

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ, заведующего лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Жердева Владимира Павловича 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[®]», 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

Коэнзим Q10 является важным соединением, естественным образом присутствующим практически в каждой клетке человеческого организма. Его основная роль заключается в синтезе аденозинтрифосфата посредством взаимодействия с дегидрогеназами дыхательной цепи и переноса электронов к цитохромам. Помимо этого, коэнзим Q10 проявляет антиоксидантную активность, предотвращая окисление ДНК, белков и является одним из основных веществ, которые определяют устойчивость плазматической мембраны к пероксидному окислению липидов. Также, было признано, что коэнзим Q10 обладает влиянием на экспрессию генов, что может объяснить его влияние на общий тканевой метаболизм. Коэнзим Q10 существует в окисленной и восстановленной формах, чье соотношение или так называемый редокс-статус является одним из важнейших показателей состояния антиоксидантной системы.

Оксидативный стресс играет центральную роль в патогенезе сердечно-

сосудистых заболеваний, включая хроническую сердечную недостаточность, ишемическую болезнь сердца и артериальную гипертензию. Сердечная недостаточность часто характеризуется нарушением сократительной способности миокарда в том числе и из-за истощения энергии в митохондриях, что, в свою очередь, связано с низкой концентрацией эндогенного коэнзима Q10. При этом доказано, что уровень коэнзима Q10 в плазме крови является показателем тяжести заболевания: была выявлена прямая зависимость между дефицитом коэнзима Q10 и летальным исходом у больных, а концентрация коэнзима Q10 в плазме крови ниже 0,48 мкг/мл является предсказателем смертности больных. Лекарственные средства, содержащие коэнзим Q10, улучшают сердечно-сосудистую функцию за счет увеличения выработки АТФ, улучшения сократительной способности миокарда и повышения антиоксидантной активности, например, предотвращают окисление липопротеинов низкой плотности. Было показано, что у пациентов со стабильной застойной сердечной недостаточностью пероральный прием коэнзима Q10 улучшает сократимость сердца и эндотелиальную дисфункцию.

Эндогенная концентрация коэнзима Q10 определяется как скоростью его синтеза, так и скоростью его потребления в организме. Концентрация коэнзима Q10 может варьировать в широких пределах в зависимости от различных патологий и принимаемых лекарственных препаратов. Доподлинно известно, что концентрация коэнзима Q10 снижается у больных с некоторыми заболеваниями репродуктивной системы, а также сердечно-сосудистыми, эндокринными и нейродегенеративными патологиями. Однако, результаты исследований концентрации эндогенного коэнзима Q10 у разных авторов существенно различаются. Также, в литературе можно найти лишь ограниченные данные о влиянии некоторых препаратов (таких как статины) на концентрацию эндогенного коэнзима Q10. При этом, практически отсутствуют исследования, изучающие изменения редокс-статуса коэнзима Q10 в плазме крови больных с различными патологиями. Для этого необходимо было разработать селективную методику количественного

определения убихинона и убихинола, которая обеспечит возможность достоверного измерения и расчета редокс-статуса у больных с различными патологиями.

Исходя из вышеизложенного, диссертационное исследование Зозиной Владлены Игоревны, целью которого являлась разработка методики количественного определения убихинона, убихинола и коэнзима Q10 с последующим расчетом редокс-статуса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, принимающими различную терапию посвящено актуальной проблеме и имеет большую теоретическую и практическую значимость.

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

Зозиной Владленой Игоревной проведен глубокий анализ литературных источников, включая отечественные и зарубежные публикации. В ходе анализа литературы диссертантом изучены основные функции, биосинтез и метаболизм коэнзима Q10, механизмы редокс-статуса коэнзима Q10 в дыхательной цепи, различные методы количественного определения коэнзима Q10, а также его роль при различных патологиях.

Степень обоснованности научных положений и выводов диссертационной работы Зозиной В.И. базируется на достаточном для получения репрезентативных результатов количестве экспериментального материала. В ходе исследования были использованы селективные, чувствительные и специфичные методы хроматографического анализа со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием. Выводы, сформулированные в диссертационном исследовании, основываются на результатах анализа исследуемых объектов, а также на статистической обработке экспериментальных данных с применением параметрических и непараметрических методов статистики. Материал исследования структурирован, выводы свидетельствуют о выполнении поставленных задач и достижении цели исследования. Рекомендации, представленные автором,

