

Отзыв официального оппонента

доктора фармацевтических наук Шохина Игоря Евгеньевича 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

Обеспечение стабильности изучаемых соединений в биологических объектах после их отбора является одним из ключевых факторов, гарантирующих достоверность результатов фармакокинетических исследований. Оценка химической устойчивости аналитов в обязательном порядке выполняется на этапе валидации биоаналитической методики. При этом испытания проводят после хранения проб биоматериала с добавкой определяемых веществ при комнатной температуре или на ледяной бане в течение короткого промежутка времени, после их хранения в морозильной камере в течение нескольких недель или месяцев, после нескольких циклов заморозки и разморозки модельных смесей. Также изучается стабильность исследуемых соединений в приготовленных образцах в автосемплере. Для проб органов и тканей целесообразным является доказательство устойчивости аналитов в процессе гомогенизации проб. При исследованиях некоторых аналитов, кроме глубокой заморозки образцов, требуется применение дополнительных мер предотвращения их разложения. В некоторых случаях достаточно использования специальных антикоагулянтов. Так, с целью предотвращения гидролиза ацетилсалициловой кислоты при проботборе крови используют пробирки со смесью натрия фторида и калия оксалата, которая ингибирует эндогенные эстеразы. В рамках биоаналитических

исследований препаратов из группы статинов образцы биологических жидкостей часто дополнительно закисляют буферными растворами. Некоторые соединения являются неустойчивыми к окислению в биоматериале. Поэтому к пробам добавляют растворы различных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота, натрия пиросульфит и другие.

В научных публикациях зачастую не приводится описание процесса создания биоаналитических методик для количественного определения легкоразлагающихся соединений. Специального подхода к выбору мер по стабилизации химически неустойчивых аналитов в пробах животных на данный момент не разработано. Поэтому его создание является актуальным.

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

Работа выполнена на высоком научно-техническом уровне. Для выполнения экспериментов использован современный высокочувствительный и высокоселективный метод - высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Все разработанные методики прошли валидацию в соответствии с требованиями приложения №6 решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Дополнительно оценивалась воспроизводимость при повторном введении аналитической серии согласно международному руководству «ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis». Объема выполненных экспериментов и статистической обработки результатов достаточно для обоснования научных положений диссертации. Выводы и практические рекомендации сформулированы исходя из полученных в ходе исследования данных. Они соответствуют поставленной цели и задачам.

Достоверность полученных результатов и научная новизна исследования

Всё использованное в работе аналитическое оборудование внесено в реестре средств измерений. Применение высокоселективного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, а также валидация всех предложенных в диссертации методик гарантируют достоверность полученных результатов.

Новизна исследования заключается в создании оригинальной концепции разработки методик определения неустойчивых к разложению соединений в биологических жидкостях, экскрементах, органах и тканях лабораторных животных. Автором сформулирован методологический подход к проведению исследований по идентификации продуктов биотрансформации нестабильных кандидатов в лекарственные препараты и кандидатов в лекарственные препараты, потенциально образующих нестабильные метаболиты, на лабораторных животных. Предложен способ косвенного изучения экскреции легкоразлагающихся веществ. При выполнении работы впервые создано 16 биоаналитических методик определения R004, ODASA, TFISA и их метаболитов в биологических объектах животных, при использовании которых обеспечена стабильность всех химически неустойчивых соединений в пробах после их отбора. После выполненных экспериментов обоснован методологический подход, позволяющий уменьшить объем валидационных испытаний для одинаковых биоаналитических методик измерения концентрации аналитов в плазме и крови разных видов животных, а также в разных органах и тканях одного вида животных.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Сформулированная концепция обобщает и систематизирует данные по подходам к разработке методик для определения химически неустойчивых соединений в биологических объектах лабораторных животных. Её применение гарантирует выбор надёжных мер по стабилизации биопроб и

получение достоверных результатов измерений. Основные положения диссертационного исследования направлены на оптимизацию работы биоаналитических лабораторий. Они внедрены в практическую деятельность ООО «Квинта-аналитика Ярославль» и Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского».

