

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора фармацевтичних наук, професора Каплаушенка Андрія Григоровича на дисертацію Осипчук Людмили Іванівни на тему «Хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія і фармакогнозія

1. Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з державними і галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки та техніки. Дисертаційна робота Осипчук Людмили Іванівни «Хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях» присвячена одній з важливих проблем фармації – розробці методик ізолювання силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу, методів їх ідентифікації та кількісного визначення, придатних для цілей судово-хімічного аналізу. Вибір об'єктів дослідження і постановка проблеми є вдалими і аргументованими. Після впровадження інгібіторів фосфодіестерази у клінічну практику були відмічені гострі отруєння препаратами даної групи, як при моноживанні, так і в комбінації із верапамілом, триметазином, йохімбіном, бромзаземом та нітрогліцерином. Судово-медичною експертизою зафіксовано летальні випадки після вживання силденафілу, в тому числі внаслідок суїциду, що підкреслює актуальність досліджень. При цьому на даний момент відсутні систематичні дані відносно хіміко-токсикологічного аналізу схожих за хімічною будовою силденафілу та варденафілу, і які мають на ряду з іншими, однаковий продукт біотрансформації. Все це зумовлює актуальність дослідження, яке, окрім вагомого внеску у галузь фармацевтичних наук, має значну соціальну значущість. Тому опрацювання токсикологічного дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів з використанням сучасного наукового підходу є безперечно важливим.

Дисертаційна робота Осипчук Людмили Іванівни виконана згідно з планом науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (№ 0116U004500, шифр теми ІН 10.06.0001.16).

2. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі. Достовірність одержаних автором результатів не викликає сумніву, тому що для інтерпретації та ізолювання, а також для порівняльної оцінки методів виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу використано сучасний пакет фізико-хімічних методів аналізу та загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання за О.О. Васильєвою, В.П. Крамаренком, Стасом-Отто.

Будова основних метаболітів силденафілу та варденафілу, виділених із органів та біологічних рідин тварин, надійно підтверджена методом хромато-мас-спектрометрії.

ГХ/МС і ВЕРХ/МС методики кількісного визначення силденафілу та варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки валідовані за такими параметрами як селективність/специфічність, лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність, матричний ефект та стабільність. Методики кількісного визначення повністю відповідають затвердженим вимогам національних та міжнародних регламентуючих документів, характеризуються правильністю, є точними та відтворюваними і можуть використовуватись для проведення хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу та варденафілу.

Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані у дисертаційній роботі, базуються на експериментальному матеріалі і логічно витікають з отриманих результатів. Висновки за окремими розділами та загальні висновки є науково обґрунтованими, викладені автором чітко та коректно.

Вважаю, що поставлені в роботі завдання реалізовані повною мірою і на високому науковому рівні.

3. Наукова новизна. Автором вперше запропоновано перспективний науковий напрямок систематичного хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу та варденафілу; запропоновано осадові та кольорові реакції для їх виявлення, умови ТШХ аналізу означених токсикантів та їх метаболітів при одночасній присутності; задля виявлення та кількісного визначення в біоматеріалі розроблено та валідовано УФ-спектрофотометричні, флуориметричні, ГХ/МС; ВЕРХ/МС та УВЕРХ методики з різними варіантами детектування; вперше вивчено умови екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів в залежності від рН середовища і природи розчинників, розроблено твердофазно-екстракційні методики концентрування препаратів; вперше проведено порівняльну оцінку ізолювання силденафілу та варденафілу загальноприйнятими методами, для виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу, в тому числі з крові, запропоновано використання суміші ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1); для ізолювання силденафілу та варденафілу з крові запропоновано метод ТФЕ. Для ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми розроблено умови для ТФЕ на картриджах Oasis HLB та на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом, а також запропоновано методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі; вивчено розподіл силденафілу та варденафілу в органах отруєних тварин після їх одночасного прийому.

Наукову новизну та пріоритет досліджень підтверджено інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я «Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь».

