

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р **Татяна Станкова Зиколова**

Относно: Дисертационен труд на тема „Проучване на връзката между амиодароновата кератопатия и реалната плазмена концентрация на активната субстанция“

За присъждане на образователната и научната степен „Доктор“ по професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия).

Докторант на самостоятелна подготовка – *Славена Емилова Стойкова*

Славена Стойкова е завършила висшето си образование в МУ – София с професионална квалификация *Магистър - лекар*.

Понастоящем е асистент, началник на отделение по офталмология към УБ „Лозенец“.

Славена Стойкова има призната специалност по офталмология и магистратура във Факултета по обществено здраве към МУ-София.

Владее отлично немски и английски езици.

Представени за рецензиране са, както следва:

1. Дисертационен труд;
2. Автореферат;
3. Три научни статии, две от които публикувани в списания с IF.

Дисертационният труд съдържа 97 страници, от които:

- Увод; Литературен обзор - 39 стр.; Цели и задачи; Материали и методи - 22 стр.; Експериментална част - 18 стр.; Заключение, изводи и приноси.
- Цитирани са 118 литературни източника;
- В дисертационния труд са представени 22 фигури, 9 схеми и 8 таблици.

Славена Стойкова представя подробен и аналитичен преглед на достъпните литературни източници, свързани с обектите на проучванията в дисертационния труд.

Прегледът на литературните данни е тематично свързан с целта и задачите на проведените от автора изследвания. Интерпретацията на резултатите от литературата са отнесени правилно към целта на дисертацията.

По литературни данни първоначално изследваното лекарство е получено като извлек от растението *Ammi visnaga L.* Извлекът е бил познат под името *Khellin*. В резултат на наблюденията за лечебното му действие започва проучване за изолиране на активното вещество Amiodarone hydrochloride. Лекарствени продукти с това лекарствено вещество се произвеждат и разпространяват под различни търговски наименования, най-известното от които е Cordarone[®]. Прилага се като антиаритмично средство от III клас.

Лечението с лекарствени продукти на основата на Amiodarone е подробно дискутирано в литературния обзор. Представени са данни и изводи от прилагането му, метаболизма и нежеланите ефекти. Широко застъпени в обсъждането са установените промени от амиодароновата кератопатия.

Изводите и заключенията от литературния обзор сочат, че има сигурни наблюдения за взаимовръзка между приема на Amiodarone за лечение на вентрикуларна аритмия и наблюдавани нежелани реакции, отлагания в различни органи и тъкани, включително роговицата на окото.

Провеждани са изследвания в тази област, но не са намерени литературни данни за изследване на връзката плазмена концентрация на Amiodarone и диагностично откриваем нежелан ефект. Терапевтичните граници на концентрация са от 1,5 µg/ml до 2,5 µg/ml.

Изследванията в дисертацията са насочени към мащабно проучване на връзката между установени очни проявления и концентрацията на Amiodarone в кръвната плазма.

За по-голяма яснота подробно е показана структурата на окото и строежа на роговицата.

Представени са и методите за клинично-офталмологични изследвания.

Дадена е подробна информация за използваните за целта апарати с техните възможности за клинични изпитвания на съвременен ниво.

Показан е примерния начин на изследване с биомикроскоп. Дадени са и трите степени на най-честите отлаганията на Amiodarone върху роговицата на окото според площта и плътността им.

Наблюденията на пациенти при лечение с Amiodarone за връзка между наличното плазмено ниво на лекарственото вещество и очните проявления се провеждат от 10 години. Проучването е проведено на 911 пациенти. Предвид възникнали проблеми със стриктното спазване на предписаната доза и продължителност на лечението, годни за наблюдение се оказват 123 пациенти (13,5%), които са на дългосрочен прием на лекарствения продукт. По време на болнично лечение обикновено е прилаган Cordarone 150 mg sol. for inj. В амбулаторни условия са предписвани Cordarone 200 mg tablets, както и Amiodarone Sopharma 200 mg tablets и Amiodarone Actavis 200 mg tablets. Предвид високите изисквания при регистрация на генеричните продукти, както към лекарственото вещество, така и към лекарствените форми следва да се приеме, че няма различия в отнасянията на цитираните по-горе лекарства, произведени от различни фирми. Това обстоятелство дава основание да се счита, че отлаганията при кератопатията са резултат на нежелан страничен ефект на Amiodarone, независимо от произхода на лекарствения продукт. Фармакопейните изисквания по отношение на сродните вещества и други примеси са строго дефинирани и лимитирани за активното вещество. Предвид ниската граница от 0,2% за всеки примес се приема, че те не оказват влияние на изследването. За целите на проучването е разработен и предложен адаптиран и опростен HPLC метод. В дисертацията е направен обстоен преглед на избора на условия за провеждане на изпитванията. Намерени са оптимални условия за провеждане на бързи, възпроизводими и достъпни анализи от гледна точка на цена. До подбор на хроматографските условия е достигнато емпирично.

