

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Фирсовой Алины Александровны «**Разработка и валидация методик количественного определения физиологически активных веществ на основе камфоры, дегидроабиетиновой и усниновой кислот для фармакокинетических исследований**», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 - биохимия.

Актуальность работы. Одним из важнейших этапов разработки новых лекарственных препаратов являются доклинические исследования с использованием лабораторных животных. Эти исследования требуют установления концентраций лекарства и его метаболитов в различных органах в зависимости от дозы введенного лекарства, способа введения, а также времени после введения. Для решения этих задач наиболее часто используют методы масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ЖХ-МС). Современные методы ЖХ-МС обладают высокой селективностью, точностью и чувствительностью и позволяют регистрировать и измерять чрезвычайно низкие концентрации органических соединений в биологических матрицах. Однако для корректного проведения исследований фармакокинетики и распределения активного вещества по различным органам для каждого лекарства необходимо разработать, оптимизировать и валидировать методы, позволяющие надежно и точно установить содержание таргетного соединения в биологическом образце. При этом необходимо разрабатывать и совершенствовать как методы пробоподготовки для максимального извлечения соединения из биологической матрицы в метаболомный экстракт, так и методы хромато-масс-спектрометрического анализа. Рецензируемая работа направлена на разработку и валидацию методик для количественного установления концентрации новых лекарственных препаратов и их метаболитов в биологических жидкостях и тканях, а также применение этих методик для установления стабильности, фармакокинетики и распределения этих соединений. Таким образом, актуальность работы не вызывает сомнений.

Научная новизна работы в первую очередь заключается в том, что впервые были установлены фармакокинетические параметры и распределение по органам целого ряда потенциальных терапевтических препаратов. На основании полученных данных были установлены химико-биологические свойства этих соединений, включая их способность адсорбироваться на форменных элементах крови, проникать через гематоэнцефалический барьер, а также были предложены наиболее эффективные способы введения этих препаратов. Новизна работы также состоит в разработке методов пробоподготовки и

хромато-масс-спектрометрического анализа, оптимизированных для количественного определения концентрации лекарственных препаратов в биологических матрицах.

Научная и практическая ценность работы.

Наибольшую научную ценность данной работы представляют полученные данные по фармакокинетике лекарственных соединений и по распределению этих соединений по тканям, а также их распределение между форменными элементами и плазмой крови. Эти данные могут быть использованы другими учеными при разработке новых лекарственных соединений. Научный интерес представляют также разработанные методы пробоподготовки и анализа, применимые к широкому кругу органических соединений в биологических матрицах.

Однако наибольшей ценностью данной работы является возможность практического применения полученных результатов. Эти результаты являются частью программы доклинических испытаний новых лекарственных средств и важным шагом для перехода к последней стадии этих испытаний – клиническим исследованиям.

Основные положения, выносимые на защиту, заключаются в следующем:

Разработаны и валидированы экспериментальные методики для количественного определения лекарственных агентов (камфецина, а также KS-389 и OL9-116) в плазме крови и в органах; установлены фармакокинетические параметры для этих соединений, а также их распределение по органам.

Диссертационная работа хорошо оформлена, написана грамотным языком с минимальным количеством грамматических и стилистических ошибок, изложена на 157 страницах, состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка литературы из 174 пунктов. Работа включает 25 таблиц и 63 рисунков.

Во введении обоснована важность данной работы для изучения поведения ксенобиотиков в живом организме, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, отражены актуальность, научная новизна и практическая значимость. В обзоре литературы проведен анализ работ, имеющих непосредственное отношение к теме настоящей диссертации, в первую очередь описывающих существующие подходы к пробоподготовке и количественному анализу метаболитов в биологических тканях и жидкостях. На основании литературного анализа показаны «белые пятна», имеющиеся в существующих на настоящий момент исследованиях, и аргументирована необходимость проведения работ, изложенных в диссертации.