Разработанные и валидированные методики количественного определения R004, ODASA и TFISA и их метаболитов в биопробах нашли практическое применение при проведении фармакокинетических исследований для выполнения двух государственных заданий Министерства здравоохранения Российской Федерации и одного гранта Министерства просвещения Российской Федерации. Методика количественного определения моноаминовых нейромедиаторов норадреналина, допамина, серотонина, адреналина и их основных метаболитов в тканях мозга крыс использовалась для оценки эффективности новых селективных ингибиторов MAO-B на экспериментальной модели болезни Паркинсона. Это исследование осуществлялось в рамках государственного задания Министерства просвещения Российской Федерации.

Соответствие результатов паспорту научной специальности

Диссертационная работа Яичкова И.И. соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а конкретно 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 положения диссертации были опубликованы в виде 28 научных работ, из них 13 статей в журналах, индексируемых в

международной базе Scopus, 3 статьи в журналах, включённых в Перечень рецензируемых изданий Сеченовского университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, 8 научных работ в сборниках конференций, 2 патента на изобретения и 2 иные публикации по теме диссертации.

Структура и содержание работы

Объём диссертации составляет 395 страниц машинописного текста. Она включает себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 6 глав, в которых описаны результаты экспериментов и основные научные положения работы, заключение, общие выводы, список сокращений и условных обозначений, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, 6 приложений. В список литературы входит 378 источников, 311 из которых – в англоязычных изданиях.

Первая глава является обзором литературы. Для изучаемых кандидатов в лекарственные препараты R004 для лечения ревматоидного артрита, OXSA, TFISA и ODASA для лечения открытоугольной глаукомы какие-либо фармакокинетические и биоаналитические исследования ранее не проводились. Данные о необходимости стабилизации производных пирокатехина допамина, норадреналина, адреналина в пробах биоматериала в научных публикациях расходятся. Специального алгоритма для идентификации химически неустойчивых соединений при изучении профиля метаболитов лекарственных средств ранее не разрабатывалось. Подходы к частичной валидации идентичных методик для определения лекарственных препаратов и продуктов их биотрансформации в схожих биологических матрицах в рамках доклинических исследований отличаются. В большинстве случаев авторы отказываются от ряда валидационных тестов без какого-либо обоснования. В обзоре приведено множество примеров разных групп нестабильных в биопробах соединений и способов предотвращения их разложения. Однако целостной концепции разработки методик для

определения химически неустойчивых аналитов в образцах лабораторных животных в этих научных публикациях не предложено.

Описание материалов и методов приведено во **второй главе**. Она включает в себя дизайн диссертационного исследования, использованное лабораторное оборудование, стандартные образцы, порядок приготовления реактивов, калибровочных образцов и образцов контроля качества. Особое внимание уделено процедуре валидации разработанных биоаналитических методик. Также описаны дизайн доклинических исследований фармакокинетики и фармакодинамики, для которых эти методики разрабатывались, и порядок статистических расчётов.

В **третьей главе** описываются эксперименты по идентификации продуктов биотрансформации изучаемых кандидатов в лекарственные препараты в биоматериале животных. При изучении профиля метаболитов OXSA специальные меры по предотвращению разложения аналитов не применялись. Обнаружению неустойчивого N-гидроксисульфонамида OXSA способствовала немедленная подготовка и анализ проб. В случае исследования TFISA образцы стабилизировались только на втором, подтверждающем этапе после идентификации N-гидроксипроизводного. В ходе идентификации продуктов биотрансформации ODASA меры по предотвращению разложения применялись начиная с первого этапа из-за высокой вероятности образования N-гидроксисульфонамидов. Это позволило обнаружить минорный метаболит ODASA-M2. Для заведомо неустойчивой молекулы R004 меры по предотвращению гидролиза подбирались экспериментально. Однако, новых продуктов биотрансформации обнаружено не было. В результате выполненных исследований был обоснован методологический подход к идентификации нестабильных соединений в биологических образцах животных.