логично вытекают из полученных результатов, выявленных закономерностей и сделанных выводов.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Зозиной В.И. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием были разработаны методики количественного определения как общего коэнзима Q10, так и убихинона, и убихинола, при помощи которых было изучено влияние таких препаратов, как амлодипин, аторвастатин, этоксидол и Кудесан® у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Диссертантом было отмечено, что у больных с такими заболеваниями, как хроническая сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия уменьшается не только концентрация общего коэнзима Q10, но меняется сам редокс-статус, соотношение между убихинолом и убихиноном в сторону окисленной формы. Зозиной В.И. впервые был определен редокс-статус у пациентов с 0-I ФК ХСН, принимающих Кудесан®, и отмечено, что при его приеме концентрация коэнзима Q10 возрастает за счет именно его восстановленной формы, убихинола, который обладает непосредственным антиоксидантным потенциалом.

Для статистической обработки полученных данных диссертантом были использованы: парный и непарный t-тест Стьюдента для сравнений в группах с нормальным распределением, а также, непараметрического теста Манна-Уитни при отсутствии нормального распределения. Для сравнения трех и более групп автор использовал метод однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорными сравнениями при помощи критерия Тьюки-Крамера. Таким образом, достоверность и новизна полученных результатов не вызывает сомнения.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Данные, полученные в ходе диссертационного исследования Зозиной

В.И. свидетельствуют о том, что разработанные методики количественного определения убихинона и убихинола при помощи ВЭЖХ-МС/МС с последующим определением редокс-статуса коэнзима Q10, могут быть использованы как инструмент показателя тяжести окислительного стресса, который, в свою очередь, может быть применен у пациентов не только с сердечно-сосудистыми заболеваниями, но и другими патологиями: бронхолегочными, нейродегенеративными, патологиями репродуктивной системы. Полученные данные также раскрывают перспективу дальнейшего развития и изучения темы по взаимосвязи и соотношению редокс-статуса коэнзима Q10 с такими маркерами окислительного стресса, как: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и другими.

С другой стороны, редокс-статус коэнзима Q10 позволяет оценить эффективность и безопасность проводимой фармакотерапии. Ранее сообщалось, что снижение концентрации коэнзима Q10 может приводить к побочным действиям (например, рабдомиолиз при приеме статинов). Однако, благодаря данным, полученным в ходе диссертации, становится понятно, что именно изменение соотношения убихинола и убихинона в сторону окисленной формы может приводить к возникновению побочных действий, а не общее снижение коэнзима Q10. Результаты диссертационного исследования могут изменить подход к оценке безопасности фармакотерапии. А методический подход, разработанный в ходе диссертации, позволяющий расчетным методом определить концентрацию убихинола, как разность между концентрацией общего CoQ10 и убихинона, делает методику легко применимой в рутинной лабораторной практике, в том числе, для проведения фармакокинетических исследований лекарственных форм, содержащих CoQ10 с уточнением изменения соотношения убихинона и убихинола в плазме крови пациентов. Разработанные автором методики количественного определения убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10 внедрены в рабочую практику лаборатории №51 Фармакологии и фармацевтической разработки ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России».

Кроме того, результаты, полученные Зозиной В.И. позволяют рекомендовать назначение антиоксидантов и препаратов, содержащих коэнзим Q10 больным сердечно-сосудистыми патологиями.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют 3 и 4 пунктам паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и 7, и 8 пунктам паспорта специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По основным положениям и результатам исследования Зозиной В.И. опубликовано 13 печатных работ, в том числе 2 работы, включенных в перечень ВАК при Минобрнауки России и 7 работ в журналах, включенных в международные базы данных, из которых 3 статьи опубликованы в категории журналов с квартилем Q2. Также, автором опубликовано 3 работы в сборниках международных и всероссийских конференций.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Зозиной В.И. состоит из литературного обзора, главы материалов и методов, трех глав с описанием полученных результатов, главы обсуждения результатов и выводов. План построения диссертации соответствует классической схеме, работа изложена на 191 странице текста, иллюстрирована 46 таблицами и 40 рисунками. Библиографический список содержит ссылки на 198 работ, включая 163 работы зарубежных авторов. Диссертация написана хорошим литературным языком, легко читается.

Во введении диссертации грамотно обоснована актуальность исследования, четко сформулированы цели и задачи исследования. Автор точно указал методы исследования, а также обосновал степень достоверности полученных результатов.

