740	741
	T ₃	744	762	775	783	786	788	789	791	792	793	793
Среднее значение		696	726	741	754	760	764	766	768	769	770	771

Примечание. AMP – амфетамин.

Как можно заметить, в таблице 11 измеренный уровень сигнала (мВ) калибраторов практически соответствует значению сигнала контрольного образца мочи. Это говорит о том, что кросс-реактивность с АМР у данного реагента не наблюдается. Кроме того, по данным из таблицы 11 можно проследить кинетику исследуемых реагентов во времени. Она разъясняет рекомендации производителя в руководстве по эксплуатации [24] начинать считывание результатов с реагентов не ранее чем через 12 минут, так как происходит постепенная стабилизация сигнала.

3.1.2 Анализ результатов измерений, полученных на анализаторе IK 200609

Для оценки качественных параметров производительности теста в анализах широко используются таблицы сопряженности. Они показывают распределение одной переменной в строках, а другой в столбцах, используется для изучения связи между этими двумя переменными. Результат качественного метода сравнивается с результатами, полученными с использованием подтверждающих методов анализа. Из этой таблицы можно рассчитать несколько параметров производительности и два прогностических значения. Одна из главных особенностей этого подхода заключается в том, что он дает общее представление о том, как осуществляется качественный метод, но он не дает индивидуальную информацию, так как вероятность ошибки для каждого образца не вычисляется. Следует также отметить, что все образцы должны быть проанализированы с использованием как качественных скрининговых, так и подтверждающих методов.

Объекты перед ИХА исследованием первоначально были разделены на две равные группы: по 65 образцов мочи с достоверно доказанным наличием («положительные» пробы) и отсутствием («отрицательные» пробы) в них синтетических катионов (их метаболитов) методом ГХ-МС (референтный метод). В двух исследуемых группах биообъектов в ряде образцов мочи было также подтверждено наличие других наркотических средств, сильнодействующих и психотропных веществ, а также лекарственных препаратов. В 37% из 65 «положительных» проб мочи содержались только α -PVP и его метаболиты. В 30% из 65 «отрицательных» проб мочи наличие контролируемых психоактивных

веществ референтным методом не было установлено. Результаты проведенного исследования представлены в таблице сопряженности (табл. 12) [21].

В процессе исследования было зафиксировано семь ложноположительных и три ложноотрицательных результатов. Для того чтобы оценить диагностическую эффективность метода ИХА с учетом последствий ложноположительных результатов, был проведен ROC-анализ по результатам измерений синтетических катинонов, указанных в таблице 12 и по формулам расчета операционных характеристик (формулы 1– 9). Полученные результаты сведены в таблицу 13.

Таблица 12 – Результаты обнаружения синтетических катинонов методом ИХА в образцах мочи на анализаторе ИК 200609 [21]

		Факт употребления катинонов (ГХ-МС)		Всего
		Присутствие	Отсутствие	
Т Е С Т	Положительные	62 (TP)	7 (FP)	69
	Отрицательные	3 (FN)	58 (TN)	61
	Всего	65	65	130

Примечание.

TP – истинно положительный результат, результат совпал в двух методах

FP – ложноположительный результат, результат референтного метода отрицательный

FN – ложноотрицательный результат, результат референтного метода положительный

TN – истинно отрицательный результат, результат совпал в двух методах

Данные по результатам измерений использовали для расчетов ROC-анализа.

Расчет чувствительности (Se):

$$Se = \frac{62}{62 + 3} \times 100\% = 95,4\% \quad (14)$$

Расчет специфичности (Sp):

$$Sp = \frac{58}{7 + 58} \times 100\% = 89,2\% \quad (15)$$

Расчет точности (Ac):

$$Ac = \frac{62 + 58}{62 + 58 + 3 + 7} \times 100\% = 92,3\% \quad (16)$$

Прогностичность положительного результата (PV+):

$$PV+ = \frac{62}{62 + 7} \times 100\% = 89,9\% \quad (17)$$

Прогностичность отрицательного результата (PV-):

$$PV- = \frac{58}{58 + 3} \times 100\% = 95,1\% \quad (18)$$

Отношение правдоподобия положительного результата (Lr+):

$$Lr+ = \frac{0,954}{1 - 0,892} = 8,83 \quad (19)$$

Отношение правдоподобия отрицательного результата (Lr-):

$$Lr- = \frac{1 - 0,954}{0,892} = 0,05 \quad (20)$$

Таблица 13 – Операционные характеристики метода диагностики

Расчетные параметры метода диагностики	Значение, %
Расчет чувствительности (Se):	95,4%
Расчет специфичности (Sp):	89,2%
Расчет точности (Ac):	92,3%
Прогностичность положительного результата (PV+):	89,9%
Прогностичность отрицательного результата (PV-):	95,1%
Отношение правдоподобия положительного результата (Lr+)	8,83
Отношение правдоподобия отрицательного результата (Lr-)	0,05

Учитывая, что согласно ГОСТ Р 51352-2013 оптимальным порогом является достижение чувствительности свыше 90%, метод предварительного скрининг-исследования, реализуемый в указанном аппаратно-программном исполнении, соответствует предъявляемым требованиям, параметры специфичности согласно полученным данным практически близки к уровню чувствительности, особенно с учетом прогностичности получаемых результатов [6].

3.1.3. Построение ROC-кривой согласно распределению по категориям решений

Одним из способов построения ROC-кривой осуществляется согласно распределению по категориям решений. Для этой цели верифицированные две группы проб от обследуемых лиц (употреблявшие и не употреблявшие

синтетические катиноны) распределили в несколько подгрупп. В нашем случае в группах было по 65 человек. Затем составлялась таблица распределения по диапазону концентраций. Полученные таким образом данные сводили в таблицах 14 и 15 и по ним строили ROC-кривую.

Для построения первой точки на оси ординат в качестве истинно положительного решения рассматривается решение с максимальной уверенностью (категория 5), т.е. 11 наблюдений. Это число относится к числу всех употреблявших катиноны, т.е. к 65. Получается значение первой точки ординаты (11/65) – 0,17 (табл. 14). Точка на оси абсцисс определяется как отношение ложноположительных решений по этой же 5-й категории (их 4) ко всем здоровым лицам, т.е. к 65.

Получается значение точки на оси абсцисс, равное 0. Таким образом, координаты первой точки ROC-кривой № 1 равны 0 и 0,17. Подобным образом вычисляются точки ординаты и абсциссы для остальных категорий решений. При этом каждая последующая ячейка таблицы рассчитывается как сумма текущей и всех предыдущих категорий (например, значение точки №3 рассчитывается (46+11+5)/65).

Таблица 14 – Распределение по категориям оценок

Фактическое состояние	Категории решений					Всего
	1	2	3	4	5	
	Нет данных	1-10 нг/мл	10-100нг/мл	100-1000нг/мл	>1000нг/мл	
Употребляли катиноны	1	2	5	46	11	65
Не употребляли катиноны	39	16	10	0	0	65

Таблица 15 – Значения точек для построения ROC-кривой

Ось	Значение точек ROC-кривой				
Ордината	0,17	0,88	0,95	0,98	1
Абсцисса	0	0	0,15	0,4	1

В итоге на основании приведенной таблицы 15 была построена ROC-кривая (рис. 24).

ROC-кривая

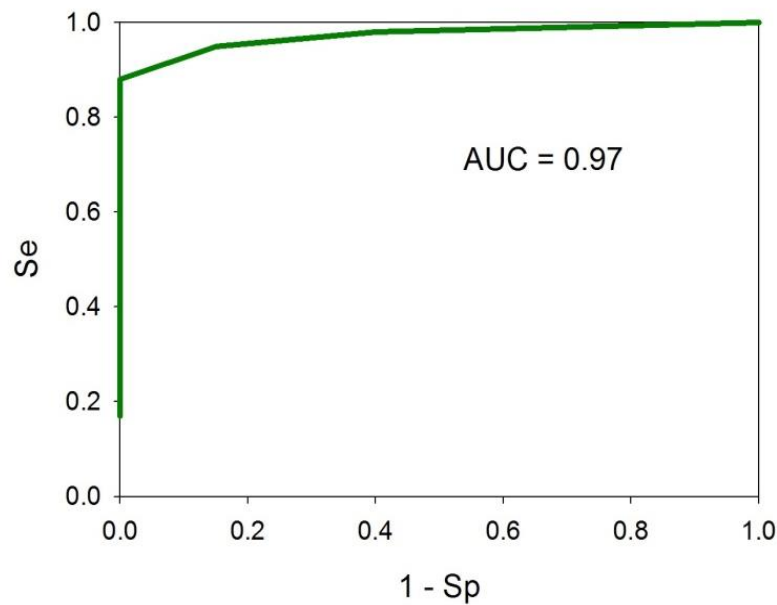


Рисунок 24 – ROC-кривая согласно распределению по категориям решений (по оси ординат истинно положительные, т.е. чувствительность, по оси абсцисс ложноположительные, или 1 – специфичность)

Принято считать, что коэффициент площади под кривой, находящийся в интервале 0,9-1,0, следует рассматривать как показатель наивысшей информативности диагностического метода: 0,8-0,9 – хорошей, 0,7-0,8 – приемлемой, 0,6-0,7 – слабой, 0,5-0,6 – чрезвычайно слабой.

Анализ площади под ROC-кривой (в нашем случае значение 0,97) позволяет сделать вывод, что качество модельного теста можно отнести к категории «отличное» (табл.7).

3.1.4. Установление пороговых значений по данным ROC-анализа

Одним из способов определения оптимального значения порогового значения является графическое представление «cut-off» (рис. 25) в виде точки пересечения двух кривых чувствительности и специфичности по результатам расчетов операционных характеристик диагностического метода исследования. На основании полученных данных, была сформирована таблица 16.

●-лица с положительными ИХА результатами.

График зависимости чувствительности и специфичности от логарифма концентрации ($\lg(c)$). Чувствительность (зеленая линия) увеличивается от 0% до 100% при $\lg(c)$ от 0.4 до 1.8. Специфичность (красная линия) уменьшается от 100% до 0% в том же диапазоне. Точка пересечения находится при $\lg(c) \approx 1.2$ и $\% \approx 60$.

$\lg(c)$	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
0.4	0.0	1.0
0.5	0.1	0.95
1.0	0.5	0.78
1.2	0.6	0.6
1.5	0.8	0.3
1.8	1.0	0.0
2.0	1.0	0.0
2.5	1.0	0.0
3.0	1.0	0.0

Пороговое значение из ROC-анализа при использовании этого критерия – точка пересечения двух кривых, когда на оси абсцисс откладывают порог отсека, а на оси ординат – специфичность и чувствительность модели.

Таким образом получается, что «cut-off» должен составлять 101,2, что равняется 15,8 нг/мл.

3.1.5. Анализ кривых распределения

Согласно Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ» от 27 января 2006 года № 40 в адрес главного внештатного специалиста Минздрава России по аналитической и судебно-медицинской токсикологии поступают отчеты о работе химико-токсикологических лабораторий наркологических диспансеров (наркологических больниц) Российской Федерации (отчетная форма №59) [3]. В этих отчетах содержатся сведения об обнаруженных психоактивных веществах в пробах обследуемых лиц (алкоголя, наркотических средств и психотропных веществ) в разных регионах страны. Обработка данных отчетов позволила оценить фоновую обстановку по синтетическим катинонам – оценка вероятности встречаемости синтетических катинонов в пробах лиц, подозреваемых в употреблении вышеупомянутых психоактивных веществ, и направляемых на освидетельствование органами внутренних дел и медицинскими организациями. Полученные результаты (всего освидетельствованных лиц на НС и ПВ в выбранных регионах и количество случаев обнаружения синтетических катинонов) использовались при анализе кривых распределения результатов тестирования, рассматриваемого ниже.

Согласно данным, приведенным в таблице 17, вероятность встречаемости лиц, употребляющих синтетические катиноны, среди лиц, попадающих на предварительный метод исследования (ИХА), составляет:

$$p = \frac{\text{Подтвержденные_катиноны}}{\text{Всего_НС_ПВ}} = \frac{5\,206}{223\,626} = \frac{1}{43} \quad (21)$$

Вероятность отсутствия синтетических катинонов среди лиц, попадающих на ИХА, составляет:

$$1 - p = \frac{223\,626 - 5\,206}{223\,626} = 1 - \frac{1}{43} \quad (22)$$

Эти значения будут учитываться при оценке величины «cut-off» по анализу распределений результатов, полученных методом ИХА, и построенных с учетом подтверждающего метода анализа (ГХ-МС) [21].

Таблица 17 – Статистика обнаружения синтетических катинонов по регионам Российской Федерации

Регион РФ	Всего освидетельствованных на НС и ПВ	Подтверждено наличие НС и ПВ	Обнаружены синтетические катиноны	Найдены иные НС и ПВ
Алтайский краевой наркологический диспансер, г. Барнаул	23005	2183	539 (4 из них подростки 15-17 лет)	1644
Республиканский наркологический диспансер, г. Грозный	29807	694	40	654
Республиканский наркодиспансер Республика Коми, Сыктывкар	8627	1266	496 (17 из них подростки 15-17 лет)	770
Оренбургский наркодиспансер, г. Оренбург	44101	1899	454 (7 из них подростки 15-17 лет)	1445
Ростовский наркодиспансер, г. Ростов-на-Дону,	56895	2016	940 (10 из них подростки 15-17 лет)	1076
Волгодонский наркодиспансер, г. Волгодонск	9291	1874	64 (10 из них дети до 14 лет)	1810
Рязанский областной наркодиспансер, г. Рязань	9018	2114	929 (29 из них подростки 15-17 лет)	1185

Регион РФ	Всего освидетельствованных на НС и ПВ	Подтверждено наличие НС и ПВ	Обнаружены синтетические катиноны	Найдены иные НС и ПВ
Сахалинский областной наркодиспансер, г. Южно-Сахалинск	19704	1584	366 (3 из них подростки 15-17 лет)	1218
Краевой наркодиспансер, Ставропольский край, г. Ставрополь	19595	4585	1332 (5 из них подростки 15-17 лет)	3253
Смоленский областной наркодиспансер, г. Смоленск	3583	860	46	814
Итого	223 626	19 075	5 206	13 869

Примечание. *Данные приведены для регионов с предоставленной информацией о выявленных синтетических катинонах.

На рисунке 26 приводятся гистограммы распределения числа лиц по диапазонам концентрации (в логарифмическом масштабе), полученные по результатам измерений ИХА. Показаны две гистограммы для наличия (сиреневый цвет) и отсутствия (циановый цвет) катинонов по результатам подтверждающих измерений методом ГХ-МС.