HPLC изпитванията са извършени с помощта на течен хроматограф *Surveyor (Thermo-Finnigan)* с детектор диодна матрица. За аналитична дължина на вълната е избрана $\lambda = 215 \text{ nm}$ след сканиране на UV – спектъра на Amiodarone в целия обхват на диодната матрица. Този абсорбционен максимум е резултат и от избора на колоната (*Hypersyl gold*), възприемана като специализирана за анализ на лекарствени вещества в кръвна плазма. Съществена част от работата е свързана с предлаганата подвижна фаза – евтина и достъпна смес метанол-вода. Колоната, с размери 150 mm x 4,6 mm, 5 μm се оказва най-подходяща от гледна точка брой на теоретичните тарелки. Този тип колони се счита, че имат висока разделителна способност и добра продължителност на експлоатация.

Предимство на работата е използването на евтина мобилна фаза и изократен режим на работа при по-ниска дължина на вълната (215 nm). Времето за анализ е 10 минути, което е от значение при анализ на голям брой проби. Работи се при рН интервал 7,36 ÷ 7,34, естествен за човешката кръв, без допълнителна корекция.

Прави впечатление извършената оптимизация по отношение на количеството на пробата за анализ.

Тези проучвания са в основата на създаване на адаптирания метод, чрез който да се постигнат приемливи стойности за чувствителност и възпроизводимост при резултатите в параклиничната дейност.

Същността на метода е дадена схематично в раздела „Материали и методи“. Представена е хроматографската система. Дадено е кратко описание на обработката на кръвните проби, както и анализирането им чрез предложената HPLC методика. Хроматографският метод е охарактеризиран по отношение степен на възвръщане по метода на стандартната добавка. За целта към кръв на пациент, свободен от изследваното лекарство е прибавян Amiodarone hydrochloride в концентрации от 0,5 µg/ml до 3 µg/ml. Степента на възвръщане е 86%. Методиката е валидирана по отношение на линейност. Представени са резултати за средна стойност, стандартно отклонение и относително стандартно отклонение. Резултатите от проведените изпитвания са обработени статистически и представени в 10 фигури и 2 таблици.

Количеството на Amiodarone в кръвната плазма се определя по калибрационна крива. Примерна хроматограма на Amiodarone в кръвна плазма (фиг. 14) показва добро разделяне при $RT = 5,408 \text{ min}$.

Данните на 7 пациента за плазмената концентрация и степента на роговичното засягане са показани таблично и графично. Степента на контаминация е основно втора, при плазмената концентрация в границите от 0,7 µg/ml до 3 µg/ml.

Обща оценка:

Целите и задачите са правилно поставени.

Авторефератът отразява същността на дисертационния труд.

Дисертационният труд е съставен на базата на три публикации, две от които в списания с IF. До този момент няма данни за цитиране на публикациите от други автори, както и за представяне на изследванията на научни форуми.

Методиката за анализ е представена цялостно като са описани подробно всички операции на пробоподготовка. Кръвните проби се обработват според изискванията на Добрата лабораторна практика. Тази част от изпитването е особено важна предвид получаване на проби за анализ с изисканата степен на възвръщане.

Течнохроматографската методика за определяне на Amiodarone в кръвната плазма е описана подробно и обоснована от теоретична гледна точка.

Предложеният подход е добър пример за решаване на важни клинични проблеми с помощта на съвременни методи за анализ.

Като резултат прилагането на този бърз и опростен метод дава възможност за системно проследяване на голям брой пациенти.

От 123 случая на дългосрочна терапия с Amiodarone, при 7 пациенти (5,7%) са установени клинично значими случаи на контаминация. При препоръчвания дозов режим това е два пъти повече от досегашните литературни експериментални данни. Този резултат показва приноса на изследванията от една страна в приложния хроматографски анализ, а от друга - неговата клинична значимост.

В съответствие със същността на работата авторът е дефинирал изводите в 6 точки и приносите в 5 точки.

Към дисертационния труд могат да се направят някои забележки:

Недостатъчно ясно е дефинирана в раздел „Цели и задачи“ работата по разработване на хроматографската методика.

Представеният хроматографски метод, както в изводите така и в приносите се губи в общото значение на изследването.

Лисват данни от валидирането на аналитичния метод, например граница на количествено определяне и прецизност. Забелязани са някои терминологично неточни изрази и технически грешки.

Заключение:

Като имам предвид гореизложеното, си позволявам да препоръчам на членовете на уважаемото научно жури да присъдят на докторант на самостоятелна подготовка **Славена Емилова Стойкова** образователната и научна степен „**Доктор**“ по професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия).

10.07.2017 г.

Рецензент:.....

/доц. Татяна Зиколова, дф/