

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке, инновациям и цифровизации ФГБОУ ВО «ВГУ»
доктор физико-математических наук, профессор
_____ Дмитрий Владимирович Костин
«21» 02 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» 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

Тема исследования Кильдюшкина Д.А., посвященного разработке методик определения порфиринов в биологических жидкостях, имеет высокую актуальность в современной медицине, фармации и научных изысканиях. Известно, что порфирии являются группой орфанных заболеваний с примерным числом заболевших в России 10/100 000 человек (по заключению Национального гематологического сообщества). При этом данная патология связана с нарушением синтеза гема, что приводит к накоплению в организме порфиринов и их предшественников, которые являются весьма токсичными соединениями.

Указанное состояние может проявляться различными клиническими симптомами, такими как фотосенсибилизация, поражения нервной системы и другие.

Порфирины применяются как лекарственные средства или являются метаболитами пролекарств, поэтому изучение фармакокинетики и проведение терапевтического лекарственного мониторинга лекарственных препаратов, основанных на порфиринах, является важным для обеспечения безопасности и эффективности лечения.

Разработка эффективных методик и технологий анализа образцов биологических материалов может улучшить точность диагностики порфирий, что позволит своевременно начать лечение и предотвратить прогрессирование заболевания. Кроме того, такие методики могут быть использованы для корректировки терапевтических подходов у пациентов с порфириями и другими заболеваниями, при которых наблюдается превышение норм значений порфиринов.

Известно, что классификация порфирий обычно основывается на двух основных типах: 1) по течению заболевания – острые и хронические; 2) по месту накопления порфиринов и их прекурсоров в организме – печёночные и эритропоэтические. Важно, что при острых порфириях характерны эпизодические кризисы, т.н. острые порфириновые атаки, которые чаще всего вызывают различные неврологические симптомы, тогда как для хронических порфирий более характерны кожные проявления. Актуальна разработка рекомендаций, позволяющих снизить вероятность порфириновых атак, что позволит уменьшить вероятность возникновения потенциально опасных клинических проявлений, понижающих качество жизни пациентов.

Существуют различные методы для определения порфиринов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Спектрофотометрический метод является быстрым и недорогостоящим, однако обладает низкой чувствительностью и специфичностью по сравнению с ВЭЖХ. Масс-спектрометрия обеспечивает высокую чувствительность и специфичность, но также требует дорогостоящего оборудования, специализированных навыков и более длительного времени для

обработки по сравнению с другими методами. Биохимические методы (например, тест Watson-Schwartz или тест Hoesch) представляют собой простые тесты, которые могут быть полезны для скрининга порфирий и позволяют быстро получить результат, но они могут дать ложноположительные или ложноотрицательные результаты и, как правило, менее точны, чем ВЭЖХ или масс-спектрометрия, а также способны определять лишь ограниченное количество аналитов. В идеальном случае метод должен быть достаточно чувствительным, специфичным, несложным в освоении, не требовать высокой стоимости и амортизации оборудования, также быть достаточно быстрым.

Важно, что высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором имеет несколько преимуществ, особенно при определении порфиринов. Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью. С ним возможно определять и разделять даже небольшие количества порфиринов, включая как свободные, так и связанные формы. Также этот метод предполагает быстрое и эффективное измерение порфиринов без необходимости длительных и сложных процедур подготовки образцов. Таким образом, высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором представляет собой мощный и эффективный инструмент для определения порфиринов, что делает тему диссертационной работы актуальной и значимой.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа Кильдюшкина Д.А. выполнена в соответствии с планом и тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237.)

Новизна исследования и полученных результатов

Автор провел исследование, в результате которого были разработаны высокоселективные методики качественного и количественного определения порфиринов в моче и плазме крови с использованием метода ВЭЖХ-УФ. Разработанные методики упрощают лабораторную диагностику порфирий и способствуют более полной дифференциации патологического состояния, а также позволяют проводить исследования по фармакокинетике порфиринов и терапевтическому лекарственному мониторингу. Их оптимизация позволяет обнаруживать 9 маркеров в 8 точках нарушения биосинтеза гема. Разработанные методики выделяются применением внутреннего стандарта для количественного определения, что позволяет уменьшить случайные ошибки при анализе. Также, возможность идентификации большего количества изомеров различных типов порфиринов обеспечивает более точную диагностику данной патологии. Кроме того, проведена валидация методик по основным валидационным требованиям согласно международным рекомендациям.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Разработанные методики могут значительно улучшить возможности отслеживания порфиринов при проведении анализов. Эффективность и простота предложенный автором методик могут обеспечить снижение затрат, трудоемкости исследований и потребности в специализированном оборудовании, что делает их более экономически релевантными для широкого использования в лабораториях учреждений здравоохранения.

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Кильдюшкина Д.А. внедрены и использованы 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;
- рабочем процессе Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия;
 - рабочем процессе Института иммунологии в Лаборатории фармакологии и клинического разработки № 51.

