

УТВЕРЖДАЮ

**Проректор по научной работе
Федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования «Российский
университет дружбы народов» (РУДН)
Министерства образования и науки РФ
профессор**

_____ **Н.С. Кирабаев**

«____» _____ 2015 г

ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ на диссертацию Харитоновой Екатерины Викторовны «Биофармацевтический анализ и фармакокинетика убидекаренона», представленную в диссертационный совет Д 208.008.02 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям: 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология; 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Диссертация Харитоновой Екатерины Викторовны посвящена совершенствованию методик определения CoQ₁₀ в лекарственных средствах и биологических материалах для оценки фармакокинетических параметров действующего вещества при разных способах введения и контроля качества препаратов.

Актуальность темы диссертационной работы. Более чем полувековая история применения CoQ₁₀ в качестве дополнительного средства для коррекции метаболических дисфункций при лечении хронической сердечной недостаточности, артериальной гипертензии, онкологических заболеваниях, синдроме приобретенного иммунодефицита и других заболеваниях доказывает его эффективность. Это порождает необходимость детальных фармакокинетических исследований терапевтического средства, применяемого в разных лекарственных формах, и контроля качества последних. В свою очередь, становится очевидным необходимость разработки новых и совершенствования

имеющихся методик определения убидекаренона при проведении фармацевтического и биофармацевтического анализа.

Актуальность диссертации несомненна в связи с широким спектром показаний к применению убидекаренона, возрастания числа и вида его лекарственных форм, ужесточением требований к методикам контроля качества лекарственных средств, совершенствованием биофармацевтических исследований на основе фармакокинетических закономерностей с использованием современных инструментальных методов анализа. Подтверждением актуальности проведенных исследований является появление зарубежных публикаций (уже после завершения диссертационного исследования) по успешному применению CoQ₁₀ в медицинской практике, например, для лечения миопатии, вызываемой статинами ([HistolHistopathol.](#) 2014 Nov 4) или обзоров по стратегии определения его в биоматериалах ([MethodsMolBiol.](#) 2015;1208:409-20).

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 163 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, включающей 5 глав. В главе 1 представлено описание материалов и методов. В главах 2-5 представлены результаты и их обсуждение. Диссертация детально проиллюстрирована 35 таблицами и 45 рисунками. В завершении работы автор делает общее заключение по работе, а также формулирует основные выводы из проведенных исследований. Список литературы содержит 254 ссылки, из них 229 – на зарубежные издания.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с приоритетными направлениями фундаментальных научных исследований МГУ имени М.В. Ломоносова «Выяснение механизмов развития патологических процессов, поиск путей их коррекции и предотвращения» по теме «Поиск новых подходов фармакологической коррекции нарушений, вызванных ишемией миокарда и мозга» по плану научно-исследовательских работ кафедры фармакологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Номер госрегистрации 01201353963.

Научная новизна полученных результатов. Автором разработаны оригинальные методики определения CoQ_{10} в окисленной и восстановленной ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) формах. Для этого автор использовал два аналитических метода: ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ. Методики применены для анализа фармацевтических субстанций, фармацевтических продуктов и биологических материалов. Определение содержания CoQ_{10} в эндометрии матки осуществлено впервые.

Автор впервые исследовал кинетические параметры распределения CoQ_{10} после внутривенного и внутримышечного введения раствора солюбилизированной субстанции. При этом прослежена динамика редокс-статуса кофермента в крови после внутривенного введения. Продемонстрировано быстрое образование его восстановленной формы, повышающей антиоксидантный резерв организма. Определены абсолютная и относительная биодоступности CoQ_{10} при внутримышечном и пероральном путях введения. Изучено распределение в потенциальные органы-мишени – миокард, головной мозг и печень. Впервые показана возможность преодоления гематоэнцефалического барьера и повышения уровня CoQ_{10} в мозге после внутривенного введения раствора солюбилизированной субстанции.

Практическое значение и внедрение полученных результатов. Методики определения CoQ_{10} на основе ВЭЖХ со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием применимы для его количественного определения в субстанции, лекарственных препаратах, БАД и биологических материалах.

