

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Фирсовой Алины Александровны

на тему **«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.

Диссертационная работа Фирсовой Алины Александровны посвящена актуальной и практически значимой задаче — разработке и валидации высокочувствительных и воспроизводимых методик количественного определения новых физиологически активных соединений на основе дегидроабиетиновой и усниновой кислот, а также производных камфоры, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ–МС/МС). Работа направлена на решение важной научно-прикладной проблемы — создание аналитической основы для проведения фармакокинетических исследований и доклинической оценки соединений, полученных в Новосибирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН и показавших перспективную биологическую активность и низкую токсичность. Продвижение таких соединений в качестве кандидатов в лекарственные препараты невозможно без достоверных данных об их распределении, метаболизме и выведении, что, в свою очередь, требует разработки высокоселективных валидированных методик анализа в соответствующих биологических матрицах.

Актуальность исследования обусловлена тем, что природные соединения и их полусинтетические аналоги, включая производные камфоры, дегидроабиетиновой и усниновой кислот, создаваемые в НИОХ СО РАН, представляют собой перспективный источник биологически активных молекул, на основе которых разрабатываются новые лекарственные препараты. Переход от исследований *in vitro* к экспериментам *in vivo* требует разработки высокочувствительных аналитических методов, обеспечивающих определение исследуемых соединений в биологических матрицах в широком диапазоне концентраций. Измерение содержания аналитов в организме, а также изучение их распределения, метаболизма и выведения являются ключевыми этапами при выборе вида лекарственных форм и оптимальных доз введения препаратов. В основном для этого используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрической детекции (ВЭЖХ–МС/МС), обеспечивающие высокую чувствительность и точность анализа. Несмотря

на наличие отдельных методик анализа камфецина, их чувствительность и низкая степень извлечения ограничивают возможности практического применения, что подчёркивает необходимость совершенствования существующих методов анализа. Также особый интерес представляют новые агенты — KS-389 (конъюгат дегидроабиетиламина и 1-адамантиламина) и OL9-116 (производное усниновой кислоты), демонстрирующие выраженную ингибирующую активность в отношении тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1) при низкой токсичности. Их способность усиливать действие ингибиторов топоизомеразы I подчёркивает актуальность детального изучения их фармакокинетики. Разработка и валидация высокочувствительных методик количественного анализа данных соединений в биологических матрицах имеет высокое значение для последующих доклинических и фармакокинетических исследований новых биологически активных веществ.

Научная новизна диссертации заключается в разработке и экспериментальной апробации новых методов определения производных дегидроабиетиновой и усниновой кислот в биологических жидкостях и тканях с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Автор впервые разработала и валидировала методики количественного определения: производного усниновой кислоты в цельной крови и гомогенатах тканей; производного дегидроабиетиновой кислоты (ингибитора TDP1 KS-389) в цельной крови и тканевых гомогенатах; противовирусного агента камфецина в плазме крови крыс. Кроме того, была оптимизирована методика количественного определения камфецина в сухих пятнах крови (Dried Blood Spots, DBS), что позволило повысить эффективность его извлечения из биологической матрицы в 5 раз и обеспечило возможность исследования распределения препарата между плазмой и форменными элементами крови в широком диапазоне концентраций. Разработанные методики обладают высокой чувствительностью (предел количественного определения - на уровне нескольких нг/мл), хорошей воспроизводимостью и линейностью в рабочих диапазонах концентраций. Результаты валидации подтверждают их пригодность для анализа в рамках доклинических исследований.

Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста, включает 63 рисунка, 25 таблиц, 2 приложения и содержит 174 литературных источника. Работа структурирована логично и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов и приложений. Литературный обзор объёмом 30 страниц систематизирует современные данные по методам пробоподготовки биологических образцов, подходам к анализу малых молекул с использованием хромато-масс-спектрометрии и основам валидации аналитических методик. Следует отметить, что обзор выполнен обстоятельно и критически, с акцентом на проблематику анализа малых количеств вещества в сложных биологических матрицах — плазме крови, цельной крови, тканях.

Экспериментальная часть объёмом около 20 страниц содержит детализированные описания этапов подготовки образцов, условий ВЭЖХ–МС/МС-анализа и параметров валидации. Автор последовательно исследует основные характеристики методик: специфичность, линейность, точность, воспроизводимость, стабильность и степень извлечения. Все данные приведены в виде таблиц и графиков, что обеспечивает наглядность и удобство восприятия. Обсуждение результатов, составляющее около 40 % объёма диссертации, логично структурировано и включает четыре раздела, посвящённые фармакокинетическим исследованиям камфецина, а также производных дегидроабетиновой и усниновой кислот — соединений KS-389 и OL9-116. Представлены фармакокинетические кривые, рассчитаны основные параметры ($C_{\max}$, $T_{\max}$, $T_{1/2}$, AUC, MRT), показано распределение веществ в различных органах и тканях, что свидетельствует о глубоком понимании автором биофармацевтических аспектов исследования.

В процессе ознакомления с работой возникли отдельные замечания и вопросы, больше относящиеся к техническим подробностям и оформлению и не снижающие её научной значимости:

1. В таблицах 11 и 12 необходимо более чётко обозначить, какие единицы измерения (нг/мл или нг/г) к чему относятся.
2. На рисунках 48 и 51 представление данных следовало бы унифицировать, используя одинаковые шкалы в графиках А и Б для повышения наглядности.
3. На рисунках 59–62 зависимость концентрации вещества от времени показана как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM), тогда как обычно приводится стандартное отклонение (SD); это требует уточнения.
4. Раздел «Материалы и методы» содержит недостаточно подробное описание процедуры расчёта фармакокинетических параметров, указана только программа, в которой выполнялись расчёты.
5. Некоторый вопрос вызывает при анализе камфецина необходимость использования в качестве матрицы сухих пятен крови, если температурные условия хранения в которых камфецин стабилен не отличаются от условий хранения плазмы крови; следовало бы подробнее раскрыть преимущества данного подхода.

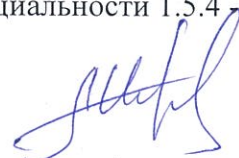
Перечисленные замечания носят рекомендательный характер и не влияют на общую положительную оценку представленной работы.

Диссертационная работа Фирсовой А. А. представляет собой завершённое, самостоятельное, комплексное исследование, выполненное на современном научно-методическом уровне. Разработанные и валидированные методики отвечают актуальным требованиям фармакокинетических исследований, обеспечивают высокую точность и

воспроизводимость результатов и могут быть использованы в доклинических исследованиях новых лекарственных соединений. Полученные результаты обладают несомненной практической ценностью, а подходы, реализованные в работе, могут быть использованы при создании аналитических методик для других классов биологически активных веществ. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, 15 тезисов докладов и представлено 8 устных сообщений на научных конференциях, что подтверждает высокую степень апробации результатов.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Фирсова Алина Александровна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 биохимия.

Ведущий научный сотрудник, руководитель ЦКП
«Центр масс-спектрометрического анализа» Института
химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
(ИХБФМ СО РАН), доктор химических наук



Черноносков Александр
Анатольевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: (383) 363-51-50

Факс: (383) 363-51-53

Эл. адрес: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись Черноносова Александра Анатольевича заверяю

Зам. директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института химической
биологии и фундаментальной медицины Сибирского
отделения Российской академии наук

Пестряков П.Е.

14 ноября 2025 г.

