

Примљено 29.03.2022.			
Орг. јед.	Број	Прилог	Вредност
	90/2		

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У ПРИШТИНИ

Одлуком Наставно-научног већа Природно-математичког факултета Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици, бр. 90/1, донетој на седници одржаној 24.02.2022. именована је комисије за оцену докторске дисертације под насловом **"Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији"** кандидата Вере Лукић, студента на студијском програму докторске академске студије Хемија, Природно-математичког факултета Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици, у саставу:

1. Проф. др Драган Манојловић, председник
2. Проф. др Ранко Симоновић, члан
3. Проф. др Ружица Мицић, члан
4. Др Владимир Живковић, ван.проф., члан
5. Др Бранка Петковић, ван. проф., члан

На основу достављеног материјала и након анализе урађене докторске дисертације Комисија подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

1. ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Лични подаци:

Име, средње слово и презиме: Вера Р. Лукић

Датум и место рођења: 19.09. 1967. године, Приштина

Образовање, биографија:

Основне студије на Одсеку за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Приштини, завршила је 1991. године.

Специјалистички рад са насловом "Одређивање етил-алкохола у крви и течности стакластог тела методом гасне хроматографије са headspace техником", одбранила је 2006. године на Катедри за токсиколошку хемију "Данило Солдатовић" Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду и стекла звање *специјалисте токсиколошке хемије*.

Судски вештак за област хемија - ужа специјалност судска токсикологија постаје 2011. године. Од 2014. године је ангажована као технички експерт Акредитационог тела Србије. Од 2017. године је члан Комисије за психоактивне контролисане супстанце Владе Републике Србије. Од 2005. године ради у Институту за судску медицину Медицинског факултета у Београду као стручни сарадник, специјалиста токсиколошке хемије, а од 2013. године и као заменик одговорног лица Референтне лабораторије за идентификацију и испитивање психоактивних контролисаних супстанци при Институту за судску медицину.

Провела је месец дана на стручном усавршавању из области судске токсикологије у токсиколошкој лабораторији Универзитета „Tor Vergata” у Риму, Италија.

2016. Учествује као стручњак из области судске токсикологије у формирању обрасца за прикупљање података о новим психоактивним супстанцама у биолошком материјалу, у организацији Канцеларије Уједињених нација за дрогу и криминал, UNODC.

Укључена је у систем раног информисања о новим психоактивним супстанцама према Протоколу о систему раног упозоравања у случају појаве нових психоактивних супстанци у Републици Србији. Члан је Удружења токсиколога Србије.

Од 2014. студент Докторских академских студија хемије (модул-Аналитичка хемија), Природно-математичког факултета, Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

На докторским академским студијама кандидат Вера Лукић је тренутно остварила 150 ЕСПБ, са просечном оценом 9.67.

2. АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Наслов теме докторске дисертације

Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији

2.2. Обим докторске дисертације

Докторска дисертација је написана на 201 страна, садржи 8 поглавља, 60 слика, 14 табела, 42 прилога.

2.3. Предмет и циљ дисертације

Докторска дисертација под насловом „Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији“ приказује савремене инструменталне технике: GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS и LC-QTOF/MS које су коришћене у циљу идентификације психоактивних супстанци у узорцима од значаја у

области судске токсикологије. Оптимизовани су аналитички параметари у тандем масеној спектрометрији; одабирани су прекурсор јони, продукт јони, колизионе енергије селектоване су реакције за праћење анализата за одабране психоактивне супстанце тзв. класичне (морфин, кодеин, 6-моноацетилморфин) и новодизајниране дроге (из групе синтетичких канабиноида, опиоида, катинона, фенетиламина, пиперазина и арилициклохексиламина) у циљу њихове идентификације. Разматрани су и критеријуми за идентификацију психоактивних супстанци методама масене спектрометрије. Постављене методе за идентификацију психоактивних супстанци примењене су на реалним узорцима у судској токсикологији. Такође је испитана могућност да се ткиво јетре које је припремљено за хистопатолошку анализу, а налази се у парафинском калупу може користити за хемијско-токсиколошку анализу јер се у њему може доказати неки од метаболита хероина, што би у случајевима да је део ткива једини узорак који се чува након обдукције могао да буде доказни материјал да је особа користила хероин и да је то могло да доведе до смртог исхода. Посебан циљ је развој метода за идентификацију изабраних новодизајнираних психоактивних супстанци на LC-MS/MS-у и LC-QTOF/MS-у, што подразумева оптимизацију хроматографских услова за њихову идентификацију а за нека једињења и квантитативну анализу.