Результаты фармакокинетических исследований позволили обосновать перспективность разработки парентеральных лекарственных форм убидекаренона для использования в неотложной терапии острых патологических состояний миокарда и головного мозга.

Методики ВЭЖХ-определения CoQ_{10} в биоматериалах внедрены в Центре планирования семьи и репродукции для изучения состояния системы антиоксидантной защиты у женщин с бесплодием различного генеза; в многоцентровом клиническом исследовании эффективности приема препарата Кудесан пациентами с диагнозом ХСН II-III функциональных классов (совместно с ЗАО «Аквион»).

Результаты работы внедрены в учебный процесс факультета фундаментальной медицины МГУ и медицинского института РУДН (дисциплины «фармакология», «фармацевтическая химия», «физико-химические основы фармацевтического анализа»).

Основное содержание работы и достижения автора. Первый раздел диссертации - обзор литературы по теме исследования. Он содержит исчерпывающую информацию по всем аспектам фармацевтического анализа и фармакологии исследуемой субстанции. Автор приводит исторические сведения по выделению кофермента Q из митохондрий сердца быка, установлению его химической структуры, созданию промышленной технологии производства субстанции, установлению механизма участия CoQ_{10} в транспорте электронов в дыхательной цепи. Детально рассмотрена цепь биологического синтеза кофермента Q. Перечислены известные функции CoQ_{10} : переносчик электронов в дыхательной цепи митохондрий и плазматической мембране лизосом; антиоксидант; участник процесса активации митохондриальных разобщающих белков; регулятор проницаемости митохондриальных пор и др. Принимая во внимание фармакохимическую направленность исследования, автор подробно характеризует физико-химические свойства кофермента Q, а именно: различий в структуре молекул в организмах разного иерархического уровня; описанию фазового состояния, температуры плавления, растворимости, воздействия излучения, спектральных характеристик. Автор дополняет язык нормативных документов химической интерпретацией, представляя все окислительно-восстановительные равновесия с участием исследуемой субстанции. Кроме того, рассмотрены описанные в научной литературе методы определения кофермента Q_{10} . В первую очередь это метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, используемый в фармакопейном анализе для оценки чистоты субстанции и количественного определения действующего вещества в готовых лекарственных формах. Автор сравнивает результаты разных источников и демонстрирует, что предел обнаружения CoQ_{10} при электрохимическом детектировании предпочтительнее в десятки раз по сравнению со спектрофотометрическим методом. В то же время сочетание обоих методов позволяет проводить определение содержания как окисленной, так и восстановленной форм кофермента. Далее рассмотрены возможности капиллярного электрофореза и вольтамперометрии.

Автором проанализированы методики пробоподготовки биологических проб для последующего определения CoQ_{10} .

Значительная часть литературного обзора посвящена фармакокинетическим исследованиям всасывания в ЖКТ, распределения в организме, оценке биодоступности при различной степени диспергирования субстанции, увеличении гидрофильности с использованием солюбилизующих агентов и микрокапсулирования.

Принимая во внимание основную цель диссертации, автор досконально проанализировал литературу и обобщил результаты по эндогенному уровню окисленной и

восстановленной форм CoQ_{10} в организме человека и лабораторных животных, кинетике распределения по органам и тканям и его экскреции.

Автор завершает обзор литературы анализом успехов применения CoQ_{10} в клинической практике.

Таким образом, диссертант представил критический обзор литературы, на основании которого несомненна перспектива реализации цели и задач, сформулированных ранее: разработка и совершенствование методик биофармацевтического анализа, поиск наиболее эффективных лекарственных форм CoQ_{10} с высокой биодоступностью для использования как в неотложных ситуациях, так и при хронических заболеваниях.

Глава 1 экспериментального раздела диссертации посвящена описанию использованных реагентов и оборудования. Все методики грамотно с точки зрения аналитической химии описаны и сопровождаются таблицами и схемами, удобными для их последующей реализации. Кроме того, автор представляет фотографии приборов и установок, на которых проводились исследования.

