



МИНИСТЕРСТВО ОБОРОНЫ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБОРОНЫ РОССИИ)

ВОЕННО-МЕДИЦИНСКАЯ  
АКАДЕМИЯ

г. Санкт-Петербург,  
ул. Академика Лебедева, 6, 194044

« 30 » 07 2014 г. № 4/10/791  
На № 01-119-390 от 04.07.14

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника  
Военно-медицинской академии  
имени С.М. Кирова  
по учебной и научной работе  
доктор медицинских наук, профессор

Б. Котив



« 29 » июля 2014 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Ярошенко Дмитрия Вадимовича «Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

**Актуальность темы выполненной работы и её связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности.**

Диссертационная работа Ярошенко Д.В. посвящена оптимизации условий проведения анализа лекарственных препаратов различного биологического действия методом хромато-масс-спектрометрии.

Внедрение фармпрепаратов подразумевает необходимость разработки методики определения этих соединений не только в самом препарате, но и в биоструктурах с целью наблюдения за их действием, изучения фармакокинетики и др. Наиболее актуально определение их содержания в плазме крови, как основной биосистемы определяющей функционирование живых систем. Плазма крови существенно отличается по составу не только от чистых растворов биологически активных соединений, но и для разных доноров. Компоненты этой биоматрицы могут взаимодействовать с аналитами и коэлюироваться вместе с ними, что, несомненно, будет приводить к изменению аналитического сигнала, искажению результатов анализа и сходимости результатов для разных доноров. Актуальность данного исследования и определяется, в первую очередь, определением мешающих эффектов компонентов матрицы при анализе препаратов в биосистемах. Исследования такого рода на начало выполнения данной диссертационной работы были весьма немногочисленны, особенно, в области хромато-масс-спектрометрии, которая в последние годы получила широкое распространение при анализе лекарственных препаратов в связи с внедрением новых методик и увеличением технических возможностей данного метода.

Основной целью работы было изучение влияния матричных эффектов на результаты хромато-масс-спектрометрического определения лекарственных препаратов в плазме крови и разработка путей их устранения.

**Личное участие автора** в получении результатов диссертации заключается в проведении эксперимента, интерпретации полученных экспериментальных данных, выявлении закономерностей и формулировке основных выводов, что подтверждается списком опубликованных работ (4 статьи в рецензируемых журналах и участие в 8 конференциях).

**Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

**Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов.**

Среди конкретных элементов новизны, определяющих научную и практическую значимость диссертации Ярошенко Д.В., следует отметить следующие положения.

Диссертантом предложен вариант устранения матричного эффекта, выражающегося в неудовлетворительной сходимости результатов для образцов плазмы крови различных доноров при определении цисплатина в форме трехлигандного комплекса платины и диэтилдитиокарбамата (DDTC) –  $Pt(DDTC)_3^+$ ; для обнаружения цисплатина в биологических жидкостях указанные аналитические формы применены впервые.

Предложен способ устранения эффекта усиления аналитического сигнала при тандемном хромато-масс-спектрометрическом определении силденафила, основанный на выборе приемлемого осколочного иона (MRM-переход 475→58).

Выявлена проблема нарушения линейности градуировочной зависимости, связанная с влиянием компонентов биологической матрицы на ионизацию в масс-спектрометрии, и предложены способы устранения указанного эффекта за счет снижения объема вводимой пробы при определении циклосерина и выбора сорбционного концентрирования на катионообменном сорбенте Waters Oasis MCX для пробоподготовки плазмы крови при определении ропинирола.

Применен прием перевода сорбента в аммонийную форму при сорбционном концентрировании циклосерина и ропинирола из плазмы крови на катионообменном сорбенте Waters Oasis MCX. В предложенном приеме ионы аммония используются в качестве конкурирующего агента, который снижает потенциальную возможность взаимодействия молекул аналита с сорбентом, что облегчает элюирование и позволяет увеличить степень извлечения аналитов.

Установлено, что использование сверхсшитого полистирола PuroSep 200 при сорбционном концентрировании позволяет устранить матричный эффект подавления ионизации при одновременном определении капецитабина и

5-фторурацила в плазме крови, а также обеспечить высокие степени извлечения аналитов ( $98\pm 2\%$  – для капецитабина и  $84\pm 1\%$  – для 5-фторурацила).

В ходе выполнения исследования было также обнаружено, что для извлечения силденафила из плазмы крови методом сорбционного концентрирования предпочтительным является применение сорбента Ser-Pak®Vac tC18, поскольку селективность извлечения при этом максимальна, а получаемый экстракт содержит минимальное количество матричных компонентов.

Значительный блок экспериментальной работы посвящен валидации разработанных методик определения лекарственных средств в плазме крови, что позволило применить их при проведении реальных клинических исследований и получить положительные результаты.

В частности, при изучении общей токсичности цисплатина применение предложенной в диссертации методики определения этого фармпрепарата в плазме крови позволило установить, что процедура изолированной перфузии позволяет значительно снизить токсичность терапии по сравнению с внутривенным введением. Это может служить примером того, как результаты данной диссертационной работы поспособствовали развитию реальной медицинской практики.

### **Структура и содержание работы.**

Диссертационная работа оформлена в соответствии с правилами и рекомендациями ВАК Минобрнауки РФ и состоит из введения, обзора литературы, общего обзора объектов и методов исследования, обсуждения полученных результатов и их практического применения, выводов, списка используемой литературы (135 наименований), сокращений, используемых медицинских терминов и приложения. Материалы диссертации изложены на 153 страницах машинописного текста, включая 21 таблицу и 62 рисунка.