2.4. Основне хипотезе докторске дисертације

1. Разрада поступка припреме узорка свежег ткива јетре и ткива јетре која су претходно фиксирана парафином у тзв. парафинском калупу код хероинских зависника за анализу метаболита хероина, 6-моноацетилморфина и морфина, као и опијатног алкалоида кодеина.

2. Оптимизација инструменталних параметара за идентификацију одабраних психоактивних супстанци (6-моноацетилморфина, морфина, кодеина): снимање у Scan/Sim и Sim режиму, као и услова за њихово хроматографско раздвајање на GC-MS.

3. Оптимизација инструменталних параметара за идентификацију одабраних психоактивних супстанци: одабир прекурсор јона, продукт јона и колизионих енергија за идентификацију одабраних психоактивних супстанци (6-моноацетилморфина, морфина, кодеина), као и услова за њихово хроматографско раздвајање на GC-MS/MS.

4. Оптимизација инструменталних параметара за идентификацију одабраних психоактивних супстанци: одабир прекурсор јона, продукт јона и колизионих енергија за идентификацију одабраних психоактивних супстанци, као и услова за хроматографско раздвајање на LC-MS/MS.

5. Оптимизација инструменталних параметара за идентификацију одабраних психоактивних супстанци: снимање у MS и Auto MS/MS режиму рада одабраних

психоактивних супстанци, одабир услова за њихово хроматографско раздвајање на LC-QTOF/MS и токсиколошки скрининг непознатих супстанци

2.5. Садржај докторске дисертације

У поглављу **Увод**, наглашене су две новине од значаја у судској аналитичкој токсикологији. Једна је брзи напредак у развоју масене спектрометрије а друга експанзија новодизајнираних психоактивних супстанци на тржишту дрога. У складу са овим изнете су идеје и постављени циљеви докторске дисертације.

Поглавље **Општи део**, се бави судском токсикологијом са посебним освртом на постмортем токсикологију, општим принципима масене спектрометрије са акцентом на врсту јонизације и врсту масених анализатора, психоактивним супстанцама класичним и новодизајнираним као и узорцима који могу бити предмет хемијско-токсиколошке анализе.

У поглављу **Експериментални део**, дате су карактеристике инструмената који су коришћени у раду и њихови радни услови или начин на који су успостављени. Наведена је врста узорака и начин њихове припреме.

Поглавље **Резултати и дискусија**, садржи преглед добијених резултата успостављања инструменталних параметара методе на LC-MS/MS-у, GC-MS/MS-у и LC-QTOF/MS-у и резултата анализе психоактивних супстанци у биљном материјалу и биолошком материјалу, са посебним акцентом на анализу метаболита хероина код хероинских зависника у новом алтернативном узорку у судској токсикологији, ткиву јетре из парафинског калупа.

У поглављу **Закључак**, сумирани су резултати истраживања у оквиру докторске дисертације.

У поглављу **Литература**, наведене су референце коришћене при писању докторке дисертације.

2.6. Остварени резултати и научни допринос дисертације

Предложена припрема узорака за анализу 6-моноацетилморфина, морфина и кодеина чврсто-течном екстракцијом је успешно примењена на реалним узорцима свежег ткива јетре, ткива јетре фиксираног у формалину и ткива јетре из парафинског калупа. За анализу је потребно само 0,5 g ткива јетре.