Гистограммы построены по одинаковому числу измерений (65 для каждой). Цветными кривыми показаны аппроксимации распределений для каждой гистограммы (в относительных единицах), нормированные на равенство интегралов (площадей под кривыми). Для распределения при подтвержденном наличии катинонов построены две кривые: сигмоидная (непрерывная красная) и логнормальная (красная пунктирная). Для подтвержденного отсутствия катинонов выбрано сигмоидное распределение (зеленая кривая). Выбор законов распределения осуществлялся, исходя из профиля гистограмм, т. к. теоретический закон распределения априори неизвестен, а величина выборки не позволяет его определить с уверенностью. Однако для случая с отсутствием катинонов (зеленая кривая) сигмоидное распределение прослеживается достаточно явно в диапазоне измеряемых концентраций. Для случая подтвержденного наличия катинонов выбранные распределения обозначают диапазон возможных кривых.

Анализ кривых распределения позволяет определить граничное (пороговое) значение концентрации, разделяющее положительные и отрицательные результаты.

Анализ кривых распределения

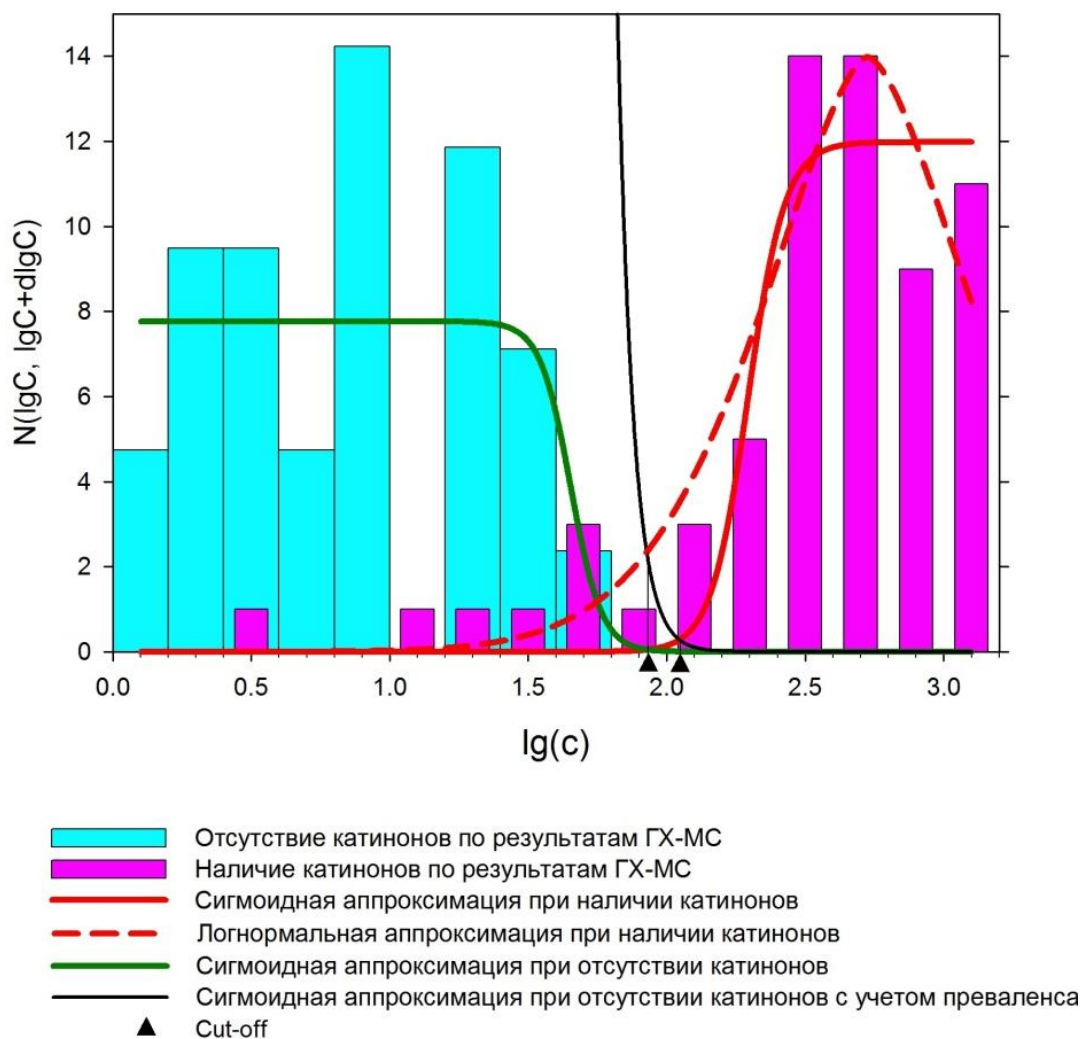


Рисунок 26 – Гистограммы распределения числа лиц по диапазонам концентрации, полученные по результатам измерений ИХА [21]

При этом, при концентрациях выше этого порогового значения вероятность истинно положительного результата превышает вероятность ложно положительного, а при концентрациях ниже – истинно отрицательные результаты преобладают над ложно отрицательными. Следует отметить, что при известных функциях распределения выбор граничного значения может осуществляться и из иных априорных условий (например, заданного отношения истинных и ложных

результатов). Данное пороговое значение концентрации определяется как «cut-off» при анализе распределений. Сама задача такого анализа относится к математическому классу задач распознавания [22]. Задачи данного класса повсеместно встречаются в проблемах науки и техники и имеют решение лишь в вероятностном смысле (не имеют детерминистического решения). Как следует из теории, пороговое значение распознавания (в нашем случае определяемое выше значение «cut-off») должно определяться, исходя из соотношения:

$$p_1 f(x|1) = p_2 f(x|2), \text{ где (23)}$$

p_1 и p_2 – вероятности появления объектов классов 1 и 2;

$f(x|1)$ и $f(x|2)$ – функции распределения для обнаружения объектов классов 1 и 2, нормированные на суммарную единичную вероятность для каждого класса.

В нашем случае к классу 1 относятся подтвержденные отрицательные результаты методом ГХ-МС, а к классу 2 – подтвержденные положительные результаты. Тогда с точностью до нормировочного коэффициента амплитуды кривой, распределение, показанное зеленой кривой на рисунке 26, является функцией $f(x|1)$, а показанное красными кривыми – функцией $f(x|2)$ (с точностью до равенства площадей под данными кривыми). Если бы условия реального тестирования (табл. 17) соответствовали бы условиям эксперимента ИХА (приводимого в данной работе), то величины p_1 и p_2 были бы равны в силу одинакового количества исследуемых образцов (65 каждый): $p_1 = p_2 = 0.5$ (т. е. без учета преваленса) [21].

Но в нашем случае, как следует из реальной статистики таблицы 17, они равны: $p_1 = 1 - p$, а $p_2 = p$, где величина p рассчитана выше из таблицы 17 и составляет 1/43. Тогда для определения истинного «cut-off», соответствующего реальной выборки лиц, попадающих на освидетельствование, функцию $f(x|1)$ (зеленая кривая) следует умножить на величину $p_1/p_2 = (1 - p)/p = 42$.

Эта функция показана на рисунке 26 кривой черного цвета. Таким образом, величина «cut-off» для граничной концентрации разделения между классами 1 и 2 попадает в интервал, отмеченный на рисунке 26 черными треугольниками. Нижняя граница концентрации равна $10^{1.9}$ (80 нг/мл), а верхняя составляет $10^{2.05}$, т.е. 110

нг/мл. Любое значение из этого диапазона может соответствовать «cut-off» исследуемых реагентов для ИХА при реальной выборке (т.е. с учетом преваленса) и отмеченного выше априорного требования на минимизации ошибки на всём интервале измерений. Это позволяет использовать данный уровень «cut-off» (80–110 нг/мл) в практических целях для минимизации затрат при проведении ХТИ, в противном случае, многочисленные пробы с ложноположительными результатами анализа на предварительной стадии ХТИ будут направлены на трудоемкую подтверждающую стадию исследования, стоимость которой относительно высока. Такой оптимальный уровень порогового значения позволит минимизировать количество ложноположительных результатов и практически исключив появление ложноотрицательных результатов. Следует отметить, что найденные значения «cut-off» существенно превышают значение «cut-off», найденное по методике ROC-анализа, явно неучитывающей преваленс в реальной выборке [21]. Еще раз отметим, что вероятность p (один на 43) соответствует обнаружению катинонов среди лиц, попадающих на освидетельствование – не среди всех людей!

3.2 Идентификация синтетических производных катинона и (или) их метаболитов методом ГХ-МС

В качестве подтверждающего метода при определении синтетических катинонов в образцах мочи использовался метод ГХ-МС.

При рекомендуемом нами уровне порогового значения 100 нг/мл для обнаружения синтетических катинонов (и их метаболитов) на стадии предварительного метода исследования, следующим шагом было проверить экспериментально возможность качественной идентификации исследуемых соединений в моче с концентрацией на уровне рассчитанного «cut-off».

Нами была оценена возможность проведения оптимизированной методики пробоподготовки мочи для извлечения веществ, обладающих основными свойствами, и последующего газохроматографического анализа, общая схема которой универсальна и широко применяется в практике химико-токсикологических лабораторий и лабораториях судебно-медицинской экспертизы (п. 2.2.2).

В литературных данных широко применяется анализ новых ПАВ методом ГХ-МС в режиме регистрации масс-спектрометра по выбранным ионам (SIM). Учитывая этот факт, для идентификации образцов мочи с относительно низкой концентрацией аналитов в режиме регистрации масс-спектров SIM были выбраны ионы: 84 m/z , 121 m/z , 126 m/z , 149 m/z для MDPV и 77 m/z , 84 m/z , 105 m/z , 126 m/z , 188 m/z для α -PVP (рис.27).

Детектирование производили путем сравнения полученного масс-спектра пика с библиотечным масс-спектром. При анализе использовали программу автоматизированной системы масс-спектральной деконволюции и идентификации (AMDIS) и библиотеки масс-спектров NIST 14 и SWGDRUG (версия 3.2, октябрь 2017).

Хроматограммы мочи и масс-спектры пиков аналитов, содержащей 100 нг/мл MDPV и 100 нг/мл α -PVP, представлены на рисунках 28–31. Полученные масс-спектры соответствовали масс-спектрам из целевых библиотек NIST 14 и SWGDRUG.

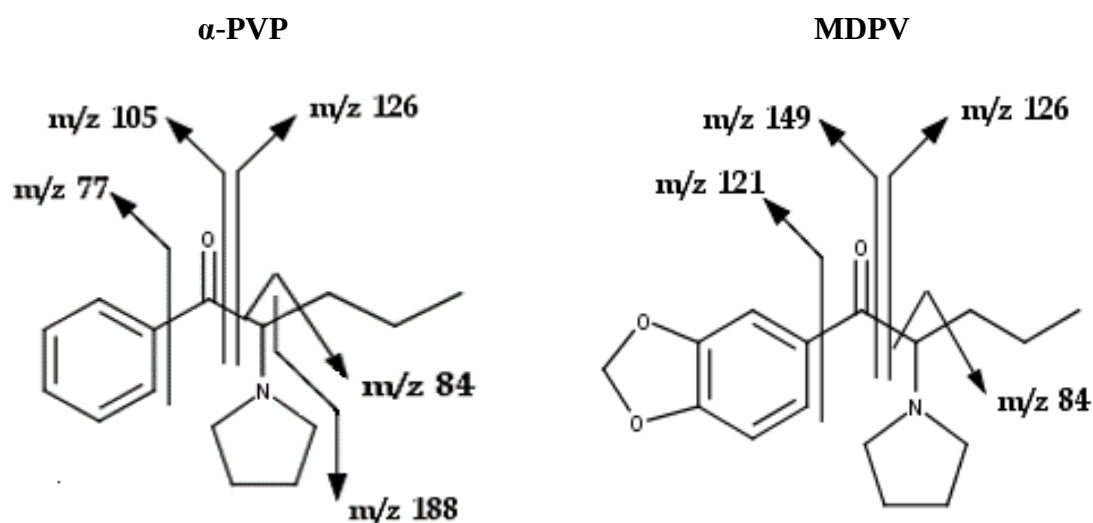


Рисунок 27 – Фрагментация α -PVP и MDPV

Ион с m/z 77 соответствует бензольному фрагменту в молекуле α -PVP, а ион с m/z 121 соответствует 3,4-метилендиоксибензольному фрагменту молекулы MDPV. Фрагментация молекулы с получением иона с m/z 126 – отщепление N-бутилпирролидинового фрагмента.

Для метаболитов с 2-оксо-структурой α -PVP и MDPV характерно образование иона с m/z 98 с интенсивностью более 50% (N-метил-2-оксо-пирролидиновый фрагмент). Ион с m/z 126 в масс-спектре α -PVP, и ион с m/z 140 в масс-спектре 2-оксо-метаболита имеют наибольшие интенсивности. Интенсивности других характеристических ионов в спектре α -PVP не превышают 10%.

Спектрометрия с выбранным ионом с m/z 126 позволяет контролировать присутствие соединений с неизменным пирролидиновым кольцом, а с ионом с m/z 140 – соединений с 2-оксо-структурой.

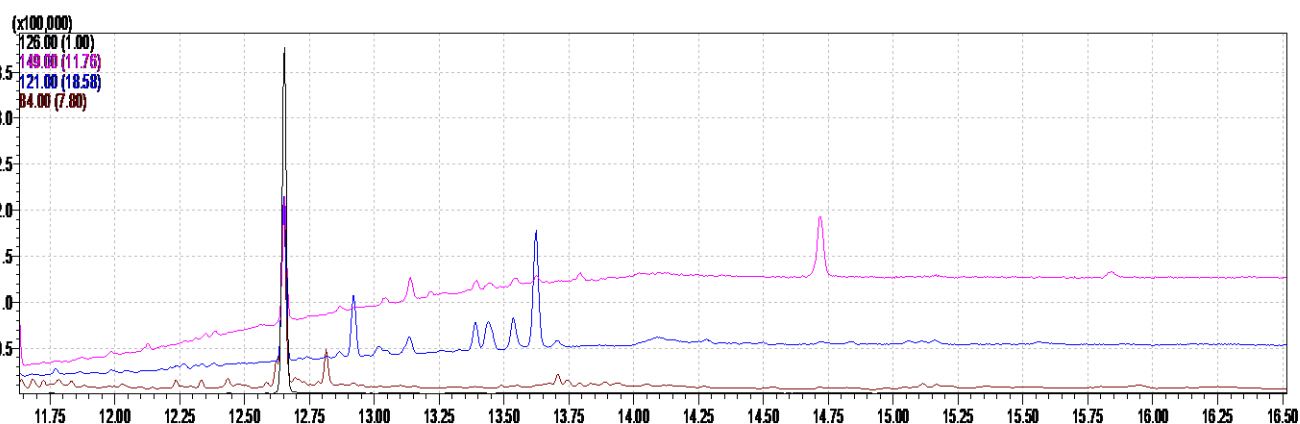


Рисунок 28 – Хроматограмма мочи в режиме сканирования по выбранным ионам (SIM), концентрация MDPV 100 нг/мл. Время выхода MDPV – 12,66 мин.

