

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора Калениковой Елены Игоревны на диссертацию Егоренкова Евгения Андреевича на тему: «Разработка методик совместного количественного определения лекарственных веществ – субстратов-маркеров различных изоферментов цитохрома P450 методом LC-MS/MS» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы исследования.

Возникновение нежелательных лекарственных явлений (НЛР) – частая причина обращения к врачу. Число больных, у которых возникают подобные явления при приеме лекарственных препаратов, составляет около 25%. Наиболее частой причиной госпитализации таких больных становятся НЛР при приеме сердечных гликозидов, НПВС, глюкокортикоидов, диуретиков, гипотензивных ЛС и антикоагулянтов непрямого действия. Частота возникновения НЛР в первую очередь зависит от индивидуальных особенностей, пола, возраста больного, тяжести основного и сопутствующих заболеваний, фармакодинамики и фармакокинетики лекарственных средств, дозы, длительности приема, путей введения препарата. Данные факторы влияют на активность метаболизма человека, что в свою очередь приводит к изменению фармакокинетических параметров препарата и последующему возникновению НЛР.

Для снижения риска возникновения НЛР существуют различные подходы к определению активности основных изоферментов системы цитохрома P450 (СYP), являющейся основной системой метаболизма практически всех известных лекарственных веществ. Наиболее точным является метод фенотипирования *in vivo*, заключающийся в введении пациенту специфических субстратов – маркеров основных изоферментов СYP с последующим количественным определением введенного субстрата и его метаболита в биологической жидкости. Для применения такого метода необходимы точные, селективные и воспроизводимые методики количественного определения субстратов – маркеров (в качестве которых применяются лекарственные вещества и вещества эндогенной природы) и их метаболитов в биожидкостях организма современными физико-химическими методами, которым является высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Все это определяет актуальность диссертационного исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Цель диссертационного исследования заключалась в разработке и валидации методики совместного количественного определения субстратов-маркеров основных изоферментов СУР и их метаболитов в биожидкости организма методом ВЭЖХ-МС/МС для фенотипирования ферментов метаболизма и определения их активности с использованием эндогенных соединений.

Для этого автором были сформулированы и последовательно решены 5 научных задач, алгоритм решения которых предопределил структуру и логику диссертационного исследования.

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав и общих выводов, содержит 14 рисунков и 13 таблиц. Библиографический список включает 122 литературных источника, из них 112 - на иностранном языке.

Первая глава посвящена аналитическому обзору профильной литературы по вопросу использования методик определения активности основных изоферментов СУР методом фенотипирования *in vivo*, в том числе, «коктейльные» методы. В интересах выбора объектов исследования автором проведена работа по определению основных изоферментов СУР, метаболизирующих лекарственные вещества. Также в данной главе автор привел сравнительную характеристику описанных в литературе методик количественного определения субстратов-маркеров и их метаболитов и критически оценил достоинства и недостатки каждой из них, таким образом предопределив основные подходы в разработке собственных методик пробоподготовки и последующего совместного количественного определения.

Во второй главе представлены физико-химические характеристики используемых в диссертационном исследовании лекарственных и эндогенных веществ. В этой же главе представлен список оборудования, реактивов и статистических методов, используемых для решения поставленных научных задач.

В рамках **третьей главы** представлены результаты разработки и валидации методик пробоподготовки с последующим совместным количественным определением исследуемых аналитов в плазме крови и моче. Автором проведена валидация разработанных биоаналитических методов по основным параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, точность и прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность. Полученные результаты валидации соответствуют критериям приемлемости согласно действующей нормативной

документации, что подтверждает возможность использования разработанных методик в практике лабораторий клинической фармакологии и фармакокинетики. Данный факт также подтверждается приведенными в этой же главе результатами применения разработанных методик в исследованиях по определению активности основных изоферментов СУР.

Достоверность полученных результатов и научная новизна.

