

Отзыв официального оппонента

Доктора фармацевтических наук, профессора Сливкина Алексея Ивановича на диссертационную работу Яичкова Ильи Игоревича на тему «Создание новых подходов к разработке методик для определения нестабильных соединений в биологических объектах при проведении доклинических исследований лекарственных средств» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы выполненной работы

Изучение фармакокинетики является обязательным при доклиническом исследовании любого оригинального лекарственного препарата. При этом новая молекула-кандидат или продукт её биотрансформации могут быть нестабильными в образцах биоматериала в процессе отбора, хранения и подготовки к анализу. Примерами таких соединений являются производные пирокатехина, сложные эфиры, лактоны, тиолы, глюкурониды. В настоящее время ведётся разработка и изучение лекарственных препаратов для терапии ревматоидного артрита, в том числе на основе амидов 4,5-дигидроизоксазолкарбоновой кислоты. Данные соединения подвержены ферментативному гидролизу. Примеры стабилизации амидной группы в биоматериале в научных публикациях встречаются гораздо реже, чем сложноэфирной группы.

Важным направлением в фармации является разработка новых лекарственных препаратов для лечения открытоугольной глаукомы. К ним относятся селективные ингибиторы карбоангидразы второго типа на основе производных сульфонамидов. Данные молекулы в процессе биотрансформации подвергаются N-гидроксилированию. Эти метаболиты после отбора проб легко разлагаются до соответствующих кислот. Биоаналитические исследования, посвящённые стабилизации и

количественному определению N-гидроксисульфонамидов в биоматериале, ранее не проводились.

В процессе биохимических и фармакодинамических исследований на лабораторных животных также может возникнуть необходимость измерения концентрации химически неустойчивых веществ. Одним из ярких примеров таких веществ являются катехоламины, которые подвергаются окислению после отбора проб. Так, для подтверждения эффективности новых препаратов для терапии болезни Паркинсона требуется оценка уровня допамина в экстрапирамидной системе лабораторных животных.

Для надёжного анализа таких химически неустойчивых соединений требуется подбор условий для предотвращения их разложения. Концепция разработки методик для определения нестабильных веществ в биоматериале лабораторных животных ранее не была сформулирована. Поэтому её разработка является актуальной.

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

Все основные научные положения диссертационной работы Яичкова И.И. основываются на достаточном объёме выполненных исследований. Так, было проведено более 300 предварительных и 50 подтверждающих экспериментов по изучению стабильности изучаемых соединений в различных биологических объектах. Надёжность выбранных условий для хранения отобранных проб животных подтверждена в ходе валидации методик, а также повторного анализа ранее проанализированных испытуемых образцов. Статистическая обработка данных выполнена корректно.

Выводы основаны на результатах, полученных в ходе диссертационного исследования. Практические рекомендации могут быть полезны для разработки и валидации методик анализа, а также изучения

профиля метаболитов и экскреции нестабильных соединений. Они также базируются на достаточном объёме экспериментальных данных.

Достоверность полученных результатов и научная новизна исследования

Исследование выполнено на современном аналитическом оборудовании, внесённом в государственный реестр средств измерений. Все методики разработаны с помощью высокоселективного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, применение которого гарантировало надёжную идентификацию и количественное определение всех аналитов в сложных биологических матрицах с добавлением различных стабилизаторов. Валидация, выполненная в соответствии с требованиями российской и международной нормативной документации, подтвердила достоверность полученных данных.

Научная новизна диссертационной работы заключается в создании концепции разработки методик определения неустойчивых к разложению соединений в биологических жидкостях, экскрементах, органах и тканях лабораторных животных. В рамках концепции предложен двухэтапный дизайн исследования по идентификации метаболитов нестабильных кандидатов в лекарственный препарат, а также кандидатов в лекарственный препарат, потенциально образующих нестабильные продукты биотрансформации. Также предложен оптимальный порядок тестов и схемы принятия решений для уменьшения объема валидационных экспериментов при испытаниях одинаковых методик для схожих биологических матриц.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Предложенная автором концепция позволяет оптимизировать процесс разработки методик для количественного определения нестабильных веществ в биологических образцах лабораторных животных. Данная концепция

(методология) внедрена в практическую деятельность биоаналитических лабораторий Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского» и ООО «Квинта-аналитика Ярославль».

Все разработанные в ходе исследования методики нашли практическое применение. С их помощью была изучена фармакокинетика и фармакодинамика новых кандидатов в лекарственные препараты в рамках гранта Министерства просвещения Российской Федерации «Разработка инновационного лекарственного средства для лечения открытоугольной глаукомы путем селективного ингибирования карбоангидразы II», государственного задания Министерства просвещения Российской Федерации «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы», государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка лекарственного препарата для лечения остроугольной глаукомы» и государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка лекарственного препарата для лечения ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний».