В этой же главе описаны валидационные характеристики разработанных автором методик ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭФ и особенности фармакокинетических исследований. Приведен состав готовых лекарственных форм с перечнем вспомогательных веществ. Детально охарактеризованы процедуры введения препаратов лабораторным животным, отбора и хранения проб крови. Представлены формулы для расчета фармакокинетических параметров: $t_{\max}$, $C_{\max}$, AUC_{0-t} , k – константы скорости элиминации, $t_{1/2}$ – полупериода элиминации, а также формула для оценки биодоступности лекарственного средства при неинтравенном введении.

Отдельно выделена методика определения CoQ_{10} при проведении клинических исследований. Ей предшествует описание отбора проб крови и других биологических материалов у пациентов с диагнозом хроническая сердечная недостаточность и у женщин с различными патологиями, приводящими к бесплодию.

Таким образом, представленные методики биофармацевтического анализа и подходы к оценке фармакокинетических параметров свидетельствуют о широком профессиональном кругозоре и возможностях диссертанта как экспериментатора в фармацевтическом анализе и в фармакологических исследованиях.

Глава 2 экспериментальной части посвящена разработке и сравнительному анализу методик определения CoQ_{10} в фармацевтической субстанции и плазме крови на

основе метода высокоэффективной хроматографии с разными способами детектирования: спектрофотометрическим и электрохимическим.

Автор начинает свои исследования с выбора длины волны при СФ-детектировании CoQ_{10} , которые отличаются в разных нормативных документах ($\lambda=275$ нм и 290 нм), и отдает предпочтение методике фармакопеи Евросоюза (Ph. Eur), согласно которой при 275 нм достигается более низкий предел обнаружения – 4 нг. Далее описана новая, разработанная автором, методика определения обоих компонентов окислительно-восстановительной системы $\text{CoQ}_{10}/\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и, при прочих ее достоинствах, позволяющая наблюдать за переходом одной формы в другую в присутствии восстанавливающего реагента. Ранее для обнаружения восстановленной и окисленной форм кофермента было необходимо последовательно подключать электрохимический и спектрофотометрический детекторы. Благодаря полученным результатам появилась возможность определения обеих форм в одной пробе, используя переключение длины волны с 290 нм (восстановленная форма) на 275 нм (окисленная форма). Методика может быть использована не только для количественного анализа, но и для оценки стабильности и сроков годности лекарственных средств на основе CoQ_{10} .

При сопоставлении методик ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ для определения CoQ_{10} в модельных смесях с плазмой крови была доказана их взаимозаменяемость. В то же время при низких содержаниях CoQ_{10} , характерных, например, для фоновых количеств в биоматериалах, предпочтение следует отдавать электрохимической индикации в связи с выявленным более низким пределом обнаружения.

Таким образом, автором разработана новая методика определения окисленной и восстановленной формы убихинона в одной пробе на основе ВЭЖХ-СФ и доказана необходимость использования электрохимической индикации при низких содержаниях CoQ_{10} в анализируемых объектах.

Глава 3 экспериментальной части посвящена совершенствованию методик пробоподготовки биологических материалов для последующего определения окисленной CoQ_{10} и восстановленной $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ форм кофермента в биоматериалах. Для этого предварительно было проведено исследование стабильности $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме крови крыс при хранении при низких температурах. Автором установлено, что при хранении проб крови при -20°C фоновое содержание $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в течение четырех суток становится ниже детектируемых значений, тогда как общее содержание остается постоянным в течение двухнедельного наблюдения. Однако после внутривенного введения солюбилизированного убидекаренона общее количество CoQ_{10} в плазме крови крыс и

доля его восстановленной формы $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, остаются неизменными. Этот результат явился основой для последующего определения общего содержания кофермента CoQ_{10} и его восстановленной формы $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах плазмы при фармакокинетических исследованиях.

При анализе образцов тканей миокарда, печени, головного мозга крыс были исследованы и выбраны оптимальные режимы гомогенизации.