Ткиво јетре из парафинског калупа, које се иначе користи за потребе хистопатолошке анализе први пут је успешно употребљено као алтернативни узорак за потребе токсиколошке анализе код хероинских зависника. Показало се да је сечење ткива јетре из калупа микротоним боље од загревања калупа и његовог механичког одвајања од парафина.

Предложена метода GC-MS је прихватљива за анализу свежег ткива јетре хероинских зависника али не и за анализу ткива јетре из калуца због слабије осетљивости у односу на методу GC-MS/MS.

За анализу опијата на GC-MS/MS-у експериментално одређене по три специфичне реакције фрагментације за 6-моноацетилморфин, морфин и кодеин и по једна за интерне стандарде, деутеризоване аналоге 6-моноацетилморфин-D6 и морфин-D6, успешно су коришћене за идентификацију и квантитативну анализу наведених анализата у свежем ткиву јетре, јетри фиксираној формалином и ткиву јетре из парафинског калуца.

Узорци ткива јетре могу се користити за анализу морфина и кодеина код хероинских зависника и до пет година, након скалдиштења на -20°C .

Узорци ткива јетре из парафинских калуца могу се користити за анализу морфина и кодеина код хероинских зависника и до шест година.

Добијени резултати у свежем ткиву јетре и ткиву јетре из парафинских калуца указују на то да се у поступцима хемијског третирања формалином и алкохолем ради фиксирања и дехидратације ткива изгуби и до 97,5% морфина и да су то главни разлози ниских концентрација морфина у ткиву јетре из парафинских калуца у односу на свеже ткиво јетре. С обзиром на то чак и идентификација морфина у ткиву јетре из калуца сугерише да је концентрација у свежој јетри била висока, а посредно и концентрација у крви.

Идентификација у масеној спектрометрији коришћењем тзв. идентификационих тачака је корисно средство за аналитичку потврду добијеног резултата. Идентификација са више идентификационих тачака је боља и поузданија. За потребе токсиколошке анализе наша препорука је коришћење три специфичне реакције фрагментације у масеној спектрометрији ниске резолуције.

Отимизирана метода за циљану анализу синтетичког канабиноида JWH-018 на GC-MS/MS-у са експериментално утврђеним прекурс и продукт јонима и колизионим енергијама може се користити за идентификацију овог анализата у биљном материјалу.

Развијена је метода за токсиколошки скрининг 16 новодизајнираних психоактивних молекула тј. оних који се у новије време налазе на илегалном тржишту дрога на LC-MS/MS-у. Спроведен је поступак оптимизације за праћење по три селектоване реакције фрагментације, за једињења из групе синтетичких катинона (мефедрон, MDPV, метилон), фенетиламина (25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 2C-B), синтетичких опиоида (АН-7921), синтетичких канабиноида (JWH-018, JWH-073, AM-2201, MMB-CHMICA), пиперазина (BZP, mCPP) и арилциклохексиламина (кетамин, норкетамин).

Метода је примењена на узорцима урина. Сви наведени анализати се могу екстраховати течно-течном базном екстракцијом.

Комбинацијом савремених инструменталних метода масене спектрометрије могуће је извршити идентификацију непознатог једињења описаног у литератури и у случајевима када лабораторија нема аналитички стандард и базу података снимљених спектра. Кључну улогу у овој врсти токсиколошког скрининга има анализа на QTOF-у којом се

добија тачна маса једињења и предложена молекулска формула. Комбинацијом са подацима о специфичној фрагментацији једињења која се добија снимањем методом EI GC-MS могуће је идентификовати непознато једињење. Ова врста идентификације се често назива идентификацијом једињења које је описано у литератури али непознато аналитичару. На овај начин је идентификован синтетички канабиноид ММВ-СНМІСА у биљном материјалу. Ово једињење је први пут идентификовано на територији Републике Србије и након пријаве путем специјалних образаца стављено на Листу психоактивних контролисаних супстанци у Републици Србији.

