

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **ОСИПЧУК Людмили Іванівни** на тему «*Хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях*», представлена до спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Актуальність теми. Дисертаційна робота Осипчук Людмили Іванівни присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню лікарських засобів силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях. Дослідження з розробки біоаналітичних методів визначення препаратів із групи інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу з вазодилатуючою дією залишаються важливим напрямком практики хіміко-токсикологічного аналізу. На сьогоднішній день відсутній системний підхід, який включає пробопідготовку широкого кола біологічних об'єктів, токсикологічний скринінг та підтверджуючі дослідження з ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу на основі комплексу хімічних та фізико-хімічних методів. До того ж більшість препаратів із групи інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу піддаються біотрансформації, що може ускладнювати їх виявлення за нативною речовиною. Тому необхідним є дослідження умов їх виявлення у присутності або за продуктами їх біотрансформації. Тому розробка схеми хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів з використанням сучасного наукового підходу є безперечно актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана згідно з планами проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (№ 0116U004500, шифр теми ІН 10.06.0001.16).

Наукова новизна роботи. Дисертантом уперше проведено системне хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених з біологічного матеріалу. Для ідентифікації силденафілу та варденафілу, виділених з біологічного матеріалу, запропоновано ряд осадових та кольорових реакцій. Вперше запропоновано системи розчинників для проведення ТШХ, які дозволяють виявляти досліджувані препарати в суміші з метаболітами.

З метою виявлення та кількісного визначення силденафілу та варденафілу у витяжках з біологічного матеріалу, розроблено умови методів УФ-спектрофотометрії; флуориметрії; ГХ/МС; ВЕРХ/МС, з УФ- та флуоресцентним детектуванням; УВЕРХ з МС/МС та УФ-детектуванням. Проведена валідація розроблених методик.

Вперше вивчено умови екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів в залежності від pH середовища і природи органічних розчинників, а також розроблено умови концентрування препаратів із водних розчинів методом твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB та картриджах з Н-клиноптилолітом.

Вперше проведено порівняльну оцінку ізолювання силденафілу та варденафілу загальноприйнятими в токсикологічному аналізі методами, а також для виділення силденафілу та варденафілу з біологічного матеріалу та крові запропоновано використання суміші ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). Для ізолювання силденафілу та варденафілу з крові також запропоновано метод ТФЕ на картриджах Oasis HLB, після депротеїнізації 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом. 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 з нітрогліцерином, що дозволяє вибрати біологічні об'єкти для проведення хіміко-токсикологічного аналізу.

Наукову новизну одержаних результатів підтверджено інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я № 268-2017 (2017 р.) «Оптимізація умов виявлення діючої речовини силденафілу в плазмі крові при діагностиці комбінованих отруєнь».

Ступінь обґрутованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність.

Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертаційній роботі, є достатньо обґрутованими і достовірними. Це забезпечується використанням сучасних методів аналізу та сучасними пристроями, великою кількістю повторних експериментальних досліджень, підтвердженням достовірності та коректності результатів, отриманих у дисертації, методами математичної статистики.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

У кандидатській дисертації Осипчук Л. І. уперше представлено системне хіміко-токсикологічне дослідження силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, виділених з біологічного матеріалу.

Для практичного втілення автором обґрутовано алгоритм та розроблено поетапну методику хіміко-токсикологічного дослідження

біологічного матеріалу на вміст силденафілу, варденафілу та їх метаболітів при комбінованих отруєннях. Розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу рекомендовано для впровадження в практичну роботу токсикологічних відділень судово-медичної експертизи при вирішенні питань щодо отруєння даними препаратами, клінічних лабораторій – з метою визначення їх в біологічних рідинах, а також для проведення аналізу чистих субстанцій та готових лікарських засобів.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження силденафілу та варденафілу впроваджені в роботу Головного бюро судово-медичної експертизи МОЗ України та Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи (акти впровадження від 17.01.2018 та 30.01.2018), а також в навчальний процес і наукову роботу кафедри лікарської та аналітичної токсикології Національного фармацевтичного університету, кафедри судової медицини Одеського національного медичного університету, кафедри фізколоїдної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, кафедри хімії Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти (акти впровадження від 25.01.2016, 31.01.2018, 6.02.2018, 13.02.2018, 15.02.2018, 13.03.2018, 16.03.2018).

Структура, зміст і оформлення дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 292 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів власних експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та 8 додатків. Обсяг основного тексту складає 167 сторінок. Робота ілюстрована 89 таблицями та 45 рисунками. Список використаних джерел нараховує 185 найменувань, з них кирилицею – 36 та латиницею – 149.

Дисертаційна робота починається з **анотації**, яка оформлена згідно з вимогами наказу № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій».

