

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук, Калёкина Романа Анатольевича 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 ФГАОУ 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

Диссертационная работа Кильдюшкина Д.А. описывает разработку и применение методик определения метаболитов порфирий. Эта тема актуальна, так как порфирии являются редкими заболеваниями, их диагностика требует более чувствительных и селективных методик определения.

Эти заболевания характеризуются аккумуляцией порфиринов и их производных в основном в тканях, которые активно участвуют в биосинтезе гема, таких как печень и костный мозг. Современная классификация делит порфирии на эритропоэтические и печеночные, с неврологическими или дерматологическими клиническими симптомами. Тип порфирии определяется по виду промежуточных продуктов, которые накапливаются в организме. Определение качественного и количественного состава прекурсоров гема позволяет установить тип заболевания и, как следствие, подобрать соответствующую терапию. Большинство порфирий имеют наследственный характер передачи.

Эпидемиологические данные о порфирии показывают, что она является редким заболеванием по всему миру. В США страдают менее 200 000 человек от различных типов порфирий, хотя точное количество затруднительно оценить. В Европе самым встречаемым типом острой порфирии является АIP с распространенностью 1/75 000. В различных странах эта цифра может варьироваться. В России порфирии считаются орфанными заболеваниями с распространённостью – 10/100 000 человек.

Диагностика порфирий включает в себя использование аналитических методов для исследования порфиринов в биологических жидкостях. Они включают высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), газожидкостную хроматографию (ГЖХ), ферментные анализы и тест Уотсона-Шварца. Каждый из них имеет свои преимущества и ограничения, однако правильно подобранный метод анализа порфиринов в биологических жидкостях является необходимым для проведения качественного и количественного исследования порфиринов. Также существующие методы не всегда способны различать разные изомеры порфиринов, что снижает их диагностическую ценность.

Порфирины – это водорастворимые вещества, что позволяет разделять их с помощью хроматографии. Их химическая структура представляет собой макроциклы тетрапиррольной структуры, которые имеют характеристический пик «Соре» (примерно 400 нм) и потому могут быть идентифицированы с использованием различных спектроскопических методов.

Порфирины широко применяются в борьбе с различными заболеваниями. К примеру, для проведения фотодинамической терапии – инновационного метода лечения онкологических

заболеваний, а также различных грибковых и бактериальных инфекций. Принцип ФДТ заключается в использовании порфиринов, которые активизируются светом, что приводит к разрушению опухолевых клеток. Кроме того, порфирины также применяются при лечении гипербилирубинемии. Пациентам с гипербилирубинемией могут быть назначены препараты порфиринов, которые помогают снизить уровень билирубина в организме, за счет конкурентного ингибирования фермента гемооксигеназы.

Разработка методик обнаружения порфиринов при помощи обращенной фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором остается актуальной задачей.

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

Диссертационная работа Кильдюшкина Д.А. представляет собой организованное и четко структурированное исследование, основанное на обширном анализе научной литературы и нормативно-правовой базы, а также использовании современных физико-химических методов для обеспечения высокого методического уровня и точности полученных результатов. При выполнении работы применялись современные методы статистической обработки данных, что обосновывает достоверность выносимых положений и выводов.

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

В ходе исследования были разработаны точные методики определения порфиринов в моче и крови, которые значительно упрощают процесс диагностики и способствуют более точному определению патологических состояний. Методики позволяют одновременно обнаружить 9 маркеров в 8 точках нарушения биосинтеза гема. Они отличаются от других использованием внутреннего стандарта, что помогает устранить случайные ошибки. Благодаря возможности идентификации большого количества изомеров порфиринов, диагностика исследуемой группы патологических нарушений становится более точной. Кроме того, проведена валидация разработанных методик определения порфиринов в крови и моче человека в соответствии с международными требованиями и рекомендациями EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 и FDA Bioanalytical Method Validation (2013). Применялись сертифицированные программы для обработки данных, такие как Empower версии 3.0, Numbers, Microsoft Excel (2010), OriginPRO 7.0, MedCalc и Medstatistic. Данные получены с использованием современных инструментальных методов анализа на проверенном оборудовании.

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

Разработанные методики определения биомаркеров порфиринов с применением метода ВЭЖХ-УФ обладают значительной специфичностью и чувствительностью, что открывает новые перспективы для выявления и классификации этого заболевания. Кроме того, установление норм содержания порфиринов в биологических жидкостях и разработка рекомендаций по фармакотерапии пациентов являются важным шагом в улучшении лечения при подозрении на порфирию. Доказанная селективность у разработанных методик подтверждает их возможность использования для фармакокинетических исследований и терапевтического лекарственного мониторинга ЛС на основе порфиринов в плазме крови и моче пациентов и добровольцев, даже если в биообъектах присутствуют естественные порфирины. В целом, полученные данные

подчеркивают важность дальнейших исследований в этой области для совершенствования методов диагностики и лечения порфиридных состояний, а также установления интервалов у порфириносодержащих лекарственных средств в рамках их ТЛМ.

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации внедрены:

- в учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГ АОУ 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, 2 иные публикации по результатам исследования, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа имеет четкую структуру и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2-х глав результатов исследования с представлением результатов проведенного валидационного процесса, а также клинического применения разработанных методик, выводов, списка литературы, который включает 127 источников, из них 18 на русском языке и 109 на иностранных языках, а также приложений. Основной текст диссертации содержит 71 рисунок и 29 таблиц.

Во **Введении** описана актуальность темы исследования, поставлены цель и задачи, приводятся основные положения, выносимые на защиту, подчеркивающие важность проводимого исследования в этой области для совершенствования методов диагностики порфирий.