Соответствие результатов паспорту научной специальности

Основные научные положения и содержание диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, пункту 4 «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, экологофармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

Полнота освещения результатов диссертации

Основные научные результаты диссертационного исследования были опубликованы в 28 научных работах, среди которых 3 статьи в журналах, включённых в Перечень рецензируемых изданий Сеченовского университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, 13 статей в журналах, индексируемых в международной базе Scopus, 2 патента на изобретения, 8 статей в сборниках конференций и 2 иные публикации по теме исследования.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание материалов и методов исследования (глава 2), 5 экспериментальных глав (главы 3-7), главу, в которой обобщены результаты всех выполненных исследований и сформулированы основные положения научной концепции, заключение, общие выводы, список сокращений и условных обозначений, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, 6 приложений. Список литературы состоит из 378 источников, 311 из которых – на иностранных языках. Объём диссертации составляет 395 страниц машинописного текста.

В первой главе автором выполнен обзор российской и зарубежной литературы. В ней приведены результаты доклинического изучения исследуемых кандидатов в лекарственные препараты для терапии ревматоидного артрита, открытоугольной глаукомы и болезни Паркинсона. Затем дано описание разработанных методов для определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов, проанализированы их преимущества и недостатки. Рассмотрены подходы к проведению исследований по идентификации метаболитов лекарственных средств и валидации биоаналитических методик для доклинических исследований. Проведён подробный обзор способов стабилизации основных групп химически неустойчивых в биоматериале соединений. В заключении первой главы дано обоснование необходимости решения поставленных задач.

Вторая глава «Материалы и методы» включает в себя дизайн исследования, характеристику использованного оборудования, стандартных образцов, реактивов и расходных материалов, описание приготовления стандартных растворов и модельных смесей. В ней дано описание процесса валидации биоаналитических методик, включая разработанную оптимизированную схему. Приводится порядок экспериментов по изучению связи с белками, идентификации метаболитов, изучению фармакокинетики R004, TFISA, ODASA и фармакодинамики кандидатов в лекарственный препарат для терапии болезни Паркинсона. В конце главы описан порядок статистических расчётов.

В третьей главе описаны эксперименты по идентификации основных продуктов биотрансформации исследуемых кандидатов в лекарственные препараты. Так, OXSA метаболизируется путём гидроксилирования сульфонамидной группы. TFISA также подвергается ацетилированию, а ODASA – С-гидроксилированию по метильной группе 1,3,4-оксадиазола. Молекула R004 была подвержена только ферментативному гидролизу по амидной группе. В конце главы автором сформулирован методологический подход, предполагающий экспериментальный подбор мер по стабилизации образцов при изучении профиля метаболитов химически неустойчивых лекарственных средств, а также применение превентивных мер по стабилизации при изучении профиля метаболитов химически устойчивых лекарственных средств, которые с высокой долей вероятности образуют легко разлагающиеся метаболиты.

Четвёртая глава содержит результаты разработки и валидации методик количественного определения R004 и его метаболитов в биологических объектах. Для устранения гидролиза R004 в образцах плазмы и мочи применялось закисление раствором ацетата аммония. Пробы кала, органов и тканей гомогенизировали с помощью ацетонитрила. Данные методики были апробированы в рамках доклинического исследования фармакокинетики R004 на крысах и кроликах.

Пятая глава посвящена разработке и валидации биоаналитических методик для количественного определения TFISA и его метаболитов в биоматериале животных. Для предотвращения разложения N-гидроксиметаболита TFISA-M1 при отборе образцов крови в качестве антикоагулянта была выбрана смесь натрия фторида и калия оксалата. Пробы плазмы сразу после получения стабилизировали 5%-м раствором аскорбиновой кислоты. К моче также добавляли 5%-й раствор аскорбиновой кислоты. Разложение TFISA-M1 в кале после гомогенизации метанолом не наблюдалось. В экскрементах дополнительно проводилось количественное определение продукта разложения N-гидроксисульфонида TFISA-M 1 - производного сульфоновой кислоты TFISA-M3 для его косвенного определения. Органы и ткани крыс после гомогенизации метанолом стабилизировали 10% раствором аскорбиновой кислоты. Все предложенные в главе методики были использованы для изучения фармакокинетики 1% глазной суспензии TFISA.

Шестая глава содержит результаты разработки и валидации методик количественного определения ODASA в биологических объектах. Меры по стабилизации минорного N-гидроксиметаболита ODASA-M2 были схожи с мерами, применяемыми в исследовании TFISA. Так, пробы плазмы, мочи и метанольных гомогенатов органов и тканей стабилизировались водными растворами аскорбиновой кислоты. В образцах экскрементов также выполняли косвенное определение N-гидроксисульфонида ODASA-M2 по соответствующему производному сульфоновой кислоты. Методики также прошли апробацию в рамках фармакокинетического исследования глазной суспензии ODASA.

