



**Софийски университет
"Св. Климент Охридски"**

**ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА „ФПОХ“**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА
ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

по тема

**ПРОУЧВАНЕ НА ВРЪЗКАТА МЕЖДУ АМИОДАРОНОВАТА
КЕРАТОПАТИЯ И РЕАЛНАТА ПЛАЗМЕНА КОНЦЕНТРАЦИЯ
НА АКТИВНАТА СУБСТАНЦИЯ**

**за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“**

на Славена Емилова Стойкова

София, 2017 г.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. Увод	стр.3
2. Цели и задачи	стр.4
3. Аналитични и клинични техники	стр.5
3.1. Подход за клинико-лабораторни проучвания на амиодарон в кръвен серум.	стр.5
3.2. Подход за клинико-офтальмологични изследвания	стр.10
4. Експериментална част	стр.22
5. Заключение	стр.40
6. Изводи	стр.41
7. Приноси	стр.42
8. Списък на публикациите по дисертацията	стр.43

1. Увод

Амиодарон и Cordarone таблетки и инжекционен разтвор са лекарствени продукти на основата на активното вещество Amiodarone HCl с молекулно тегло 681,77 g/mol и брутна формула $C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$. Причислява се към III антиаритмичен клас. Основното предназначение е лечението на вентрикуларна аритмия и намира извънредно широко приложение в кардиологията, както и при постоперативното лечение на кардиохирургични пациенти. Предписва се обичайно в съдържание на активно вещество 100, 200 и 400 mg, а бионаличността му варира в широки граници. Като липофилно съединение се абсорбира много добре от мастната тъкан, черния дроб, мускулната тъкан и кожата.

Най-често дискутираните нежелани ефекти на амиодарона са ендокринни, гастроинтестинални, неврологични, белодробни, дерматологични и офталмологични. Последните се оказват най-слабо проучени. Те са свързани с изменения в рогочината повърхност, наречени *cornea verticillata* или амиодаронова кератопатия (АКП).

Поради високия му обем на разпределение, научните работи, касаещи нежеланите ефекти на амиодарона, не изясняват достатъчно връзката между приеманата доза и тяхната тежест. Същевременно тази субстанция не фигурира в листата на обичайно мониторираните вещества в кръвната плазма, макар да съществуват ефективни течностно-хроматографски методи, позволяващи това.

Настоящата работа съчетава проучването на тежестта на роговичната контаминация с амиодаронови кристали -АКП посредством съвременни офталмодиагностични методи и връзката с плазменото ниво на продукта, определено чрез течна-хроматография HPLC.

2. Цели и задачи

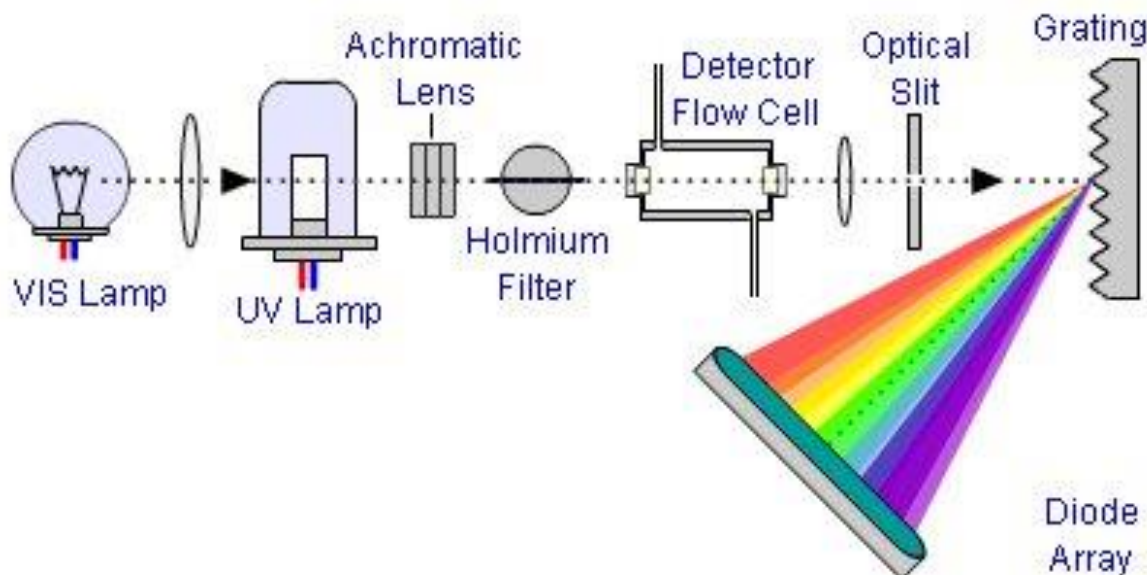
1. Насочено обследване роговиците на пациенти на дългосрочна терапия с амиодрон посредством съвременни офталмологични методики и оборудване преди поява на специфични оплаквания от тяхна страна.
2. На базата на литературните данни от обзора апробиране на лесен бърз и по-достъпен течно-хроматографски (HPLC) метод за определяне на амиодарон количествено при запазване характеристиките на другите методи по точност и възпроизводимост.
3. Събиране на данни от офталмологичния статус на пациентите и данни от лекарственото мониториране на серумните нива на амиодарон.
4. Подбор на пациентите, подложени на дългосрочна терапия с амиодарон и установяване връзката между очните проявления и лабораторната находка.