4. Теоретичне значення результатів дослідження. Дисертантом проведено комплексні дослідження, на основі яких запропоновано та обґрунтовано актуальність виконання цілеспрямованого хіміко-токсикологічного дос-

лідження біологічного матеріалу на вміст силденафілу та варденафілу, що включає методики ізолювання із біологічного матеріалу, чутливі та експресні методи їх ідентифікації та кількісного визначення. Завдяки проведеним хіміко-токсикологічним дослідженням дана робота є суттєвим внеском у судово-медичну експертизу. На основі вивчення розподілу силденафілу та варденафілу в органах та біологічних рідинах тварин, встановлено, що при їх одночасному прийомі з органічними нітратами, через 24 години найвищий вміст силденафілу спостерігається в шлунку, кишківнику, печінці, легенях, серці та сечі, варденафілу – в шлунку, кишківнику, печінці, легенях та серці. Для досліджень потрібно направляти кров (сироватку) протягом перших трьох годин після прийому силденафілу та варденафілу в кількостях, що відповідають однократній терапевтичній дозі.

5. Практичне значення одержаних результатів. Автором розроблено методику хіміко-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст силденафілу, варденафілу та їх метаболітів. Запропоновані методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу можна рекомендувати для впровадження в практичну роботу токсикологічних відділень судово-медичної експертизи при вирішенні питань щодо отруєння даними препаратами, в клінічних лабораторіях – з метою визначення їх в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному аналізі.

Фрагменти роботи впроваджено в навчальний та науковий процеси ряду ВНЗ та науково-дослідних установ України.

6. Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях. Наукові праці, що висвітлюють зміст роботи, опубліковано у міжнародних та провідних фахових виданнях України. За матеріалами дисертації опубліковано 18 робіт, у тому числі 8 статей, із них 4 – у фахових виданнях України, 1 – в журналі, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 інформаційний лист, а також 9 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях. Автореферат дисертації як за структурою, так і за змістом відповідає основним положенням дисертації.

Вважаю, що опубліковані результати достатньо і повно відображають зміст дисертаційної роботи.

7. Структура та зміст роботи, зауваження щодо змісту і оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому. Дисертаційна робота, загальний обсяг якої становить 292 сторінки, має стандартну структуру – складається зі вступу, огляду літератури, 5 розділів експериментальних досліджень, що включають 89 таблиць та 45 рисунків. Список використаних джерел нараховує 185 найменувань, з них кирилицею – 36 та латиницею – 149, загальних висновків, списку використаних літературних джерел. Мовний стиль дисертації відповідає сучасним філологічним нормам, характеризується якісним представленням використаних формул, змістовністю табличного і графічного матеріалу.

В *першому* розділі наводиться загальна, фізико-хімічна, фармакологічна, токсикологічна характеристики силденафілу та варденафілу. Акцентовано на тому, що основним протипоказанням до застосування інгібіторів ФДЕ-5 є

їх одночасне вживання з нітровоазодилататорами, α -адреноблокаторами, інгаляційними формами нітропохідних.

В *другому* розділі представлені методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу в розчинах. Запропоновано ряд осадових та кольорових реакцій, а також склад систем, які можна використовувати для ТШХ-дослідження при отруєнні вказаними препаратами. Представлені УФ-спектри обговорюваних препаратів в метанолі та 96 % етанолі. Досліджено залежність інтенсивності флуоресценції силденафілу і варденафілу від природи розчинника. Досліджено можливість ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС. Для ідентифікації та кількісного визначення опрацьовано умови аналізу АФІ методом ВЕРХ, при цьому встановлено межі виявлення та кількісного визначення при різних способах детекції.

Розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ з МС/МС та УФ-детектуванням. Методики кількісного визначення силденафілу і варденафілу в розчинах методами УФ-спектрометрії, флуориметрії, ГХ/МС, ВЕРХ з мас-, УФ-детектуванням та флуоресцентним детектуванням і УВЕРХ/МС/МС валідовано за показниками лінійності, правильності та прецизійності.

В *третьому* розділі наведено результати впливу природи органічних розчинників та рН середовища на ступінь екстракції і коефіцієнт розподілу препаратів, встановлено, що для їх екстракції з водних розчинів найкраще застосовувати 1,2-дихлоретан. Оптимальне значення рН середовища для екстракції силденафілу становить 8,0, а для варденафілу – 7,5. Наведено схему проведення твердофазної екстракції (ТФЕ). Вивчено вплив рН середовища на сорбцію силденафілу і варденафілу Н-клинлоптілолітом в статичних умовах. Встановлено, що область максимуму сорбції двох препаратів цим сорбентом спостерігається при рН 5,5-7,8.

В *четвертому* розділі проведено порівняльну оцінку ізолювання силденафілу та варденафілу з використанням загальноприйнятих методів В. П. Крамаренка, О. О. Васильєвої та Стаса-Отто.