Обзор литературы представляет собой описание как общих биохимических свойств коэнзима Q10, его функции и распределение в организме, так и роль в различных патологиях. Несмотря на то, что в диссертационной работе изучены концентрации убихинона, убихинола и коэнзима Q10 только у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, в литературном обзоре автор описывает его роль и при других патологиях. Это открывает перспективы дальнейшего изучения данной тематики. Также, в обзоре приведены современные методы количественного определения коэнзима Q10 с кратким описанием пробоподготовки и экстракции коэнзима Q10 из биологических матриц.

Глава Материалы и методы посвящена как перечислению приборов и реактивов, использованных в ходе исследования, так и приготовлению стандартных растворов для методик со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием. Стоит отметить четкое описание дизайна исследования, проиллюстрированного таблицами, что логично облегчает восприятие материала. В данной главе очень подробно описаны методы статистической обработки полученных результатов. Стоит отметить разнообразие статистических методов, использованных автором, что только подчеркивает достоверность полученных результатов.

Третья глава посвящена разработке методик количественного определения убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Автором была разработана методика определения убихинона при помощи ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, но из-за недостаточной чувствительности было принято решение разработать методику ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, как более чувствительную и специфичную. Автором четко представлен подбор хроматографический условий с приложением к работе хроматограмм и описанием этапов выбора подвижной фазы, скорости потока, температуры. Для методики ВЭЖХ - МС/МС автором представлены все условия детектирования, а также

приведено описание градиента состава и скорости потока подвижной фазы. Для количественного определения убихинола предложен метод «вычитания». Проведена валидация разработанных методик. Предел детектирования для методики ВЭЖХ-МС/МС составил 0,10 мкг/мл, что позволило автору использовать данную методику для дальнейших исследований.

В четвертой главе автор изучает особенности содержания убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10 у больных II-III ФК ХСН, принимающих амлодипин, аторвастатин и этоксидол. Автор сравнивает концентрации содержания убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10 у здоровых лиц и у изученной группы, приходя к выводу, что у последних редокс-статус резко смещается в сторону окисленной формы. Таким образом, определение редокс-статуса коэнзима Q10 можно принять как косвенный, но надежный показатель усиления оксидативного стресса у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Автором показано влияние изученных препаратов на концентрации убихинола, убихинона и редокс-статуса коэнзима Q10: при приеме аторвастатина значительно снижается как концентрация общего коэнзима Q10, так и концентрация убихинола, что влечет за собой умеренное снижение редокс-статуса. Прием амлодипина влечет за собой достоверное увеличение концентрации убихинона и незначительное повышение концентрации убихинола, что также незначительно увеличивает редокс-статус. В свою очередь, этоксидол достоверно увеличивает концентрацию общего коэнзима Q10, как за счет окисленной формы, так и за счет восстановленной формы, из-за чего можно отметить тенденцию к увеличению редокс-статуса.

В пятой главе автор изучает влияние Кудесана® на концентрации убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10, сравнивая группу больных 0-I ФК ХСН, принимающих стандартную терапию и группу больных 0-I ФК ХСН, дополнительно к стандартной терапии получающих Кудесан®. Было отмечено, что у больных на стандартной терапии и в исходной, и в тестируемой группе наблюдалось снижение концентрации как коэнзима Q10,

Данные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на её положительную оценку. Принципиальных замечаний по диссертации нет.

В качестве научной дискуссии хотелось бы получить ответы на вопросы:

1. Почему в хроматограммах проб плазм крови, полученных методом ВЭЖХ-МС/МС, присутствует только пик токоферола ацетата, но отсутствует эндогенный токоферол?
2. Зачем в работе используются две ВЭЖХ методики количественного определения коэнзима Q10 - с УФ-детектированием и с МС/МС-детектированием?

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 законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача по научному обоснованию фармакологического действия лекарственного препарата Кудесана® с применением разработанной автором методики количественного определения убихинона и убихинола методом ВЭЖХ-МС/МС, и заслуживает положительной оценки. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Зозиной В.И. имеет существенное значение для фармацевтической химии и клинической фармакологии и полностью 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 медицинских наук (3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология)
профессор, заслуженный деятель науки РФ
заведующий лабораторией фармакокинетики
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

01. 12. 2022.

Жердев Владимир Павлович

Подпись д.м.н., профессора Жердева В.П. заверяю:
ученый секретарь
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»
к.б.н.



Крайнева Валентина Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова"
Адрес: 125315, г. Москва, улица Балтийская, д. 8
Тел.: 8 (495) 601-21-57
Адрес электронной почты: zherdevpharm@mail.ru