

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

профессора кафедры фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора фармацевтических наук (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела, 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия) профессора Федосеевой Людмилы Михайловны на диссертацию Хренкова Алексея Николаевича «Химический состав и фитостимулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**Актуальность выполненного исследования.** В последние годы проводятся интенсивные исследования по биологической деструкции фармацевтических поллютантов – компонентов лекарственных средств и их метаболитов, детектируемых в окружающей среде. Интерес к данной теме вызван глобальным фармацевтическим загрязнением водных объектов: в 71 стране мира обнаружено уже более 600 веществ, относящихся к фармацевтическим препаратам. При этом наиболее часто обнаруживаются антибиотики, эстрогены, антидепрессанты, нестероидные противовоспалительные средства и др.

На настоящий момент накоплен значительный экспериментальный материал по биодеструкции лекарственных средств различными микроорганизмами: протеобактериями, актинобактериями и грибами. Среди образующихся метаболитов, например парацетамола, обнаруживаются соединения с выраженной фитостимулирующей активностью. Наряду с парацетамолом одним из повсеместно детектируемых фармацевтических поллютантов является ацетилсалициловая кислота (АСК), широко доступное и часто применяемое в мировой медицинской практике НПВС. Ежегодное мировое потребление АСК составляет десятки тысяч тонн, что способствует неизбежному попаданию данного вещества в окружающую среду. В связи с

этим необходимы методы детоксикации данного фармполлутанта. Приоритет по показателям эффективности и экологической безопасности признается за биотехнологическими способами разложения подобных загрязнителей. Работы по биоконверсии АСК проведены с использованием различных микроорганизмов. Однако исследования направлены в основном на изучение метаболических путей процесса биодegradации данного вещества. При этом существует явный недостаток информации о разработке методик анализа АСК и образующихся метаболитов в процессе биодеструкции, скорости данного процесса, об обеспечении качества проводимых аналитических процедур и свойствах образующихся продуктов.

В связи с этим работа Хренкова А.Н., посвященная исследованию химического состава и возможного фитостимулирующего действия продуктов бактериальной деструкции АСК весьма актуальна.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (номер государственной регистрации темы 01.9.50 007417).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования данной специальности, указанной в пункте 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 построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2–5), выводов, списка сокращений и списка

цитируемой литературы, включающего 202 наименования работ, в том числе 71 отечественных и 131 зарубежных авторов, и приложения.

Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 24 рисунка.

Содержание работы соответствует цели исследования и отражает последовательность выполнения поставленных автором задач.

**Во введении** представлена актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сведения об апробации и внедрении полученных результатов, личный вклад автора, обосновано соответствие исследования паспорту специальности, сформулированы положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** (обзор литературы) проведен анализ ситуации и рассмотрены перспективы переработки фармацевтических отходов, содержащих АСК. Показано, что массовое производство и потребление АСК неизбежно приводит к образованию значительного количества отходов и попаданию данного соединения в объекты окружающей среды. Представлена характеристика АСК как фармацевтического поллютанта. Приведены пути метаболизма АСК различными микроорганизмами. Отмечено, что одним из возможных бактериальных метаболитов АСК является фумаровая кислота, проявляющая фитостимулирующее действие. Это положение явилось посылком для формулировки цели и задач диссертационного исследования.

**Во второй главе** описаны объекты и методы, использованные при проведении экспериментальных исследований, представлены приборы и реактивы, схемы исследования фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции АСК в лабораторных и полевых условиях.

**В третьей главе** представлены результаты скрининга активного штамма-биодеструктора АСК, а также результаты разработки методики определения содержания АСК в посферментационных средах родококков

методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

На этапе скрининга штамма-биодеструктора автором определена жизнеспособность актинобактерий *Rhodococcus* и *Gordonia* в отношении АСК, минимальная подавляющая концентрация АСК в отношении 15 штаммов актинобактерий рода *Rhodococcus* и 13 коллекционных культур *R. jostii*, в частности. Установлено, что активным штаммом-биодеструктором АСК является *R. jostii* ИЭГМ 60, способный к биодеструкции АСК в качестве единственного источника углерода и энергии.

В результате поиска условий количественного определения АСК в постферментационных средах родококков разработана методика анализа, позволяющая оценить содержание АСК и продукта ее гидролиза салициловой кислоты при совместном присутствии в образующейся многокомпонентной системе и степень биодеструкции АСК родококками. Процедурой валидации подтверждена селективность, линейность, прецизионность и правильность разработанной методики и ее пригодность для определения остаточного содержания АСК в процессе биодеструкции.

С использованием математического моделирования установлено влияние начальной концентрации АСК и вспомогательных веществ таблеток на продолжительность, скорость процесса биодеструкции и период полураспада АСК.

