

Минздрав России

УТВЕРЖДАЮ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

И.о. ректора
ФГБОУ ВО СибГМУ
Минздрава России
доктор медицинских наук, доцент


Е.С. Куликов

Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
<http://www.ssmu.ru>

ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001

« 2 » 11 2020 г.

№ _____
На № _____ от _____

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы Хренкова Алексея Николаевича на тему «Химический состав и фитостимулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Актуальность темы

Исследования по биологической деструкции фармацевтических поллютантов – компонентов лекарственных средств и их метаболитов, детектируемых в окружающей среде, особенно актуальны в современных экологических условиях, характеризующихся глобальным фармацевтическим загрязнением водных объектов многих стран. Одним из повсеместно детектируемых фармацевтических поллютантов является ацетилсалициловая кислота (АСК). 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 фармполлютанта. Приоритет по показателям эффективности и экологической безопасности признается за

биотехнологическими способами разложения подобных загрязнителей. Работы по биоконверсии АСК проведены с использованием различных микроорганизмов. Но исследования направлены в основном на изучение метаболических путей разложения 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.

Диссертационная работа Хренкова Алексея Николаевича в определенной степени восполняет недостаток указанной информации. Актуальность работы несомненна.

Соответствие содержания диссертации заявленной научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Конкретно представленный материал соответствует областям исследования, указанным в п. 4 паспорта научной специальности: разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Диссертационная работа Хренкова А.Н. выполнялась в соответствии с утвержденным планом НИР Пермской государственной фармацевтической академии. Номер государственной регистрации темы 01.9.50 007419.

Научная новизна исследования, полученных результатов

и выводов

Автором в процессе работы выполнен достаточно большой объем экспериментальных исследований и получен ряд новых интересных научных результатов. Разработана методика динамического определения содержания АСК в присутствии метаболитов в постферментационных средах родококков методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. С использованием математического моделирования проведен сравнительный анализ скорости процесса биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции и

таблеток. На основании данных ТСХ и ВЭЖХ/МС установлен химический состав продуктов и пути бактериальной деструкции АСК с образованием нетоксичных конечных метаболитов. Впервые показано фитостимулирующее действие продуктов биодеструкции АСК на лекарственные растения на примере зверобоя продырявленного. Установлено, что фитостимулирующий эффект продуктов биодеструкции АСК обусловлен присутствием в их составе фумаровой кислоты и зависит от ее концентрации.

Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций

Использованные в представленной диссертационной работе современные методы хроматографического анализа, валидационной оценки исследований, математического моделирования и статистической обработки экспериментальных данных подтверждают достоверность полученных результатов. Однозначно положительно следует оценить применение диссертантом математического моделирования для характеристики скорости процесса биодеструкции АСК, а также проведение экспериментов не только в лабораторных, но и в полевых условиях.

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 работы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов кандидатских и докторских диссертаций, из которых 1 – в журнале, индексируемом реферативной базой SCOPUS.

Апробация фрагментов диссертационного исследования проведена на представительных всероссийских и международных конференциях и съездах.

Оценка содержания диссертации, её завершённость в целом, выводов и заключений

Диссертационная работа Хренкова А.Н. по структуре, объему и построению соответствует общим требованиям: изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 24 рисунка, что свидетельствует об экспериментальной насыщенности работы и ее достаточной иллюстрированности. Список литературы включает 202 источника, в том числе 71 отечественных и 131 зарубежных авторов.

Работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2–5), выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы и приложения

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.

ГЛАВА 1. Анализ ситуации и перспективы переработки фармацевтических отходов, содержащих ацетилсалициловую кислоту (обзор литературы)

Глава изложена на 20 страницах машинописного текста и содержит анализ ситуации, а также 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. Рассмотрены примеры использования ГХ/МС и ВЭЖХ/МС для идентификации и количественного определения продуктов деструкции АСК в биологических жидкостях и объектах окружающей среды.

Глава заканчивается выводами, в последнем из которых отмечено, что одним из возможных бактериальных метаболитов АСК является фумаровая кислота, проявляющая фитостимулирующее действие. Это положение положено в основу реализуемой диссертантом идеи о возможности получения в процессе биодеструкции АСК продуктов с новыми полезными свойствами.

ГЛАВА 2. Объекты, материалы и методы исследования включает в себя описание объектов, материалов и методов, использованных при проведении экспериментальных исследований; приборы и реактивы, схемы исследования фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции АСК в лабораторных и полевых условиях.