Розроблено методику ізолювання силденафілу і варденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Показано, що після депротейнізації крові 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом, і наступної пробопідготовки методом ТФЕ ізолюється 59-60 % силденафілу і варденафілу.

Розроблено методику для ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми крові методом ТФЕ. Запропоновано методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі з використанням рідинної та твердофазної екстракції.

В *п'ятому* розділі проведена валідація розроблених методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу в біологічних об'єктах методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС. Визначали критерії, необхідні для забезпечення відтворюваності і надійності аналітичних результатів: селективність/специфічність, нижні межі виявлення та кількісного визначення в даному біологічному об'єкті, лінійність/калібрувальна модель, правильність та прецизійність, мат-

ричний ефект та відтворюваність. Вивчена стабільність силденафілу та варденафілу в пробах плазми і сечі при різних умовах зберігання.

У шостому розділі вивчено розподіл силденафілу та варденафілу в органах та біологічних рідинах щурів. Встановлено, що з використанням розроблених методів ізолювання, опрацьованими хроматографічними методами аналізу, в усіх зразках відібраних тканин і біологічних рідин можна ідентифікувати силденафіл і варденафіл та їх метаболіти. Методом ГХ/МС у пробах виявлено 4 метаболіти силденафілу і 3 метаболіти варденафілу. Методом ВЕРХ/МС у пробах виявлено 6 метаболітів силденафілу та 5 метаболітів варденафілу. Застосовуючи фрагментацію мас-спектрів ідентифіковано метаболіти силденафілу та варденафілу. Наявність метаболітів в пробах підтверджено також при УФ-детектуванні і флуориметричному детектуванні.

Вивчено динаміку розподілу силденафілу і варденафілу в органах та біологічних рідинах. Встановлено, що найвищий вміст силденафілу спостерігається в шлунку із вмістом, кишківнику, печінці, легенях, серці та сечі, а варденафілу – в шлунку із вмістом, кишківнику, печінці, легенях та серці. Для клінічних лабораторних досліджень на аналіз потрібно відбирати кров та плазму протягом перших трьох годин після прийому силденафілу та варденафілу.

Визначено домінуючі метаболіти силденафілу та варденафілу.

Загальна оцінка роботи є беззаперечно позитивною. При розгляді дисертаційної роботи виникли деякі зауваження та запитання:

1. За результатами проведених комплексних досліджень бажано було навести схему спрямованого хіміко-токсикологічного аналізу силденафілу та варденафілу.
2. В дисертаційній роботі можна було не наводити дані відносно ТШХ аналізу препаратів, які не дали позитивного результату і не мають практичного значення.
3. Виходячи з назви роботи бажано більш детально дослідити поведінку аналітів за присутності нітровоазодилаторів та алкілнітритів.

Також в ході вивчення роботи виникли запитання, а саме:

1. З огляду на дані рКа силденафілу та варденафілу є незрозумілим дослідження екстракції означених аналітів при рН 2-4 та більш ніж 10.
2. Чим обумовлений вибір концентрацій АФІ силденафілу та варденафілу при проведенні валідації УФ-спектрофотометричних, флуороспектрометричних методик.

Проте наведені зауваження не є принциповими і жодною мірою не впливають на, як вже зазначалось, високу оцінку роботи роботи.

8. Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження на практиці. Запропоновані дисертантом методики виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу у розчинах є чутливими та відтворюваними і можуть мати практичне використання у наукових лабораторіях, які займаються хіміко-токсикологічним аналізом. Розроблені автором методики ізолювання силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу, методи їх ідентифікації та кількісного визначення, особливо у присутно-

сті інших препаратів є пріоритетними для цілей судово-хімічного аналізу.

9. Висновок про відповідність дисертації вимогам положення. На підставі всього вищезначеного можна зробити висновок, що дисертаційна робота Осипчук Людмили Іванівни на тему «Хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях» є завершеною науковою працею і за обсягом виконаних досліджень, своєю актуальністю, ступенем обґрунтованості наукових положень, новизною одержаних результатів, теоретичним та практичним значенням, висновками повністю відповідає п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМ України № 567 від 24 липня 2013 р. зі змінами, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

Зав.каф. фізколоїдної хімії ЗДМУ

д. фарм. н., професор



Власноручний підпис *А.Г. Каплаушенко*
ПІДТВЕРДЖУЮ
Нач. відділу кадрів Запорізького
державного медичного університету
«__» ____ 20__ р. Підпис *Дудук*

Дудук А.М.