

11 № 1230/02-23-103  
Листов 13 10 20 25  
федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Самарский государственный  
медицинский университет" Минздрава  
здравоохранения Российской Федерации  
тел./факс: 8(831) 433-10-00

## ОТЗЫВ

официального оппонента заведующего лаборатории судебно-химических и химико-токсикологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздрава России», доктора фармацевтических наук, старшего научного сотрудника Калёкина Романа Анатольевича по диссертации Аносовой Людмилы Сергеевны соискателя на тему: «Разработка методик анализа клопидогрела и его основного метаболита для целей химико-токсикологических исследований», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

### 1. Актуальность выполненного исследования

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются одной из ведущих причин смертности во всем мире, что обуславливает широкое применение антитромбоцитарных препаратов, в частности клопидогрела. Этот препарат входит в стандартные протоколы лечения острых коронарных синдромов, инфаркта миокарда, ишемического инсульта, а также используется после стентирования коронарных артерий. Высокая распространенность ССЗ делает клопидогрел одним из наиболее часто назначаемых лекарственных средств, что, в свою очередь, увеличивает вероятность его передозировки, неправильного применения и токсических эффектов.

Основная сложность в детекции клопидогрела связана с его быстрым метаболизмом. В организме он превращается в два ключевых метаболита: активный тиолопроизводный метаболит (нестабилен, быстро связывается с тромбоцитами), неактивную карбоновую кислоту (стабильное соединение, основной циркулирующий метаболит).

При этом существующие методы судебно-химического анализа часто не учитывают карбоксильный метаболит, хотя именно он может служить надежным маркером приема клопидогрела в случаях: подозрения на отравление (умышленное или случайное), суицидальных попыток (из-за риска массивных кровотечений), криминальных интоксикаций (в сочетании с антикоагулянтами или другими геморрагическими ядами), посмертной диагностики (установление причины кровотечений неясного генеза).

Кроме того, генетический полиморфизм CYP2C19 влияет на метаболизм клопидогрела, что может приводить либо к его накоплению (с риском геморрагических осложнений), либо к недостаточной биоактивации (снижая эффективность терапии). В судебной медицине это важно при расследовании медицинских ошибок, неправильного дозирования или индивидуальной непереносимости препарата.

В настоящее время отсутствуют стандартизированные методики, позволяющие достоверно определять клопидогрел и его основной метаболит в крови, моче или других биологических образцах. Разработка таких методов позволит точнее устанавливать причину отравлений, выявлять случаи злоупотребления препаратом и проводить более качественную химико-токсикологическую экспертизу. Это особенно важно в ситуациях, когда необходимо доказать связь между приемом клопидогрела и наступившими последствиями, такими как тяжелые кровотечения или смерть.

Таким образом, создание надежных способов анализа клопидогрела и его метаболитов является актуальной задачей для химико-токсикологической экспертизы, так как позволит повысить точность диагностики отравлений и даст экспертам новые инструменты для объективной оценки подобных случаев.

## **2. Новизна исследования и полученных результатов, их достоверность**

Представленная работа посвящена актуальной проблеме разработки комплексных методик химико-токсикологического анализа клопидогрела и его основного метаболита (клопидогрел карбоновой кислоты) в биологических объектах для нужд судебно-медицинской экспертизы. Автором проведено масштабное исследование, охватывающее все ключевые аспекты данной проблемы - от разработки методов пробоподготовки до создания схемы химико-токсикологического анализа.

Особую научную ценность представляет разработанный комплекс взаимодополняющих аналитических методик, включающий тонкослойную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию и УФ-

спектрофотометрию. Методологически грамотный подход к оптимизации условий экстракции изучаемых соединений из различных биологических матриц (кровь, моча, ткани внутренних органов) позволил получить воспроизводимые и достоверные результаты. Примечательно, что автор не ограничился стандартными биологическими жидкостями, а разработал методики выделения соединений из тканевых матриц, что особенно важно для судебно-химической практики.

Важным достижением работы является адаптация классических методов изолирования лекарственных веществ (Васильевой, Крамаренко, Стаса-Отто) к современным условиям химико-токсикологического анализа. Автор проявил научную зрелость, не просто механически применяя известные методики, а творчески их модифицируя и оптимизируя для решения конкретных аналитических задач.

Проведенное исследование фармакокинетических особенностей клопидогрела и его метаболита в организме лабораторных животных представляет не только теоретический, но и значительный практический интерес. Полученные данные о распределении и стабильности изучаемых соединений в биологических средах позволяют более обоснованно подходить к интерпретации результатов судебно-химической экспертизы.

Разработанная автором схема химико-токсикологического анализа отличается комплексностью и методологической завершенностью. Она учитывает все ключевые аспекты - от пробоподготовки до идентификации и количественного определения как нативного вещества, так и его основного метаболита. Предложенные методики прошли необходимую валидацию и готовы к внедрению в практику судебно-химических отделений.

Работа выполнена на высоком научном уровне, с использованием современных методов исследования и корректной статистической обработкой данных. Полученные результаты обладают высокой степенью достоверности и представляют значительный интерес для специалистов в области судебной химии и токсикологии. Разработанные методики позволят существенно повысить качество экспертиз в случаях подозрения на отравление

клопидогрелом.