В **четвёртой главе** описан процесс разработки методик количественного определения R004 и его метаболитов в плазме, моче, кале, органах и тканях методом ВЭЖХ-МС/МС. Валидации методик для плазмы

крыс и кроликов, а также печени, почек, селезёнки, сердца, лёгких, мозга, кожи и мышц выполнены с применением оптимизированного подхода. Меры по стабилизации R004 в биологических жидкостях и кале были такими же, как и при идентификации метаболитов. Органы и ткани гомогенизировали с помощью ацетонитрила. С помощью разработанных методик выполнено доклиническое изучение фармакокинетики R004.

Пятая глава посвящена разработке методик для количественного определения TFISA и его метаболитов в образцах лабораторных животных. Стабилизацию N-гидроксиметаболита TFISA-M1 в биологических жидкостях и гомогенатах органов и тканей осуществляли с помощью растворов аскорбиновой кислоты. Для проб фекалий было достаточно изолирования аналитов с помощью метанола. Валидация идентичных методик для плазмы крыс и кроликов, цельной крови крыс и кроликов, а также печени, почек, селезёнки, сердца, лёгких, мозга, кожи и мышц выполнена с применением оптимизированного подхода. Испытания на образцах глаз выполнены в полном объёме из-за различий от перечисленных выше объектов в соотношении объёма метанола и массы органа при их гомогенизации. В методике для количественного определения TFISA и его метаболитов в экскрементах определялся продукт разложения N-гидроксисульфонамида TFISA-M3. Из-за ко-элюирования данного соединения с действующим веществом и наличия пиков на его MRM-переходах из-за близости их молекулярных масс были использованы другие параметры хроматографического разделения. Все описанные в главе методики были использованы для доклинического изучения фармакокинетики TFISA.

В шестой главе описан процесс создания методик для количественного определения ODASA и его метаболитов в плазме, цельной крови, моче, кале, органах и тканях. Меры по стабилизации образцов и дизайн валидационных испытаний были схожи с биоаналитическим исследованием TFISA. В экскрементах проводилось измерение концентрации продукта разложения N-гидроксисульфонамида ODASA-M3 для косвенного определения ODASA-M2.

Параметры хроматографического разделения для этого также модифицировались. Доклиническое фармакокинетическое исследование ODASA на животных выполнялось с помощью описанных в главе методик.

В **седьмой** главе описан процесс разработки методики определения норадреналина, допамина, адреналина, серотонина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, (5-гидрокси-1H-индол-3-ил)-уксусной кислоты, гомованилиновой кислоты, ванилилминдальной кислоты и их метаболитов в тканях мозга крыс. В качестве стабилизатора для производных пирокатехина был использован 5% раствор аскорбиновой кислоты, который добавлялся к метанольному гомогенату пробы. Подбор антиоксиданта осуществлялся по оптимизированной схеме: на этапе скрининга проводились испытания краткосрочной стабильности и стабильности в автосемплере, а на этапе подтверждения – дополнительно проверялась стабильность аналитов после 3 циклов заморозки и разморозки. Методика прошла полную валидацию. Она была применена для изучения эффективности новых кандидатов в лекарственный препарат S9 и S13 на модели болезни Паркинсона.

В **восьмой** главе сформулированы основные научные положения диссертации. В начале главы обоснован перечень и объём скрининговых и подтверждающих тестов по выбору мер для стабилизации химически неустойчивых соединений в биологических пробах после их отбора. Далее приводится описание процесса разработки методик для исследований плазмы, цельной крови, органов и тканей животных. В подглаве, посвящённой анализу образцов экскрементов, описан способ косвенного определения легкоразлагающихся веществ, не являющихся метаболитами изучаемого кандидата в лекарственный препарат. В конце главы изложен методологический подход к валидации биоаналитических методик для определения нестабильных соединений в биологических объектах.

