

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Великановой Людмилы Иосифовны на диссертационную работу Безвуляк Екатерины Игоревны на тему: «Клинико-лабораторная оценка методов терапевтического лекарственного мониторинга иммуносупрессивной терапии у пациентов после трансплантации сердца», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность избранной темы

Терапевтический лекарственный мониторинг – направление лабораторной медицины, занимающееся реализацией количественного определения лекарственных средств и их метаболитов в биологических жидкостях человека с целью оптимизации дозы и кратности приема. Терапевтический лекарственный мониторинг является востребованной отраслью лабораторной службы и инструментом персонализированной медицины, что обусловлено широким использованием в клинической практике лекарственных препаратов с узким окном безопасности. Сложность использования таких препаратов заключается в том, что незначительная, с количественной точки зрения, лабильность концентрации препарата в крови оказывает существенное значение на клинические проявления. Так, если концентрация препарата не достигает целевых значений, то и не будет достигнут лечебный эффект от терапии, а если концентрация препарата превысит верхний уровень терапевтического окна, то будут наблюдаться токсические проявления.

Проведения терапевтического лекарственного мониторинга в процессе фармакотерапии требуют некоторые антибиотики, противосудорожные препараты, сердечные гликозиды, психотропные препараты. Одной из групп препаратов, также нуждающихся в лекарственном мониторинге, и представляющие особую важность являются иммуносупрессанты.

Иммуносупрессанты – класс лекарственных препаратов, целью назначения которых выступает подавление иммунного ответа организма. Препараты из

представленной группы назначаются при различных показаниях (аутоиммунные заболевания, онкологическая патология), в том числе и при трансплантации органов.

Для проведения поддерживающей иммуносупрессивной терапии пациентов после трансплантации сердца с 2016 года рекомендован иммуносупрессант эверолимус, обладающий узким терапевтическим интервалом (3-8 нг/мл). В случае передозировки эверолимуса у пациентов наблюдаются инфекционные осложнения, проявления гематологической токсичности, нарушения липидного и углеводного обменов. В случае если концентрация эверолимуса не будет достигнута целевых значений, то возникнут серьезные риски развития отторжения. Выше сказанное требует проведения мониторинга концентраций эверолимуса в процессе лечения больных.

В практике лабораторного дела для реализации терапевтического лекарственного мониторинга используется чаще всего технологии, реализующие иммунохимический метод, отличающийся простотой использования, не дорогой стоимостью оборудования, отсутствием необходимости дополнительной подготовки специалистов. Однако, с позиции аналитической химии, принцип иммунохимического метода заключается во взаимодействии антител с молекулой лекарственного препарата. Известно, что антитела обладают сродством к определенному участку молекулы искомого вещества, а метаболиты, обладающие похожей структурой, способны также связываться с антителами, что именуется как «кросс-реактивность» метаболитов и обуславливает получение в результате более высоких уровней концентрации аналита. В рутинных биохимических исследованиях с большим диапазоном значений кросс-реактивность может не иметь существенного клинического значения, а для иммуносупрессантов, от которых зависит выживаемость пациента после трансплантации сердца, подобная погрешность в результате может носить фатальный характер.

Второй метод, используемый для реализации терапевтического лекарственного мониторинга – высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия. Метод демонстрирует высокую точность, чувствительность и специфичность в различных областях исследований. Принцип метода исключает «кросс-реактивность» метаболитов искомого вещества, что является существенным преимуществом. Для ВЭЖХ-МС/МС необходимо дорогостоящее оборудование, дополнительное

обучение персонала, время для разработки и внедрения методик. Эти сложности делают метод менее востребованным.

Опыт исследователей, описанный в публикациях, свидетельствует о несопоставимости результатов, полученных описанными технологиями, но специальных детализирующих исследований, свидетельствующих о превосходстве ВЭЖХ-МС/МС в приложении к терапевтическому лекарственному мониторингу нет.

Таким образом, на сегодняшний день, сравнительные исследования аналитического смещения между результатами, полученными иммунохимическим методом и ВЭЖХ-МС/МС, а также влияния этого смещения на отдаленные результаты лечения является крайне актуальной задачей для аналитической химии, клинической лабораторной диагностики и клинической фармакологии, а выбор оптимального метода терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса имеет существенное клиническое значение для кардиологической трансплантологии.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертационного исследования заключается в модификации методики количественного определения эверолимуса в цельной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, а именно протокола предварительной подготовки образцов цельной крови, что позволяет сократить время анализа. Модифицированная методика успешно прошла тестирование на предмет соответствия международным требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Модифицированный и валидированный протокол был впервые внедрен в лабораторную практику, демонстрируя удовлетворительные результаты межлабораторных сличительных испытаний и впервые прошел клиническую апробацию с хорошими результатами.

Впервые в лабораторной практике терапевтического лекарственного мониторинга, руководствуясь международным рекомендованным CLSI протоколом сравнения методов измерения аналитов с использованием проб пациентов, было проведено сравнительное исследование с расчетом аналитического смещения между результатами, полученными иммунохемилюминесцентным методом анализа и хромато-масс-спектрометрией.

