

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук Белоусова Михаила Валерьевича на диссертационную работу **Смирнова Валерия Валерьевича** на тему: «Разработка комплексного подхода оценки активности основных изоферментов метаболизма лекарственных средств для изучения их фармакокинетики на различных этапах исследований *in vivo*, а также персонализации фармакотерапии», представленной на соискание учёной степени доктора фармацевтических наук по специальности **14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 14.04.02-фармацевтическая химия, фармакогнозия** в Диссертационный совет ДСУ **208.001.11** созданный на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Актуальность темы исследования

Изучение фармакокинетики лекарственных средств является важным инструментом в оценке их эффективности и безопасности. Уже на этапе доклинических испытаний новых лекарственных средств изучение фармакокинетики позволяет довольно точно предсказать различные варианты межлекарственного взаимодействия, тем самым помогает избежать возможного развития нежелательных лекарственных явлений. В клинической практике разработка эффективной и безопасной фармакотерапии при различных заболеваниях также является одной из основных проблем. В первую очередь это также касается вопросов межлекарственного взаимодействия. Кроме того, сопутствующие патологические состояния и даже физиологические особенности могут сильно влиять на фармакокинетический профиль биологически активных веществ. Изучение фармакокинетических и фармакодинамических показателей на различных этапах лечения пациента может значительно упростить работу клинических специалистов в персонализации фармакотерапии, а также снизить количества нежелательное действие лекарственных препаратов на пациентов.

В диссертационной работе автором исследуется процесс оценки метаболической активности CYP450, как основного звена, влияющего на эффективность и безопасность применения лекарственного средства, двумя подходами: генотипирования и фенотипирования. Рассматриваются их преимущества и недостатки, различные методики проведения данных исследований. Автором разработан систематический подход к анализу индивидуальных фармакокинетических особенностей на различных этапах применения лекарственного средства. Кроме того, автором затрагивается вопрос применения метаболомики, как нового метода, который также может использоваться для схожих задач, включая целевые или нецелевые методы.

Вышеизложенное определило выбор темы, формулировку цели, определение задач для ее решения.

Целью настоящего исследования являлась научная разработка, с использованием современных методов анализа и методологии фенотипирования, комплексного подхода оценки активности изоферментов системы цитохрома P450 для изучения фармакокинетики лекарственных средств на различных этапах их исследования *in vivo* и персонализации фармакотерапии при их применении.

Для реализации поставленной цели автором были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести научно обоснованный выбор наиболее актуальных и клинически значимых изоферментов CYP450, участвующих в биотрансформации большинства ксенобиотиков, их субстратов и маркеров из числа эндогенных и лекарственных средств.
2. Разработать и валидировать методики количественного определения маркеров – субстратов и их метаболитов с использованием современных хроматографических методов анализа.
3. Разработать метод количественного определения эндогенных субстратов без использования очищенных биоматриц и дейтерированных аналогов.
4. Провести сравнение альтернативных методик определения активности одного и того же изофермента CYP450 с помощью различных субстратов.
5. Оценить возможность использования разработанных методик для выявления индуцирующего или ингибирующего воздействия ЛС на систему CYP450 на этапе доклинических исследований, на примере препарата Афобазол.
6. Изучить связь генотипирования и фенотипирования пациентов по активности CYP450 при фармакотерапии антикоагулянтами.
7. Провести сопоставление активности CYP450 у пациентов разных возрастных групп с помощью разработанных методик.
8. Оценить возможность использования разработанных методик для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии на примере пациентов, больных алкоголизмом.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформированных в диссертации

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237. Соответствует плану научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств». Номер государственной регистрации 01.2.009.07145.

Обоснованность научных положений, выводов и внедрений, сформированных в процессе написания диссертационной работы, базируются на достаточном количестве изученных источников научной литературы, методических указаний, нормативно-правовых документов, большим количеством экспериментальных данных и статистическими методами обработки результатов.

Основные результаты диссертационных исследований были доложены на различных научных и научно-практических конференциях на территории Российской Федерации, Европейского Союза и стран Евразийского экономического союза.

Важнейшие результаты исследования опубликованы в 59 научных работах автора, в том числе 37 из них в журналах SCOPUS и ВАК Минобрнауки России. Кроме того, исследования автора легли в основу одного патента, двух методических рекомендаций.

Достоверность полученных результатов и научная новизна исследований

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием высокоселективных современных методов физико-химического и хроматографического анализа. Все приборы включены в Государственный реестр средств измерений и имеют сертификаты поверки и соответствия. Использование современного программного обеспечения также повышает уровень достоверности полученных результатов. В работе приведены наглядные примеры, таблицы и схемы, также представлены методики и расчеты, что позволяет воспроизвести полученные результаты.