У **першому розділі** подано загальну характеристику силденафілу та варденафілу, їх фізико-хімічні властивості, фармакокінетику та можливі шляхи метаболізму, їх побічні ефекти та токсична дія. Встановлено, що більшість побічних ефектів спостерігається у пацієнтів з факторами ризику із сторони серцево-судинної системи. Виявлено наукову проблему, що полягає у доцільності розробки експресних та чутливих методів виділення, ідентифікації та кількісного визначення силденафілу, варденафілу та їх метаболітів, що будуть придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу та

при діагностиці станів гострої інтоксикації даними препаратами при комбінованих отруєннях.

У другому розділі представлені методики ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу в розчинах, які можна застосовувати при проведенні судово-хімічних досліджень. Вивчено реакційну здатність досліджуваних сполук з рядом реагентів, які використовуються в судово-хімічній практиці для експрес-виявлення ксенобіотиків. За результатами експериментальних досліджень вибрано реакції з межею виявлення 1-8 мкг силденафілу та варденафілу в пробі. Вивчено УФ-спектри даних препаратів в метанолі та 96 % етанолі. Встановлено межі концентрацій, в яких поглинання силденафілу та варденафілу в метанольних та етанольних розчинах підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера. Досліджено залежність інтенсивності флуоресценції силденафілу і варденафілу від природи розчинника (ацетонітрилу, ізопропанолу, 96 % етанолу та води бідистильованої). Описано умови кількісного визначення силденафілу та варденафілу за природньою флуоресценцією. Досліджено можливість ідентифікації та кількісного визначення силденафілу та варденафілу методом ГХ/МС без проведення дериватизації на капілярних колонках HP-1 та RTX-5. Встановлено, що використання колонки RTX-5 є придатним для ідентифікації та кількісного визначення обидвох препаратів у суміші. Для ідентифікації та кількісного визначення силденафілу і варденафілу опрацьовано умови їх аналізу методом ВЕРХ, при цьому встановлено межі виявлення та кількісного визначення при різних способах детектії (мас-, УФ- та флуоресцентному детектуванні). В роботі використано хроматографічні колонки Zorbax SB - C18 та LUNA® C18. Розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення силденафілу методом УВЕРХ з МС/МС детектуванням та УФ-детектуванням на колонці BEH C18.

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.

У третьому розділі вивчено вплив природи органічних розчинників (1,2-дихлоретану, хлороформу, діетилового етеру, тетрахлорид карбону, гексану, толуену) та pH середовища на ступінь екстракції і коефіцієнт розподілу силденафілу та варденафілу. Дисертантом встановлено, що найкращим органічним розчинником для екстракції даних препаратів з водних розчинів є 1,2-дихлоретан. Оптимальне значення pH середовища для екстракції силденафілу становить 8,0, а для варденафілу – 7,5. При даних значеннях pH екстрагується 93-95 % досліджуваних препаратів. Встановлено, що електроліти зменшують ступінь екстракції силденафілу та варденафілу з водних розчинів.

Автором розроблено схему проведення твердофазної екстракції (ТФЕ) на картриджах Oasis HLB, при цьому ступінь вилучення силденафілу та варденафілу із водних розчинів становить 99,0-99,5 % та 98-99 % відповідно.

Вивчено вплив pH середовища на сорбцію силденафілу і варденафілу Н-клиноптилолітом в статичних умовах. Встановлено, що область максимуму сорбції двох препаратів цим сорбентом спостерігається при pH 5,5-7,8. В статичних умовах із колонок з Н-клиноптилолітом 5 % розчином аміаку в 96 % етанолі елюється до 82-83 % варденафілу та 84-85 % силденафілу. В динамічних умовах із Н-клиноптилоліту ізолюється до 90-91 % варденафілу та 93-94 % силденафілу.

У четвертому розділі дисертантом проведено порівняльну оцінку ізолювання силденафілу та варденафілу з використанням загальноприйнятих в токсикологічному аналізі методів. Зокрема, методом В.П. Крамаренка можна виділити 35-38 % силденафілу та 33-37 % варденафілу; методом О.О. Васильєвої – 25-28 % силденафілу та 26-28 % варденафілу; методом Стаса-Отто виділяється 31-35 % варденафілу та 33-36 % силденафілу.

Автором розроблено методику ізолювання силденафілу і варденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70 % перхлоратної кислоти (1:1). При використанні даної методики і наступної очистки проб методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB із тканини печінки виділяється 46 - 48 % силденафілу та 45-48 % варденафілу.

Запропоновано методику ізолювання силденафілу та варденафілу з крові сумішшю ацетонітрилу із 70 % перхлоратною кислотою (1:1), при цьому виділяється 45-47 % силденафілу і варденафілу.

Встановлено, що після депротеїнізації крові 10 % розчином цинку сульфату та 96 % етанолом, і наступної пробопідготовки методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB з цієї біологічної рідини ізолюється 59-60 % силденафілу і варденафілу.