Седьмая глава посвящена разработке методики определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс. Выбор антиоксиданта для стабилизации норадреналина, адреналина, допамина и 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты осуществлялся при сокращённом объёме скрининговых испытаний на основании R004, TFISA и

ODASA. Полная валидация методики и повторный анализ проанализированных ранее испытуемых образцов крыс доказали правильность подобранных условий. Методика была апробирована при изучении фармакодинамики новых ингибиторов моноаминооксидазы.

Восьмая глава посвящена обобщению и систематизации результатов всех выполненных экспериментов. В ней приведен перечень предварительных экспериментов, необходимых для выбора надёжного способа стабилизации аналитов. Далее описан порядок разработки методик для плазмы и цельной крови, органов и тканей, мочи и кала лабораторных животных, сформулирован способ косвенного определения нестабильных соединений в экскрементах. В конце главы приводится схема принятия решений для сокращения объёма валидационных испытаний для одинаковых биоаналитических методик для схожих биологических матриц.

В **заключении** отражены основные тезисы разработанной концепции определения нестабильных соединений в биологических объектах животных. Выводы соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации основаны на результатах выполненных экспериментов. В приложениях содержатся подробные результаты расчёта некоторых фармакокинетических параметров, примеры хроматограмм, результаты оценки стабильности основных и рабочих растворов, а также копии актов внедрения полученных результатов.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат полностью соответствует структуре и содержанию диссертации. В нём кратко отражены материалы и методы исследования. Содержание основных экспериментальных глав с 3 по 7, которые посвящены идентификации метаболитов изучаемых кандидатов в лекарственный препарат, а также разработке и валидации методик их количественного определения, приводится в таблицах. Далее подробно описывается

сформулированная по результатам исследования концепция создания методик количественного определения нестабильных соединений в биологических объектах лабораторных животных. Таким образом, автореферат диссертации содержит информацию о решении всех поставленных задач. После его прочтения можно сделать вывод о достижении поставленной цели исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Яичкова Ильи Игоревича является законченным научным трудом, в рамках которого предлагается инновационная методологическая концепция проведения биоаналитических исследований нестабильных соединений. Однако, при изучении материалов исследования возникли следующие вопросы:

1. Какова реализуемость на практике в условиях коммерческих биоаналитических лабораторий предлагаемого подхода для идентификации нестабильных метаболитов в биообразцах животных, предполагающего прогнозирование структуры и осуществление синтеза субстанций изучаемых продуктов биотрансформации?
2. Почему в процессе создания методик определения TFISA и ODASA в плазме при подборе осадителя не использовался ацетонитрил, как в исследовании R004?
3. Применимы ли разработанные методики количественного определения R004, TFISA и ODASA, а также их основных метаболитов в плазме и цельной крови крыс и кроликов для проведения клинических исследований данных соединений?

Данные вопросы носят уточняющий характер и не влияют на общую положительную оценку работы. Также к содержанию диссертации возник ряд замечаний:

1. В литературном обзоре отсутствуют сведения об основных физико-химических свойствах изучаемых кандидатов в лекарственные препараты, таких как растворимость, константа диссоциации и другие.
2. В главе, посвящённой материалам и методам исследования, не приводится описание методик анализа субстанций метаболитов методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.
3. Фармакокинетические профили TFISA и ODASA после последнего 14-го введения данных соединений на рисунках В.5, В.6, Г.5, Г.6 имеют недостаточный масштаб в конечных точках, что не позволяет по этим графикам оценить продолжительность выведения следовых количеств данных соединений.

В тексте работы можно встретить отдельные неудачные фразы, неточные формулировки и опечатки. Однако, всё вышеперечисленное не снижает научной и практической ценности диссертационного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Яичкова Ильи Игоревича на тему: «Создание новых подходов к разработке методик для определения нестабильных соединений в биологических объектах при проведении доклинических исследований лекарственных средств» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной научной проблемы фармацевтической химии, состоящей в необходимости создания специальных алгоритмов разработки методик анализа химически неустойчивых веществ в плазме, цельной крови, органах, тканях, экскрементах и других видах биоматериала в рамках доклинического изучения фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов. По актуальности, степени научной новизны, теоретической и практической значимости диссертационная работа

соответствует требованиям п. 15 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 № 0692/Р от 06.06.2022 (с изменениями, утвержденными: приказом №1179/Р от 29.08.2023, приказом №0787/Р от 24.05.2024), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Яичков Илья Игоревич, заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

Доктор фармацевтических наук
(3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия), профессор
заведующий кафедрой фармацевтической технологии
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
«Воронежский государственный университет»,
Сливкин Алексей Иванович

«19» февраля 2026 года

Подпись профессора А.И. Сливкина заверяю
ученый секретарь ФГБОУ ВО «ВГУ»



М.А. Лопаева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1, тел.: +7 (473) 220-75-21, электронная почта: slivkin@pharm.vsu.ru)