Отимизована је метода за циљану анализу ММВ-СНМІСЕ на LC-MS/MS-у помоћу екстракта из биљног материјала са илегалног тржишта дрога. Селектоване су три специфичне реакције фрагментације и њихов релативни однос јона m/z , одабране одговарајуће колизионе енергије, волтаже као и мобилна фаза и услови за њено хроматографско раздвајање. Комбинација MeOH/0,1% HCOOH као мобилна фаза дала је бољи одговор у односу на ACN/0,1% HCOOH.

Конформациона анализа у хлороформу за нову психоактивну супстанцу ММВ-СНМІСА је дала највероватнију биоактивну конформацију и даље се може користити за молекулски докинг који може дати увид у интеракције ове психоактивне супстанце са рецепторима. Исто важи и за резултате конформационе анализе новодизајнираних психоактивних супстанци мефедрон, АН-7921, 25В-НВОМе, 25С- НВОМе, 25І-НВОМе, ВЗР, АМ-2201, МDPV, метилон, ЈWH-018, и 2С-В.

Разрађен је поступак коришћења LC-QTOF/MS-а за опште непознати токсиколошки скрининг. Постављени су инструментални параметри за извођење MS и Auto MS/MS експеримената и испробани на постмортел узорцима биолошких течности, алтернативним узорцима као што је коса и биљном материјалу који је садржао синтетички канабиноид ММВ-СНМІСУ. Auto MS/MS метода са фиксним колизионим енергијама и енергијама које се генеришу на основу молекулске масе једињења успешно је примењена у циљу успостављања услова за хроматографско раздвајање новодизајнираних психоактивних супстанци: мефедрона, метилона, МDPV, 2С-В, 25В-НВОМе, 25І-НВОМе, ВЗР, АМ-2201, ЈWH-018, ЈWH-073, и лекова прегабалина, кетамина и норкетамина (метаболит кетамина) који су све чешћа појава на илегалном тржишту дрога.

LC-QTOF/MS је тренутно најнапреднија метода за токсиколошки скрининг у судској токсикологији. Auto MS/MS режим рада омогућава бележење великог броја информација о једињењу као што су тачна молекулска маса, молекулска формула, изотопска расподела као и тачна маса фрагмената специфичних за једињење. Прикупљени подаци погодни су за ретроспективну анализу без поновног мерења уколико се касније појави сумња на присуство одређених токсиколошки значајних једињења.

Савремене методе масене спектрометрије као што су LC-MS/MS, GC-MS/MS и LC-QTOF/MS пружају специфичне информације о аналиту потребне за његову

идентификацију, али је неопходан и критички приступ аналитичара и токсиколошко знање и искуство у интерпретацији добијених резултата. Успостављање и критеријума за идентификацију један је од начина потврде добијеног резултата.

2.7. Објављени и саопштени резултати који чине део докторске дисертације

Научни допринос докторске дисертације Вере Лукић верификован је публикавањем два рада и више научних саопштења, који су повезани са садржајем докторске дисертације:

