

ОТЗЫВ

официального оппонента Журба Ольги Михайловны на диссертацию Мальцевой Ольги Андреевны на тему «МЕТОДИЧЕСКОЕ И КРИТЕРИАЛЬНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА НИТРАТОВ И N-НИТРОЗОАМИНОВ В ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ ЧЕЛОВЕКА», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.02.01 – «Гигиена».

Актуальность исследования. Вопросы обеспечения гигиенической безопасности в целом и химической, в частности, носят глобальный характер и лежат в основе ряда международных программ (Программы Всемирной организации здравоохранения по окружающей среде и здоровью, Организации объединенных наций по окружающей среде UNEP и др.), целью которых является улучшение здоровья населения. Именно здоровье населения, является основным системообразующим звеном управления качеством окружающей среды и входит в число ключевых направлений государственной политики в области обеспечения национальной безопасности Российской Федерации. К числу определяющих факторов охраны здоровья населения относится снабжение его доброкачественной питьевой водой.

Известно, что питьевая вода – один из главных стратегических ресурсов каждой страны, важный фактор формирования здоровья и качества жизни населения. Высокая загрязненность водоисточников и неэффективные технологии водоподготовки – основные причины неудовлетворительного качества питьевой воды в Российской Федерации, где поверхностные водные объекты являются источниками хозяйственно-питьевого водоснабжения 32,7% населения (по состоянию на 2017 г.).

Среди химических факторов загрязнения водоисточников, формирующих риск здоровью населения, особое значение имеют неорганические соединения нитратов, содержание которых стремится к постоянному увеличению в водных объектах.

Опасность нитратов заключается в том, что при поступлении в организм в повышенных количествах может происходить эндогенное нитрозирование и образование токсичных N-нитрозоаминов.

Гигиеническая оценка реальных последствий воздействия нитратов и N-нитрозоаминов на здоровье населения в Российской Федерации до настоящего времени весьма затруднена. Основной проблемой является отсутствие методического обеспечения медико-биологических исследований и лабораторного контроля нитратов и N-нитрозоаминов в биологических средах как базовых элементов социально-гигиенического мониторинга.

Отсутствие современных высокочувствительных и селективных методик определения нитратов и N-нитрозоаминов в биологических средах человека не позволяет адекватно оценивать опасность воздействия изучаемых соединений на организм, определять уровни содержания нитратов, N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в биологических средах населения, проживающего в условиях повышенного содержания нитратов в питьевой воде. Кроме того, отсутствие фоновых региональных уровней в биологических средах человека и маркерных показателей ответной реакции организма затрудняет получение данных о влиянии нитратов и N-нитрозоаминов на здоровье и ограничивает возможность проведения профилактических мероприятий, направленных на предупреждение развития патологических состояний.

Вышеизложенное определило актуальность настоящих исследований, целью которых явилась разработка методического и критериального обеспечения медико-биологического мониторинга нитратов и N-нитрозоаминов в биологических средах человека для гигиенической оценки опасности их воздействия.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Научная новизна и теоретическая значимость работы заключается в обосновании методических и критериальных основ медико-биологического мониторинга N-нитрозоаминов и нитратов в биологических средах человека для

повышения эффективности гигиенической стратегии охраны здоровья, а также в совершенствовании методических подходов гигиенического анализа, построения систем медико-биологического мониторинга и его критериального обеспечения в рамках социально-гигиенического мониторинга.

Сформированное новое научное направление по химико-аналитической диагностике контаминантной нагрузки биосред человека позволяет реализовать исследования при постановке диагноза экообусловленных патологий.

Создана новая система высокочувствительных и селективных методик определения N-нитрозоаминов на уровне микроконцентраций на фоне сложного состава биосред человека для задач медико-биологического мониторинга.

В качестве критериальной оценки контаминантной нагрузки организма разработаны региональные фоновые уровни содержания N-нитрозоаминов и нитратов в биосредах, и на основании параметров причинно-следственных зависимостей «уровень токсиканта в крови – клиничко-лабораторные показатели» установлены их статистические репрезентативные величины, как критерии оценки результатов медико-биологического мониторинга.

На основании химико-аналитических исследований питьевой воды и биосред человека доказано, что индикатором экспозиции нитратов и N-нитрозодиметиламина, поступающих с питьевой водой является уровень N-нитрозодиметиламина в крови, который может быть использован для оценки опасности воздействия нитратов при поступлении с питьевой водой.