### **3. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации, обладают высокой степенью обоснованности, что подтверждается комплексным подходом к решению поставленных задач. Диссертантом Аносовой Л.С. проведена систематическая работа по разработке, оптимизации и валидации методик анализа клопидогрела и его основного метаболита – клопидогрел карбоновой кислоты – в различных биологических матрицах. Теоретические положения исследования подкреплены экспериментальными данными, полученными с использованием современных аналитических методов, включая тонкослойную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию и УФ-спектрофотометрию. Достоверность результатов обеспечивается корректным выбором условий экстракции, статистической обработкой данных и воспроизводимостью полученных результатов в серии экспериментов.

Разработанные методики прошли апробацию в реальных условиях судебно-химических исследований, что подтверждает их практическую применимость и надежность. Особое значение имеет внедрение результатов работы в учебный процесс кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки» (акт внедрения от 22.01.2024 г.), что свидетельствует о востребованности проведенного исследования в образовательной сфере.

На основании проведенных исследований диссертантом разработана схема химико-токсикологического анализа биологического материала на клопидогрел, которая нашла отражение в методических рекомендациях «Методика химико-токсикологического и судебно-химического анализа клопидогрела и его метаболита – клопидогрел карбоновой кислоты – в биологических жидкостях». Данные рекомендации утверждены Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский центр судебно-

медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации и рекомендованы для использования в судебно-химических лабораториях. Практическая значимость методик подтверждена их успешной апробацией в судебно-химическом отделении Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения ДНР, что свидетельствует о высокой степени готовности результатов исследования к применению в экспертной практике.

Таким образом, научные положения, выводы и рекомендации диссертации обоснованы экспериментальными данными, подтверждены внедрением в образовательный процесс и экспертные учреждения, а также соответствуют современным требованиям химико-токсикологического анализа, что позволяет считать их достоверными и практически значимыми.

#### **4. . Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования**

Полученные автором результаты имеют существенное значение как для развития теоретических основ химико-токсикологического анализа, так и для практики судебно-медицинских и клиничко-токсикологических исследований. Разработанные методики обнаружения и количественного определения клопидогрела и его основного метаболита в биологических средах, основанные на комплексе современных аналитических методов (ТСХ, УФ-спектрофотометрия в видимой области спектра, ВЭЖХ-УФД), вносят значительный вклад в решение актуальной проблемы идентификации данного антиагреганта в судебно-химической экспертизе.

С теоретической точки зрения, исследование расширяет представления о метаболизме клопидогрела в организме и особенностях его детекции в различных биологических матрицах. Разработанные подходы к пробоподготовке и анализу создают методологическую базу для дальнейших исследований в области химико-токсикологического анализа тиенопиридиновых соединений. Особую научную ценность представляет комплексный характер разработанных методик, позволяющий проводить как

скрининговые исследования, так и точное количественное определение изучаемых соединений.

В практическом аспекте результаты работы имеют непосредственное значение для судебно-медицинской и клинической токсикологии. Разработанные методики могут быть успешно применены в практике судебно-химических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы для установления фактов отравления клопидогрелом, в том числе при проведении посмертных исследований. В клинических токсикологических лабораториях данные методы могут быть использованы для диагностики острых и хронических интоксикаций, мониторинга концентраций препарата при передозировках, а также для контроля приверженности пациентов к антитромбоцитарной терапии.

Важным практическим применением результатов является возможность их использования при расследовании случаев криминальных отравлений, суицидальных попыток и медицинских инцидентов, связанных с применением клопидогрела. Разработанные методики, сочетающие достаточную чувствительность, специфичность и воспроизводимость с относительной простотой выполнения, могут быть легко адаптированы к условиям рутинных лабораторных исследований.

Особого внимания заслуживает потенциал применения полученных результатов в системе контроля качества лекарственной терапии и фармаконадзора, где разработанные методы могут быть использованы для мониторинга нежелательных лекарственных реакций, связанных с применением клопидогрела. Таким образом, проведенное исследование имеет значительный междисциплинарный потенциал, охватывая как судебно-медицинскую экспертизу, так и клиническую практику, что подчеркивает его комплексную научную и практическую значимость.

## **5. Оценка содержания диссертации**

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения,

выводов и библиографического указателя, включающего 30 отечественных и 127 зарубежных источников, приложения. Работа иллюстрирована 31 таблицей, 36 рисунками и 2 схемами.

Во введении диссертации автор убедительно обосновывает актуальность выбранной темы, четко формулирует цель и задачи исследования, а также аргументированно раскрывает научную новизну и практическую значимость работы. Особое внимание уделено важности разработки надежных методов химико-токсикологического анализа клопидогрела для судебно-медицинской практики.

