

## 2018 ОТЗЫВ

официального оппонента профессора кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук, Куклина Владимира Николаевича по диссертации Булгаковой Евгении Александровны на тему: «Разработка биоаналитических методик для исследования фармакокинетики биологически активного соединения – производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, по специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

### ***Актуальность выполненного исследования***

В соответствии со Стратегией развития фармацевтической промышленности «ФАРМА-2020» актуальным является, разработка и производство инновационных лекарственных средств, импортозамещение и поддержка экспорта российских лекарств. Одной из динамично развивающихся и востребованных групп лекарственных средств на сегодняшний день являются ноотропные препараты из группы рацематов, используемые в различных областях медицинской практики и для фармакопрофилактики здоровых лиц. В настоящее время, продолжается поиск новых эффективных и безопасных средств с ноотропным действием. Один из примеров: производное 3-гидрокси-3-пирролин-2-он (КОН-1), синтезированный в Пермской государственной фармацевтической академии, для которого установлен широкий спектр фармакологической активности не уступающий по активности препаратам, используемым в клинике, и поэтому соединение рекомендовано для доклинических исследований в качестве потенциального ноотропного средства. Одним из важных этапов доклинических исследований является изучение фармакокинетики нового биологически активного соединения, которое дает представление о процессах его всасывания, распределения, элиминации и позволяет обосновать выбор лекарственной формы, путей введения и схемы дозирования. В связи с этим возникает необходимость в разработке высокочувствительных аналитических методик, позволяющих достоверно определять концентрацию анализируемого вещества в условиях фармакокинетического эксперимента. Поэтому тема диссертации является, несомненно, актуальной, проведенные исследования – своевременными.

## ***Новизна исследования и полученных результатов***

Автору многое удалось. Впервые определены условия анализа производного 3-гидрокси-3- пирролин -2-она (КОН-1) и для него разработаны и валидированы методики количественного определения в извлечениях из биологических объектов с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и массспектрометрическим детектированием для целей изучения фармакокинетики нового биологически активного соединения.

Установлены оптимальные условия изолирования КОН-1 из водных растворов и биологических объектов (кровь, моча и внутренних органов лабораторных животных), обеспечивающие максимальную эффективность извлечения.

Впервые изучены процессы ионизации и характер фрагментации КОН-1 в условиях tandemной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) и определены условия его детектирования в режиме регистрации ионных переходов (MRM).

Впервые рассчитаны основные фармакокинетические параметры КОН-1 после однократного перорального введения субстанции лабораторным животным, которые могут быть использованы как на этапе доклинических, так и клинических испытаний.

***Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертационной работе***  
Диссертационная работа Булгаковой Евгении Александровны выполнена на достаточно высоком научном уровне. Для полученных научных результатов автор обосновано использует современные методы и высокочувствительное оборудование, которое используется в фармацевтическом анализе, согласно Фармакопее 13 издания. Обоснованность и достоверность положений и выводов подтверждается аналитическим обобщением отечественных и зарубежных источников по теме диссертации. Результаты экспериментальных исследований отвечают поставленным задачам, получены на проверенном оборудовании, при этом используются современные методы сбора и обработки исходной информации, регистрации полученных результатов исследования с использованием современного аналитического оборудования и данных компьютерных библиотек.

Все положения, выдвинутые на защиту научно обоснованы. Выводы вытекают из полученных результатов, аргументированы и согласуются с задачами исследования. Достоверность выводов подтверждается достаточным

объемом представленного материала и аргументированным анализом полученных данных.

**Теоретическая и практическая значимость полученных результатов и рекомендации по их использованию.** Разработанные методики показали, что методики определения КОН-1 в биологических объектах обладают специфичностью и высокой чувствительностью, что позволяет использовать их при изучении фармакокинетики соединения как на этапе доклинических, так и клинических исследований. Методика количественного определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом tandemной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с положительной оценкой апробирована в лаборатории физико-химических методов анализа ООО «Парма Клиника», г. Пермь (Акт апробации от 19.12.2017 г.)

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России и используются при проведении практического занятия «Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС) в анализе лекарственных средств, доклинических фармакокинетических исследованиях новых биологически активных соединений, синтезированных в Пермской фармацевтической академии, и определении биоэквивалентности» цикла «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» для преподавателей кафедр фармацевтических вузов и училищ химического, технологического профиля, фармакогнозии и ботаники, проводимого на базе Регионального испытательного центра «Фарматест» и кафедры токсикологической химии ПГФА (Акт внедрения научных достижений в учебный процесс от 20.12.2017 г.), а также в учебный процесс на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: материалы работы используются в учебном процессе при проведении лекционных и практических занятий со студентами, обучающимися по специальности «Фармация» (Акт о внедрении результатов диссертационной работы от 29.05.2018 г.).

**Апробация работы.** Работа, Булгаковой Е.А. хорошо апробирована. Основные положения и результаты, доложены на научно-практических конференциях России с международным участием и достаточно полно отражены в 9 научных работах, в том числе 3 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации темы – 01.9.50 007417.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно п. 4 – разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (6 глав), общих выводов, списка литературы, включающего 147 наименований (из них 85 источников зарубежной литературы), приложения. Работа изложена на 162 страницах компьютерного набора, включает 35 таблиц, 46 рисунков и приложения.

Для проведения исследования диссидентом сформулирована цель работы, логично определены и последовательно решены задачи для ее достижения.

Во введении обоснована актуальность темы, определены цель и задачи исследования, сформулирована научная новизна теоретическая и практическая значимость работы, представлена методология и методы исследования, определены положения, выносимые на защиту, приведена информация о личном участии автора и аprobации результатов исследования.

