

## ОТЗЫВ

Официального оппонента, доктора фармацевтических наук, Гаевой Людмилы Михайловны на диссертационную работу Кильдюшкина Даниила Андреевича на тему «Создание подходов определения порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диагностическими целями», представленную в диссертационный совет ДСУ 208.002.02 при ФГ АОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

### *Актуальность темы исследования*

Порфирии – это группа редких генетических заболеваний, связанных с нарушением синтеза гема, основного компонента гемоглобина. При порфириях возникает накопление прекурсоров гема, что может привести к различным клиническим проявлениям, таким как боли в животе, общая слабость, неврологические симптомы и фоточувствительность.

Распространённость порфирий остаётся невысокой по всему миру. Некоторые из них, такие как острая перемежающаяся порфирия или поздняя кожная порфирия встречаются у 1 из 50 000-200000 человек. Другие формы порфирии (например, обусловленная дефицитом дегидратазы δ-аминолевулиновой кислоты) являются ещё более редкими, что делает невозможным их усреднённый подсчёт.

Порфирии могут быть наследственными или приобретенными, и их диагностика и лечение требуют специализированного подхода со стороны врачей-генетиков, гематологов и других специалистов. Важно отметить, что из-за редкости этих заболеваний, они могут быть недооценены или неправильно диагностированы, что подчеркивает важность разработки универсальных, простых и высокоселективных методик диагностики порфиринов, а также повышения осведомлённости в медицинском сообществе о порфириях.

Порфирины представляют собой кольцевые структуры, состоящие из четырех пиррольных колец, соединенных мостиками. Порфирины играют важную роль в фармации, так как они являются лекарственными средствами или фармакологически активными метаболитами, такими как Stanate® или Аласенс®.

Оптические свойства порфиринов связаны с их способностью поглощать свет в видимой области спектра и переносить заряды при воздействии света, что предопределяет их использование в проведении фотодинамической терапии.

Диагностика порфиринов часто требует комплексного подхода, в том числе биохимических анализов, генетических тестов и инструментальных методов. Одним из важных методов диагностики порфирий является анализ биохимических показателей в крови, моче и кале, таких как уровень порфиринов, их прекурсоров и метаболитов.

Генетические тесты позволяют идентифицировать конкретные мутации генов, ответственных за нарушения синтеза гема, что особенно важно для установления точного диагноза и предоставления генетической консультации для пациентов и их семей, но такой вид анализа требует больших затрат, узкоквалифицированных специалистов, дорогостоящего оборудования.

Хроматографические методы занимают одну из ключевых позиций при диагностике данной группы заболеваний. Метод ВЭЖХ-УФ может помочь в определении порфиринов, основываясь на их особенности строения, наличия хромофорных групп, что делает разработку методик, основанных на данном методе, актуальной и важной задачей.

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

Диссертация посвящена разработке методик определения порфиринов в биологических жидкостях человека и их применению в клинической практике. Для достижения этой цели был проведен анализ эмпирических данных, а также использованы методы статистического анализа для проведения валидации биоаналитических методик.

Научные выводы и рекомендации, сформулированные на основе полученных результатов, логично изложены, обоснованы и имеют практическое значение при клинической диагностике порфирий. Они соответствуют текущим тенденциям в области персонализированной медицины при лечении исследуемой группы заболеваний.

### *Достоверность полученных результатов и научная новизна исследования*

Достоверность полученных результатов настоящего исследования обеспечивается многоступенчатым подходом к разработке методики определения порфиринов, который включал в себя применение современного метода химического анализа, методов пробоподготовки и аппаратных средств с высокой точностью измерений. Эксперименты были проведены с использованием образцов различных биологических жидкостей, а именно плазмы крови и мочи, что позволило убедительно продемонстрировать применимость разработанной методики в различных областях биомедицинской диагностики. С помощью разработанных методик возможно одновременно обнаружить 9 биомаркёров порфирий. Они отличаются от других методик использованием внутреннего стандарта, что помогает нивелировать влияние биологической матрицы на анализ.

