

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук Шохина Игоря Евгеньевича на диссертационную работу Зозиной Владлены Игоревны «Разработка методики количественного определения и ВЭЖХ-анализ убихинола и убихинона в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями при назначении отечественного лекарственного средства Кудесан<sup>®</sup>», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

### Актуальность избранной темы

Кудесан<sup>®</sup> - зарегистрированное лекарственное средство из группы антиоксидантов и антигипоксантов, по фармацевтической форме представляющее собой капли для приема внутрь. Основным компонентом Кудесана<sup>®</sup> является коэнзим Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>). Биодоступность Кудесана<sup>®</sup> в виде солюбилизированной формы относительно порошка составляет 264%, что позволяет с большой эффективностью применять его в клинической практике, особенно при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. В настоящее время ведется активная разработка новых антиоксидантов, которые бы способствовали восстановлению физической работоспособности, увеличению возможности адаптации организма к повышенным нагрузкам, стрессорным воздействиям, а также уменьшали бы воздействие оксидативного стресса, ключевого фактора множества заболеваний. Поддерживать протекание свободнорадикальных процессов и удерживать накопление активных форм кислорода на оптимальном уровне позволяет антиоксидантная система организма. Одну из центральных ролей в антиоксидантной системе организма занимает CoQ<sub>10</sub>, состоящий из окисленной формы «убихинон» и восстановленной формы «убихинол».

Соотношение убихинола и убихинона, или редокс-статус  $\text{CoQ}_{10}$  является важным параметром антиоксидантной системы организма. Соответственно, представляется важным изучить именно редокс-статус  $\text{CoQ}_{10}$ , а не его общее содержание для правильной оценки влияния различных заболеваний и препаратов на антиоксидантную систему организма. Таким образом, актуальной является задача по разработке надежного метода количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови человека. Однако, гидрофобность, легкая окисляемость, а также низкие концентрации в плазме крови затрудняют количественное определение. Поэтому, многие исследования посвящены изучению общего  $\text{CoQ}_{10}$  с полным окислением убихинола, что не позволяет в полной мере оценить эффективность проводимой терапии, так как именно убихинол обуславливает, главным образом, антиоксидантные свойства  $\text{CoQ}_{10}$ . В свою очередь, исследования, посвященные определению только убихинола, в которых полностью восстанавливая убихинон до убихинола, тоже не являются репрезентативными по причине невозможности расчета редокс-статуса  $\text{CoQ}_{10}$ .

Актуальность диссертационной работы Зозиной В.И., посвященной разработке надежного метода количественного определения убихинола, убихинона,  $\text{CoQ}_{10}$ , а также определению редокс-статуса  $\text{CoQ}_{10}$  в плазме крови пациентов сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые получали различную терапию, а также препарат  $\text{CoQ}_{10}$ , Кудесан<sup>®</sup>, не вызывает сомнений.

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

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. Исследованная выборка пациентов является репрезентативной. Используемые методы количественного определения убихинола, убихинона и  $\text{CoQ}_{10}$  являются наиболее современными и высокоточными. В работе использованы и сравнены методы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС на приборе, который идеально подходит для таргетного количественного анализа. Обработка полученных результатов

проводилась при помощи подходящих методов статистического анализа, и результаты анализа представлены в информативном виде. Результаты детально изучены, соотнесены с отечественными и зарубежными источниками литературы, и даны разъяснения для наблюдаемых изменений в концентрациях убихинона, убихинола,  $\text{CoQ}_{10}$  и редокс-статуса во всех группах пациентов. Выводы, сделанные автором, логично вытекают из полученных результатов и соответствуют заявленной цели и задачам диссертации. Практические рекомендации, представленные автором, абсолютно верно основываются на полученных результатах.

Таким образом, научные положения, выводы и практические рекомендации диссертационной работы являются обоснованными.

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

Достоверность представленных результатов не вызывает сомнения. Автором были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, условия электрораспыления, выбрана энергия фрагментации. Автор подчеркивает, что работа выполнялась в затемненном помещении, что действительно критично для убихинола и убихинона, которые могут вступать в реакции спонтанной радикальной конденсации – типичная проблема при исследовании всех фенольных соединений. При выборе фрагментных ионов соискатель опиралась на литературные данные, что говорит и о правильной подготовке к экспериментам. Дизайн эксперимента, выборка пациентов представительна, и все результаты обработаны с использованием адекватных статистических методов. Во всех таблицах представлены уровни достоверности.

Научная новизна, заявленная в диссертации, также не вызывает сомнений. Автор разработала несколько методик, среди которых самыми ценными являются методики количественного определения с использованием ВЭЖХ-МС/МС, позволяющие определить концентрации убихинона, убихинола и  $\text{CoQ}_{10}$  вплоть до 0,1 мкг/мл. Получены впервые данные по редокс-статусу больных с



разными функциональными классами ХСН. Было показано значимое уменьшение как концентрации Q10, так и редокс-статуса у пациентов, в сравнении с практически здоровыми лицами. Однако, применение различных лекарственных препаратов по-разному влияет на концентрацию CoQ<sub>10</sub>, например, прием статинов уменьшает концентрацию CoQ<sub>10</sub>, при добавлении амплодипина в терапию повышается концентрация CoQ<sub>10</sub> за счет убихинона, а прием Кудесан® приводит к резкому повышению концентрации восстановленной формы – убихинола, и резкому повышению редокс-статуса. Такая детализация стала возможна, благодаря методике, разработанной Зозиной В.И.