Глава 2 «Обсуждение результатов» состоит из четырех подглав, посвященных исследованию фармакокинетики, распределению по органам, а также химико-биологическим свойствам трех ксенобиотиков – камфецина, KS-389 и OL9-116. Для всех трех соединений вначале осуществлялась оптимизация методики выделения целевого соединения из биологической матрицы, а также подбор хроматографических и масс-спектрометрических условий для надежной идентификации и квантификации этих соединений. Дальнейшим шагом являлось измерение концентрации этих соединений в образцах крови и тканей экспериментальных животных в зависимости от способа введения препарата, времени после введения, и распределение препарата по органам. Для рецензента наиболее интересными результатами этих работ показалось установление распределения камфецина между форменными элементами крови и плазмой при разных уровнях гематокрита, а также установление распределения агента KS-389 по органам. В последнем исследовании было установлено, что KS-389 способен проникать через гематоэнцефалический барьер, а также накапливаться в высоких концентрациях в печени и почках крыс. Хочется отметить высокую тщательность проведения экспериментальных работ: все эксперименты проводились с использованием не менее трех повторов, были проведены необходимые контрольные эксперименты, статистическая обработка полученных данных проведена на высоком профессиональном уровне. Такой подход обеспечивает высокую надежность как первичных экспериментальных данных, так и выводов, сделанных на их основе.

Важной частью данной работы является глава 3 «Экспериментальная часть», в которой детально описаны использованные в работе методы пробоподготовки крови и тканей лабораторных животных, аналитические методы, использованные для количественного анализа камфецина, KS-389 и OL9-116, а также валидация примененных методов. Текст этой главы, как предыдущей, написан на высоком профессиональном уровне с указанием всех параметров, необходимых для повторения этих экспериментов другими учеными.

В заключении диссертации изложено подведение итогов по полученным результатам, а также обрисованы перспективы дальнейших исследований в данной области. Приведенные в конце диссертации выводы логически следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

Достоверность и надежность полученных результатов не вызывают сомнений. Все результаты данной работы были получены Фирсовой А.А. лично или при ее непосредственном участии. В целом, диссертационная работа Фирсовой А.А. производит хорошее впечатление, все выводы работы являются обоснованными.

Диссертация Фирсовой А.А. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят существенный вклад в изучаемую проблему. Результаты

диссертации опубликованы в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК, и неоднократно обсуждались на российских и международных конференциях. Автореферат достаточно полно и правильно отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, рецензируемая работа вызывает несколько вопросов:

- Не совсем понятно пристрастие автора к анализу сухих пятен крови по сравнению с жидкостной экстракцией. По мнению рецензента, анализ сухих пятен подразумевает использование дополнительных процедур, включая нанесение капли крови на фильтровальную бумагу, вырезание нужного пятна, экстракцию метаболитов из бумаги. Все это вносит дополнительную погрешность в измерения и, вероятно, частичную потерю метаболитов.

- В литературном обзоре на стр. 42 приведены преимущества и недостатки метода анализа сухих пятен крови. Тут было бы очень полезно привести результаты метаболомного анализа образцов крови, полученных методом сухих пятен и методом жидкостной экстракции, и сравнить эффективность этих методов.

- На Рис. 46 приведен график зависимости концентрации OL9-116 от времени. К сожалению, на графике не показаны «усы», и не указано, сколько повторов было сделано для получения этого графика. Это заметно снижает достоверность результатов, полученных с использованием этого графика.

- По всему тексту прослеживается нарушение правил округления величин. Например, в Таблице 14 вместо $35,5 \pm 8,3$ нужно указывать 36 ± 8 , а вместо 4936 ± 262 - 4940 ± 260 .

Несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа Фирсовой А.А. заслуживает высокой оценки, так как является самостоятельным, законченным научным исследованием, содержащим новые и важные научные результаты.

Считаю, что диссертационная работа Фирсовой А.А. *«Разработка и валидация методик количественного определения физиологически активных веществ на основе камфоры, дегидроабиеитиновой и усниновой кислот для фармакокинетических исследований»* по объему, уровню выполнения, новизне, надежности и актуальности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а её автор, а ее автор, Фирсова Алина Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент

Центалович Юрий Павлович

Доктор химических наук, специальность 02.00.04 – физическая химия,
главный научный сотрудник лаборатории протеомики и метаболомики Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Институт «Международный
томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук (МТЦ СО РАН),
630090. г. Новосибирск, ул. Институтская, 3а

Электронная почта: yura@tomo.nsc.ru

Телефон: +7(383)3303136

«13» нояб 2025 г.



Ю.П. Центалович

Согласен на включение моих персональных данных в документы, связанные с работой
диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись Ю.П. Центаловича заверяю

Ученый секретарь МТЦ СО РАН

К.Х.Н., Н.С.



Л.В. Янышолё