Научная новизна настоящего исследования заключается в разработке уникального подхода к анализу порфиринов, основанного на комбинации спектроскопических и хроматографических методов. Полученные результаты позволяют создать основу для развития мониторинга состояния пациентов с заболеваниями, связанными с порфириновым обменом. Методологический подход для селективного определения лекарственных средств или их фармакологически активных метаболитов при наличии в матрице эндогенных порфиринов, позволяющий изучать их фармакокинетику, также является важным новшеством проведённой работы.

### *Значимость полученных результатов для науки и практики*

Значимость полученных результатов заключается в их потенциальной способности изменить и улучшить подходы к биоаналитическим исследованиям и практической медицинской деятельности в рамках персонализированной медицины, а также способствовать усовершенствованию методов и подходов терапевтического лекарственного мониторинга порфиринсодержащих

лекарственных препаратов. Разработанные методики определения порфиринов являются важным инструментом для медицинской диагностики, помогая в раннем выявлении различных заболеваний, таких как порфирии, свинцовая интоксикация, печеночные заболевания и др.

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации были внедрены в учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «токсикологическая химия» и «медицинская химия» по направлениям подготовок (специальностей) 33.05.01 Фармация; в рабочем процессе Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева; в рабочем процессе Института иммунологии в Лаборатории фармакологии и клинической разработки № 51.

#### *Соответствие диссертации паспорту специальности*

Диссертационные научные положения, результаты исследований соответствуют пунктам паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия – пункту 4, научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология – пункту 20.

#### *Полнота освещения результатов диссертации*

По результатам исследования опубликовано 8 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которой должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 научные статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 5 публикаций в сборниках

материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

### *Структура и содержание диссертации*

Диссертационная работа написана в соответствии с существующими требованиями, изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 рисунком и 29 таблицами. Построение диссертации классическое и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и литературы, а также приложений. Литературный указатель содержит 127 источников, из них 18 на русском языке и 109 на иностранных языках.

**Во введении** раскрыта и обоснована актуальность темы, четко сформулирована цель и задачи исследования, охарактеризованы научная новизна, практическая значимость и внедрение результатов работы, отмечен личный вклад автора, указаны публикации и апробация диссертации.

**В обзоре литературы** представлена общая характеристика порфирий и их классификация. Рассмотрены различные аспекты этого заболевания, включая его этиологию, патогенез, клиническую картину и лечение. Подробно описан физиологический биосинтез гема. Также в обзоре проведено систематическое исследование существующих методик определения порфиринов с целью выявления наиболее эффективного подхода к их анализу. Описан процесс валидации и требуемые критерии для биоаналитических методик.

**Во второй главе** (материалы и методы исследования) излагается подробная информация о конкретных веществах и реагентах, подвижной и неподвижной фазах, которые были задействованы в проводимом исследовании; описывается процесс элюирования. Даны рекомендации пациентам относительно подготовки к сборам образцов, кроме того, раскрываются способы подготовки стандартных растворов, процедуры отбора образцов и их

дальнейшей обработки для обеспечения надлежащего выполнения научного эксперимента.

В **третьей главе** обсуждается непосредственно разработка методик: определение оптимальных параметров для проведения хроматографии. Рассматривается и обосновывается выбор неподвижной и подвижной фаз, определение оптимальной колонки и смеси органических растворителей, а также переход на градиентный режим элюирования для улучшения хроматографического разделения. Далее в главе описывается процесс валидации и калибровки методик для качественного и количественного определения биомаркёров порфиринов в моче и плазме для следующих параметров: селективность, линейность, прецизионность, правильность, нижний предел количественного определения, эффективность процесса, предел обнаружения, аналитическая область методик и устойчивость. При валидации селективности отмечается возможность разделения изомеров порфиринов (уропорфирин I и уропорфирин III) и копропорфиринов (копропорфирин I и копропорфирин III), что не всегда возможно с использованием других существующих методик.