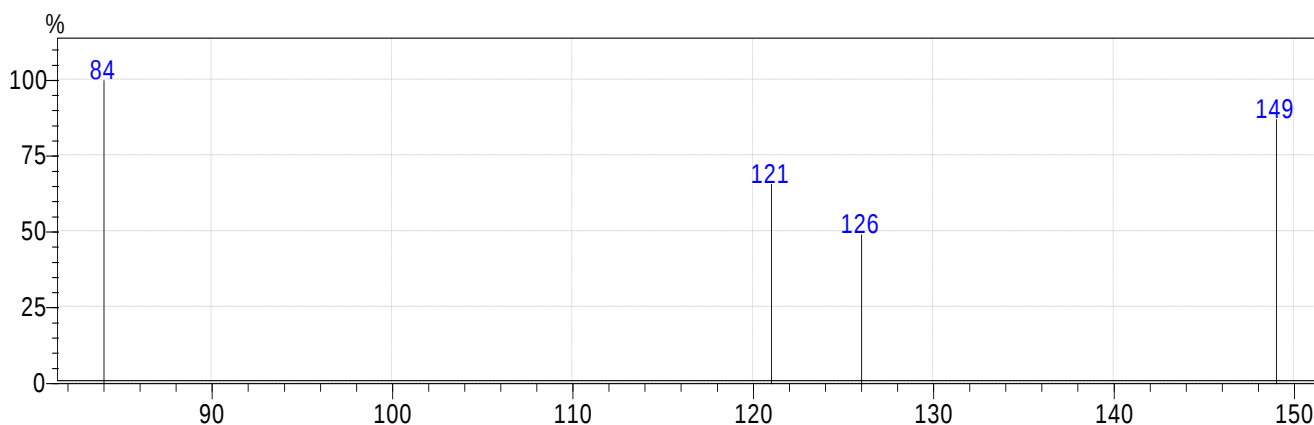


Рисунок 29 – Масс-спектр MDPV в режиме сканирования по выбранным ионам (SIM)

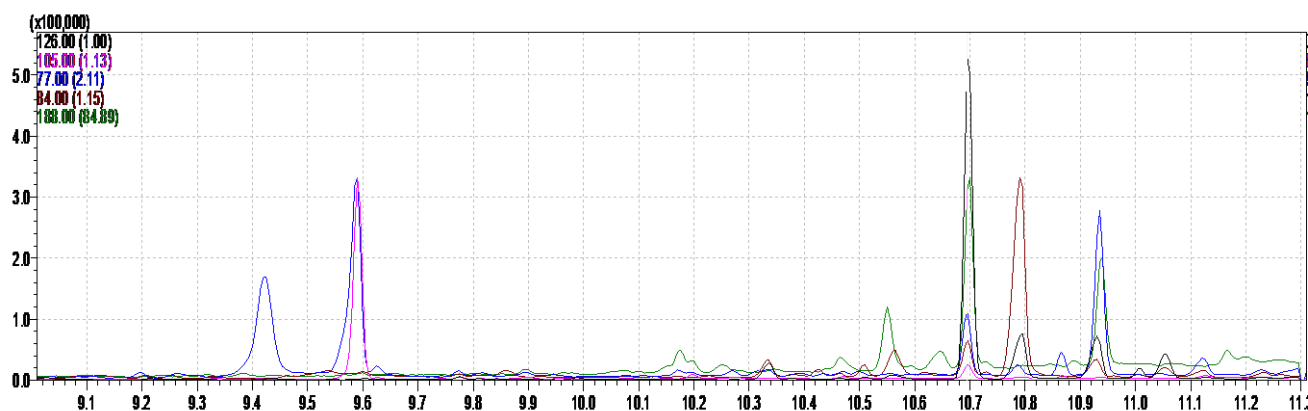


Рисунок 30 –Хроматограмма мочи в режиме сканирования по выбранным ионам (SIM), концентрация α -PVP 100 нг/мл. Время выхода α -PVP – 10,71 мин.

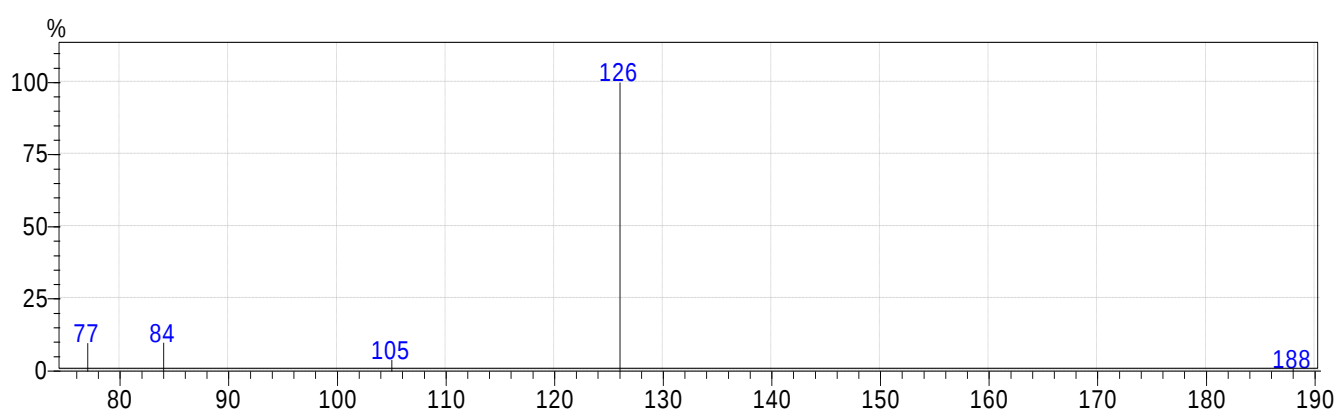


Рисунок 31 – Масс-спектр α -PVP в режиме сканирования по выбранным ионам (SIM)

Отношение сигнала в максимуме пика в момент времени выхода вещества к отношению уровня шума в тот же момент время при сравнении с контрольной пробой (blank) называется отношением сигнал/шум (S/N).

Для методик с инструментальной оценкой результата анализа методами, для которых наблюдается шум базовой линии, в нормативной документации устанавливают минимальное количество определяемого вещества в образце, при котором величина отношения аналитического сигнала к уровню шумов равна 3 [7]. В момент времени выхода MDPV (12,66 мин) отношение сигнал/шум составляет более 10 ($S/N=12$), а в момент времени выхода α -PVP (10,71 мин) данный параметр выше 20 ($S/N=23$). При этом учитывая значения S/N для каждого соединения, можно теоретически говорить об пределе обнаружения около 30 нг/мл. Таким образом, в результате пробоподготовки мочи по данной схеме, мы смогли

идентифицировать исследуемые аналиты в концентрации, соответствующей предложенному уровню порогового значения (100 нг/мл).

Заключительным шагом эксперимента был анализ образцов мочи, содержащих анализируемые вещества.

Синтетические катиноны и (или) их метаболиты зачастую присутствуют в моче в диапазоне относительно высоких концентраций (как правило выше 300 нг/мл, согласно полученным данным), поэтому при анализе на ГХ-МС синтетических катинонов и их производных, выделенные концентрации аналитов во время процедуры пробоподготовки достаточны для анализа в режиме по полному ионному току (SCAN), что позволяет надежно идентифицировать хроматографируемые вещества.

Набор основных метаболитов α -PVP и MDPV наглядно иллюстрируют хроматограммы образцов мочи потребителей данных НС. Пробоподготовка образцов мочи осуществлялась по методике, описанной ранее в п. 2.2.2.

На рисунке 32 представлена хроматограмма мочи, в которой идентифицированы α -PVP (время удерживания 10.71 мин) и метаболиты – 2-оксо- α -PVP (время удерживания 11.82 мин), ОН- α -PVP (время удерживания 10.98 мин). Масс-спектры данных соединений приводятся на рисунках 33– 35. В отобранных на исследование образцах мочи MDPV и его метаболитов обнаружено не было.

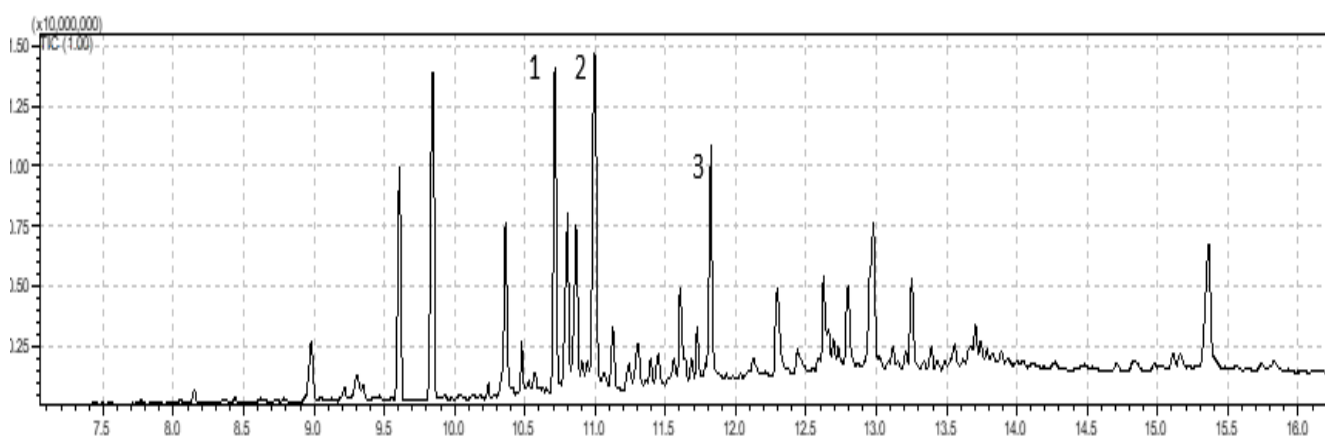


Рисунок 32– Пример хроматограммы мочи, содержащей следующие соединения: 1 – α -PVP, 2 – ОН- α -PVP (метаболит α -PVP), 3 – 2-оксо- α -PVP (метаболит α -PVP)

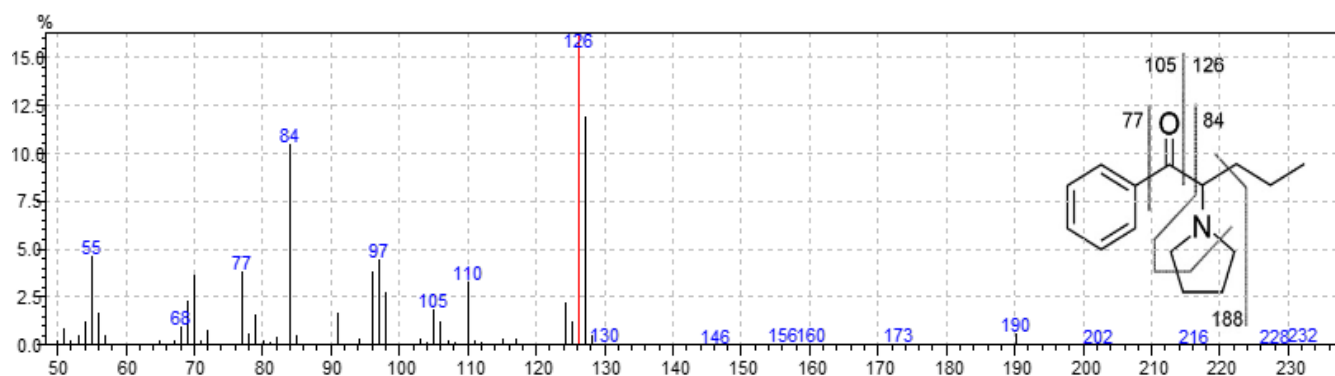


Рисунок 33 – Масс-спектр α-PVP в режиме SCAN

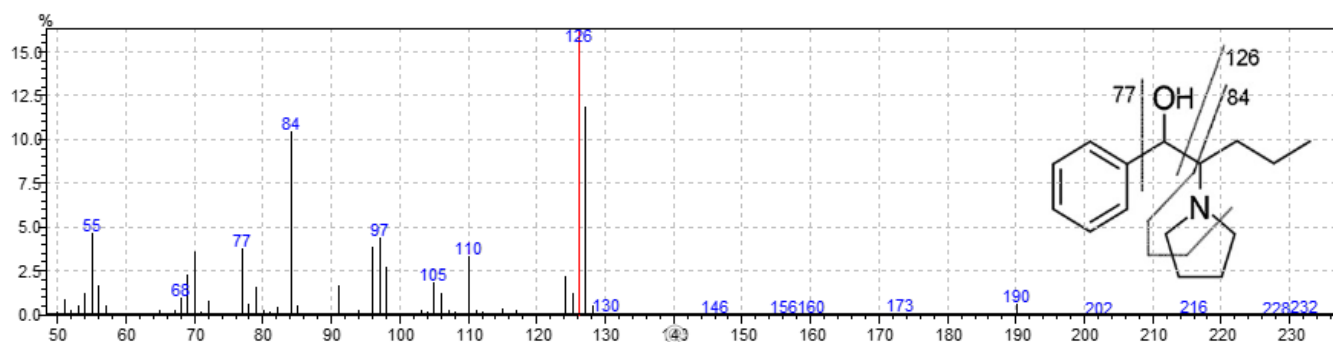


Рисунок 34 – Масс-спектр OH-α-PVP в режиме SCAN

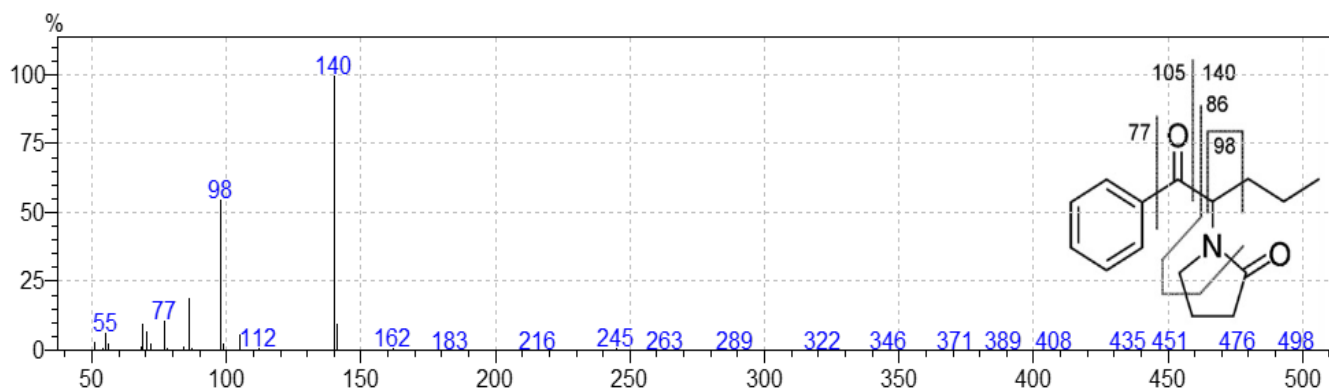


Рисунок 35 – Масс-спектр 2-оксо-α-PVP в режиме SCAN

3.2.1 Влияние гидролиза и дериватизации на сохранность исследуемых анализов

Анализируемые соединения, в случае необходимости, подвергаются предварительной химической модификации (дериватизации) для улучшения летучести, улучшения термической стабильности и для повышения предела детектирования. Гидролиз в кислых условиях может также применяться для идентификации дополнительных (минорных) метаболитов.