**В четвертой главе** представлены результаты исследования химического состава и количественного содержания продуктов бактериальной деструкции АСК, а также пути биодеструкции АСК клетками *R. jostii* ИЭГМ 60. Показано, что процесс биодеструкции АСК может происходить по двум метаболическим путям, один из которых приводит к образованию гентизиновой кислоты, превращающейся на конечных этапах в фумаровую кислоту. Определена концентрация фумаровой кислоты на 8-е сут процесса.

Разработан лабораторный регламент получения продуктов бактериальной деструкции АСК, содержащих фумаровую кислоту. Технологическая документация реализована при проведении процесса биодеструкции АСК на автоматизированной ферментационной установке.

**В пятой главе** представлены результаты исследования острой токсичности, фитотоксичности, антиоксидантной активности и фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции АСК в лабораторных условиях и в условиях полевого эксперимента.

Показано, что продукты биодеструкции АСК являются умеренно токсичными (3 класс токсичности), относятся к IV классу опасности (мало опасные) для окружающей природной среды и проявляют слабую антиоксидантную активность по сравнению с аскорбиновой кислотой.

Установлено, что продукты биодеструкции АСК оказывают положительный эффект на динамику накопления флавоноидов в траве зверобоя продырявленного, обусловленный присутствием в их составе фумаровой кислоты.

В заключении представлены основные результаты проведенных исследований, выводы и перспективы использования полученных экспериментальных данных.

**Научная новизна исследований и полученных результатов, их достоверность.** Впервые разработана методика динамического определения содержания АСК в присутствии метаболитов в постферментационных средах родококков методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. С использованием математического моделирования проведен анализ скорости процесса биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции и таблеток. На основании данных ТСХ и ВЭЖХ/МС установлен химический состав ПБ и пути бактериальной деструкции АСК с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Впервые показано фитостимулирующее действие ПБ АСК на лекарственное растение зверобой продырявленный *Hypericum perforatum* L.

Установлено, что фитостимулирующий эффект ПБ АСК обусловлен присутствием в их составе фумаровой кислоты и зависит от ее концентрации.

Степень достоверности проведенных исследований и полученных результатов определяется достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных хроматографических методов анализа, метода математического моделирования, валидации методик исследования и статистической обработки полученных результатов.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций основана на проведенном анализе как литературных данных, так и значительного объема экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования. Выводы логично вытекают из полученных автором диссертации результатов. Результаты исследований статистически достоверны.

**Значимость результатов исследования для науки и практики, возможные пути их применения.** Полученные автором сведения расширяют научное представление о свойствах и биологической активности продуктов биодеструкции АСК. Разработаны методики идентификации и динамического хроматографического определения содержания АСК в присутствии метаболитов в постферментационных средах родококков. Методика идентификации АСК и её метаболитов методом ТСХ применяется в лабораторном практикуме студентов при изучении дисциплины «Аналитическая химия» в Пермской государственной фармацевтической академии. Методика количественного определения АСК методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в постферментационных средах родококков с положительным результатом апробирована в РИЦ «Фарматест», г. Пермь. Методика количественного определения фумаровой кислоты как продукта биодеструкции АСК методом ВЭЖХ/МС апробирована в ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью

населения», г. Пермь. Разработан лабораторный регламент получения продуктов бактериальной деструкции АСК, содержащих фумаровую кислоту. Показано, что продукты биодеструкции АСК могут применяться в качестве стимуляторов роста растений, в том числе лекарственных, и индукторов накопления в них биологически активных веществ.

**Соответствие публикаций требованиям ВАК.** По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 2 – в изданиях, входящих в утвержденный ВАК перечень рецензируемых изданий.

**Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению работы.** Представленный в диссертационной работе материал изложен последовательно и аргументировано. В работе практически отсутствуют опечатки и некорректные выражения. Тем не менее при чтении диссертации возникли следующие вопросы и замечания.

1. Чем обоснован выбор актинобактерий рода *Rhodococcus* в качестве биодеструкторов ацетилсалициловой кислоты?

2. Какие еще штаммы родококков могут метаболизировать ацетилсалициловую кислоту в полезные продукты?

3. Почему в процессе биодеструкции ацетилсалициловой кислоты образуется именно фумаровая кислота, а не ее стереоизомер малеиновая? Определялось ли отсутствие малеиновой кислоты в культуральных средах родококков?

4. В работе было бы интересно обосновать фитостимулирующее действие фумаровой кислоты с позиций биохимии растений.

Однако указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают ценности проведенного диссертантом исследования.

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

Таким образом, диссертационная работа Хренкова Алексея Николаевича «Химический состав и фитостимулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты»,

представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная фармакохимическая задача, состоящая в установлении химического состава и фитостимулирующего действия продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты. Диссертационная работа Хренкова Алексея Николаевича соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п.п. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.20), а ее автор Хренков Алексей Николаевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент

профессор кафедры фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела, 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия) профессор Федосеева Людмила Михайловна

Адрес: 656038, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

+7 (385) 256-68-93

ludmila@agmu.ru

30.10.2020