В **Главе 4** выдвигается идея о том, что применение методик определения порфиринов в клинике и в рамках персонализированной медицины имеет большое практическое значение. Порфириновые профили мочи и крови могут служить важным инструментом для диагностики и мониторинга различных состояний здоровья, включая наследственные порфиринопатии, печеночные заболевания, неврологические расстройства, аутоиммунные заболевания, а также для отслеживания реакций на различные лекарства. Параллельное использование разработанных методик обеспечивает возможность точного и надежного анализа биомаркёров в биологических жидкостях. В этой главе также предложены персонализированная стратегия применения методик и рекомендации по фармакотерапии для пациентов с различными порфириновыми нарушениями, а также описано возможное применение методик при последующем изучении лекарственных препаратов, основанных на порфиринах.

Выводы и практические рекомендации соответствуют цели и задачам исследования, логически вытекают из содержания работы и являются обоснованными.

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

Основные положения автореферата диссертации полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы.

### *Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации*

На основании проведенных исследований и анализа данных можно сделать вывод, что диссертационная работа Кильдюшкина Даниила Андреевича внесла ценный вклад в изучение диагностики порфиринов и представляет собой значимый шаг в развитии научного понимания этой группы орфанных заболеваний.

Несмотря на общую положительную оценку диссертационной работы, при ее рассмотрении возникли следующие вопросы и замечания:

1. По данным литературы твердофазная экстракция (ТФЭ) является одним из основных методов пробоподготовки для плазмы крови. Чем обоснован выбор метода пробоподготовки - осаждение белковой фракции с помощью ацетонитрила для анализа ВЭЖХ ?
2. В проводимом исследовании при разработке хроматографических условий был использован ацетатно-аммониевый буфер. Чем обусловлен такой выбор? Какие преимущества он предоставляет по сравнению с другими возможными вариантами буферов?

3. С какой целью при градиентном элюировании использовали снижение содержания ПФ Б с последующим подъемом заново в течение анализа? Нет ли проблем с растворимостью испытуемых веществ в метаноле?
4. Во избежание возникновения постановки ложноотрицательного диагноза рекомендуется дополнительно провести определение порфиринов в кале пациентов.
5. В тексте присутствуют единичные опечатки, неточности и неудачно сформулированные выражения.

Вышеуказанные замечания и вопросы не являются критическими, не снижают научной и практической значимости диссертационной работы Кильдюшкина Д.А. и имеют рекомендательный и дискуссионный характер.

#### *Заключение*

Диссертационная работа Кильдюшкина Даниила Андреевича на тему: «Создание подходов определения порфиринов в биологических жидкостях пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диагностическими целями» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой представлено решение актуальной задачи по созданию селективных, прецизионных методик качественного и количественного определения порфиринов, а также их применению при корректировке фармакотерапии у пациентов с порфириями или со схожей симптоматикой, имеющей существенное значение для фармацевтической химии и клинической фармакологии, что соответствует требованиям п. 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом



ректора от 06.06.2022 г. № 0692/P, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Кильдюшкин Даниил Андреевич заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

### **Официальный оппонент**

ведущий научный сотрудник лаборатории стандартизации и контроля качества лекарственных средств отдела качества и технологии лекарственных средств, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», доктор фармацевтических наук (3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология)



Гаева Людмила Михайловна

Подпись Гаевой Людмилы Михайловны удостоверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,

кандидат биологических наук



Крайнева Валентина Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Адрес: 125315, Российская Федерация, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

Телефон: \_ Тел: +7 (499) 151 18 81.

e-mail: [info@academpharm.ru](mailto:info@academpharm.ru), [otopharm@mail.ru](mailto:otopharm@mail.ru)

« 01 » марта 2024 г.