Учитывая факт, что в процессе метаболизма α-PVP и MDPV образуются

гидроксированные метаболиты, которые могут образовывать конъюгаты, нами было принято решение оценить влияние проведения гидролиза в кислых условиях и дериватизации в процессе пробоподготовки на сохранность целевых аналитов (их основных метаболитов). Также была изучена возможность получения дериватов.

Для проведения гидролиза в кислых условиях в пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 10 мл добавили 3 мл анализируемой мочи, затем 10 мкл раствора внутреннего стандарта (дифениламин с концентрацией 1 мг/мл) с помощью микрошприца для хроматографии, 300 мкл концентрированной соляной кислоты, закрыли крышкой, поместили в сушижаровой шкаф и выдерживали 30 минут при температуре 95°C. Гидролизат охладили до комнатной температуры, после чего нейтрализовали добавлением 300–350 мкл 40% раствора гидроксида натрия. Контроль pH осуществляли с помощью универсальной индикаторной бумаге.

Далее проводили пробоподготовку по ранее описанной методике (п. 2.2.2), но после стадии упаривания проводили дериватизацию с помощью MBTFA с целью получения трифторацетильных производных. Сухой остаток после упаривания растворили в 20 мкл MBTFA, поместили в сушижаровой шкаф и выдерживали 20 минут при температуре 80°C в герметично закрытом флаконе. После упаривали досуха в токе сухого воздуха при нагревании 50°C. Затем сухой остаток перерастворяли в 100 мкл этилацетата и переносили во вставку для виалы, позволяющей использовать автоматический инжектор для ввода пробы в газовый хроматограф, закрывали виалу крышкой и анализировали методом ГХ-МС при условиях, указанных в п. 2.2.2.

Проанализировав полученные результаты, можно сделать вывод о том, что ОН- α -PVP обнаруживается в моче в свободном состоянии, т.е. его можно идентифицировать без проведения гидролиза. Однако получение трифторацетильного производного значительно улучшает хроматографические параметры этого метаболита, что позволяет его обнаружить в более низких концентрациях. На сохранность α -PVP и его метаболита 2-оксо- α -PVP процедура проведения гидролиза и процесса дериватизации существенно не влияет.

Наличие нативного соединения и метаболита 2-оксо- α -PVP, для обнаружения

которых не требуется дериватизация, позволяет надежно идентифицировать факт употребления α -PVP.

3.3 Оценка экономической эффективности предложенной схемы проведения ХТИ синтетических производных катинона

Для рациональной работы лаборатории, сокращения сроков выполнения лабораторных исследований, экономической эффективности необходимо провести оценку затрат на проведение ХТА конкретного вещества.

В этом экономическом разделе показана методика расчета затрат в пересчете на один образец мочи, согласно предложенной в работе схемы проведения ХТИ синтетических производных катинона (методами ИХА и ГХ-МС), учитывая оборудование и материальные запасы, используемые в данной методике.

Для реализации поставленной цели необходимо было провести расчет затрат на оплату труда основного персонала, затрат на материальные запасы (реактивы и расходные материалы), суммы амортизации оборудования и эксплуатационных расходов на содержание оборудования и инвентаря, после чего выполнить расчет итоговых затрат.

Оплата труда входит в величину стоимости анализа в зависимости от длительности этого анализа. При этом учитывается не только непосредственное время проведения исследования, но и категория специалиста, выполняющего эту работу. Вся работа по проведению анализа, как правило, делится на работу врача клинической лабораторной диагностики (КЛД) и работу среднего медицинского персонала (лаборант, фельдшер-лаборант).

Для расчета затрат на оплату труда основного персонала необходимо средний должностной оклад в месяц, включая начисления на выплаты по оплате труда (руб.) разделить на месячный фонд рабочего времени (час), умноженный на норму времени на оказание платной услуги (час).

Для расчета затрат на материальные запасы необходимо объем потребления (в единицах измерения) умножить на цену за единицу материального запаса (руб.).

Для того, чтобы рассчитать амортизацию оборудования, необходимо выполнить следующие операции: перемножить балансовую стоимость

оборудования (руб.), годовую норму амортизации (%) и время работы оборудования в процессе анализа (час). Полученное произведение разделить на годовую норму времени работы оборудования (час).

Итог рассчитывается путем суммирования всех статей затрат.

Информация о стоимости используемых материалов и оборудования взята из каталогов основных поставщиков лаборатории, где выполнялась экспериментальная часть работы.

Расчет материальных запасов вначале производился на 3000 анализов (оптимальная и обоснованная загрузка прибора с учетом остановки оборудования на профилактическое обслуживание и иных операций, проводимых в моменты между анализами), после чего был выполнен расчет стоимости материальных запасов на один анализ. Для оценки затрат разработанной методики исследования была взята за основу форма расчета, регламентированная Приказом МЗ РФ от 25 декабря 1997 г. № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Для расчета затрат на оплату труда основного персонала взяты средние должностные оклады врача КЛД и лаборанта ХТЛ в г. Москва и сведены в таблицу 18.

Уровень заработной платы существенно зависит от региона, поэтому эта статья расходов бесспорно во многом влияет на формирование общей стоимости анализа.

Для установления затрат рабочего времени на проведение исследований использовался метод хронометража, в котором изучается длительность циклически повторяющихся операций при выполнении анализа. В хронометражных исследованиях учитывались операции, выполняемые вручную специалистом в процессе пробоподготовки мочи по предлагаемой методике в п. 2.2.2, при проведении анализа ГХ-МС и на этапе скрининга с применением анализатора ИК 200609.

Таблица 18 – Расчет затрат на оплату труда основного персонала (ГХ-МС)

Должность	Средний должностной оклад в месяц, включая начисления на выплаты по оплате труда (руб.)	Месячный фонд рабочего времени (час)	Норма времени на оказание платной услуги (час)	Затраты на оплату труда персонала (руб.)
Врач КДЛ	93 464,91	147,70	0,5	316,40
Лаборант	71 187,71	147,70	0,29	139,78
ИТОГО				456,18

Данные расчета затрат на материальные запасы (реактивы и расходные материалы) представлены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19 – Затраты на материальные запасы (реактивы) на 3000 анализов

№	Товары (работы, услуги)	Производитель, страна происхождения	Ед.изм.	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
1	Метанол для ВЭЖХ (градиентный), в упаковке 1 канистра (2,5л.)	J.T. Baker, США	уп	12	5 300,00	63 600,00
2	Этилацетат для ВЭЖХ, в упаковке 1 канистра (1л.)	J.T. Baker, США	уп	15	6 700,00	100 500,00
3	Дихлорметан для ВЭЖХ в упаковке 1 канистра (2,5л.)	J.T. Baker, США	уп	3	3 150,00	9 450,00
4	Пропанол-2 для ВЭЖХ, в упаковке 1 канистра (2,5л.)	J.T. Baker, США	уп	1	3 000,00	3 000,00
5	н-Гексан для ВЭЖХ (95%), в упаковке 1 канистра (1л.)	J.T. Baker, США	уп	3	4 100,00	12 300,00
6	Бикарбонат натрия ч.д.а. BioXtra, 99.5-100.5% в упаковке 1 канистра (1кг.)	Sigma-Aldrich, США	уп	2	16 800,00	33 600,00
7	Карбонат натрия ч.д.а. BioXtra, ≥99.0% в упаковке 1 канистра (1кг.)	Sigma-Aldrich, США	уп	2	11 500,00	23 000,00
8	Хлорид натрия х.ч. Sodium chloride ≥99.5% в упаковке 1 канистра (1кг.)	Fluka, Германия	уп	2	950,00	1900,00
	ИТОГО					247 350,00
	ИТОГО (1 анализ)					82,45

Таблица 20 – Затраты на материальные запасы (расходные материалы) на 3000 анализов

№	Товары (работы, услуги)	Производитель, страна происхождения	Ед.изм	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
1	ILVDAC-200-1000 Комплект вкл.виалы деактивированные из темного стекла на 2 мл, крышки синие с центр. отверстием, трехслойные септы, 1000 шт./уп.	ООО ИНТЕРЛАБ, Россия	уп	3	64 050,00	192 150,00
2	ILIGD-250-100 Стеклянные вставки объемом 250 мкл, для виал 2 мл, 100 шт/уп.	ООО ИНТЕРЛАБ, Россия	уп	30	5 228,00	156 840,00
3	Наконечники до 1000 мкл (от 100 мкл), 10x1000 шт., Gilson	http://www.diam.ru/	уп	2	17 909,80	35 819,60
4	Наконечники до 300 мкл (от 20 мкл), 10x1000 шт., Gilson	http://www.diam.ru/	уп	2	17 909,80	35 819,60
5	Колонка капиллярная DB-5MS Ultra Inert 30 м, 0.25 мм, 0.25 мкм 122-5532UI	Agilent Technologies, США	шт	3	50 040,00	150 120,00
6	Гелий газообразный (сжатый) высокой чистоты, в баллонах марка 7.0	НИИ КМ, Москва	шт	8	9 224,06	73 792,48
7	Комплект фильтров для газов Trap, Big O2, 1/4 in BOT-4	Agilent Technologies, США	шт	1	25 400,00	25 400,00
8	Перчатки диагностические (смотровые) из натурального латекса, размер L	Топ глав СДН БХД, Малайзия	уп	20	350,00	7 000,00
	ИТОГО					676 941,68
	ИТОГО (1 анализ)					225,65

Результаты расчета суммы амортизации оборудования внесены в таблицу 21.

Таблица 21 – Сумма затрат на амортизацию оборудования

№	Наименование объекта	Балансовая стоимость оборудования, руб.	Годовая норма амортизации, %	Годовая норма работы, час	Время работы в процессе анализа, час	Сумма начисленной амортизации, руб.
1	Газовый хроматограф-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (Япония)	7 500 000,00	10	1970	1,0	380,71
2	Весы аналитические Mettler Toledo XS205 DualRange (США)	751 712,5	10	1970	0,2	7,63
3	Центрифуга CM-6.03 ELMi (Латвия)	65 178,08	20	1970	0,05	0,33
4	Сухожаровой шкаф FD 115 Binder GmbH (Германия)	168 112,15	10	1970	0,83	7,08
5	Шейкер MSV-3500 BioSan (Латвия)	29 392,20	14,3	1970	0,08	0,17
6	Выпариватель Reacti-Therm TS 18824/TS 18826 (США)	145 236,32	14,3	1970	0,17	1,79
ИТОГО						397,71

В работе также показано, что при необходимости исследования минорных метаболитов, требуется проводить гидролиз и дальнейшую дериватизацию. В таблице 22 представлены затраты на реактивы (с указанием стоимости на один анализ), которые потребуется для выполнения данных операций на этапе пробоподготовки.

Результаты расчета материалозатрат на выполнение одного анализа методом ГХ-МС сведены в таблицу 23. Графически это отображено на рисунке 35.

Таблица 22 – Расход реактивов в случае проведения гидролиза и дериватизации на 3000 анализов

№	Товары (работы, услуги)	Производитель, страна происхождения	Ед.изм.	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
1	N-метил-бис- (трифторацетамид) MBTFA 65943-25ML N-Methyl- bis(trifluoroacetamide) for GC derivatization, 25 мл	Sigma-Aldrich, США	уп	3	99 710,00	299 130,00
2	Хлористоводородная кислота (36.5-38.0%) Hydrochloric acid (0,5 л)	Sigma-Aldrich, США	уп	2	8000,00	16 000, 00
3	Гидроксид натрия ч.д.а. Sodium hydroxide BioXtra, ≥98% (acidimetric), pellets (anhydrous) (2кг) в упаковке 1 канистра по 1 кг.	Sigma-Aldrich, США	уп	2	10 700,00	21 400,00
	ИТОГО					336 530,00
	ИТОГО (1 анализ)					112,20

Таблица 23 – Себестоимость одного анализа методом ГХ-МС

Наименование статей затрат	Сумма, руб.
Затраты на оплату труда основного персонала, участвующего в оказании платной услуги	456,18
Затраты на приобретение реактивов	82,45
Затраты на приобретение расходных материалов	225,65
Сумма амортизации оборудования	397,70
Затраты на приобретение реактивов для процедуры гидролиза и дериватизации (при необходимости)	112,20
Итого затрат	1274,18

Таким образом, затраты на проведение одного химико-токсикологического анализа методом газовой хромато-масс-спектрометрии составляют 1274,18 рублей.



Рисунок 36 – Дифференциация затрат по статьям расходов на проведение ХТИ синтетических производных катинона методом ГХ-МС

Произведенные расчеты наглядно показывают, что затраты на оплату труда основного персонала, участвующего в проведении анализа методом ГХ-МС, вносят значительный вклад в формирование стоимости проведения исследования. Данная статья расходов занимает 35,8% от общей стоимости анализа, что объясняется высокой трудоемкостью и большим количеством времени на проведение всех операций пробоподготовки биологического объекта. Наибольшую долю в затратах на материальные запасы занимают расходные материалы (17,7% от общих расходов). Это связано с тем, что во избежание контаминации большая часть расходных материалов используется однократно в ХТА для исключения риска получения ложноположительных/ложноотрицательных результатов. Затраты на основные реактивы значительно ниже по сравнению с расходными материалами (почти в 3 раза) даже несмотря на то, что в процессе работы использовались реактивы импортного производства. В России производство этих реагентов отсутствует, но специфика разработанного метода анализа, включая методику пробоподготовки и тип применяемого аналитического оборудования, позволяет использовать мили- и микроколичества этих реагентов для проведения аналитического исследования.

Из-за использования высокотехнологичного и многофункционального аналитического оборудования, затраты на его амортизацию крайне высоки (31,2% от общих расходов на анализ). Значительную часть из этих расходов составляют амортизационные отчисления на систему ГХ-МС (свыше 95%), несмотря на высокий гарантийный срок эксплуатации, заявленный предприятием изготовителем (Shimadzu) – 10 лет; амортизация высока за счёт относительно высокой стоимости системы (7 500 000,00 рублей).

Также была произведена калькуляция затрат на оплату труда, на расходные материалы, необходимые для выполнения иммунохимического анализа с применением анализатора ИК 200609, а также рассчитаны затраты на амортизацию прибора, представленные в таблицах 24, 25 и 26 соответственно.

Результаты расчета себестоимости одного анализа методом ИХА сведены в таблицу 27 и в графическом выражении представлено на рисунке 36.