1. **Lukic Vera**, Micic Ruzica J Arsic Biljana B Nedovic Bojan Radosavljevic Zivana, *Overview of the major classes of new psychoactive substances, psychoactive effects, analytical determination and conformational analysis of selected illegal drugs (Review)*, OPEN CHEMISTRY, (2021), vol. 19 br. 1, str. 60-106, doi.org/10.1515/chem-2021-0196 (M23)
2. **Lukic Vera**, Micic Ruzica J Arsic Biljana B Mitic Milan N Jovanovic Milos D Pavlovic Aleksandra N, *Identification of synthetic cannabinoid methyl 2-{{[1-(cyclohexylmethyl)-1H-indol-3-yl] formamido}-3-methylbutanoate using modern mass spectrometry and nuclear magnetic resonance techniques (Article)*, OPEN CHEMISTRY, (2021), vol. 19 br. 1, str. 1259-1273, doi.org/10.1515/chem-2021-0113 (M23)
3. **Lukić V**, Micić R, Verbić T, Jokić A. *Identification of Synthetic Cannabinoid MMB CHMICA in "Spice-like" Herbal Mixture: Update of the Serbian Situation for the October 2017*. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries and 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology, Belgrade, Serbia, 2018; Abstract book pp. 94. (M34)
4. **Vera Lukić**, Ružica Micić, Biljana Arsić, Anja Jokić, Dragana Sejmanović, *Prediction of physico-chemical properties of illegal drugs using the conformational analysis*, 6th IAPC Meeting Sixth World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery & Third World Conference on ADMET and DMPK Zagreb, Croatia, September 4-7, 2017. Abstract book pp. 41. (M34)
5. **Vera Lukić**, Anja Jokić, Dragana Sejmanović, Ružica Micić, *Identification and quantitative analysis of synthetic cannabinoid JWH-018 in plant materials*, 24th Congress of SCTM; Macedonia, Ohrid, 11-24 septembar, 2016. Book of Abstract, AC012, (M34)
6. **Vera Lukić**, Anja Jokić, Dragana Sejmanović, Ružica Micić, *2,5-dimetoxy-4-bromophenethylamine identification and quantitative determination by GC-EI/MS*, 24th Congress of SCTM; Macedonia, Ohrid, 11-24 septembar, 2016. Book of Abstract, AC013. (M34)
7. **В. Лукић**, Р. Мицић, К.Денић, А. Јокић, Б. Арсић, *Токсиколошки screening средстава злоупотребе применом LC-QTOF-MS*, 54. Саветовање СХД, 6, 2017, Београд. (M64)
8. **В. Лукић**, Р. Мицић, А. Јокић, *Брза селекција прекурсор и продукт јона синетског канабиноида JW-018 за његово одеређивање променом GC-EI/MSMS*. 19, 53. Саветовање СХД, 2016, Крагујевац. (M64)


3. ЗАКЉУЧАК

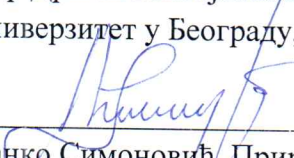
Докторска дисертација под насловом "Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији" кандидата Вере Лукић, дипломираног хемичара, специјалисте токсиколошке хемије, урађена је у складу са одобреном темом и представља оригинални и самостални научни рад кандидата. Дисертација је конципирана и написана у складу са Правилником о докторским академским студијама Природно-математичког факултета, Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици. У оквиру дисертације испуњени су постављени научни циљеви и приказани су резултати који садржински одговарају теми, добијени применом најсавременијих научних методолошких поступака, критеријума и научне литературе у вези са проучаваном проблематиком. Резултати добијени у оквиру ове дисертације верификовани су публикавањем два рада у међународним часописима М23, једне публикације у домаћем часопису М53, као и четири саопштења категорије М34 и два саопштења М64.

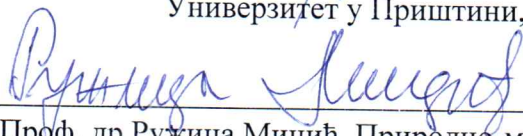
На основу наведеног комисија предлаже да се урађена дисертација под насловом "Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији" прихвати и да се кандидату Вери Лукић одобри усмена одбрана.

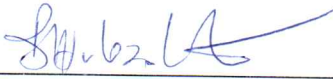
У Београду и Косовској Митровици,
30. 03. 2022. године

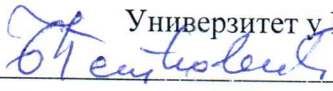
КОМИСИЈА:


1. Проф. др Драган Манојловић, Хемијски факултет,
Универзитет у Београду, Председник Комисије


2. Проф. др Ранко Симоновић, Природно-математички факултет,
Универзитет у Приштини, Косовска Митровица


3. Проф. др Ружица Мицић, Природно-математички факултет,
Универзитет у Приштини, Косовска Митровица, Ментор


4. Др Владимир Живковић, ван. проф, Медицински факултет,
Универзитет у Београду


5. Др Бранка Петковић, ван. проф. Природно-математички факултет,
Универзитет у Приштини, Косовска Митровица