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

Диссертационная работа Зозиной В.И. имеет существенное значение для науки. Во-первых, получены новые важные данные по действию различных препаратов, применяющихся при лечении ХСН, на редокс-статус CoQ<sub>10</sub>, предложены механизмы, которые объясняют детектируемые изменения в концентрациях CoQ<sub>10</sub>, убихинола и убихинона в плазме крови больных. Во-вторых, автор разработала надежную и легко адаптируемую методику ВЭЖХ-МС/МС, которая может применяться при исследовании редокс-статуса у пациентов с иными заболеваниями и при применении другой терапии. Разработанные методики открывают новые возможности для будущих исследований, в то числе для изучения клинической фармакокинетики и относительной биодоступности различных лекарственных препаратов CoQ<sub>10</sub>. Предполагается важным в будущих работах применить предложенные методики для исследования плазмы крови пациентов с тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями.

Практическая значимость работы заключается в выявлении детального биологического эффекта применения изученных лекарственных препаратов и препарата Кудесан® при лечении пациентов с ХСН. Показано, что применение

аторвастатина снижает редокс-статус пациентов, а применение Кудесана® статистически значимо повышает концентрацию убихинола. Полагаю, что учет таких факторов поможет подбирать наиболее эффективную медикаментозную терапию для пациентов с ХСН и другими заболеваниями, ассоциированными с оксидативным стрессом.

Таким образом, представленная работа имеет большую научную и практическую значимость. Результаты внедрены в рабочую практику лаборатории №51 Фармакологии и фармацевтической разработки ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России». Дополнительно разработанные методики могут быть уже использованы в стационарах и медицинских центрах, оснащенных доступными масс-спектрометрами с тройным квадруполом или иной масс-спектрометрической системой, а также в учебном процессе.

#### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Тема, поставленные цели и задачи, положения на защиту, а также результаты диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пунктам 3 и 4, а также паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, а именно пунктам 7 и 8.

#### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

Результаты диссертационного исследования представлены в 13 научных работах, из которых 7 статей опубликованы в журналах, включенных в международные базы: PubMed, Chemical Abstracts, Scopus и Web of Science, и 2 статьи в журналах из списка ВАК. Также результаты прошли апробацию на российских и международных конференциях, включая публикацию 3 тезисов.

#### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа Зозиной В.И. изложена на 191 странице текста. Работа содержит все необходимые разделы, отражающие суть проведенных исследований: введение, обзор литературы, и главы, описывающие материалы и

методы, результаты исследования, обсуждение результатов, общие выводы по работе и практические рекомендации. Список цитируемой литературы включает 198 источников, из которых 163 представлены в зарубежных журналах, и 35 – в отечественных. Текст диссертационной работы проиллюстрирован 40 рисунками и 46 Таблицами.

**Введение** содержит обоснование актуальности работы, формулировку целей и задач исследования. Изложены теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимую на защиту. Дано подробное описание личного вклада автора, из которого следует его доминирующая роль в постановке и проведении экспериментов, анализу литературы, статистической обработке результатов и написании научных статей.

**Обзор литературы** весьма подробный и содержит 8 частей. Автор рассматривает биологическую роль CoQ<sub>10</sub> в организме, биохимические пути его синтеза в организме, причем отдельно рассмотрены этапы этого синтеза. Далее автор вводит понятие о редокс-статусе CoQ<sub>10</sub>. Показана схема авторегуляции форм CoQ<sub>10</sub>, рассмотрены ферменты, участвующие в процессе, описана их роль. Показана важность содержания убихинола в организме и подчеркнута отсутствие в литературе систематических исследований по изучению редокс-статуса у больных с различными заболеваниями. Далее в обзоре очень подробно обсуждаются различные методы определения концентрации CoQ<sub>10</sub> в плазме крови, обсуждены основные требования к методу исследования, их преимущества и недостатки. Рассмотрены и вопросы стабильности CoQ<sub>10</sub>, что критично для планирования экспериментов. Обзор литературы включает в себя подробное обсуждение роли CoQ<sub>10</sub> в развитии различных патологий, и, не менее важно, влияние лекарственных средств разных групп на содержание CoQ<sub>10</sub> в плазме крови. Раздел завершается конденсированными выводами по обзору литературы, которые согласованы с задачами диссертации.

**Раздел Материалов и методов** дает полное представление об объеме исследования. Автор проявила щепетильность при описании всех методик



исследования. Подробно описаны группы пациентов, и терапия, которую они получали, подходы для статистической обработки.