Таблица 24 – Расчет затрат на оплату труда основного персонала (ИХА)

Должность	Средний должностной оклад в месяц, включая начисления на выплаты по оплате труда (руб.)	Месячный фонд рабочего времени(час)	Норма времени на оказание платной услуги (час)	Затраты на оплату труда персонала (руб.)
Лаборант	71 187,71	147,70	0,054	26,02
ИТОГО				26,02

Таблица 25 – Затраты на материальные запасы (расходные материалы) на 50 анализов

№	Товары (работы, услуги)	Производитель, страна происхождения	Ед. изм.	Кол-во	Цена	Сумма
1	Реагент диагностический-иммунохроматографический тест, R1 ИК 200609 (Амфетамины (АМР, катионы-MDPV, А-PVP, А-RHP))	ООО «ЕВРОДИАГНОСТИК», Россия	шт	50	336,00	16 800,00
2	Лента регистрационная бумажная с тепловой записью в рулонах, 57ммх10м, вт.12мм	ООО «ЕВРОДИАГНОСТИК», Россия	шт	1	87,00	87,00
3	Контейнер 120 мл с винтовой крышкой для сбора биоматериала, в инд.упаковке, стерильный	Апекслаб, Россия	шт	50	5,00	250,0
4	Перчатки диагностические (смотровые) из натурального латекса, размер L	Топ глав СДН БХД, Малайзия	уп	1	350,00	350,00
	ИТОГО					17 487,00
	ИТОГО (1 анализ)					349,74

Таблица 26 – Сумма затрат на амортизацию оборудования

№	Наименование объекта	Балансовая стоимость оборудования, руб.	Годовая норма амортизации, %	Годовая норма работы, час	Время работы в процессе анализа, час	Сумма начисленной амортизации, руб.
1	Анализатор для химико-токсикологических исследований ИК 200609	281 555,00	20	1974	0,02	5,71
	ИТОГО					5,71

Таблица 27 – Себестоимость одного анализа методом ИХА

Наименование статей затрат	Сумма (руб)
Затраты на оплату труда основного персонала, участвующего в оказании платной услуги	26,02
Затраты на приобретение расходных материалов	349,74
Сумма амортизации оборудования	5,71
Итого затрат	381,47

Таким образом, затраты на проведение одного химико-токсикологического анализа, методом иммунной хроматографии с применением анализатора ИК 200609 и диагностических реагентов для обнаружения синтетических катинонов в моче составляют 381,47 рублей.



Рисунок 37 – Дифференциация затрат по статьям расходов на проведение ХТИ синтетических производных катинона методом ИХА

Произведенные выше расчеты наглядно показывают, что наибольшую долю в общие материалозатраты на анализ вносят реагенты диагностические для ИХА (более 90% от общих расходов). Незначительные затраты на амортизацию оборудования можно объяснить малым временем эксплуатации на один анализ (в среднем около минуты).

Затраты на оплату труда персонала, участвующего в проведении анализа

метод ИХА с применением анализатора ИК 200609 вносят также незначительный вклад в формирование стоимости проведения исследования по сравнению с аналогичной статьей расходов в случае анализа методом ГХ-МС (в 5 раз меньше). Данная статья расходов занимает 6,82% от общей стоимости анализа, что объясняется быстротой выполнения анализа и автоматизацией процесса.

Проведение предварительных исследований методом ИХА в аппаратно-программном исполнении позволяет говорить об его экономической эффективности за счет отсутствия этапа пробоподготовки биообразца. Еще одно его преимущество – метод прост и быстр в использовании, а автоматизация процесса детекции позволяет исключить субъективность в оценке результата тем самым понизить категорию специалиста для его проведения (лаборант).

Как видно из расчета затрат, себестоимость проведения анализа методом ИХА (с применением анализатора ИК 200609 и реагентов диагностических) на этапе скрининга составит 381,47 рублей, а себестоимость анализа на подтверждающей стадии ХТИ методом ГХ-МС – 1274,18 рублей, общая стоимость ХТИ одного образца мочи на синтетические производные катинона составит 1655,65 рублей. Расчет себестоимости ХТИ одного биообъекта произведен без учета покрытия издержек учреждения на оказание данной услуги (содержание зданий, административного персонала и т.д.), уровня рентабельности согласно конъюнктуре рынка и повышающего коэффициента в отношении услуг, оказываемых в условиях, отличных от нормальных (в ночное время, в выходные и праздничные дни).

Таким образом, в диссертационной работе наглядно показана возможность снижения расходов лаборатории и повышение ее экономической эффективности с внедрением разработанной двухстадийной системы ХТИ, учитывая вероятность встречаемости лиц, злоупотребляющих синтетическими производными катинона и тот факт, что отрицательный результат на этапе скрининга имеет доказательное значение (согласно действующим нормативно-правовым актам), и образец мочи не передается на вторую, более затратную стадию ХТИ.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Выполнена статистическая обработка полученных экспериментальных данных с применением ROC-анализа, установлен уровень порогового значения («cut-off») и проведен анализ площади под ROC-кривой (AUC), что позволило отнести качество модельного теста к категории «отличное».

2. Произведен расчет операционных характеристик метода диагностики и установлены параметры чувствительности и специфичности аналитического комплекса (анализатор ИК 200609 и диагностические реагенты для обнаружения синтетических катинонов в моче). Метод предварительного скрининг-исследования, реализуемый в указанном аппаратно-программном исполнении, соответствует предъявляемым требованиям согласно ГОСТ Р 51352-2013.

3. Проведён анализ кривых распределения с учетом преваленса и установлен рекомендуемый в практике уровень порогового значения («cut-off»).

4. Проверено влияние гидролиза и дериватизации в процессе пробоподготовки мочи на сохранность исследуемых аналитов.

5. Представлен расчет затрат на проведение химико-токсикологического анализа методом иммунной хроматографии с применением аналитического комплекса и методом газовой хромато-масс-спектрометрии.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучены свойства токсикологически значимых синтетических производных катинона и их метаболитов с применением программного обеспечения ACD/Labs и платформы ACD/Percepta и доказано, относительно теоретических расчетов, что – α -PVP и MDPV и их основные метаболиты эффективно изолируются в щелочных условиях (pH 8–9).

2. Рассчитан уровень порогового значения («cut-off») по данным ROC-анализа (15,8 нг/мл), и по результатам проведенного статистического анализа кривых распределения впервые экспериментально установлен «cut-off» с учетом преваленса синтетических катинонов в Российской Федерации с целью их достоверного обнаружения в моче (100 нг/мл).

3. Оптимизирована методика иммунохроматографического исследования в аппаратно-программном исполнении с учетом полученных данных и дана аналитическая оценка применения в практике, согласно ГОСТ Р 51352-2013. Установлена чувствительность аналитического комплекса (анализатор ИК 200609 и реагенты для обнаружения синтетических катинонов) – 95,4%, что соответствует согласно ГОСТ Р 51352-2013 (не менее 90%) для рекомендации к использованию в клинико-диагностической практике. Специфичность аналитического комплекса составила 89,2%, точность – 92,3%.

4. Подобраны оптимальные условия изолирования из мочи α -PVP и MDPV (их метаболитов) и хромато-масс-спектрометрического анализа исследуемых аналитов при проведении ХТИ на уровне порогового значения 100 нг/мл по нативным соединениям. По значению S/N (отношение аналитического сигнала вещества к уровню шумов) для α -PVP и MDPV достигнут предел обнаружения методом хромато-масс-спектрометрии 30 нг/мл.

5. С учетом обоснованного аналитического уровня порогового значения на основе преваленса доказана прогностическая и экономическая эффективность применения предложенной схемы системного химико-токсикологического анализа биобъектов на синтетические катиноны при проведении медицинского

освидетельствования на состояние опьянения, установление факта немедицинского потребления ПАВ, а также при производстве судебно-химических экспертиз. Предложенная схема проведения ХТИ соответствует законодательно установленным требованиям, при этом метод ИХА в аппаратно-программном исполнении обходится в 3 раза дешевле, чем проведение анализа методом ГХ-МС, что позволит лаборатории существенно снизить общие издержки при её реализации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТХ – анатомо-терапевтическо-химическая классификация

БСМЭ – бюро судебно-медицинской экспертизы

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография масс-селективным детектированием

ГСО – государственный стандартный образец

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-селективным детектированием

ИХА – иммунохроматографический анализ

КЛД – клиническая лабораторная диагностика

НС – наркотическое средство

ПАВ – психоактивное вещество

ПВ – психотропное вещество

pKa – отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации

pH – водородный показатель

США – Соединенные Штаты Америки

T_{max} – время достижения максимальной концентрации вещества в плазме

ХТА – химико-токсикологический анализ

ХТИ – химико-токсикологические исследования

ХТЛ – химико-токсикологическая лаборатория

Ac – точность

AMP – амфетамин

AUC – площадь под фармакокинетической кривой

C_{max} – максимум, или пик концентрации лекарственного вещества в крови

Cut-off – уровень порогового значения

DAT – транспортер дофамина

EMCDDA – Европейский центр мониторинга наркотиков и наркозависимости

FDA – Американское Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов

FN – ложноотрицательные результаты анализа

FP – ложноположительные результаты анализа

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

LogD – логарифм коэффициента распределения в системе октанол/вода в зависимости от pH среды

LogP – логарифм коэффициента распределения в системе октанол/вода в нейтральной среде

LR (+/-) – отношение правдоподобия результатов анализа

MDPV – 3,4-метилендиоксипировалерон

MBTFA – N-метил-бис-(трифторацетамид)

NET – транспортер норадреналина

PV (+/-) – прогностичность положительного результата

SCAN – режиме анализа по полному ионному току

Se – чувствительность

SERT – транспортер серотонина

SIM – режиме регистрации масс-спектрометра по выбранным ионам

Sp – специфичность

t_{1/2} – период полувыведения

TIC – полная ионная хроматограмма

TN – истинно отрицательные результаты анализа

TP – истинно положительные результаты анализа

UNODC – Управление ООН по наркотикам и преступности

α-PBP – альфа-пирролидинобутиофенон

α-PHP – альфа-пирролидиногексиофенон

α-PPP – альфа-пирролидинопропиофенон

α-PVP – альфа-пирролидинопентиофенон

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федеральный закон Российской Федерации от 31 мая 2001 г. № 73-ФЗ "О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации".
2. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 1998 г. № 681 "Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации".
3. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 27 января 2006 г. № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ".
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 декабря 2015 г. № 933н "О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического)".
5. Приказ от 12 мая 2010 г. № 346н г. Москва "Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации", п. 87.2.
6. ГОСТ Р 51352–2013. Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний. – М.: Стандартинформ, 2014. – 23 с.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том I. Общая фармакопейная статья "Валидация аналитических методик". ОФС.1.1.0012.15.
8. Асадуллин А.Р. Катиноны. Новая реальность / А.Р. Асадуллин, Э.А. Ахметова, А.Ю. Ненастьева // Наркология. – 2017. – №1 (181). – С. 87-92.
9. Асадуллин А.Р. Синтетические катиноны: эпидемиология, экспериментальная фармакология, токсикология, клинические аспекты / А.Р. Асадуллин, А.В. Анцыборов // Вопросы наркологии. – 2017. – №8. – С. 58-71.
10. Брагин Р.Б. Психиатрический и наркологический аспекты употребления листьев ката: монография / Р.Б Брагин. – Харьков: Пегас, 2010. – 276 с.

11. Васильев А.Ю. Анализ данных лучевых методов исследования на основе принципов доказательной медицины: учебное пособие / А.Ю. Васильев, А.Ю. Малый, Н.С. Серова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 22 с.

12. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> – (дата обращения: 15.09.2017).

13. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник для вузов по спец. "Ветеринария". Ч. 2: Иммунология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. – М.: КолосС, 2007. – 223 с.: ил.

14. Комиссина И.Н. Синтетические наркотики – новая угроза человечеству / И.Н. Комиссина // Проблемы национальной стратегии. – 2012. – № 1(10). – С. 92-112.

15. Королук И.П. "ROC-анализ (операционные характеристики наблюдателя): базовые принципы и применение в лучевой диагностике" / И.П. Королук // Медицинская визуализация. – 2013. – № 6. – С. 113-123.

16. Лисовская С.Б. К вопросу применения иммунохимических технологий для обнаружения наркотиков в экспертной практике / С.Б. Лисовская, Н.И. Виноградова, Е.В. Гребенкина // Сборник материалов XXI Международной выставки средств обеспечения безопасности государства "Интерполитех-2017". – Москва, 2017. – С. 107-108.

17. Лисовская С.Б. Основные тенденции изменений при злоупотреблении психоактивными веществами особенности проведения судебно-химических исследований с целью оценки их влияния на состояние человека / С.Б. Лисовская, Б.Н. Изотов, Е.В. Гребенкина // Актуальные проблемы судебной медицины: материалы междунар. науч. конф. – Москва: Изд-во Сеченовского Университета, 2018. – С. 74-76.

18. Мелентьев А.Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская. –

М.: Издательство "Перо", 2016. – 326 с.

19. Морозова В.С. Диагностика и профилактика заболеваний зависимости: монография / В.С. Морозова, О.А. Габрильянц, М.А. Мягкова. – М.: Академия естествознания, 2015. – 177 с.: ил.

20. Обнаружение альфа-пирролидиновалерофенона (альфа-PVP) и его метаболитов в объектах судебно-химического исследования / Е.В. Москалева [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60. – №1. – С. 19-23.

21. Оценка диагностической эффективности предварительного иммунохроматографического анализа при проведении химико-токсикологических исследований на синтетические катиноны / Е.В. Гребенкина [и др.] // Медицина. – 2018. – Т. 6. № 3 (23). – С. 140-152.

22. Пугачев В.С. Теория вероятностей и математическая статистика / В.С. Пугачев. – М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1979. – С. 431 – 440.

23. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл // Пер с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.: ил.

24. Руководство по эксплуатации анализатора для химико-токсикологических исследований ИК 200609, T&D Innovationen GmbH. Версия документа от 30 января 2015 г. – 48 с.

25. Силантьев А.С. Необходимость введения методов количественной оценки психоактивных веществ в биологических объектах / А.С. Силантьев, Е.В. Гребенкина, А.Е. Носырев // Вопросы наркологии. – 2018. – №1(161). – С. 138-152.

26. Справочник лекарственных средств Видаль [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/1749> – (дата обращения: 08.11.2017).

27. Сумароков А.А. Катиноны (происхождение, особенности злоупотребления и клинические аспекты) / А.А. Сумароков, Н.М. Дралюк // Наркология. – 2016. – №9 (177). – С. 79-83.

28. Темердашев А.З. Эволюция новых наркотических средств и методы их определения / А.З. Темердашев, А.М. Григорьев, И.В. Рыбальченко // Журнал

аналитической химии. – 2014. – Т. 69. – №9. – С. 899.

29. Токсикологическая характеристика дизайнерских наркотиков. / А.И. Головки [и др.] // Клиническая медицина: Терапия. Клиническая токсикология. – 2015. – Т. 16. – С. 26-57.

30. Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией. Наркотические и другие одурманивающие средства: уч. Пособие / В.П. Евстигнеева [и др.] – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. – 47 с.

31. Adamowicz P. Blood concentrations of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) determined in 66 forensic samples / P. Adamowicz [et al.] // Forensic Toxicology. – 2016. – V. 34. – №. 2. – P. 227-234.

32. Al-Hebshi N. Khat (*Catha edulis*) – an updated review / N. Al-Hebshi, N. Skaug // Addiction biology. – 2005. – V. 10. – №. 4. – P. 299-307.

33. Al-Saffar Y. Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine-experience from the Swedish population / Y. Al-Saffar, N. Stephanson, O. Beck // Journal of Chromatography B. – 2013. – V. 930. – P. 112-120.

34. Anizan S. et al. Linear pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and its metabolites in the rat: relationship to pharmacodynamic effects // Addiction biology. – 2016. – V. 21. – №. 2. – P. 339-347.

35. Banks M. Synthetic cathinones ("bath salts") / M. Banks [et al.] // Journal of Emergency Medicine. – 2014. – V. 46. – №. 5. – P. 632-642.

36. Baumann M. Psychoactive "bath salt": not so soothing / M. Baumann, J. Partilla, K. Lehner // European journal of pharmacology. – 2013. – V. 698. – №. 1-3. – P. 1-5.

37. Baumann M. Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive "bath salts" products / M. Baumann [et al.] // Neuropsychopharmacology. – 2013. – V. 38. – №. 4. – P. 552-562.

38. Beck O. Detectability of new psychoactive substances, "legal highs", in

CEDIA, EMIT, and KIMS immunochemical screening assays for drugs of abuse / O. Beck [et al.] // Drug testing and analysis. – 2014. – V. 6. – №. 5. – P. 492-499.

39. Beck O. Intoxications involving MDPV in Sweden during 2010–2014: results from the STRIDA project / O. Beck [et al.] // Clinical toxicology. – 2015. – V. 53. – №. 9. – P. 865-873.

40. Biliński P. Designer Drug (DD) abuse in Poland; a review of the psychoactive and toxic properties of substances found from seizures of illegal drug products and the legal consequences thereof. Part 1 – cannabinoids and cathinones / P. Biliński, P. Hołownia, L. Kapka-Skrzypczak, A. Wojtyła // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2012. – V. 19. – №. 4. – P. 857-870.

41. Bonano J. Abuse-related and abuse-limiting effects of methcathinone and the synthetic "bath salts" cathinone analogs 26 methylenedioxypyrovalerone (MDPV), methylone and mephedrone on intracranial self-stimulation in rats / J. Bonano [et al.] // Psychopharmacology. – 2014. – V. 231. – №. 1. – P. 199-207.

42. Borek H. Hyperthermia and multiorgan failure after abuse of "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypyrovalerone / H. Borek, C. Holstege // Annals of emergency medicine. – 2012. – V. 60. – №. 1. – P. 103-105.

43. Busardo F. Assessment of the stability of mephedrone in ante-mortem and postmortem blood specimens / F. Busardo [et al.] // Forensic science international. – 2015. – V. 256. – P. 28-37.

44. Canada's Controlled Drugs and Substances Act, Schedule 4 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/acts/C-38.8/> – (дата обращения: 12.02.2017).

45. Casale J. The characterization of α -pyrrolidinopentiophenone / J. Casale, P. Hays // Microgram Journal – 2012. – V. 9. – P. 33-38.

46. Cawrse B. Distribution of methylone in four postmortem cases / B. Cawrse [et al.] // Journal of analytical toxicology. – 2012. – V. 36. – №. 6. – P. 434-439.

47. Class C Drugs. Schedule 2 Controlled Drugs. United Kingdom Legislation [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.legislation.gov.uk/ukpga/1971/38/schedule/2> – (дата обращения: 12.02.2017).

48. Coppola M. 3,4-methylenedioxypropylone (MDPV): chemistry, pharmacology and toxicology of a new designer drug of abuse marketed online / M. Coppola, R. Mondola // *Toxicology Letters*. – 2012. – V. 208. – №. 1. – P. 12-15.
49. Cottencin O. New designer drugs (synthetic cannabinoids and synthetic cathinones): review of literature / O. Cottencin, B. Rolland, L. Karila // *Current pharmaceutical design*. – 2014. – V. 20. – №. 25. – P. 4106-4111.
50. Deluca P. MDPV report. Psychonaut Research Web Mapping Project / P. Deluca [et al.] – 2010.
51. Dizikes C. Khat – Is it more coffee or cocaine? The narcotic leaf is a time-honored tradition in Africa but illegal in the US, where demand is growing // *Los Angeles Times* (30.09 9). – 2009.
52. Ellefsen K. Quantification of methylone and metabolites in rat and human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / K. Ellefsen, M. Concheiro, M. Suzuki // *Forensic Toxicology*. – 2015. – V. 33. – №. 2. – P. 202-212.
53. Ellefsen K. Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases / K. Ellefsen, M. Concheiro, M. Huestis // *Drug metabolism reviews*. – 2016. – V. 48. – №. 2. – P. 237-265.
54. Emerson T. Methcathinone: a Russian designer amphetamine infiltrates the rural midwest / T. Emerson, J. Cisek // *Annals of emergency medicine*. – 1993. – V. 22. – №. 12. – P. 1897-1903.
55. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2014: Trends and Developments*. – 2014.
56. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *Report on the risk assessment of 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl) pentan-1-one (3,4-methylenedioxypropylone, MDPV) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances*. – 2014.
57. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *Europol Joint Report on a new psychoactive substance: MDPV (3,4-methylenedioxypropylone)*. – 2014.

58. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Europol Joint Report on a new psychoactive substance: 1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-pentanone (α -PVP). – 2015.

59. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Synthetic cathinones drug profile [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones> – (дата обращения: 22.07.2016).

60. Gannon B. Reinforcing effects of abused "bath salts" constituents 3,4-methylenedioxypyrovalerone and α -pyrrolidinopentiophenone and their enantiomers / B. Gannon, K. Rice, G. Collins // Behavioural pharmacology. – 2017. – V. 28. – №. 7. – P. 578-581.

61. Giannotti G. The Cathinones MDPV and α -PVP Elicit Different Behavioral and Molecular Effects Following Acute Exposure / G. Giannotti [et al.] // Neurotoxicity research. – 2017. – V. 32. – №. 4. – P. 594-602.

62. Glennon R. Neurobiology of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) / R. Glennon, R. Young // Brain research bulletin. – 2016. – V. 126. – P. 111-126.

63. Glicksberg L., Kerrigan S. Stability of synthetic cathinones in urine //Journal of analytical toxicology. – 2017. – V. 42. – №. 2. – P. 77-87.

64. Glicksberg L., Rana S., Kerrigan S. Cathinone stability in authentic urine specimens //Forensic science international. – 2018. – V. 286. – P. 54-60.

65. Grapp M. Toxicological investigation of forensic cases related to the designer drug 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV): Detection, quantification and studies on human metabolism by GC–MS / M. Grapp, C. Kaufmann, M. Ebbecke // Forensic science international. – 2017. – V. 273. – P. 1-9.

66. Grapp M. GC–MS analysis of the designer drug α -pyrrolidinovalerophenone and its metabolites in urine and blood in an acute poisoning case / M. Grapp [et al.] //

Forensic science international. – 2016. – V. 259. – P. e14-e19.

67. Gregg R. Behavioral pharmacology of designer cathinones: a review of the preclinical literature / R. Gregg, S. Rawls // Life sciences. – 2014. – V. 97. – №. 1. – P. 27-30.

68. Hasegawa K. Postmortem distribution of α -pyrrolidinovalerophenone and its metabolite in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case measured by LC–MS–MS with the standard addition method / K. Hasegawa [et al.] // Forensic Toxicology. – 2014. – V. 32. – №. 2. – P. 225-234.

69. Johnson R. The stability of four designer drugs: MDPV, mephedrone, BZP and TFMPP in three biological matrices under various storage conditions / R. Johnson, S. Botch-Jones // Journal of analytical toxicology. – 2013. – V. 37. – №. 2. – P. 51-55.

70. Karila L. Synthetic cathinones: a new public health problem / L. Karila [et al.] // Current neuropharmacology. – 2015. – V. 13. – №. 1. – P. 12-20.

71. Katselou M. α -PVP ("flakka"): a new synthetic cathinone invades the drug arena / M. Katselou [et al.] // Forensic Toxicology. – 2016. – V. 34. – №. 1. – P. 41-50.

72. Kelly J. Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology / J. Kelly // Drug testing and analysis. – 2011. – V. 3. – №. 7-8. – P. 439-453.

73. Khreit O. Synthesis, full chemical characterisation and development of validated methods for the quantification of the components found in the evolved "legal high" NRG-2 / O. Khreit [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2012. – V. 61. – P. 122-135.

74. Kolanos R. Stereoselective actions of methylenedioxypropylvalerone (MDPV) to inhibit dopamine and norepinephrine transporters and facilitate intracranial self-stimulation in rats / R. Kolanos [et al.] // ACS chemical neuroscience. – 2015. – V. 6. – №. 5. – P. 771-777.

75. Lehmann S. Organ distribution of 4-MEC, MDPV, methoxetamine and α -PVP: comparison of QuEChERS and SPE / S. Lehmann [et al.] // Forensic Toxicology. – 2018. – P. 1-14.

76. Levenson M. Antidepressants and suicidality in adults: statistical evaluation /

M. Levenson, C. Holland // Presentation at Psychopharmacologic Drugs Advisory Committee. – 2006.

77. Liveri K. A fatal intoxication related to MDPV and pentedrone combined with antipsychotic and antidepressant substances in Cyprus / K. Liveri [et al.] // Forensic science international. – 2016. – V. 265. – P. 160-165.

78. Marinetti L. Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: method development, drug distribution and interpretation of results / L. Marinetti, H. Antonides // Journal of analytical toxicology. – 2013. – V. 37. – №. 3. – P. 135-146.

79. Marusich J. Pharmacology of novel synthetic stimulants structurally related to the "bath salts" constituent 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) / J. Marusich [et al.] // Neuropharmacology. – 2014. – V. 87. – P. 206-213.

80. Meyer M. Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and its detectability in urine by GC–MS / M. Meyer [et al.] // Journal of Mass Spectrometry. – 2010. – V. 45. – №. 12. – P. 1426-1442.

81. Murray B. Death following recreational use of designer drug "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) / B. Murray, C. Murphy, M. Beuhler // Journal of Medical Toxicology. – 2012. – V. 8. – №. 1. – P. 69-75.

82. Namera A. et al. Time-course profile of urinary excretion of intravenously administered α -pyrrolidinovalerophenone and α -pyrrolidinobutiophenone in a human // Forensic Toxicology. – 2014. – V. 32. – №. 1. – P. 68-74.

83. Negreira N. In vitro Phase I and Phase II metabolism of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP), methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol / N. Negreira [et al.] // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2015. – V. 407. – №. 19. – P. 5803-5816.

84. Ojanperä I. Urine analysis of 3,4-methylenedioxypyrovalerone in opioid-dependent patients by gas chromatography-mass spectrometry / I. Ojanperä, P. Heikman, I. Rasanen // Therapeutic drug monitoring. – 2011. – V. 33. – №. 2. – P. 257-263.

85. Paillet-Loilier M. Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones / M. Paillet-Loilier [et al.] // Substance abuse and rehabilitation. – 2014. – V. 5. – P. 37.
86. Petit A. Mephedrone: a new synthetic drug / A. Petit [et al.] // Presse medicale (Paris, France: 1983). – 2013. – V. 42. – №. 10. – P. 1310-1316.
87. Potocka-Banaś B. Fatal Intoxication with α -PVP, a Synthetic Cathinone Derivative / B. Potocka-Banaś [et al.] // Journal of forensic sciences. – 2017. – V. 62. – №. 2. – P. 553-556.
88. Prosser J. The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones / J. Prosser, L. Nelson // Journal of Medical Toxicology. – 2012. – V. 8. – №. 1. – P. 33-42.
89. Saito T. SPME–GC–MS analysis of α -pyrrolidinovalerophenone in blood in a fatal poisoning case / T. Saito [et al.] // Forensic toxicology. – 2013. – V. 31. – №. 2. – P. 328-332.
90. Sauer C. New designer drug α -pyrrolidinovalerophenone (PVP): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric techniques / C. Sauer [et al.] // Journal of mass spectrometry. – 2009. – V. 44. – №. 6. – P. 952-964.
91. Shima N. Metabolism of the newly encountered designer drug α -pyrrolidinovalerophenone in humans: identification and quantitation of urinary metabolites / N. Shima [et al.] // Forensic Toxicology. – 2014. – V. 32. – №. 1. – P. 59-67.
92. Slemmer J. Bupropion is a nicotinic antagonist / J. Slemmer, B. Martin, M. Damaj // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2000. – V. 295. – №. 1. – P. 321-327.
93. Spiller H. Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States / H. Spiller [et al.] // Clinical toxicology. – 2011. – V. 49. – №. 6. – P. 499-505.
94. Strange L. G. et al. The pharmacokinetic profile of synthetic cathinones in a pregnancy model // Neurotoxicology and teratology. – 2017. – V. 63. – P. 9-13.
95. Terry P. Dopaminergic mediation of the discriminative stimulus effects of

bupropion in rats / P. Terry, J. Katz // *Psychopharmacology*. – 1997. – V. 134. – №. 2. – P. 201-212.

96. The Controlled Substances Act (CSA) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.dea.gov/druginfo/csa.shtml> – (дата обращения: 12.09.2017).

97. Tyrkko E. In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/ quadrupole-time-of-flight mass spectrometry / E. Tyrkko [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – V. 405. – P. 6697-6709.

98. United Nations Office on Drugs Crime (UNODC). Data from the UNODC Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances. – 2015.

99. United Nations Office on Drugs Crime (UNODC). Recommended Methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials. – 2015.

100. United Nations Office on Drugs Crime (UNODC). The challenge of new psychoactive substances. Global Synthetics Monitoring: Analyses, Reporting and Trends (SMART) Programme. – 2013.

101. Von Lode P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods / P. Von Lode // *Clinical biochemistry*. – 2005. – V. 38. – №. 7. – P. 591-606.

102. Watterson L. Potent rewarding and reinforcing effects of the synthetic cathinone 3, 4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) / L. Watterson [et al.] // *Addiction biology*. – 2014. – V. 19. – №. 2. – P. 165-174.

103. World Health Organization (WHO). 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl) pentan-1-one (α -PVP) Critical Review Report. 37th ECDD. – 2015.

104. Wright T. Deaths involving methylenedioxypyrovalerone (MDPV) in upper east Tennessee / T. Wright [et al.] // *Journal of forensic sciences*. – 2013. – V. 58. – №. 6. – P. 1558-1562.

105. Wright T. Twenty-one cases involving alpha-pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) / T. Wright, C. Harris // Journal of analytical toxicology. – 2016. – V. 40. – №. 5. – P. 396-402.