Первая глава представляет собой фундаментальный литературный обзор, в котором систематизированы современные научные данные о клопидогреле. Автор детально анализирует физико-химические и фармакологические свойства вещества, его роль в терапии сердечно-сосудистых патологий, а также токсикокинетические и фармакокинетические параметры. Особый акцент сделан на механизмах метаболизма клопидогрела с подробным описанием основных метаболических путей. Критический анализ существующих методов анализа вещества в фармацевтических препаратах и биологических средах выявляет пробелы в современных подходах к его детекции.

Вторая глава содержит подробное описание объектов и методов исследования, что обеспечивает воспроизводимость экспериментальных данных. Автор тщательно документирует все используемые методики, включая аппаратуру, реактивы и условия проведения анализов.

Третья глава посвящена разработке и оптимизации методик определения клопидогрела и его основного метаболита. Предложен комплексный подход, сочетающий методы тонкослойной хроматографии, УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Такой многоуровневый анализ позволяет проводить как скрининговые исследования, так и точное количественное определение целевых соединений.

В четвертой главе представлены результаты систематического исследования условий экстракции изучаемых соединений. Автор детально анализирует влияние различных факторов (природа растворителя, pH среды, наличие электролитов) на эффективность экстракционных процессов, что позволило разработать оптимальные протоколы пробоподготовки.

Пятая глава содержит инновационные разработки по выделению клопидогрела и его метаболита из сложных биологических матриц. Особого внимания заслуживает предложенный метод ТСХ-очистки с использованием двух подвижных фаз, значительно повышающий селективность анализа.

Шестая глава интегрирует полученные результаты в комплексную схему химико-токсикологического анализа, предусматривающую одновременное определение как исходного вещества, так и его метаболита. Разработанная схема отличается методологической завершенностью и готова к практическому применению.

Выводы диссертации логически вытекают из представленных экспериментальных данных и подтверждаются статистической обработкой результатов. Практические рекомендации основаны на апробации разработанных методик в реальных условиях.

Приложения к работе содержат документальное подтверждение внедрения результатов.

По теме диссертации опубликовано 14 работ, 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Данные диссертации используются в практической работе отделений судебно-медицинской токсикологии Донецкой Народной Республики (акт внедрения от 11.01.2024), а также в учебном процессе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки» (акт внедрения от 22.01.2024г.).

## Вопросы и замечания:

1. На стр. 24 представлена информация о 3- метаболитах и указано какие есть смысл исследовать, а почему не указана нецелесообразность исследования промежуточного метаболита 2- оксо-клопидогрела?
2. Указано отнесение клопидогрела к классу вредных веществ, к какому именно? От этого зависит степень вредности и влияния токсического на организм.
3. В разделе 2.2. Вами указано, что методика была модифицирована за счет уменьшение навески биоматериала до 10 г. Известно, что уменьшение навески увеличивает погрешность в результатах. Вами изучалось влияние модификации метода на полученные результаты и их погрешность (отклонение)?
4. При проведении скринингового метода (ТСХ) как учитывалось ложноположительный результат на сопутствующие препараты при лечении в комплексной терапии с клопидогрелом?
5. При проведении анализа методом ВЭЖХ не проводилось исследование спектральных соотношений 210 нм к 270 нм и 290 нм. Одновременно просим пояснить принцип установления максимальной концентрации в калибровочном графике (400 мкг/мл): была ли эта концентрация определена экспериментальным путем или расчетным методом? В случае расчета просим предоставить использованную методику расчета и соответствующие формулы.
6. В разделе 4.3. изучалась степень извлечения от времени экстракции и на рис. 13 показано, что степень экстракции увеличивается при увеличении времени экстрагирования с 3 до 5 минут, но при дальнейшем экстрагировании до 10 минут степень извлечения снижается на существенное значение. В связи, с чем это связано?
7. При изучении распределения в органах клопидогреля взяты временные промежутки 3 часа и 24 часа. Период полувыведения

составляет 8 часов, а максимальная концентрация исследуемого вещества в организме наблюдается через 45 минут. В связи с чем выбраны именно 3 и 24 часа для изучения?

## **6 Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Содержание автореферата Аносовой Л.С. полностью соответствует основным положениям и выводам диссертации.

Диссертационная работа Аносовой Людмилы Сергеевны соответствует заявленной научной специальности 3.4.2 -Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

## **7 Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»**

Таким образом, диссертационная работа Аносовой Людмилы Сергеевны на тему: «Разработка методик анализа клопидогрела и его основного метаболита для целей химико-токсикологических исследований», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи современной судебной химии и токсикологической аналитики по изучению методов химико-токсикологического анализа клопидогрела и его метаболитов в биологическом материале.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов диссертационная работа Аносовой Людмилы Сергеевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 16.10.2024 № 1382), предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

### Официальный оппонент

Заведующий лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздрава России»  
125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13  
+7 (495) 945 21-69, [mail@rc-sme.ru](mailto:mail@rc-sme.ru)  
доктор фармацевтических наук  
3.4.2 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия,  
старший научный сотрудник



*Кал* Калекин Роман Анатольевич

Подпись Калёкина Романа Анатольевича заверяю  
Начальник отдела кадров ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России

«06» 10 2018

*Кухоль*

Кухоль Татьяна Николаевна

*С отзывом ознакомлена  
13.10.2025. Минус*