Дисертантом розроблено методику для ізолювання силденафілу та варденафілу з плазми крові методом ТФЕ на картриджах Oasis HLB та на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом. При застосуванні картриджів Oasis HLB із плазми ізолюється до 89 % силденафілу та до 88 % варденафілу, а на сорбційних колонках з Н-клиноптилолітом ізолюється 78-79 % досліджуваних сполук.

Запропоновано методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі з використанням рідинної та твердофазної екстракції. При цьому виділяється 68-69 % силденафілу та 67-68 % варденафілу.

П'ятий розділ присвячено валідації розроблених методик кількісного визначення силденафілу та варденафілу в біологічних об'єктах методами ГХ/МС і ВЕРХ/МС. Дисертантом визначено критерії, необхідні для забезпечення відтворюваності і надійності аналітичних результатів: селективність, нижні межі виявлення та кількісного визначення в даному біологічному об'єкті, лінійність/калібрувальна модель, правильність та

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

Розроблені методи характеризуються точністю та відтворюваністю, їх запропоновано використовувати при хіміко-токсикологічних дослідженнях силденафілу та варденафілу.

У шостому розділі автором вивчено розподіл силденафілу та варденафілу в органах та біологічних рідинах щурів, яким вводили досліджувані препарати однократно в терапевтичній та вищій разовій дозі разом з нітрогліцерином. Біологічний матеріал досліджували через 3 та 24 години після введення.

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 на колонці Zorbax SB-C18 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.

Дисертантом 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 годин після прийому силденафілу та варденафілу.

Основними домінуючими метаболітами силденафілу є гідроксилований за піперазиновим циклом силденафіл та гідроксилований продукт деградації за піперазиновим циклом деметилсилденафілу, а варденафілу – продукти деградації деетилварденафілу за піперазиновим циклом та їх гідроксиловані форми. При цьому через 24 години найвищий вміст метаболітів силденафілу та варденафілу спостерігається в легенях, печінці та сечі.

Аналізуючи дисертаційну роботу, необхідно відзначити, що експериментальна частина виконана на високому науковому рівні, має теоретичне обґрунтування та супроводжується обговоренням отриманих результатів. Висновки роботи обґрунтовані та відповідають завданням дослідження.

На основі визначених завдань дисертаційної роботи, з використанням обраних методів дослідження та оцінки їх результатів, дисертанту вдалося досягти поставленої мети.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті.

За матеріалами дисертації опубліковано 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, робота добре представлена науковій спільноті на конференціях різного рівня.

Опубліковані роботи повністю відповідають основним результатам досліджень. Структура та зміст автореферату відповідають структурі та змісту дисертації.

Поряд з позитивними характеристиками роботи необхідно відмітити **деякі зауваження та пропозиції:**

1. З розділу 3 незрозуміло, які критерії прийнятності ступеню екстракції і його відтворюваності.
2. Вважаю за необхідне вивчення робасносні при валідації аналітичних методик.
3. Автор проводить валідацію в широкому діапазоні концентрацій. Для такого випадку більш коректно застосовувати не відношення найдено/введено, а їх різницю.
4. У підрозділі 5.3 незрозуміло, які критерії прийнятності для лінійності/калібрувальної моделі при кількісному визначенні силденафілу та варденафілу в плазмі, сечі та тканині печінки методами ГХ/МС та ВЕРХ/МС.
5. В роботі зустрічаються поодинокі друкарські помилки та невдалі вирази.

У порядку проведення наукової дискусії вважаю за доцільне, щоб дисертант відповіла на наступне питання:

- Чому не проводилося вивчення валідаційних параметрів «ефект переносу» (*carry over*) та «стабільність при розведенні» (*dilution integrity*) при дослідженні силденафілу та варденафілу у плазмі та сечі методом ВЕРХ/МС?

Наведені зауваження мають дискусійний характер і не знижують загальну високу оцінку дисертації, яка спирається на величезний експериментальний і теоретичний матеріал, написана гарною науковою мовою і характеризується значною науковою новизною.

Рекомендації щодо використання результатів дисертації.

Теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи можуть бути використані для впровадження в практичну роботу токсикологічних відділень судово-медичної експертизи при вирішенні питань щодо отруєння

даними препаратами, клінічних лабораторій. Одержані результати також доцільно використовувати у навчальному процесі та науковій роботі університетів при підготовці фахівців для підприємств означених галузей.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Положення.

Враховуючи наведене вище, 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 актуальністю, об'ємом проведених досліджень, науковою новизною одержаних результатів, їх теоретичним та практичним значенням, ступенем обґрунтованості наукових положень, повнотою викладу у фахових виданнях повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (із змінами, внесеними згідно постанови № 656 від 19.08.2015 р. і № 1159 від 30.12.2015 р.) та вимогам, які ставляться до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02, а її автор Осипчук Людмила Іванівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

Доктор фармацевтичних наук, доцент,
завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Тернопільського національного
 медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Л. С. Логойда

Особистий підпис

Гостинник ректора
Національного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
Тернопільського національного
 медичного університету