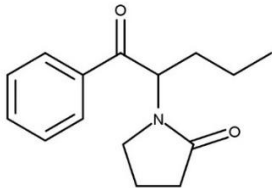
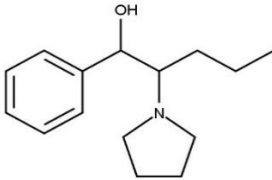
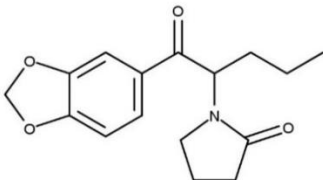
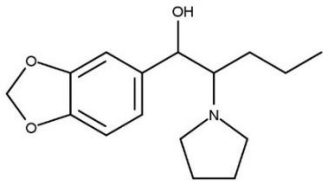
106. Wyman J. Postmortem tissue distribution of MDPV following lethal intoxication by "bath salts" / J. Wyman [et al] // Journal of analytical toxicology. – 2013. – V. 37. – №. 3. – P. 182-185.

107. Zaiko V. Microarray method for multiplex and serial latex agglutination tests with digital image registration / V. Zaiko [et al.] // Clinical laboratory. – 2008. – V. 54. – №. 7-8. – P. 273-279.

108. Zawilska J. α -Pyrrolidinophenones: a new wave of designer cathinones / J. Zawilska, J. Wojcieszak // Forensic Toxicology. – 2017. – V. 35. – №. 2. – P. 201-216.

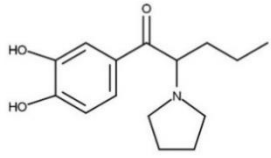
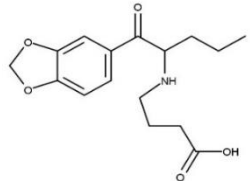
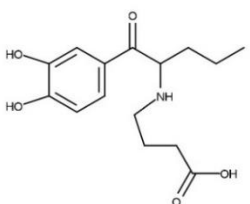
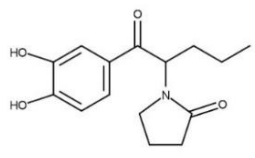
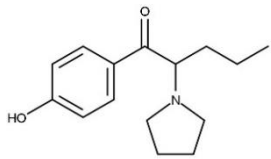
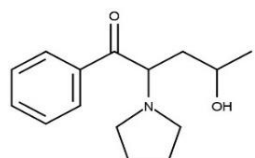
ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)Таблица А1 – Значения рКа для основных метаболитов α -PVP и MDPV

Структурная формула метаболита	Название метаболита	рКа
	1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он	-0,8±0,2
	1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-ол	9,9±0,2
	1-[1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-оксопентан-2-ил]пирролидин-2-он	-0,8±0,2
	1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-ол	9,7±0,2

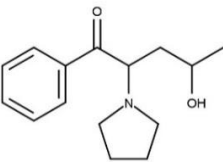
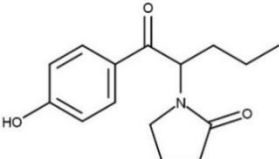
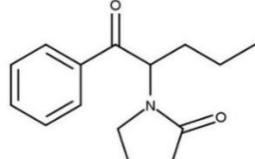
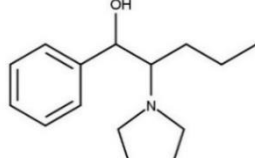
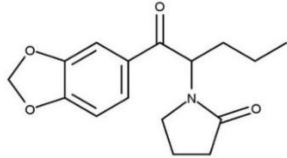
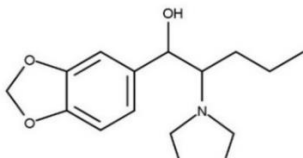
ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Таблица Б1 – Значения LogP для основных метаболитов α -PVP и MDPV

Структурная формула метаболита	Название метаболита	LogP
	1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	7,5 8,5
	4-{[1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-оксопентан-2-ил]амино}бутановой кислоты	3,81 8,47
	4-{[1-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопентан-2-ил]амино}бутановой кислоты	3,85 8,66
	1-[1-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопентан-2-ил]пирролидин-2-он	7,84 -1,54
	1-(4-гидроксифенил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	7,7 8,5
	4-гидрокси-1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	15,6 7,47

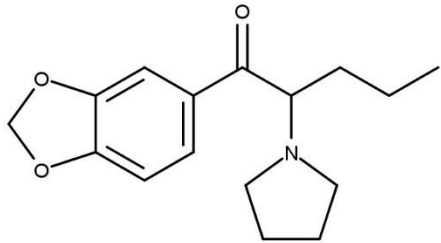
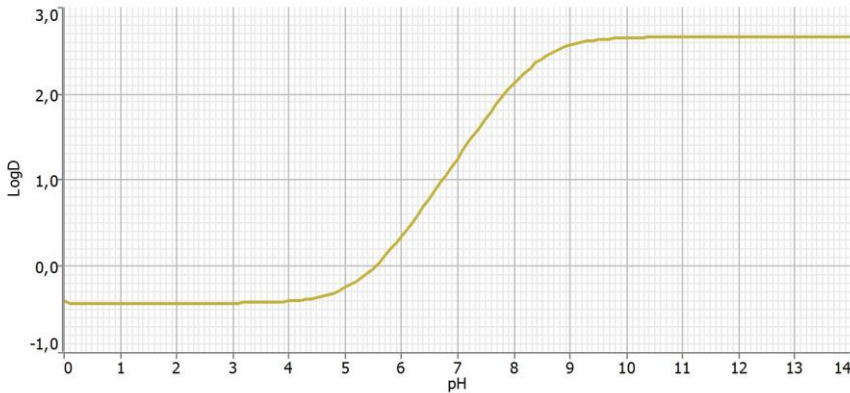
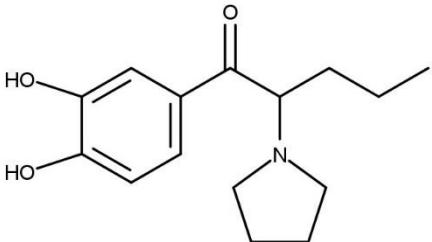
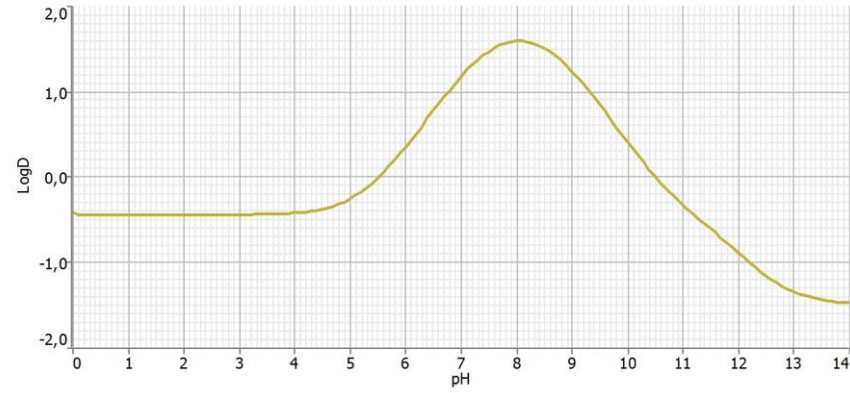
Продолжение Приложения Б
(справочное)

Продолжение таблицы Б.1

Структурная формула метаболита	Название метаболита	LogP
	4-гидроксн-1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	15,6 7,47
	1-[1-(4-гидроксифенил)-1-охопентан-2-ил]пирролидин-2-он	7,72 -1,54
	1-(1-оксо-1-фенилпентан-2-ил)пирролидин-2-он	2,5
	1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-ол	3,5
	1-[1-(2Н-1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-оксопентан-2-ил]пирролидин-2-он	1,9
	1-(2Н-1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-ол	3,4

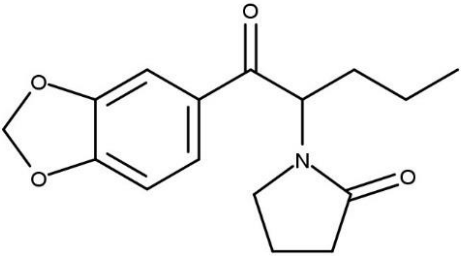
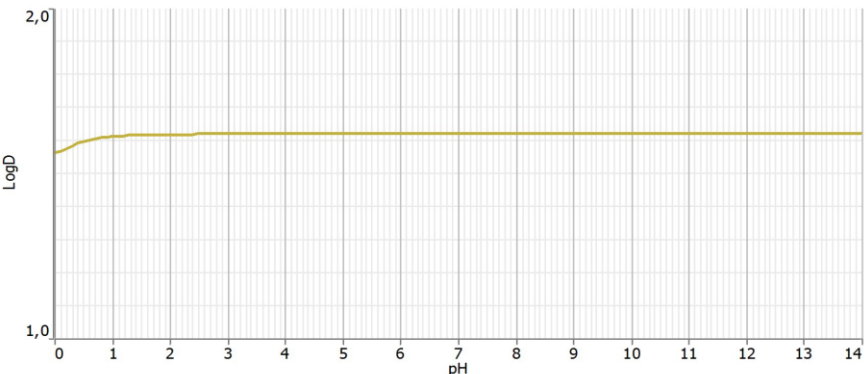
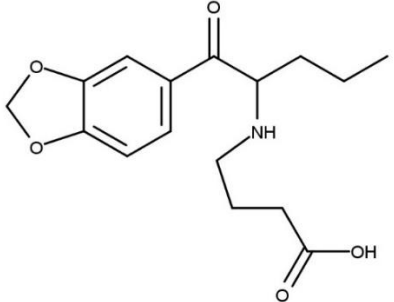
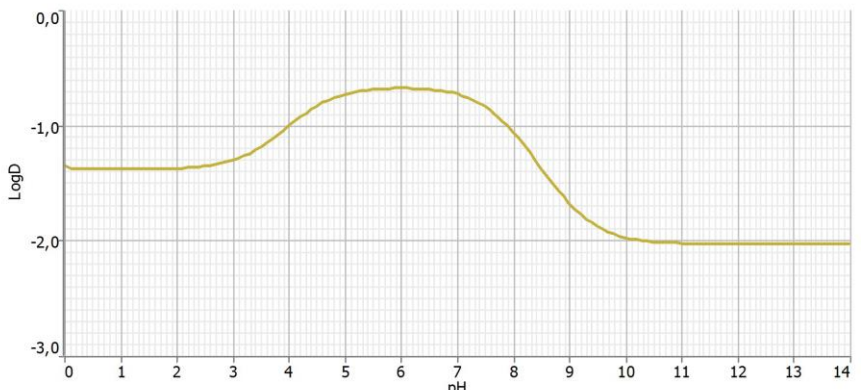
ПРИЛОЖЕНИЕ В (справочное)

Таблица В.1 – Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от pH среды (logD) для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов (платформа ACD/Percepta 14.0.0)

MDPV pH = 1,7: -0,44 pH = 4,6: -0,36 pH = 6,5: 0,77 pH = 7,4: 1,61 pH = 8,0: 2,11	 1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	
1е направление метаболизма pH = 1,7: -0,45 pH = 4,6: -0,37 pH = 6,5: 0,77 pH = 7,4: 1,42 pH = 8,0: 1,59	 1-(3,4-дигидроксифенил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	

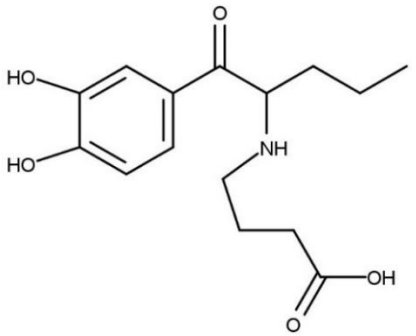
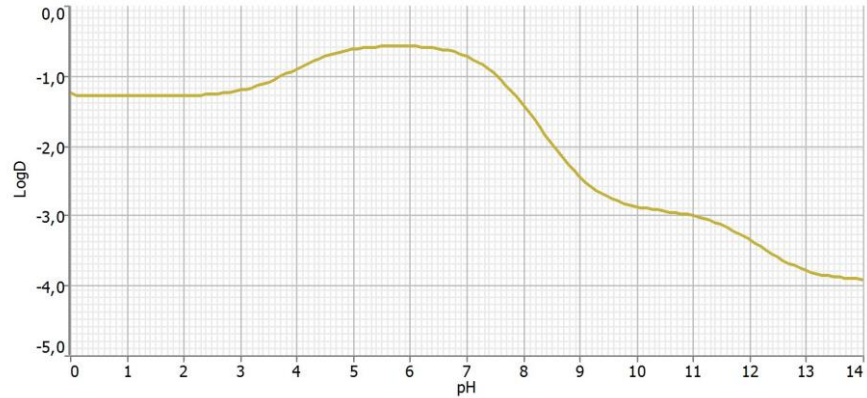
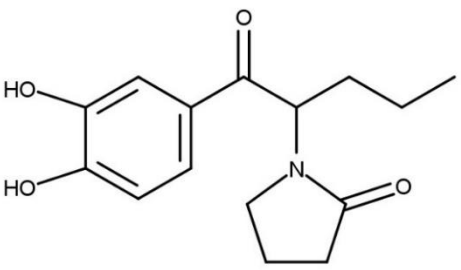
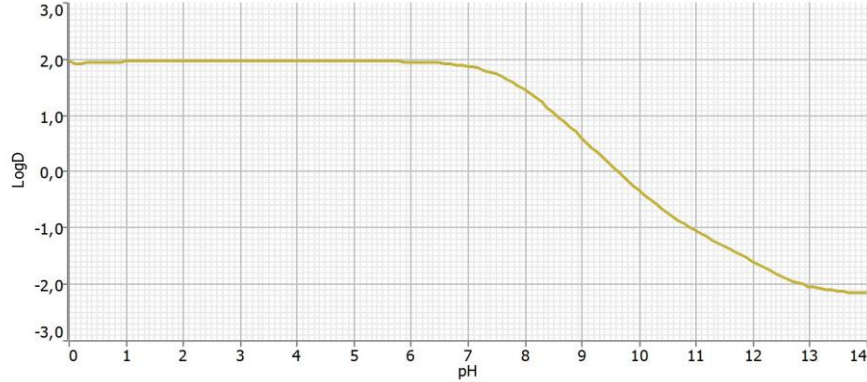
Продолжение Приложения В
(справочное)

Таблица В.2 – Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от pH среды (logD) для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов (платформа ACD/Percepta 14.0.0)

2е направление метаболизма pH = 1,7: 1,62 pH = 4,6: 1,62 pH = 6,5: 1,62 pH = 7,4: 1,62 pH = 8,0: 1,62	 1-[1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-оксопентан-2-ил]пирролидин-2-он	
3е направление метаболизма pH = 1,7: -1,38 pH = 4,6: -0,8 pH = 6,5: -0,68 pH = 7,4: -0,8 pH = 8,0: -1,06	 4-{[1-(2H-1,3-бензодиоксол-5-ил)-1-оксопентан-2-ил]амино}бутановой кислоты	