Обзор литературы составляет **Главу 1**. Он включает в себя комплексный анализ актуальных исследований, научных статей, книг и других источников, связанных с этим редким генетическим нарушением. В литературном обзоре рассматриваются различные аспекты заболевания порфирии, включая его этиологию, патогенез, клиническую картину и лечение.

Отмечается, что порфирия может проявляться различными симптомами, включая боли в животе, неврологические расстройства, фоточувствительность и даже психические расстройства. Описаны лекарственные препараты, основанные на порфиринах. Далее в литературном обзоре проведено систематическое исследование существующих методов определения порфиринов, их преимуществ и недостатков, с целью выявления наиболее эффективного подхода к анализу порфиринов; описывается процесс валидации и требуемые критерии.

В **Главе 2** описаны материалы и методы, используемые в диссертационной работе. В частности, в ней перечисляются биологические соединения и реактивы, которые были применены в исследовании. Кроме того, приводятся примеры процедур приготовления стандартных растворов, методы отбора образцов и дальнейшей пробоподготовки.

В начале **Главы 3** приведена разработка методик определения порфиринов в моче и плазме крови человека с использованием ВЭЖХ-УФ. Особое внимание уделяется выбору неподвижной фазы, подвижной фазы и режима элюирования, а также оптимизации смесей органических растворителей для получения оптимальных результатов разделения порфиринов. Далее приведена процедура валидации и калибровки методик для определения биомаркеров в биожидкостях, описаны параметры валидации. Для обеспечения селективности был проведен анализ смеси стандартов индивидуальных порфиринов, а также оценено разделение изомеров. Результаты показали, что методика обладает высокой селективностью и способностью разделять изомеры, что важно для точного определения биомаркеров в моче. Что касается оценки линейности, она была проведена на основании калибровочных кривых, показавших линейную зависимость между отношением площадей пиков порфиринов и их концентраций. Для определения прецизионности каждая проба была хроматографирована 6 раз, а также проведены дублированные испытания. Значения относительной погрешности были просчитаны для оценивания критерия правильности. Далее описывается влияние биологической матрицы на точность определения аналитов искомым соединений. Нижний предел количественного определения составляет 62,5 нМ, а предел обнаружения – 31,25 нМ. Аналитическая область охватывает диапазон от 31,25 нМ до 1 000 нМ. Методики также прошли проверку устойчивости при хранении и замораживании-размораживании образцов.

В **Главе 4** повествуется о клиническом применении разработанных методик. При анализе проб, взятых от здоровых добровольцев, а также после разбора литературных источников, были установлены нормы по содержанию порфиринов в моче и плазме крови. Была также выявлена необходимость использования этих методик при исследовании мочи и плазмы крови пациентов для получения более полной картины заболевания. Приведены: обоснование возможности определения лекарственных средств на основе порфиринов и их метаболитов в присутствии эндогенных порфиринов с помощью разработанных методик; описание алгоритма использования разработанных методик в рамках персонализированной медицины, а также рекомендации, включающие ограничения по применению определенных групп лекарственных средств, что поможет уменьшить риск возникновения осложнений, связанных с порфириями. В конце диссертационной работы размещены общие выводы, полностью отвечающие на поставленные задачи.

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

Автореферат содержит основную суть глав и разделов диссертационной работы, а также краткие итоги и выводы, что позволяет определить дальнейшие перспективы по данной тематике.

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

Диссертационная работа Даниила Андреевича Кильдюшкина является важной как с теоретической, так и с практической точки зрения для развития направления в диагностике порфиринов. За время ознакомления с результатами исследования возникли определенные вопросы и замечания, которые требуют дальнейшего рассмотрения:

1. На каком основании был сделан вывод о том, что выборка доноров условно здоровая, если не проводился специфический предварительный скрининг?
2. Недостаточно представлены данные о проведенных фармакокинетических исследованиях по существующим лекарственным препаратам на основе порфиринов. Логично было бы дополнить работу этими данными.
3. В Главе 3 в подглавах «Прецизионность» для обоих биоматериалов не приведены значения по межлабораторной прецизионности для разработанных методик. Было бы интересно посмотреть на значения по данному критерию.
4. Почему приведены только 2 критерия оценки специфичности методик (точный критерий Фишера; критерий хи-квадрат Пирсона)?
5. В диссертации наблюдаются старые источники информации, что может повлиять на актуальность и достоверность представленных данных. Рекомендуется обновить литературный базис работы с добавлением более современных источников для укрепления теоретической и практической значимости исследования.
6. Для чего при помощи разработанных методик определяются промежуточные порфирины: гептакарбоксихлоропорфирин, гексакарбоксихлоропорфирин, пентакарбоксихлоропорфирин?
7. В представленном тексте обнаружены профессиональный сленг, а также стилистические неточности, которые могут затруднять понимание для неспециалистов в данной области.

Отмеченные рекомендации и вопросы не являются принципиальными, не влияют на ценность и актуальность диссертационной работы Кильдюшкина Д.А. и имеют информационно-уточняющий характер.

## **Заключение**

Таким образом, 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 содержится решение актуальной задачи по разработке методик качественного и количественного определения порфиринов и их применению в рамках инструмента персонализированной медицины, 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 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**

Доктор фармацевтических наук

(3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия),

заведующий лабораторией судебно-химических и химико-токсикологических исследований, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 125284, Российская Федерация, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13

Телефон: +7 (495) 945 21-69

e-mail: info@rc-sme.ru



Калёкин Роман Анатольевич

Подпись

Подпись Калёкина Романа Анатольевича заверяю  
Начальник ОК ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России



Кухоль Т.Н.

« *ds* » февраль 2024 г.