ГЛАВА 3. Разработка методики количественного определения ацетилсалициловой кислоты в постферментационных средах родококков методом ВЭЖХ

Глава включает в себя 18 страниц. В начале главы представлены результаты скрининга наиболее активного штамма-биодеструктора АСК, а затем результаты разработки методики определения содержания АСК в посферментационных средах выбранного штамма методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. 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 концентрации АСК и вспомогательных веществ таблеток на продолжительность, скорость процесса биодеструкции и период полураспада АСК. В конце главы имеется интересная ссылка на то, что идея кинетического моделирования экспериментальных реализаций процессов биологической деструкции лекарственных средств, которые относятся к нестационарным случайным процессам, перспективна и получила развитие в ряде междисциплинарных исследований.

ГЛАВА 4. Исследование химического состава продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты методами ТСХ и ВЭЖХ/МС

В главе, изложенной на 14 страницах, 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 родококками может происходить по двум метаболическим путям, один из которых приводит к образованию фумаровой кислоты. Разработан лабораторный регламент получения продуктов бактериальной деструкции АСК, содержащих фумаровую кислоту. Технологическая документация реализована при проведении процесса биодеструкции АСК на автоматизированной ферментационной установке.

ГЛАВА 5. Исследование токсических свойств и биологической активности продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты

В пятой главе, изложенной на 10 страницах, представлены

результаты исследования острой токсичности, фитотоксичности, антиоксидантной активности и фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции АСК в лабораторных условиях и в условиях полевого эксперимента. Данная экспериментальная глава небольшая по объему, но является самодостаточной, так как подробные схемы исследования токсичности и фитостимулирующего действия продуктов биодеструкции АСК описаны в главе 2. В рассматриваемой главе показано, что продукты биодеструкции АСК являются умеренно токсичными, мало опасными для окружающей природной среды и проявляют слабую антиоксидантную активность. В главе содержится основной вывод работы о том, что продукты биодеструкции АСК оказывают положительный эффект на динамику накопления флавоноидов в траве зверобоя продырявленного, обусловленный присутствием в их составе фумаровой кислоты.

Далее следует Заключение, которым автор обобщает результаты проведенных исследований, делает выводы и указывает на перспективы использования полученных результатов. Список сокращений и условных обозначений помещен на одной странице в начале работы. Список литературы составлен грамотно, с преобладанием источников зарубежных авторов. Последним в диссертации представлен блок Приложений, включающий Лабораторный регламент получения продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, содержащих фумаровую кислоту; Протокол исследования острой токсичности продуктов биодеструкции ацетилсалициловой кислоты, а также документы, подчеркивающие практическую значимость работы (два акта внедрения и два акта апробации).

Значимость полученных результатов для науки и практики

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные сведения расширяют представление о химическом составе, свойствах и биологической активности продуктов бактериальной деструкции АСК. Определены условия и основные пути метаболизма АСК клетками родококков с образованием нетоксичных и не опасных для окружающей природной среды продуктов. Разработаны методики идентификации и количественного определения АСК и образующихся метаболитов в культуральных средах родококков. Определены параметры

скорости процесса биодеструкции АСК. Доказано фитостимулирующее действие продуктов биодеструкции АСК на лекарственные растения, обусловленное фумаровой кислотой.

Практическая значимость исследования подтверждена разработкой лабораторного регламента получения продуктов бактериальной деструкции АСК, содержащих фумаровую кислоту, а также представлена апробацией и внедрением разработанных методик в учебный процесс вузов г. Перми.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные автором результаты имеют несомненные перспективы для практического использования в современной фармации. Диссертантом показана возможность получения из ацетилсалициловой кислоты микробиологическим способом новых биологически активных продуктов, которые могут быть использованы как стимуляторы роста лекарственных растений и индукторы накопления в них биологически активных веществ.

Полученные результаты могут быть полезны также при реализации биотехнологических решений процессов доочистки сточных вод фармацевтических предприятий; при прогнозировании продолжительности процесса биодеструкции и мониторинга содержания ацетилсалициловой кислоты в объектах окружающей среды.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор – А.Н. Хренков, исходя из информации, представленной в диссертации, приложениям к ней и автореферате, участвовал во всех действиях и этапах исследования, направленных на выполнение диссертационной работы. Все исследования, процедуры апробации и внедрения проведены с его непосредственным участием.