Все методики, использованные для анализа биоматериалов были валидированы согласно нормативным требованиям. Линейность хроматографической системы соблюдалась в интервале содержаний CoQ_{10} 0,01-500 мкг/мл для ВЭЖХ-ЭХ и 0,5-500 мкг/мл для ВЭЖХ-СФ ($R^2 < 0,9990$). Предел обнаружения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ составил: ВЭЖХ-ЭХ – 0,005 мкг/мл, для ВЭЖХ-СФ – 0,1 мкг/мл. Правильность составила для ВЭЖХ-ЭХ – 101,3%; ВЭЖХ-СФ – 101,6%. Прецизионность – 9,4% и 5,1% соответственно.

Таким образом, проведенный автором сравнительный анализ двух типов индикации кофермента при анализе биологических материалов методом ВЭЖХ доказал, что более достоверным и селективным является метод электрохимического детектирования.

Глава 4 экспериментальной части посвящена исследованиям фармакокинетики процессов абсорбции и элиминации CoQ_{10} после введения лекарственного средства в различных лекарственных формах. Автором представлены кинетические кривые накопления в крови и элиминации CoQ_{10} для нескольких групп животных для пяти таблетированных форм лекарственного средства. Из обобщенных фармакокинетических кривых рассчитаны важные для фармакологии параметры: AUC_{0-48} , C_{max} , t_{max} . Статистически достоверного различия в биодоступности CoQ_{10} для таблеток, содержащих и не содержащих солюбилизатор кремофор, не выявлено. Результаты характеризовались значительной вариабельностью, что автор связывает не столько с действием вспомогательных субстанций в готовых лекарственных формах сколько с межиндивидуальными различиями в абсорбции действующей субстанции. Полученные результаты позволили автору прогнозировать более высокую эффективность парентеральных форм препаратов.

Фармакокинетические кривые в полулогарифмических координатах при внутривенном введении препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) в дозе 10 мг/кг свидетельствуют о кинетике элиминации первого порядка. Изменение содержания CoQ_{10} в миокарде крыс имеет параболическую форму с максимумом при $t=6$ час, а в печени – возрастающую экспоненту. Автором впервые получены результаты по

накоплению CoQ_{10} в мозге крыс: максимум параболической кривой приходится на 0,5 час после внутривенного введения и свидетельствует о быстром преодолении гематоэнцефалического барьера.

Диссертантом впервые доказано, что после внутривенного введения значительное количество CoQ_{10} в плазме восстанавливается до $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$, а через 7 час восстановленная форма становится преобладающей.

Исследовано распределение CoQ_{10} в организме при внутримышечном введении препарата Кудесан. Повышенный уровень кофермента сохранялся в плазме крови, сердечной мышце и печени. Доказано, что абсолютная биодоступность CoQ_{10} при пероральном введении препарата Кудесан составила 0,3%, при внутримышечном – 17%. Относительная биодоступность CoQ_{10} при внутримышечном введении выше на несколько порядков в сравнении с введением той же дозы *per os*.

Таким образом, в диссертации приводятся статистически достоверные результаты, свидетельствующие о высокой тканевой доступности действующего вещества при парентеральном введении и способности организма трансформировать окисленную форму CoQ_{10} в эффективную в плане антиоксидантного действия восстановленную форму $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$. Это дало основание для заключения о перспективности разработки и использования парентеральных лекарственных форм CoQ_{10} , в первую очередь, в терапии острых патологических состояний.

Глава 5 экспериментальной части посвящена применению разработанных и усовершенствованных методик определения CoQ_{10} в клинических исследованиях. Автором проведены исследования антиоксидантного статуса женщин с эндометриозом по показателям содержания CoQ_{10} в плазме крови и эндометрии.

Оценка эффективности трехмесячного приема убидекаренона в составе препарата Кудесан при хронической сердечной недостаточности II-III классов по содержанию CoQ_{10} в плазме крови и функциональным параметрам пациентов свидетельствует о тенденции к увеличению показателей фракции выброса левого желудочка основной группы пациентов.