Научная новизна исследования также определяется первым опытом лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов, перенесших трансплантацию сердца, с проведением сравнительной оценки клинических результатов лечения, полученных при использовании иммунохемилюминесцентного метода и хромато-масс-спектрометрии для контроля за концентрациями эверолимуса.

Теоретическая и практическая значимость научных результатов

Результаты диссертационной работы имеют существенное теоретическое и практическое значение.

Проблема несопоставимости результатов измерения концентраций препаратов в биологических жидкостях иммунохимическими и хромато-масс-спектрометрическими методиками существует уже давно, что подтверждается ссылками в публикациях, однако уточняющих исследований по этому вопросу не проводилось. Представленная диссертационная работа подтверждает факт существенного различия в результатах, полученных на иммунохимическом анализаторе и при помощи ВЭЖХ-МС/МС, демонстрируя конкретную величину абсолютного и относительного смещения, что расширяет знания об аналитических характеристиках лабораторных методов и представляет теоретическую значимость для аналитической и токсикологической химии, клинической лабораторной диагностики и клинической фармакологии. Сравнение характеристик иммунохимической методики и методики, реализуемой методом ВЭЖХ-МС/МС, имеет фундаментальное значение для понимания аналитических возможностей лабораторных технологий терапевтического лекарственного мониторинга и практических точек приложения. Полученные результаты диссертационного исследования могут служить основой и причиной для расширения дальнейшего поля исследований в области контроля за фармакотерапией.

Практическая значимость работы заключается в модификации биоаналитической методики определения концентрации эверолимуса в крови методом ВЭЖХ-МС/МС, внедрении в лабораторную и клиническую практику наблюдения за пациентами с сердечным трансплантатом, принимающих в составе поддерживающей иммуносупрессивной терапии эверолимус.

Особо ценными являются результаты, отражающие влияние выбора лабораторного метода измерения концентрации эверолимуса на клинические исходы по результатам четырехлетнего наблюдения, а именно риски развития острого и хронического отторжения, и частоту инфекционных заболеваний, что имеет существенное и решающее клиническое значение для пациентов с сердечным трансплантатом.

Полученные результаты научно-исследовательской работы внедрены в деятельность центральной клиничко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Теоретически значимые результаты исследования внедрены в образовательный процесс кафедры лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Достоверность и апробация результатов

Диссертационная работа Безвуляк Е.И. выполнена с соблюдением правил проведения научных исследований и отвечает этическим принципам.

Обоснованность научных результатов и выводов, сформулированных в диссертации, обусловлена тем, что работа методологически грамотно выполнена, цель исследования, задачи и положения, выносимые на защиту сформулированы адекватно и соответствуют содержанию диссертационной работы, объем проведенных исследований достаточен, дизайн исследования – ретроспективно-проспективное исследование позволяет полностью реализовать задачи, поставленные в научной работе.

Достоверность полученных результатов обеспечена тем, что в процессе реализации диссертационного исследования использовалось высокотехнологичное современное лабораторное оборудование и сертифицированные реагенты, регулярно проводился внутрिलाбораторный контроль качества и межлабораторные сличительные испытания.

Модифицированная аналитическая методика определения концентрации эверолимуса в крови была протестирована на соответствие международным требованиям, продемонстрировав хорошие результаты. Сходимость результатов при проведении межлабораторных сличительных испытаний составила 86%.

Раздел работы, направленный на оценку смещения между результатами, измеренными ВЭЖХ-МС/МС и иммунохимическим методом, выполнен при помощи проб пациентов в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов. Отбор образцов производился в одинаковых условиях в точке остаточной равновесной концентрации. Сравнительные исследования выполнялись из одного и того же биологического материала одновременно. Измерения концентрации эверолимуса в каждом биологическом образце проводили двукратно каждым методом.

Математическая обработка результатов, полученных ВЭЖХ-МС/МС проводилась при помощи программы качественного анализа MussHunter Qualitative analysis V.07.00. Статистическая обработка данных проводилась посредством соответствующих надлежащих методов с использованием современных статистических пакетов, что удовлетворяет требованиям доказательной медицины.

Научные выводы и практические рекомендации диссертационной работы аргументированы и, в целом, соответствуют поставленным цели и задачам, отражая полученные результаты.

Апробация работы проведена на международных научных и научно-практических конференциях. Результаты апробации и реализации полученных данных подтверждают научную новизну и значимость выполненного исследования. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 размещены в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом

Диссертация Безвуляк Екатерины Игоревны представлена на 115 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Материалы, методы и результаты работы достаточно и качественно проиллюстрированы.

Во введении имеются все необходимые разделы: актуальность темы исследования, степень разработанности темы, цель и задачи исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы

исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов.

Соискатель в своей работе цитирует 139 источников литературы, 82 из которых принадлежат зарубежным авторам. Указанные источники в списке литературы позволяют автору раскрыть точку зрения на исследуемую в работе проблему.

Первая глава диссертации, которая представляет собой обзор литературы, посвящена роли эверолимуса в структуре иммуносупрессивной терапии у пациентов после трансплантации сердца, его механизмам действия и основным побочным эффектам. В главе рассмотрены основные факторы, влияющие на достижение целевых концентраций эверолимуса. Подробно описаны методы количественного определения препарата в крови, а также отражены основные достоинства и недостатки каждого из них.