Личный вклад автора

Личный вклад автора Кильдюшкина Д.А. является определяющим на каждой фазе исследования, начиная от сбора информации и заканчивая проведением экспериментов, обнародованием результатов в статьях, отчетах, их внедрением в обучение и профессиональную деятельность. Вклад автора включает в себя определение основных целей и завершения их путем теоретического и экспериментального подходов. Процесс отбора и анализа литературных источников и эмпирических данных также включен в авторский вклад, что позволило выбрать метод ВЭЖХ-УФ. Лично автором разработаны пробоподготовка, проведена валидация методик в различных биологических жидкостях (моче и плазме крови), а также проанализированы образцы потенциально здоровых добровольцев, установлены нормы содержания порфиринов в изучаемых биожидкостях, рассчитана диагностическая ценность методик, обосновано применение методик в изучении фармакокинетики порфириносодержащих препаратов и представлены рекомендации по лекарственной терапии данной группы заболеваний. Автор занимался созданием дизайна исследования, выбором инструментария, разработкой и модификацией методик анализа данных, а также интерпретацией и подведением итогов исследования.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Полученные результаты и выводы диссертационной работы Кильдюшкина Даниила Андреевича рекомендуется применять в учебной деятельности заведений высшего и среднего медицинского и фармацевтического образования по специальности «Фармация». Результаты диссертационной работы рекомендуются к использованию лабораториям, а также специалистам, связанным с клинической диагностикой заболеваний, при которых происходят нарушения порфиринового обмена.

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 изложена на 140 страницах текста компьютерной веретки и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, 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.

Введение в диссертационной работе описывает общий контекст исследования, обоснование актуальности исследуемой проблемы, цели и задачи работы, содержит краткое изложение методологии исследования, а также основные теоретические и практические аспекты, связанные с исследуемой темой.

Глава 1 представляет собой обзор литературных источников и эмпирического материала, который содержит три основных раздела. В начале представлена краткая характеристика лекарственных средств, основанных на порфиринах, общая характеристика порфирий. В следующем разделе содержится анализ подтипов порфирий в соответствии с их классификацией (печеночные и эритропоэтические), рассмотрена этиология и клиническая диагностика порфирий.

В **Главе 2** содержится обобщенная информация о объектах исследования, оборудовании, реактивах и методиках, применяемых в проведении эксперимента.

В **Главе 3** приведены итоги проведения оценки разработанных методик согласно выбранным валидационным критериям. Разработанные методики показали свою эффективность при выявлении порфиринов в биологических образцах, так как с их помощью возможно выявлять даже изомеры порфиринов, что повышает значимость данных методик. Результаты валидации указывают на высокую специфичность, исключающую возможное воздействие других компонентов на результаты анализа порфиринов. Разработанные методики демонстрирует линейную зависимость между концентрацией порфиринов и отношением площадей их пиков и внутреннего стандарта, что подтверждается значением коэффициента корреляции больше 0,99. Результаты валидации показали, что методики обладает высокой точностью, что подтверждается сопоставлением полученных значений порфиринов с известными эталонами. Стандартное отклонение от среднего значения не превышает установленные допустимые пределы.

В **Главе 4** приводятся примеры использования разработанных методик определения порфиринов в клинической практике. Приводятся обоснования применения методик в обеих биожидкостях (крови и моче), с целью повышения прецизионности диагностирования. Описывается разработка норм по содержанию

порфиринов в моче и плазме крови пациентов, что подчёркивает основательность проведённого исследования. Приводятся сведения об использовании предложенных методик при исследовании лекарственных средств на основе порфиринов, предлагается разработанный алгоритм применения методик в рамках персонализированной медицины и рекомендации по корректировке фармакотерапии порфириногенными лекарственными препаратами.

Сформулированные автором выводы являются логическим результатом аналитической обработки информации и экспериментальных данных, полученных в процессе диссертационного исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

На основании проведенных исследований и анализа данных можно сделать вывод, что диссертационная работа Кильдюшкина Даниила Андреевича может внести существенный вклад как в академическую науку, так и в практику медицинского обслуживания, предоставляя новые знания, методики и инструменты для диагностики и лечения порфирий. При ознакомлении с результатами исследования возникли определенные вопросы и замечания:

1. Предлагаемый Вами метод позволяет определять такие активные фармацевтические субстанции, как станнопорфин и активные метаболиты лекарственного препарата Аласенс (аминолевулиновая кислота), включая протопорфин. В связи с этим возник вопрос, какие ещё лекарственные средства описанный метод способен идентифицировать?
2. Рекомендуется приводить таблицы по критерию валидации «устойчивость», описывающие методологию оценки этого параметра.
3. Почему в качестве внутреннего стандарта используется 2-винил 4-гидроксиметил-дейтеропорфирин IX?
4. В литературном обзоре Вами были описаны различные методы анализа порфиринов. Проводили ли вы анализ сравнительной эффективности методов

хроматографии и оценивали ли их применимость в контексте вашего исследования?

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 на основании выполненных автором исследований по разработке методик качественного и количественного определения порфиринов, а также их применения в клинической практике и в рамках персонализированной медицины, содержится решение задачи, имеющей существенное значение для фармацевтической химии, фармакологии 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.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Кильдюшкина Даниила Андреевича обсужден и утвержден на совместном заседании кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии и

кафедры фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», протокол № 1
от 21.02 2024 г.

Отзыв подготовили:

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», доктор медицинских наук (14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология), доцент

Бузлама Анна Витальевна

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», доктор фармацевтических наук (14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия), профессор

Сливкин Алексей Иванович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», 394006, Воронеж, Университетская площадь, д. 1, тел. (473)220-75-21, e-mail. office@main.vsu.ru, web-сайт <http://www.vsu.ru>

Подпись Сливкина Алексея Ивановича и Бузлама Анны Витальевны заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»



Лопаева М.А..

« 21 » февраля 2024 г.