Литературный обзор посвящен рассмотрению методов, используемых при анализе лекарственных препаратов в биологических структурах, и общим требованиям, предъявляемым международным Европейским Медицинским Агентством (ЕМА) к проведению таких исследований и обработке полученных результатов.

Анализ литературных данных, несомненно, способствовал правильной оценке ситуации, постановке цели и задач диссертации.

Диссертационная работа следует классической методологии. Сначала – выбор условий анализа используемых для исследования препаратов на модельных смесях и установление матричных эффектов, а затем – использование полученных данных в приложении к реальным природным объектам.

Как указано выше, решение основной целевой задачи потребовало проведения значительного по объему предварительного исследования по опти-

мизации условий анализа выбранных представителей биологически активных соединений с учетом известных литературных данных.

В целом теоретическая и практическая значимость диссертационной работы Ярошенко Д.В. не вызывают сомнений. Сложность в решении поставленных задач потребовала использования адекватного научного аппарата, соответствующих практических методик пробоподготовки и анализа, а также применения специального оборудования, которые подробно обсуждены в главе 2. Все изложенное дает возможность оценить **достоверность** полученных данных и сделанных на их основе выводов, которые не вызывают сомнений. Можно отметить, что полученные автором результаты расширяют существующие представления в области аналитической химии при хромато-масс-спектрометрическом определении лекарственных препаратов.

Представленный материал диссертации полно отражен в автореферате. Результаты диссертационной работы опубликованы в периодической печати в виде 4 научных статей в рекомендованных ВАК рецензируемых изданиях и были представлены на профильных всероссийских и международных конференциях. Выводы (7), а также статьи и тезисы докладов на конференциях (8) отвечают ее основному содержанию.

Диссертация, в целом, изложена хорошим литературным языком, грамотно оформлена и отредактирована. Описки и опечатки встречаются достаточно редко (с. 2, 8, 15, 46, 49, 89, 97, 103, 114, 128). Имеются лишь отдельные неудачные выражения.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.**

Результаты работы могут быть использованы для внедрения на химическом факультете Московского государственного университета, в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (Техническом университете), Иркутском государственном университете, Институте органической химии РАН им. Н.Д. Зелинского, Российском государственном педагогическом университете им. А.И. Герцена, Центре контроля качества и сертификации лекарственных препаратов, Северо-западном государственном университете им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербургском институте физиологии им. И.П. Павлова. Теоретические положения работы могут быть включены в курсы лекций по аналитической химии и физико-химическим методам анализа на химических факультетах университетов и магистерские программы по аналитической химии.

### **Замечания к работе.**

В ходе изучения материалов диссертационной работы, кроме уже сделанных выше замечаний, возникло еще несколько замечаний и вопросов:

1. При масс-спектрометрическом анализе не был обнаружен ни один из ожидаемых автором сигналов с  $m/z$  570 и 835 (соотношение металл-лиганд, 1:1 и 2:1). По этой причине от такого комплексообразующего

агента автор отказался (стр. 88). Но кроме этих двух возможно образование и других комплексов, например, с соотношением 1:2. Были ли исследованы масс-спектры на предмет образования с этим лигандом других возможных комплексов?

2. На стр. 97-98 автор утверждает, что «...Лучшим соотношением объемов раствора цисплатина и раствора ДДТК в 0,2 М раствора NaOH, при котором хроматографические характеристики пика аналита максимальны, а влияние примесных компонентов минимально, оказалось соотношение 1 : 1 (объемн.), а концентрация раствора реагента – 25% (рис.44).» Однако, при изучении этого рис. видно, что при 30 % реагента аналитический сигнал значительно превышает сигнал при 25% ?
3. Аналогично, на стр. 98 автор говорит, что «... уже при 50°C через 30 минут начинался процесс разрушения комплекса  $Pt(DDTC)_3^+$ , о чем свидетельствует снижение значений площади пика аналита. Установлено, что наиболее подходящим является сочетание времени и температуры реакции – 45°C и 50 мин.». Но, из рис. видно, что, если реакцию при 50°C проводить в течении 25-28 мин, то разложения не наблюдается. Площадь пика, при этом, значительно выше – 500000 вместо 450000, а время на анализ в два раза меньше. Чем же определяется выбор?

### **Заключение.**

Сделанные замечания не принципиальны, не снижают хорошего впечатления от работы и не сказываются на общей положительной оценке диссертации Д.В. Ярошенко. Она содержит необходимые элементы научной новизны и практической значимости. Сформулированные выводы новы и носят обобщающий характер. Следует отметить высокую достоверность и широкую апробацию результатов работы.

Диссертация Ярошенко Д.В. на тему «Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия, является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий. Она имеет существенное значение для аналитической химии лекарственных препаратов в биологических средах.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской

Федерации от 24.09.2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор достоин присуждения искомой степени по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры химии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, протокол заседания № 13 от 6 июля 2014 года.

Заведующий кафедрой химии  
Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова  
Заслуженный работник высшей школы РФ  
доктор химических наук профессор



В. Алексеев

11.07.2014 г.

Почтовый адрес: 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6.  
Тел. (812)292-34-89, +7-950-047-86-05  
e-mail: [alekseyevv.v@mail.ru](mailto:alekseyevv.v@mail.ru)



ПОДЛИННОСТЬ ПОДПИСИ

ЗАВЕРЯЮ

А. Цымбаленко, начальник  
отдела кадров ВМедА

подполковник медицинской службы  
А. Цымбаленко