Степень обоснованности основных научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, подтверждается используемыми автором теоретическими положениями и экспериментальными результатами. Фармакокинетические и фармакохимические исследования были проведены с использованием современных инструментальных методов анализа, в соответствии с

нормативными регламентами, при сопоставлении с зарубежными публикациями ведущих научных изданий. Результаты экспериментов статистически обработаны с использованием современных компьютерных программ. Научные положения и выводы, вытекающие из результатов исследования, обоснованы и достоверны.

Публикации и апробация. По материалам диссертации опубликовано 23 работы, из них 6 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Результаты работы прошли многократную апробацию на конференциях регионального, всероссийского и международного уровня. Автор принимал участие в 16 научных конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальностей:

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология: п.4 Исследование взаимодействий между организмом и лекарственными средствами, изучение их фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция фармакологических параметров с биологических моделей на человека; п.11 Изучение клинической эффективности лекарственных средств у пациентов с различными заболеваниями в открытых, двойных слепых, рандомизированных, сравнительных и плацебо-контролируемых исследованиях; п.15 Изучение влияния лекарственных средств на качество жизни пациентов и здоровых добровольцев.

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия: п.3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; п.4 «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертационной работы. Поставленные задачи и использованные для их реализации подходы позволили автору получить новые результаты, которые являются важным вкладом в фармакологию и биофармацевтический анализ.

По работе имеются вопросы и замечания:

1. Пользуясь 5-ым изданием фармакопеи Европы, автор указывает в описании субстанции ее вкусовые характеристики («без вкуса») - стр. 20, хотя этот показатель качества снят с рассмотрения и отсутствует в текущих изданиях фармакопей, в том числе в Ph.Eur 7.

2. Автор среди различных названий исследуемой субстанции применяет термин «коэнзим Q₁₀». Но, несмотря на то, что термины «фермент» и «энзим» используют как синонимы, следует принять во внимание, что первый из них предпочтителен для русской и немецкой научной литературы, второй — англо- и франкоязычной.

3. В диссертации отсутствует методика количественного определения действующего вещества в субстанции (Ph.Eur7) методом УФ-спектрометрии по величине удельной абсорбции (E=169). Не обсуждается методика определения подлинности методом ИК-спектроскопии (Ph.Eur7, JP, USP – Dietary Supplements) или химическим методом с диметилмалонатом (JP, USP).

4. Выделение полярографии в отдельный метод определения CoQ₁₀ ошибочно, так как это – вольтамперометрия, но с ртутным электродом (стр.24).

5. Нечеткие выражения:

Стр.53 кислота перхлорная – по-русски это хлорная кислота

С.61 предел количественного обнаружения – количественного определения.

Замеченные опечатки и неточности не умаляют достоинств большого современного и перспективного исследования и не снижают общей высокой оценки диссертационного исследования.

Результаты диссертации характеризуются новизной и оригинальностью, соответствуют поставленным целям. Выводы сформулированы убедительно.

Автореферат диссертации соответствует содержанию диссертации.

Заключение

Диссертация Харитоновой Екатерины Викторовны «Биофармацевтический анализ и фармакокинетика убидекаренона», представляет собой самостоятельную законченную научно-квалификационную работу, в которой решены задачи, актуальные для фармакологии и фармацевтической химии.

По объему выполненных исследований, актуальности, новизне, научной и практической ценности, уровню обсуждения результатов, надежности и достоверности основных выводов кандидатская диссертация Харитоновой Екатерины Викторовны соответствует требованиям п.9 постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым

к диссертациям на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология; 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв обсужден на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института Российского университета дружбы народов» (протокол № 9 от 4 марта 2015 г.).

**Заведующая кафедрой фармацевтической
и токсикологической химии медицинского
института Федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования «Российский университет
дружбы народов» (РУДН) Министерства
образования и науки РФ доктор химических наук,
профессор Татьяна Вадимовна Плетенева
тел. 8 495 434 70 01; 8916 072 62 82
Электронная почта: tvplet@mail.ru
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6**

**Подпись доктора химических наук
профессора Плетеневой Т.В.
удостоверяю –**

«___»_____2015 г.

Директор медицинского института РУДН

А.Ю. АБРАМОВ