Достоверность полученных результатов и научная новизна обеспечены достаточным объемом исследований, выполненных автором с использованием современных научных методов и подходов.

Основные результаты диссертационного исследования были предметом широкого обсуждения во время докладов на научном совете НИИ Фармации «Достижения и перспективы молодых ученых НИИ Фармации» (Москва, 2014) и на Конгрессе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ) (Барселона, 2015). Также результаты диссертационного исследования представлены в 6 научных публикациях, из них 3 – в изданиях из Перечня ВАК, 2 – в изданиях, включенных в базу Scopus и Web of Science.

Научная новизна исследования состоит в разработке новых подходов к подбору субстратов-маркеров для определения активности изоферментов СУР. С целью повышения безопасности методики, в качестве субстратов-маркеров, где это возможно, использовались эндогенные вещества. В остальных случаях использовались относительно безопасные лекарственные вещества, не вызывающие НЛР в используемых дозировках. Автором представлены валидированные методики пробоподготовки, позволяющие изолировать изучаемые аналиты в одну пробу, для облегчения последующего количественного определения последних при совместном присутствии. Данный подход значительно облегчает введение результатов исследования в лабораторную практику.

Значимость для науки и практики.

Важным научно-практическим выводом диссертации является разработка точных, воспроизводимых методик совместного количественного определения субстратов-маркеров основных изоферментов СУР и их метаболитов в плазме крови и моче с последующим внедрением полученных результатов исследования в практику лаборатории клинической фармакологии ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России и отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России.

Теоретические результаты разработки подходов к пробоподготовке и количественному определению исследуемых аналитов в биожидкостях организма могут быть в дальнейшем использованы для проведения исследования фармакокинетики различных лекарственных и эндогенных веществ.

Результаты работы могут использоваться в процессе подготовки специалистов по специальности 33.05.01 Фармация и слушателям курсов повышения квалификации при организации и подготовке к занятиям.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Оценивая данное диссертационное исследование в целом положительно, необходимо отметить следующие недостатки и замечания:

1. В качестве внутреннего стандарта выбран карбамазепин, являющийся структурным аналогом лишь двух исследуемых аналитов.

Использование дейтерированных внутренних стандартов могло бы повысить точность и линейность разрабатываемых методик.

2. Определение активности основных изоферментов СYP после трансплантации печени проводилось лишь однократно. Это может дать недостоверные результаты для специалистов-трансплантологов и гепатологов.

3. Диссертация в целом написана хорошим литературным языком, однако в тексте встречаются отдельные стилистические погрешности и опечатки.

Указанные замечания не снижают высокой результативности и научной значимости данного диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Егоренкова Евгения Андреевича на тему: «Разработка методик совместного количественного определения лекарственных веществ субстратов-маркеров различных изоферментов цитохрома P450 методом LC-MS/MS», представленная в Диссертационный совет Д 208.040.09 на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по разработке новых методик

пробоподготовки и количественного определения лекарственных и эндогенных веществ при совместном присутствии методом LC-MS/MS.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, степени обоснованности и достоверности полученных результатов и выводов диссертационная работа Егоренкова Евгений Андреевича на тему: «Разработка методик совместного количественного определения лекарственных веществ – субстратов-маркеров различных изоферментов цитохрома P450 методом LC-MS/MS» соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Егоренков Евгений Андреевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – фармацевтическая
химия, фармакогнозия), профессор,
заведующий кафедрой
фармацевтической химии,
фармакогнозии и организации
фармацевтического дела
Факультета фундаментальной
медицины Московского
государственного университета им.
М.В. Ломоносова,
119192, г. Москва, Ломоносовский
проспект, 27 корп. 1,
тел.: 8 (495) 932-99-11
eikaleni@fbm.msu.ru

Каленикова Елена Игоревна

Подпись Калениковой Елены
Игоревны подтверждаю

Декан Факультета фундаментальной
медицины Московского
государственного университета им.
М.В. Ломоносова, академик РАН



Качук Всеволод Арсеньевич