Глава 1 представляет собой обзор литературных данных, в котором приведена характеристика современных ноотропных препаратов, их классификация с учетом механизма действия и химического строения. Показано, что рацетамы являются перспективной группой для поиска новых соединений, обладающих ноотропным действием. Дано характеристика биологически активного соединения КОН-1, синтезированного в Пермской государственной фармацевтической академии и рекомендованного для доклинических исследований в качестве потенциального ноотропного средства. Представлены обобщенные данные по фармакокинетике препаратов из группы рацетамов, описаны биоаналитические методики, используемые в фармакокинетических исследованиях ноотропов.

2 Глава включает в себя описание объектов и методов, используемых при исследовании. Реактивы, растворители и методы, используемые при разработке методик и для проведения анализа.

В 3 главе обсуждаются результаты эксперимента по выбору оптимальных условий определения КОН-1 методом обращено-фазной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором.

Глава 4 включает в себя результаты экспериментальных исследований по разработке методик пробоподготовки биологических жидкостей к последующему аналитическому этапу на основе прямого осаждения белков плазмы крови, жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции, а также выбор условий изолирования КОН-1 из внутренних органов.

В 5 главе приводятся результаты валидационной оценки методик количественного определения КОН-1 в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-УФ. Валидацию разработанных методик проводили с использованием модельных смесей согласно современным требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Были оценены основные валидационные параметры: селективность, линейность, правильность и прецизионность.

Глава 6 посвящена разработке методики определения КОН-1 в плазме крови методом tandemной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) и ее валидационной оценке. Эксперимент проводился на жидкостном хроматографе «LCMS-8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении).

В 7 главе представлены результаты фармакокинетического эксперимента после перорального введения субстанции КОН-1 кроликам и крысам. Дан расчет основных фармакокинетических параметров для КОН-1.

Общие выводы по диссертационному исследованию, приведенные в заключении, подкреплены убедительными и обоснованными результатами собственных исследований и соответствует поставленным задачам.

В приложении представлена характеристика лекарственных ноотропных препаратов из группы рацематов и акты внедрения полученных результатов.

Автореферат отражает основное содержание и выводы диссертации.

При общей положительной оценке работы Булгаковой Евгении Александровны следует сделать несколько замечаний и задать вопросы:

- В литературном обзоре, в пункте 1.3, стоило более подробно остановиться на характеристике исследуемого соединения, рассмотреть механизм реакции получения КОН-1, привести нормативную документацию на стандартный образец и субстанцию, поскольку от этих данных Вы отталкиваетесь, изучая фармакокинетику для вновь синтезированного препарата. Почему в данном разделе нет данных о токсичности КОН – 1, в сравнении с пирацетамом?

- Глава 2 диссертации очень детализирована, следовало бы перечислить реагенты и растворители, а затем дать общую ссылку на ГФ 13. На мой взгляд, пункты 2.3-2.4 стоило объединить, чтобы избежать повторов.
- Почему при приготовлении модельных смесей внутренних органов использована вода (какая?) и не использован фосфатный буфер с физиологическим значением pH среды?
- Почему в работе не указано значение  $pK_a$ , которое позволило бы оценить данные по изучению процесса экстракции КОН-1 из водных растворов (таблица 4.2.1.1). На мой взгляд, исходя из структуры, изучаемое соединение может экстрагироваться с высоким процентом, как из кислых, так и щелочных сред.
- С чем связано, что для изолирования КОН-1 из модельных смесей мочи и плазмы крови необходимо использовать разные системы растворителей?
- Предложенные частные методики изолирования являются Вашей разработкой или это модификация известных методик? Если да, то где ссылки на литературные источники?
- Почему при валидации методик количественного определения соединения КОН-1 значения коэффициентов корреляции указаны с пятью знаками после запятой? Как это соотносится с требованиями ГФ 13?
- В ходе эксперимента Вами установлено, что за 24 часа в среднем из организма крыс выводится 4,57 % неизмененного КОН-1 относительно введенной дозы. За вторые сутки выводится 0,72 % вещества. Изучались ли другие пути выведения?
- По тексту встречаются неудачные выражения и опечатки, а также ошибки редакционного плана. Например, при нумерации подглав точка у последней цифры не ставится. Имеются замечания по названию растворов кислот и щелочей стр. 26, 29, 45 и т.д.

Перечисленные замечания не имеют принципиального значения, не снижают значимости выполненных исследований, достоверности результатов и достоинств выполненной работы.

#### ***Заключение о соответствии диссертации критериям «Положения о присуждении ученых степеней»***

Таким образом, диссертационная работа Булгаковой Евгении Александровны на тему: «Разработка биоаналитических методик для исследования фармакокинетики биологически активного соединения – производного 3-гидрокси-3-пирролин - 2- она», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научной квалификационной работой, в рамках поставленных задач, в которой

содержится решение важной научной задачи современной фармации по созданию эффективных, валидированных биоаналитических методик для исследования фармакокинетики биологически активных соединений.

Диссертационная работа Булгаковой Евгении Александровны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с учетом изменений, внесенных в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Булгакова Евгения Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

### ***Официальный оппонент***

Профессор кафедры фармацевтической химии  
федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский  
государственный химико-фармацевтический университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор фармацевтических наук,

(15.02.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия),

Профессор

Владимир Николаевич Куклин

197376 г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит.А

Телефон рабочий: +7 (812) 499-39-00 доб. 4080.

E-mail: kuklin-prof@yandex.ru

05.10.2018 г

Подпись руки

*Куклин В.Н.*

удостоверяю

*05.10.2018*

Павлук И.Е.

Начальник отдела документации

ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России