Заключение посвящено подведению итогов диссертационной работы. В нём отражены основные аспекты предложенной автором концепции. Общие

выводы отражают весь объём проведённого исследования и соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации сформулированы исходя из результатов выполненных экспериментов.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. В нём кратко изложены результаты проведённых экспериментов, а также сформулированы основные научные положения работы. Все данные, представленные в автореферате, точно совпадают с данными, представленными в диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Главным достоинством рассматриваемой работы является её структурированность, последовательное изложение, систематизация данных и алгоритмизация процессов. Представленные подходы и алгоритмы принятия решений являются полноценным руководством к действию при проведении аналогичных исследований для лекарственных средств рассматриваемых групп.

В целом положительно характеризуя рассматриваемую работу, стоит отметить ряд замечаний, возникших при её прочтении:

1. Во введении указывается, что при проведении доклинических исследований указывается, что их отличительной особенностью является то, что для исследуемых веществ методики определения их в биоматериале разрабатываются впервые. Стоит отметить, что сфера доклинических исследований является гораздо более широкой, чем проведение исследований новых, неизученных ранее молекул, а значит, данное утверждение является спорным.
2. Со своей стороны считаем некорректным употребление термина «более экспрессный» применительно к методике. Сравнительную степень необходимо применять к понятию скорости анализа,

пробоподготовке и т.д., тогда как экспрессность – понятие абсолютное.

3. При обозначении, например, 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде, необходимо указывать, массовую или объёмную долю вы используете.

Также при прочтении рассматриваемой работы возникли уточняющие вопросы к диссертанту:

1. Насколько обосновано применение декапитации лабораторных животных при осуществлении забора органов? Почему не был использован более гуманный с точки зрения биоэтики способ умерщвления лабораторных животных с помощью газовых этанайзеров, наркотических препаратов или внутривенного введения раствора калия хлорида?
2. Чем обусловлен столь короткий срок оценки долгосрочной стабильности образцов (1 месяц)? Ведь контрольные образцы исследуемого биоматериала могут храниться и дольше.
3. Каким методом трапеций (линейным или лог-линейным) рассчитывался фармакокинетический параметр AUC_{0-t} ? Приведите обоснование его использования.
4. Поясните, в чем состоит преимущество методики определения катехоламинов и их метаболитов в мозге крыс (стр. 7 автореферата) по сравнению с опубликованными, например Lin Y. et al. UPLC-MS/MS assay for the simultaneous determination of catecholamines and their metabolites at low pg/mg in rat/mouse striatum //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2022. – Т. 213. – С. 114697.
5. Прояснить, в чем состоит научная новизна методологических подходов к биоанализу нестабильных аналитов и/или их метаболитов по сравнению с ранее опубликованными, например

Niwa M. et al. Handling unstable analytes: literature review and expert panel survey by the Japan Bioanalysis Forum Discussion Group //Bioanalysis. – 2022. – Т. 14. – №. 3. – С. 169-185.

6. Поясните, оценивалась ли в процессе анализа испытуемых образцов вариабельность внутреннего стандарта?
7. Обеспечивалась ли на всех этапах работы с образцами, содержащими нестабильные соединения, защита образцов от света и повышенных температур, как указано в рекомендациях? Какие приёмы были использованы?
8. Насколько применимы описываемые вами подходы при проведении аналитического этапа и изучения фармакокинетики в рамках клинических исследований?

Указанные замечания и вопросы не снижают общую положительную оценку рассматриваемой работы.

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 крупной научной проблемы современной фармации, заключающейся в создании подходов к стабилизации легкоразлагающихся соединений в различных биологических образцах животных в процессе хранения и выполнения анализов. 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),
генеральный директор
общества с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики»
Шохин Игорь Евгеньевич

«26» февраля 2026 года



Подпись И.Е. Шохина заверяю:

Директор исследовательского центра
ООО «ЦФА», доктор фармацевтических наук

Комаров Тимофей Николаевич

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, 8
Телефон: +7 (495)-281-81-11
Электронная почта: i.shohin@cpha.ru