Обосновано, что наиболее чувствительным маркером ответа на воздействие нитратов и N-нитрозодиметиламина с питьевой водой является повышение уровня IgG, специфического к N-нитрозодиметилмину, в сыворотке крови, начальные отклонения от нормы которого наблюдаются при концентрации N-нитрозодиметиламина в крови выше $0,00013 \text{ мг/дм}^3$, что позволяет рекомендовать эту величину в качестве реперного уровня.

Общая характеристика диссертационной работы. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 39 таблиц, 31 рисунок. Состоит из введения, аналитического обзора литературы, главы материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, выводов, списка литературы, приложения. Библиография включает 180 источников (из них 132 отечественных, 48 зарубежных работ).

Во введении рассмотрены актуальность, практическая ценность, сформулированы цели работы и поставлены задачи, решение которых необходимы для достижения поставленной цели. Обоснована научная новизна, практическая значимость полученных результатов.

Во 2 главе показаны объекты и предмет исследования, приведены объем и комплекс химико-аналитических, биохимических, иммунологических, эпидемиологических и статистических методов, методы математического моделирования причинно-следственных связей, адекватные решению поставленных задач.

В 3 и 4 главах подробно рассмотрена разработка высокочувствительных и селективных методик определения N-нитрозоаминов в биологических средах человека (кровь, моча).

Автором приводятся материалы, характеризующие параметры газохроматографического определения и подготовки пробы к анализу, градуировочные характеристики и диапазоны количественного определения, метрологические характеристики метода, подтверждающие точность и достоверность результатов. В процессе разработки методик газохроматографического анализа автор учитывал факторы, влияющие на разделение изучаемых и матричных соединений: характеристики колонки (геометрические размеры - длина и внутренний диаметр), тип неподвижной фазы и толщину пленки, природу газа-носителя и его скорость, температуру колонки. Изучены условия разделения на капиллярных колонках с различными характеристиками неподвижных жидких фаз: DB-624, HP-FFAP, HP-Plot/U, HP-VOC. Оптимальное разделение N-нитрозоаминов с матричными

компонентами было достигнуто на капиллярной колонке серии DB-624-30m*0,32mm*1,8µm длиной 30 метров и толщиной пленки неподвижной фазы 1,8 µm.

Для повышения чувствительности и оптимизации селективности определения варьировали температуру колонки, скорость нагревания, расход газа-носителя и деление потока. При температуре колонки в режиме линейного программирования 50–200⁰ С со скоростью программирования 10⁰С/мин, температуре испарителя 200 °С и детектора ТИД 320 °С, расходе газа-носителя 20 мл/мин и делении потока 1:14 не наблюдалось интерференций с компонентами матрицы.

Для подготовки проб крови Мальцевой О.А. экспериментально отработаны условия и подобраны параметры подготовки образцов крови для химического анализа, которая включала метод дистилляции N-нитрозоаминов из образцов с перегретым водяным паром и концентрирование дистиллята на картриджах автоматической системы твердофазной экстракции (ТФЭ) при использовании оптимальной схемы подготовки пробы для элюирования.

Селективность проведения процесса ТФЭ достигнута подбором картриджа с соответствующей фазой. Для этого апробированы следующие типы картриджей: угольный Coconut 6 мл, заполненные октадецилом Chromabond C18 на 100 и 500 мг, картриджи на полимерной основе Strata на 200 мг. Анализ полученных результатов с использованием стандартных образцов N-нитрозоаминов показал, что на угольном картридже Coconut 6 мл полнота извлечения N-нитрозоаминов составила 97,5 %.

Дополнительно автором были проведены исследования по отработке оптимальных условий процесса элюирования N-нитрозоаминов с угольного картриджа Coconut 6 мл с применением различных растворителей. Для этого варьировали параметрами: объемами растворителей на стадии кондиционирования, объемами образца на стадии загрузки, временем сушки картриджа и объемом слива. Полученные результаты позволили определить

оптимальную схему элюирования. Она включает несколько стадий и характеризуется следующими параметрами: стадия кондиционирования, стадия адсорбции, сушка картриджа и заключительная стадия элюирования целевых аналитов.