Вторая глава диссертационного исследования посвящена описанию материалов и методов, использованных при выполнении исследования. В работе для достижения цели и решения задач исследования была использована кровь, полученная у пациентов после трансплантации сердца, принимающих эверолимус в структуре поддерживающей иммуносупрессивной терапии, а также кровь с моделированием различных уровней эверолимуса. Проводилась оценка аналитического смещения результатов с использованием проб пациентов. В работе использованы иммунохимический метод и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для количественного определения эверолимуса в цельной крови. Для лабораторной оценки осложнений терапии использовались биохимические и гематологические исследования. Автором обосновано применены различные методы статистического анализа.

В третьей главе диссертационного исследования автор представил полученные результаты работы. Так, в первом подразделе этой главы указаны данные о результатах модификации методики количественного определения эверолимуса в цельной крови, позволившие валидировать методику и успешно внедрить в лабораторную и клиническую практику. Отдельная часть главы посвящена оценке аналитического смещения между результатами измерения эверолимуса, полученными на иммунохимическом анализаторе и ВЭЖХ-МС/МС, и демонстрации клинических результатов использования каждого метода для проведения

лекарственного мониторинга эверолимуса в группе пациентов после пересадки сердца. Представленные данные позволяют сделать заключение о предпочтительности выбора ВЭЖХ-МС/МС.

Глава «Обсуждение» свидетельствует об умении автора анализировать, обобщать и интерпретировать полученные результаты.

Основные выводы по результатам исследования полностью согласуются с приведенным в диссертации фактическим экспериментальным материалом.

Полученные автором результаты, несомненно, важны для теоретической науки, так как позволяют расширить наши представления об аналитической возможности различных методов количественного определения эверолимуса.

В целом диссертационное исследование выполнено на высоком уровне с применением современных лабораторных и статистических методов, что позволило Безвуляк Екатерине Игоревне решить важную научную задачу по совершенствованию терапевтического лекарственного мониторинга эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца, провести сравнительную оценку различных методов определения.

Автореферат диссертации Безвуляк Е.И. достаточно полно отражает содержание работы. В нем содержатся сведения об актуальности изучаемой проблемы, научной новизне и практической значимости работы, материале и методах исследования, основных результатах с их обсуждением, а также выводы, практические рекомендации и список работ автора по теме исследования. Автореферат дает полное представление о выполненной работе.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Диссертация заслуживает положительной оценки. В процессе ознакомления с работой возникли некоторые замечания и вопросы, на которые хотелось бы услышать мнение автора:

1. Замечания касаются данных, представляющих собой расчет точности и воспроизводимости модифицированной методики. Количественные характеристики представлены конечными значениями, но при этом не продемонстрированы полученные средние значения.

2. Методы хроматографии дают возможность исследовать метаболиты лекарственных препаратов, а использование масс-спектрометрии позволяет изучать состав сложных биологических смесей. Известно, что фермент СУР3А4 принимает участие в метаболизме эверолимуса. Что Вам известно об исследованиях в этом направлении отечественных или зарубежных авторов?
3. Метод ВЭЖХ-МС/МС на сегодняшний день демонстрирует самые высокие показатели чувствительности и специфичности среди другого аналитического оборудования. Чем обусловлена чувствительность представленной модификации метода определения эверолимуса 1 нг/мл? Какое минимальное количество анализируемого вещества в образце может быть обнаружено? (предел количественного определения).
4. Ряд исследователей применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием, менее чувствительный в сравнении с ВЭЖХ-МС/МС, в лекарственном мониторинге. В обзоре литературы приводится много ссылок, в том числе и обзоров, посвященных данному методу. Существуют ли исследования по определению эверолимуса методом ВЭЖХ среди отечественных или зарубежных авторов?

Заданные вопросы не снижают достоинства настоящего диссертационного исследования и не влияют на положительную оценку работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По актуальности темы исследования, научной новизне, методическому уровню и практической значимости полученных результатов работа Безвуляк Екатерины Игоревны «Клинико-лабораторная оценка методов терапевтического лекарственного мониторинга иммуносупрессивной терапии у пациентов после трансплантации сердца» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, содержит решение важной задачи по выбору оптимальной лабораторной технологии количественного определения эверолимуса у пациентов после трансплантации сердца, основанному на результатах оценки лабораторной информативности методов и клинической апробации, что имеет существенное значение для лабораторной медицины, практики лабораторий терапевтического лекарственного мониторинга и фармакокинетических исследований, и полностью соответствует

критериям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук в пунктах 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842. Автор диссертации – Безвуляк Екатерина Игоревна - заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, заведующий
научно-исследовательской лабораторией хроматографии
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Великанова Людмила Иосифовна

«27» мая 2024 г.

Адрес: 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41.
Телефон: +7 (921) 379-32-95
e-mail: velikanova46@gmail.com

Подпись д.б.н. Великановой Людмилы Иосифовны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

д.м.н. профессор



Трофимов Е.А.