Дальнейшие **Главы 3-5** посвящены непосредственно результатам диссертации. В главе 3 описан процесс разработки методики количественного определения в плазме крови концентраций убихинола и убихинона. Автор пробовала различные методики, 2 детектора (УФ и масс-спектрометрический). Представлены все калибровочные графики и сделан выбор в пользу масс-спектрометрического детектирования, из-за большей чувствительности и однозначной идентификации по переходу в МРМ. Представлены хроматограммы в виде полных ионных токов. По виду масс-спектров можно судить об эффективном разделении на ВЭЖХ. Стоит отметить, что Зозина В.И. освоила довольно сложный метод, всё необходимое программное обеспечение и особенности пробоподготовки. Завершают Главу 3 промежуточные выводы с основными валидационными характеристиками методики: правильность, точность, прецизионность, стабильность, предел количественного определения. В Главе 4 показаны результаты применения разработанной методики для определения убихинола, убихинона и редокс-статуса  $\text{CoQ}_{10}$  в образцах плазмы крови, отобранной у исследованных групп пациентов. Показано резкое уменьшение концентрации  $\text{CoQ}_{10}$  в плазме больных с ХСН. Методика позволила выявить не только уменьшение содержания  $\text{CoQ}_{10}$ , но и нарушение соотношения «убихинон-убихинол» в сторону убихинона. Далее рассмотрено влияние лекарственных средств, применяемых при терапии ХСН на редокс-статус  $\text{CoQ}_{10}$ . В Главе 5 автор сосредотачивается на исследовании влияния Кудесана<sup>®</sup> на концентрации убихинола и убихинона в плазме. Автор применила разработанные методики для исследования всех групп пациентов. Показаны особенности распределения концентраций  $\text{CoQ}_{10}$  и его компонентов в плазме больных, принимающих стандартную терапию и стандартную терапию с Кудесаном<sup>®</sup>. Продемонстрировано положительное влияние препарата на концентрации  $\text{CoQ}_{10}$  уже через 14 дней после начала приема больными с ХСН.

Представляется интересным, что прием Кудесана<sup>®</sup> приводит к росту концентрации CoQ<sub>10</sub> за счет перераспределению его эндогенных форм в пользу убихинола. В результате наибольшие изменения замечены для редокс-статуса CoQ<sub>10</sub>.

**Глава Обсуждение результатов** включает в себя анализ результатов Глав 3-5. Глава включает наглядные иллюстрации калибровочных графиков, метрологические характеристики разработанных методик, **динамику** изменения плазменной концентрации общего CoQ<sub>10</sub>, убихинола, убихинона и редокс-статуса при применении амлодипина, статинов, этоксида и Кудесана. Рисунки 38-40 с динамикой наглядно показывают влияние каждого из препаратов. При такой визуализации сразу виден эффект Кудесана<sup>®</sup> на редокс-статус организма. Завершается работа **Общими выводами**, списком литературы и списком сокращений, согласно требованиям, представляемым к кандидатским диссертациям. **Список литературы** оформлен согласно требованиям ГОСТа.

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

Автореферат полностью отражает основные положения, изложенные в диссертации.

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

По существу, работа лишена существенных методических недостатков. Текст диссертационной работы оформлен должным образом. Тем не менее, в процессе рассмотрения диссертации возникли следующие замечания и вопросы:

1. В списке оборудования (стр. 55) не указаны применяемое холодильное и морозильное оборудование. Таким образом, соответствовали ли фактические условия хранения условиям определения стабильности, неясно.
2. Описание стандартных образцов (стр. 56) не содержит информации по



каталожному номеру, количественному содержанию и сроку годности СО.

3. Не приведен класс чистоты метанола и ацетонитрила (стр. 56), использовавшихся для целей ВЭЖХ-МС/МС.
4. Объем валидационных испытаний для методик ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-УФ не вполне соответствует действующей нормативной базе (Решение № 85 ЕЭК).
5. Какие преимущества имеет выбранный автором метод оценки селективности методики эндогенных соединений (стр. 89) перед альтернативными подходами (использование суррогатной матрицы либо суррогатного аналита)?
6. Методология определения стабильности аналитов (стр. 93-94) не вполне детально описана (уровни концентраций QC, данные по «настойной» и «постпрепаративной» стабильности).
7. Имеются незначительные опечатки, в том числе в списке литературы.

В целом, отмеченные недостатки не влияют на аргументацию полученных результатов, и сформулированные выводы, а также положительную оценку представленной работы, выполненной на высоком научно-техническом уровне.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Зозиной Владлены Игоревны на тему: «Разработка методики количественного определения и ВЭЖХ-анализ убихинола и убихинона в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями при назначении отечественного лекарственного средства Кудесан®» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по разработке методик количественного определения убихинона и убихинола, и дальнейшее их применение для определения редокс-статуса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, 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/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Зозина Владлена Игоревна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

### Официальный оппонент

доктор фармацевтических наук  
(3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия),  
генеральный директор  
ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»  
*05.12.2022 г.*

Шохин Игорь Евгеньевич

Подпись д.ф.н. Шохина И.Е. заверяю  
старший химик-аналитик  
ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»



Колганова Мария Алексеевна

Общество с ограниченной ответственностью  
«Центр Фармацевтической Аналитики»  
Адрес: 117420, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3,  
4 этаж, комната 412  
Тел.: +7(919) 019-94-01  
Электронная почта: i.shohin@cpha.ru