Следующий этап исследований заключался в отработке условий дистилляции N-нитрозаминов стандартного образца с последующей сорбцией на угольный картридж Coconut 6 мл ТФЭ.

Для этого исследуемый стандартный образец в объеме 25 см³ помещали в круглодонную колбу объемом 250 см³ для отгона, добавляли высаливающие реагенты (5 г сульфата натрия и хлорида натрия), стандартный образец нитрозаминов подкисляли 2,5 мл 2% сульфаминовой и 1 н серной кислотой до pH=3, с помощью перегретого водяного пара при t парогенератора = 100±5 °С и t колбы со стандартным образцом = 80±5 °С отгоняли 25 см³ и 70 см³ дистиллята, полученный дистиллят (объемом 25 см³ и 70 см³) пропускали через картридж Coconut 6 мл в системе твердофазной экстракции по схеме элюирования.

Комплексное использование дистилляции в сочетании с оптимальной схемой элюирования и концентрированием дистиллята на угольный картридж Coconut 6 мл позволило достичь высокой полноты извлечения N-нитрозаминов из стандартного образца, которая составила для НДМА – 98,5 %, для НДЭА – 100%.

Проведенные экспериментальные исследования по разработке методики определения N-нитрозоаминов в крови позволили установить высокую чувствительность определения N-нитрозаминов в крови нижним пределом определения для N-нитрозодиметиламина 0,00014 мг/дм³ и для N-нитрозодиэтиламина – 0,0005 мг/дм³ при погрешности определения 19,97 %.

При отработке способа подготовки пробы мочи к газохроматографическому анализу и достижения оптимальной степени экстракции экспериментально подобраны различные условия процедуры экстракции: применение ряда высаливающих реагентов нейтральных солей

щелочных и щелочноземельных металлов (Na_2SO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , NH_4HPO_4 и смесь солей хлорида калия, K_2HPO , Na_2SO_4).

В процессе проведенных исследований автором установлено, что наибольшая степень извлечения N-нитрозаминов из образца мочи методом анализа равновесной паровой фазы достигается при использовании высаливающего реагента сульфата натрия в количестве 16 г и составила для N-НДМА – 99%, для N-НДЭА – 100%.

Разработанный метод применительно к анализу биологической среды (моча) позволяет выполнять определение исследуемых соединений на уровне для N-НДМА 0,0018-1,0 мкг/см³ и N-НДЭА – 0,00048-1,0 мкг/см³.

В главе 5 автором проведено обоснование региональных фоновых уровней N-нитрозоаминов в крови и нитратов в моче. Обоснование региональных фоновых уровней является одной из важных гигиенических проблем, так как это дает возможность оценить антропологическое воздействие различных факторов на окружающую среду и население.

Для проведения экспериментальных исследований автор выбрала две относительно чистые территории, Осинский и Карагайский районы с содержанием нитратов 10,9 мг/дм³ и N-нитрозоаминов 0,0065 мг/дм³ в питьевой воде.

На основе многолетних исследований Мальцевой О.А. показала, что распределение N-нитрозоаминов в крови и нитратов в моче подчиняется нормальному распределению. Зная закон распределения, используя метод вариационной статистики, в том числе исключение из выборки резко отличающихся значений, установлены величины региональных фоновых уровней в биосредах (кровь, моча) детей Пермского края, которые составили для нитратов в моче $29,95 \pm 2,135$ мг/дм³, для N-нитрозодиметиламина – $0,00025 \pm 0,00008$ мг/дм³ и для N-нитрозодиэтиламина – $0,00145 \pm 0,0008$ мг/дм³ в крови.

Следует особо подчеркнуть главы 6 и 7, важность биологических исследований автора по обоснованию индикаторных показателей экспозиции