Научная новизна диссертационной работы Смирнова В.В. без сомнения заключается в том, что автором:

- предложена и обоснована математическая методика расчета концентрации эндогенных соединений в биообъектах, определяемых методом хроматографии без использования, так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых, а также дорогостоящих дейтерированных аналогов маркеров – субстратов изоферментов CYP450, и их метаболитов;
- продемонстрирована взаимозаменяемость методик определения активности изофермента CYP3A4 на основании результатов исследования эндогенных субстратов;
- афобазол в эффективной, анксиолитической дозе не вызывает ни ингибирующего, ни индуцирующего действия в доклинических исследованиях;
- выявлено существенное влияние активности CYP2D6 и CYP3A4 на эффективность и безопасность галоперидола у больных, страдающих алкогольной зависимостью.

В диссертационной работе Смирнова В.В., продемонстрирована теоретическая значимость проведенного исследования, в которой следует отметить:

- формирование подхода и комплексной методики оценки активности изоферментов системы цитохрома Р450 для изучения фармакокинетики лекарственных средств при проведении доклинических и клинических исследований на различных стадиях жизненного цикла и этапах обращения лекарственных средств, в том числе на этапе применения, а также при персонализации фармакотерапии;
- разработку и демонстрацию алгоритма количественного определения (хроматографическими методами) эндогенных веществ в биообъектах, позволяющего получить достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений, в то время как существующие методики ограничиваются точечной оценкой концентрации, которая определяется по калибровочной кривой;
- сформированный подход к оценке активности СYP450 позволяющего определить – является ли исследуемое ЛС субстратом, индуктором или ингибитором основных изоферментов СYP450;
- фармакокинетические характеристики применяемых в клинике препаратов, таких как ривароксабан, омепразол, апиксабан, феназепам, галоперидол, карбамазепин, этилметилгидроксипиридин, а также их взаимодействие с другими ЛС при совместном применении.

Значимость результатов для науки и практики

Важно отметить, что практическая значимость исследования состоит в научной и практической обоснованности оценки эффективности и безопасности фармакотерапии пациентов с различными нозологическими формами, в том числе, такими как сердечная недостаточность, алкоголизм, язва желудка, бронхиальная астма в клинической практике.

Также предложены подходы для коррекции фармакотерапии феназепамом и карбамазепином при совместном применении у больных алкоголизмом.

Результаты диссертационного исследования Смирнова В.В. внедрены:

- в работу лаборатория клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России;
- в работу отдел клинической фармакокинетики Центра Клинической Фармакологии ФГБУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ;
- в работу лаборатория фармакокинетики ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова" РАН;
- в образовательный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.

И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по различным дисциплинам;

- в образовательный процесс кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Таким образом, продемонстрирована значимость проведенных результатов для науки и практики на территории Российской Федерации.

Структура и содержание диссертационной работы

Текст диссертационной работы Смирнова В.В. изложен на 255 странице печатного текста, содержит 79 таблиц, 35 рисунков. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы (Глава 1), описание объектов, материалов и методов исследования (Глава 2), осуждение собственных экспериментальных исследований (Глава 3), общие выводы, заключение, перечень сокращений и терминов, список литературы, включающий 161 источник, в том числе 142 зарубежных.

Важно отметить, что структура диссертационной работы полностью соответствует логике и этапности поставленных задач и совокупного дизайна эксперимента.

Во введении автором демонстрируется актуальность выбранной темы, сформирована цель и задачи исследования. Раскрыта научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, представлена информация об апробации диссертационной работы, внедрении результатов и полноты публикации в открытом доступе.

Первая глава раскрывает проблему изучения биотрансформации низкомолекулярных химических веществ *in vivo*, а именно индивидуальную изменчивость ответа на прием лекарственных препаратов клинической практике, возможность повышения токсичности и проявления нежелательных реакций организма.

Автор проводит детальный анализ современной научной отечественной и зарубежной литературы, а также современное состояние научных исследований в области существующих стратегий фенотипирования по активности изоферментов системы P450 с использованием различных маркеров, таких как ксенобиотики, эндогенные маркеры и маркеры активности различных изоферментов (CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A).

Также следует отметить большой интерес к информации, которую предоставил автор о применении оценки активности изоферментов CYP450 на различных стадиях жизненного цикла ЛС (доклинические, клинические исследования и клиническая практика).

Вторая глава диссертации посвящена описанию использованных материалов и методов. В главе подробно описаны разработанные методики пробоподготовки и хроматографические методики.