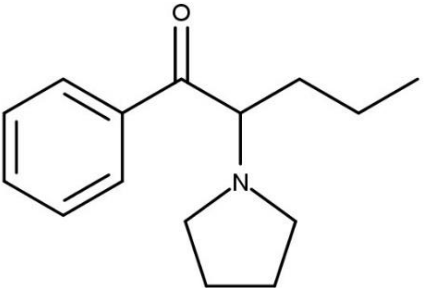
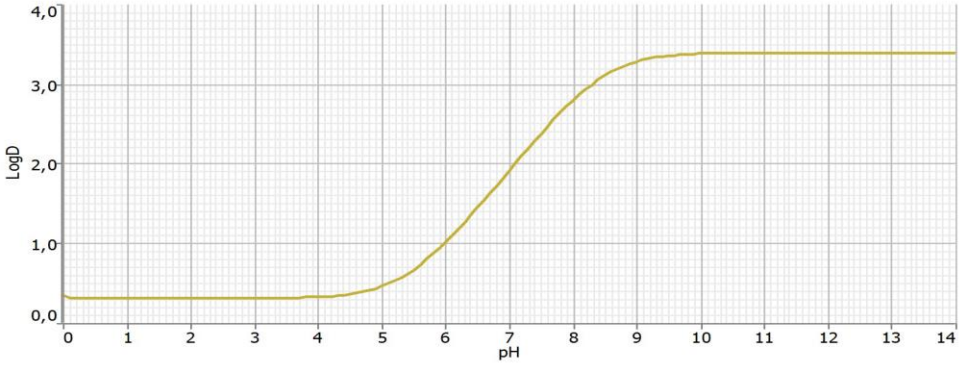
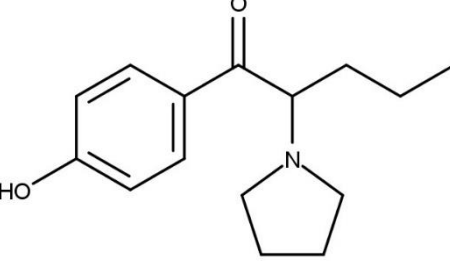
Продолжение Приложения В
(справочное)

Таблица В.3 – Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от pH среды (logD) для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов (платформа ACD/Percepta 14.0.0)

3е направление метаболизма 2й метаболит pH = 1,7: -1,29 pH = 4,6: -0,69 pH = 6,5: -0,61 pH = 7,4: -0,91 pH = 8,0: -1,41	 4-{[1-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопентан-2-ил]амино}бутановой кислоты	
Общий метаболит для 2 и 3го направления pH = 1,7: 1,96 pH = 4,6: 1,96 pH = 6,5: 1,93 pH = 7,4: 1,77 pH = 8,0: 1,45	 1-[1-(3,4-дигидроксифенил)-1-оксопентан-2-ил]пирролидин-2-он	

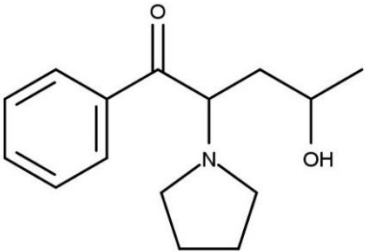
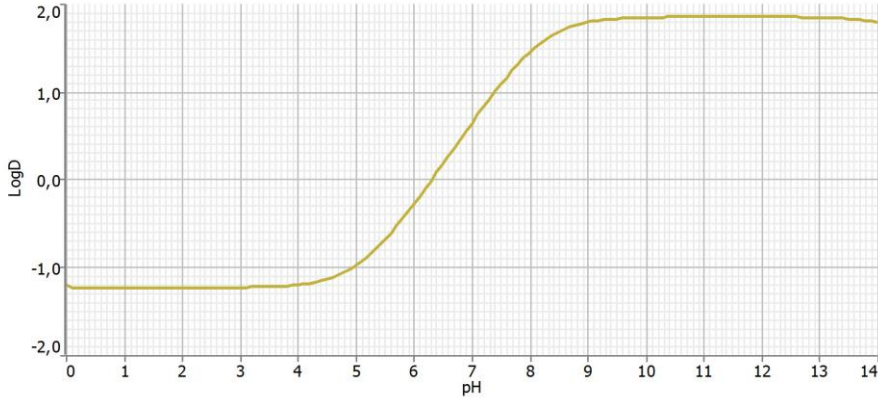
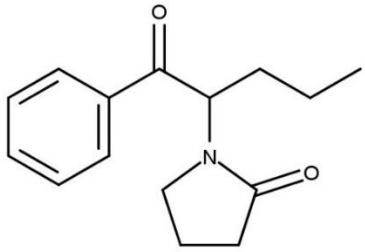
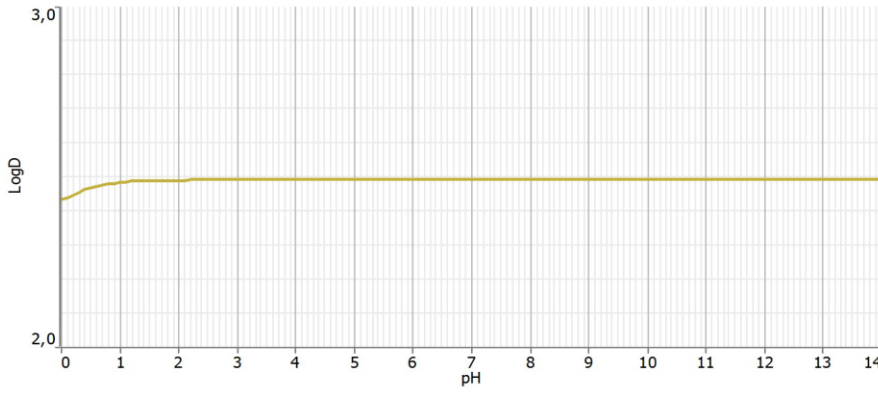
Продолжение Приложения В
(справочное)

Таблица В.4 – Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от рН среды (logD) для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов (платформа ACD/Percepta 14.0.0)

α- PVP pH = 1,7: 0,3 pH = 4,6: 0,37 pH = 6,5: 1,44 pH = 7,4: 2,28 pH = 8,0: 2,79	 1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	
1е направление метаболизма pH = 1,7: -0,04 pH = 4,6: 0,06 pH = 6,5: 1,28 pH = 7,4: 1,97 pH = 8,0: 2,17	 1-(4-гидроксифенил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	

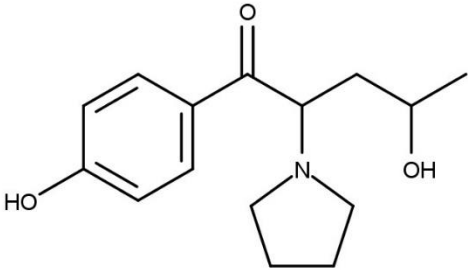
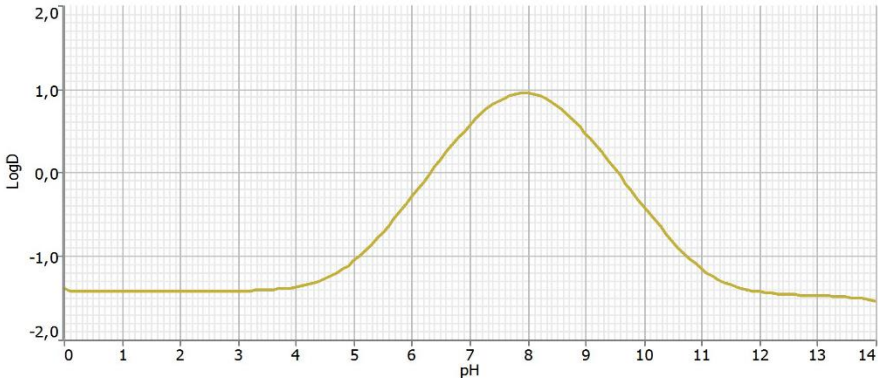
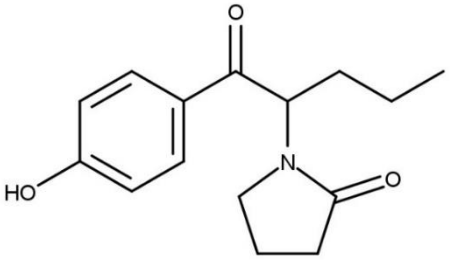
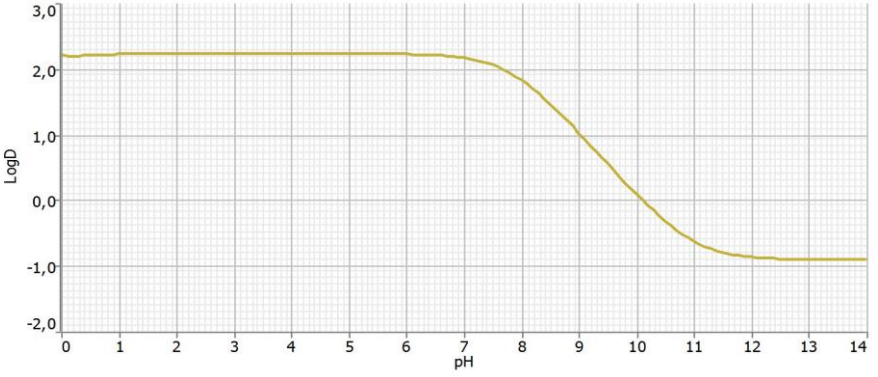
Продолжение Приложения В
(справочное)

Таблица В.5 – Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от pH среды (logD) для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов (платформа ACD/Percepta 14.0.0)

2е направление метаболизма pH = 1,7: -1,24 pH = 4,6: -1,12 pH = 6,5: 0,17 pH = 7,4: 1 pH = 8,0: 1,45	 4-гидрокси-1-фенил-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	
3е направление метаболизма pH = 1,7: 2,49 pH = 4,6: 2,49 pH = 6,5: 2,49 pH = 7,4: 2,49 pH = 8,0: 2,49	 1-(1-фенил-1-оксопентан-2-ил)пирролидин-2-он	

Продолжение Приложения В
(справочное)

Таблица В.6 – Расчеты коэффициентов липофильности в зависимости от рН среды (logD) для α -PVP, MDPV и их основных метаболитов (платформа ACD/Percepta 14.0.0)

Общий метаболит для 1 и 2го направления pH = 1,7: -1,43 pH = 4,6: -1,25 pH = 6,5: 0,16 pH = 7,4: 0,82 pH = 8,0: 0,95	 4-гидрокси-1-(4-гидроксифенил)-2-(пирролидин-1-ил)пентан-1-он	
Общий метаболит для 1 и 3го направления pH = 1,7: 2,24 pH = 4,6: 2,24 pH = 6,5: 2,22 pH = 7,4: 2,1 pH = 8,0: 1,84	 1-[1-(4-гидроксифенил)-1-оксопентан-2-ил]пирролидин-2-он	

ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное)

МАРИЙ ЭЛ РЕСПУБЛИКЫН
ТАЗАЛЫК АРАЛЫМЕ
МИНИСТЕРСТВЫЖЕ
МАРИЙ ЭЛ РЕСПУБЛИКЫН
«РЕСПУБЛИКЫСЕ
НАРКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСПАНСЕР»
КУТЫЖАНЫШ БЮДЖЕТ ТОНЕЖШЕ

Комсомольский урем, 81-шо п., Йошкар-Ола, 424004
тел. (8362) 45-33-05, факс 64-17-04
E-Mail: rnd@minzdrav12.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ МАРИЙ ЭЛ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКИ МАРИЙ ЭЛ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
НАРКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСПАНСЕР»

ул. Комсомольская, д. 81, г. Йошкар-Ола, 424004
тел. (8362) 45-33-05, факс 64-17-04
E-Mail: rnd@minzdrav12.ru

ОКПО 44789112, ОГРН 1021200778565, ИНН/КПП 1215055146/121501001

«УТВЕРЖДАЮ»
Заведующая химико-токсикологической
лабораторией
Е.О.Саватеева

«25» июня 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий документ выдан Е.В.Гребенкиной, свидетельствующий о том, что в рамках диссертационного исследования оптимизированная методика пробоподготовки мочи «Условия анализа газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для обнаружения синтетических катионов (метилendiоксипиривалерона, альфа-пирролидиновалерофенона) и их метаболитов» внедрена в практическую деятельность химико-токсикологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения Республики Марий Эл «Республиканский наркологический диспансер».

Заведующая
химико-токсикологической лабораторией



Е.О.Саватеева

ПРИЛОЖЕНИЕ Д (справочное)

ОБЛАСТНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «БЮРО СУДЕБНО – МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ»

ОГБУЗ Бюро судебно-медицинской
экспертизы Томской области
Судебно-химическое отделение
№ 22 июне 20 18 г.
№ 415 г. Томск
Тел. 8322-2 (46-20-59)

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий судебно-химического
отделения
Пипина Е.Б.

« 22 » июне 20 18 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящий документ выдан Е.В. Гребенкиной, свидетельствующий о том, что в рамках диссертационного исследования, оптимизированная методика пробоподготовки мочи «условия анализа методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для обнаружения синтетических катинонов (метилendioксипировалерон, альфа-пирролидинопентифенон) и их метаболитов при проведении химико-токсикологического исследования, внедрены в практическую деятельность судебно-химического отделения ОГБУЗ Бюро судебно-медицинской экспертизы г.Томска.

Заведующий судебно-химического отделения ОГБУЗ БСМЭ ТО,
Главный внештатный специалист по аналитической и судебно-медицинской токсикологии
Сибирского федерального округа

Пипина Е.Б.

22 июня 2018 года



БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю, заведующему кафедрой аналитической и судебно-медицинской токсикологии, к.фарм.н, профессору Изотову Борису Николаевичу за ценные советы и оказанную помощь при работе над диссертацией, за предоставленную возможность проведения исследований на базе кафедры и поддержку во время защиты.

Отдельная искренняя благодарность доценту кафедры аналитической и судебно-медицинской токсикологии, к.фарм.н. Лисовской С.Б. за понимание, терпение, пунктуальность, комментарии при планировании исследования и рекомендации по оформлению диссертации.

Автор выражает искреннюю благодарность руководителю Центра биоаналитических исследований и молекулярного дизайна, к.техн.н. Носыреву А.Е. и сотрудникам Центра: Кардонскому Д.А., Веселову В.В., Еганову А.А., Кирюшину А.Н. и Ерощенко Н.Н. за организацию и помощь при выполнении экспериментальной части работы, а также за участие в обсуждении полученных результатов. Огромное спасибо Гаврюшову С.А. (PhD) за помощь в статистической обработке данных для диссертационного исследования и ценные замечания.

Спасибо Вам!