и эффекта нитратов и N-нитрозоаминов, поступающих с питьевой водой. На основании медико-биологических исследований детей, проживающих на территориях с повышенным содержанием нитратов в питьевой воде, диссертант получила достоверные модели связи между содержанием индикатора экспозиции (N-нитрозодиметиламина) и уровнем ряда иммунологических и биохимических показателей в виде повышения активности глутатионпероксидазы ($R^2=0,93$; $F=39,99$; $p=0,000$), АСАТ ($R^2=0,81$; $F=87,66$; $p=0,000$), уровня общего билирубина ($R^2=0,84$; $F=98,43$; $p=0,000$), IgG специфического к N-нитрозодиметиламину ($R^2=0,95$; $F=89,46$; $p=0,000$). Это позволило автору обосновать маркер ответной реакции организма детей. К нему относится IgG специфического к N-нитрозодиметиламину.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций определяются высокой степенью репрезентативности выборок контингента детей в контрольной группе и группах наблюдения, достаточной кратностью наблюдения. В работе использован комплекс современных и адекватных методов исследования (санитарно-гигиенических, клинических, химико-аналитических, биохимических, иммунологических, статистической обработки цифрового материала и моделирования причинно-следственных связей), позволяющих объективно и с высокой степенью точности решить поставленные задачи. Исследования выполнены в соответствии с соблюдением международных этических правил и стандартов. Все разделы работы являются завершенными, логично взаимосвязанными, базирующимися на достоверных научных данных.

Практическая значимость работы заключается в разработке высокочувствительных методик определения N-нитрозоаминов в биологических средах (кровь, моча) (МУК 4.1.3231-14; МУК 4.1.3479-17), которые в совокупности с действующими МУ по определению нитратов и нитрозаминов в воде, позволяют обеспечить доказательство связи

загрязнения нитро-соединениями питьевой воды с нарушениями здоровья экспонируемого населения за счет определения изучаемых соединений в биосредах человека.

Внедрение материалов диссертационной работы О.А. Мальцевой в практику можно считать достаточным, так как результаты работы, помимо разработки 2-х методических указаний, использованы при подготовке 2 патентов на изобретение.

Результаты выполненных исследований использованы при реализации ряда программных и информационных документов, рекомендованных Роспотребнадзором разного уровня для использования в практике работы службы Роспотребнадзора РФ, испытательных лабораторных центрах в системе стандартизации, в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений и НИИ клинического и гигиенического профиля.

Проведенные исследования могут получить дальнейшее перспективное развитие при расширении подсистемы медико-биологического мониторинга; уточнении патогенетических аспектов нарушения здоровья человека под влиянием химических факторов антропогенной нагрузки; развитии методик оценки риска; развитии медико-профилактических технологий коррекции неблагоприятных последствий антропогенного действия; обосновании направлений деятельности по снижению антропогенной нагрузки в рамках социально-гигиенического мониторинга.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Результаты диссертационного исследования полностью отражены в 18 печатных работах, из них 7 – в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

При рассмотрении работы не было отмечено существенных и принципиальных замечаний по полученным результатам и изложенному автором материалу. Сформулированные выводы логичны и убедительны,

соответствуют поставленным цели, задачам, а также отражают новизну исследования. Работа заслуживает положительной оценки, вместе с тем хотелось бы в порядке обсуждения хотелось бы услышать ответы от автора на следующие вопросы:

1. Какие критерии служили основанием для отбора контингента детей в контрольную группу?
2. Учитывали ли вы поступление нитратов и нитрозоаминов с пищевыми продуктами?

Заключение

Диссертационная работа Мальцевой Ольги Андреевны на тему: **«Методическое и критериальное обеспечение медико-биологического мониторинга нитратов и п-нитрозоаминов в питьевой воде и биологических средах человека»** является законченной научно-исследовательской работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы и обоснованы научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение важной научной проблемы – разработки методических и критериальных основ медико-биологического мониторинга нитратов и N-нитрозоаминов, внесшей существенный вклад в решении проблемы создания системы гигиенической безопасности для здоровья детского населения в условиях неблагоприятного воздействия химических факторов природно-техногенного происхождения.

Вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждено постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Мальцева Ольга Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.02.01 – «Гигиена».

Официальный оппонент, Журба Ольга Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией аналитической экотоксикологии и биомониторинга ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827 Россия, Иркутская область, г. Ангарск, 12 «А» микрорайон, дом 3. т. 8(3955) 586910–1321; 586910–1325 E-mail: zhurba99@gmail.com, сайт: <http://www.vsimei.ru/>

 О.М. Журба

Подпись старшего научного сотрудника, заведующей лабораторией аналитической экотоксикологии и биомониторинга ФГБНУ «Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований», кандидата биологических наук Журба Ольги Михайловны заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ «Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований», кандидат биологических наук,

«28» ноября 2018 года.



Т.М. Гуськова