В третьей главе, самой объемной в работе, представлены результаты собственных исследований. Представлены результаты валидации всех разработанных методик, представлен новый, разработанный автором, метод количественного определения эндогенных веществ без использования внутренних стандартов. Проведено сравнение двух методик – с использованием дейтерированных внутренних стандартов и без. Проведено сравнение методик оценки активности изофермента CYP3A4 с помощью отношения концентраций 6-β-гидрокортизол/кортизол и 4β-гидроксихолестерин/холестерин. Приведены подробные результаты использования разработанных методик на различных этапах жизненного цикла лекарственных веществ: на этапе доклинических исследований, на этапе клинических исследований и уже при клиническом применении лекарственных препаратов с целью персонализации и оптимизации фармакотерапии.

Общие выводы диссертационной работы полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертационной работы

Диссертационная работа Смирнова В.В. построена логично, задачи исследования выполнены полностью. Проведена разработка аналитических методик определения активности изоферментов и их валидация. Показаны широкие возможности разработанных методик для решения разнообразных проблем в клинической практике, что, несомненно, имеет большое значение для фармацевтической и медицинской науки и практики.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, при ее рассмотрении возникли следующие вопросы и замечания:

1. В работе на этапе пробоподготовки автором использован ряд схожих по свойствам сорбентов на основе C18, при этом методика активации патронов для различных аналитов отличается, с чем это связано?
2. При интегрировании сигналов аналитов (например, рисунки 11, 12) не понятно в каком режиме записи хроматограмм проводилась количественная оценка содержания. Почему окончание интегрирования пиков аналитов осуществляется не по базовой линии?
3. Существенной проблемой, возникающей при проведении фармакокинетических исследований, является вариативность состава биологической матрицы, связанная с приемами пищи и другими физиологическими процессами, что в свою очередь может оказывать влияние на степень экстракции и ионизацию аналита, и в конечном итоге на полученное значение концентрации. Может ли

разработанный автором математический подход с использованием метода внутренней стандартизации применяться в клинической диагностике или это в большей степени инструмент для научной работы?

4. Возможно ли с помощью описанного автором подхода оценить нижний предел количественного определения (НПКО) без использования очищенной матрицы?
5. Автор в своей работе достаточно много внимания уделил процессу валидации биоаналитических методик, опираясь на «стандартный» подход – метод внутренней стандартизации. В то же время, очень скромно описан раздел по валидации с использованием разработанного автором подхода и выполнена лишь частичная валидация (оценена точность и прецизионность методики).
6. Экспериментальными работами фармакологов (Саратиков, Новожеева, Ахмеджанов и др.) показано, что индукторы и ингибиторы могут быть терапевтическими инструментами для регуляции процессов биотрансформации. Насколько перспективно использование индукторов и ингибиторов метаболизма ксенобиотиков в тераностике, в частности, в качестве диагностических инструментов?
7. Возможно ли транслировать разработанные автором подходы к другим лекарственным средствам, которые не метаболизируются с участием изученных изоферментов CYP450?

Однако, вышеперечисленные замечания и вопросы носят уточняющий характер и не снижают научной и практической значимости диссертационного исследования. Результаты исследований хорошо апробированы и представлены на различных научных мероприятиях. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертация Смирнова Валерия Валерьевича на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук на тему: «Разработка комплексного подхода оценки активности основных изоферментов метаболизма лекарственных средств для изучения их фармакокинетики на различных этапах исследований *in vivo*, а также персонализации фармакотерапии» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой автором предложен подход, направленную на решение проблемы, стоящей перед экспериментальной и клинической фармакологией и фармацевтической химией, имеющей важное фармакоэкономическое значение, и заключающуюся в изучении метаболизма лекарственных веществ и межлекарственного взаимодействия, основанных на изучении активности изоферментов системы цитохрома P450.

По актуальности и важности темы, глубине исследований, теоретической и практической значимости, обоснованности и достоверности полученных результатов и выводов диссертационная работа Смирнова Валерия Валерьевича соответствует требованиям п. 15 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 Сеченовского Университета от 31.01.2020 г. № 0094/Р, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор – Смирнов Валерий Валерьевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой фармацевтического анализа
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2,
тел. (3822)90-98-23,
e-mail: mvb63@mail.ru
доктор фармацевтических наук,
15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия;
14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология



Белоусов Михаил Валерьевич



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
634050, Томск, Московский тракт, д. 2, тел. 8(3822)53-04-23, 909-823, e-mail: rector@ssmu.ru