При общем положительном впечатлении, полученном при ознакомлении с диссертационной работой А.Н. Хренкова, возникли следующие замечания и вопросы.

1. В работе очень кратко описаны характеристики бактерий, использованных автором для биодеструкции ацетилсалициловой кислоты. Возникает вопрос, на каком основании в качестве биодеструкторов

автором выбраны именно родококки и какие ферменты родококков участвуют в процессе биодеструкции ацетилсалициловой кислоты?

2. В выводах к главе 1 (п. 3) утверждается, что для определения аналитов диссертационной работы используются методы газовой и жидкостной хроматографии, однако отсутствует обоснование использования в работе именно метода ВЭЖХ, как и необходимости разработки новых методик.
3. Из п. 2.3.5. не совсем понятно, какой именно тип источника ионизации использовался в работе при определении содержания фумаровой кислоты в составе ПБ АСК.
4. Зависит ли скорость процесса биодеструкции от температуры? Соблюдается ли при этом правило Вант-Гоффа?
5. Изучалась ли динамика накопления в культуральной среде родококков целевого продукта биодеструкции – фумаровой кислоты?
6. Почему для доказательства химического состава и структуры образующихся метаболитов использовали метод ВЭЖХ/МС? Возможно ли использование ЯМР и ИК спектроскопии для решения этой задачи?
7. Автор отказывается от градиентного элюирования в пользу оптимизации времен удерживания АСК и СК, которые в оптимизированной системе составили 8,25 и 12,30 мин, соответственно. Какой принцип лежал в основе оптимизации хроматографической системы? Как изменились времена удерживания аналитов при переходе от градиентного к изократическому элюированию? И чем можно объяснить ранний выход более гидрофобного соединения – ацетилсалициловой кислоты в условиях обращенно-фазной хроматографии?
8. Чем обусловлен выбор рН подвижной фазы (3.0)? Проводилось ли изучение влияния природы кислоты и ее концентрации на хроматографические параметры аналитов?
9. В п. 4.1.1. указано, что при подборе подвижной фазы использовались как метанол, так и этанол, однако на странице 66 среди апробированных систем представлены только ПФ, содержащие этанол.
10. Не пытались ли прогнозировать биологическую активность метаболитов ацетилсалициловой кислоты с помощью программы PASS online?

11. Проводилась ли оценка влияния посторонних веществ проб на сигнал иона 115 m/z, исходя из малого времени удерживания ФК?
12. В разделе 2.3.7 автор указывает, что изучение острой токсичности ПД АСК проводили на беспородных мышах при пероральном пути введения. В то же время, при расчете LD₅₀ определяли класс токсичности по классификации К.К. Сидорова, приведенной для парентеральных способов введения (а именно подкожном и внутрибрюшинном), что приводит в итоге к некорректной интерпретации полученных результатов. Вероятно, стоило воспользоваться соответствующим ГОСТ 12.1.007-76 для определения класса опасности или классификацией Ходжа и Стернера.
13. Целесообразно ли приводить схему химического производства, если процесс является биосинтетическим и не ведется внутрипроизводственный контроль промежуточных продуктов?

Высказанные замечания и вопросы не критичны и не умаляют ценности представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Хренкова Алексея Николаевича на тему: «Химический состав и фитостимулирующее действие продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты» является самостоятельным, законченным, в рамках поставленных задач, научно-квалификационным исследованием по актуальной проблеме, результаты которого имеют существенное значение для развития фармацевтической науки и практики в области разработки методов анализа лекарственных средств и их метаболитов в биологических объектах.

В диссертационном исследовании А.Н. Хренкова решена важная фармакохимическая задача, заключающаяся в установлении химического состава и фитостимулирующего действия продуктов бактериальной деструкции ацетилсалициловой кислоты.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности, уровню публикаций и степени апробации полученных результатов, а также обоснованности выводов диссертационная работа Хренкова Алексея Николаевича соответствует требованиям п.п. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор – Хренков Алексей Николаевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв на диссертационную работу Хренкова Алексея Николаевича обсуждён на заседании кафедры фармацевтического анализа федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 04/20 от 20.10.2020 г.).

Заведующий кафедрой фармацевтического анализа
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор фармацевтических наук
15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия;
14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология
(фармацевтические науки)

Белоусов Михаил Валерьевич

02.11.2020 г

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь

М.В. Терехова
«02» 11 2020