3. Аналитични и клинични техники

3.1. Подход за анализ на амиодарон в кръвен серум

HPLC изследванията са проведени с течен хроматограф Surveyor на американския производител Thermo-Finnigan. Детекторът е с диодна матрица, която обхваща интервала от 650 до 180 nm. На практика се работи само при дължина на вълната $\lambda = 215$ nm. Изборът на тази дължина на вълната е направен след сканиране на UV спектъра на амиодарон в целия обхват на диодната матрица. Работата при фиксирана дължина на вълната води до повишаване чувствителността с един порядък по данни на производителя. Всички органични разтворители са с чистота за градиентна HPLC работа.

Опростена схема на детектор с диодна матрица е представена на **Фигура 1**.



Фигура 1. Схематично устройство на детектор с фиксирана дължина на вълната и с диодна матрица

Кръвните проби се вземат по правилата на добрата медицинска практика (GMP) според общоприетите стандарти за работа на клиничната лаборатория (GLP).

1. След почистване на кожата с 65% алкохолен разтвор, се извършва венепункция на подходящо място, най-често кубиталната вена чрез затворена система Vacutainer. Материалът се събира в епруветка за стандартна кръвна картина (BC) с EDTA - Na, обозначена с лилава капачка.
2. Пробата може да се съхранява в хладилник при температура 4⁰C. Центруфугира се за 5 min при 4000 rpm. От горния слой с автоматична вариопипета се вземат 0,7 mL и се поставя във флаконче Eppendorf от 1,5 mL за еднократна употреба. После се прибавят 0,7 mL етилацетат като депротеинизиращ екстрагент. Впоследствие флаконът Eppendorf се разбърква в продължение на 20 sec с вибробъркалка Votrex. След това флаконът се пренася в микроцентрофуга Eppendorf при 9000 rpm за 5 min.
3. Горният органичен слой се извлича с вариопипета количествено и се прехвърля в друга епруветка Eppendorf 1,5 mL като се изпарява с поток от въздух до пълно изсушаване. Диапазонът на рН, в който се работи тук се оказва зададен от свойствата на кръвта и е в интервала рН = 7,36 – 7,34. Това способства да се избегне комплицираното регулиране на рН с буфер и опростява и поевтинява значително подготовката на пробата.
4. Изпарената до сухо проба в еднократната епруветка Eppendorf 1,5 mL се извлича с 20 µl метанол за HPLC и се прехвърля в стъклена вложка от 50 µl, а тя се поставя във флакон за аутосемплер.

Течният хроматограф е снабден с колона на Thermo Fisher- Hypersil Gold C18 (150 mm x 4.6 mm; с едрина на пълнежа 5 µm). UV детекцията е при дължина на вълната 215 nm, а времето на задържане за амиодарон е 5,408 min. Температурата на колонната пещ е 55⁰C, а подвижната фаза се състои от метанол/вода (80:20 v/v), като потокът на

помпата е 0,4 mL/min. За стандартна субстанция се използва Cordarone[®] със степен на чистота 98,5% съгласно американската фармакопея (USP 2014). Използван е Amiodaron HCl със следните показатели:

Таблица 1. Параметри на Амиодарон хидрохлорид

1	Batch	20100409
2	Assay %	100.75
3	Loss on drying,%	0,0
4	Best before	25.04.2014
5	Quantity	3,0 g

HPLC методът касае активното вещество в клиничните проби, получени в болничната лаборатория, а не анализ на използвания препарат по идентичност, чистота и други показатели, обект на фармакопейните изисквания. Реално в лечебната практика се използват един оригинален френски препарат Cordarone (Sanofi Aventis) и два български генерика Amiodaron Actavis и Amiodarone Sopharma. Лекарствената форма на всички е делима таблетка от 200 mg, помощните вещества са лактоза монохидрат, царевично нишесте, повидон, силициев диоксид, колоиден безводен магнезиев стеарат. Инфузиите се извършват с инжекционен разтвор на амиодаронов хидрохлорид 150 mg в 3mL ампули, помощните вещества включват бензилов алкохол и полисорбат. Поради факта, че изискванията към генеричните продукти са вече унифицирани и изключително завишени и строги, резорбцията и бионаличността на лекарствата от отделни производители, са смята за идентична.

Хроматографският метод е охарактеризиран по метода на стандартната добавка, като към кръв на пациент, който не приема амиодарон са прибавени различни количества от активното вещество

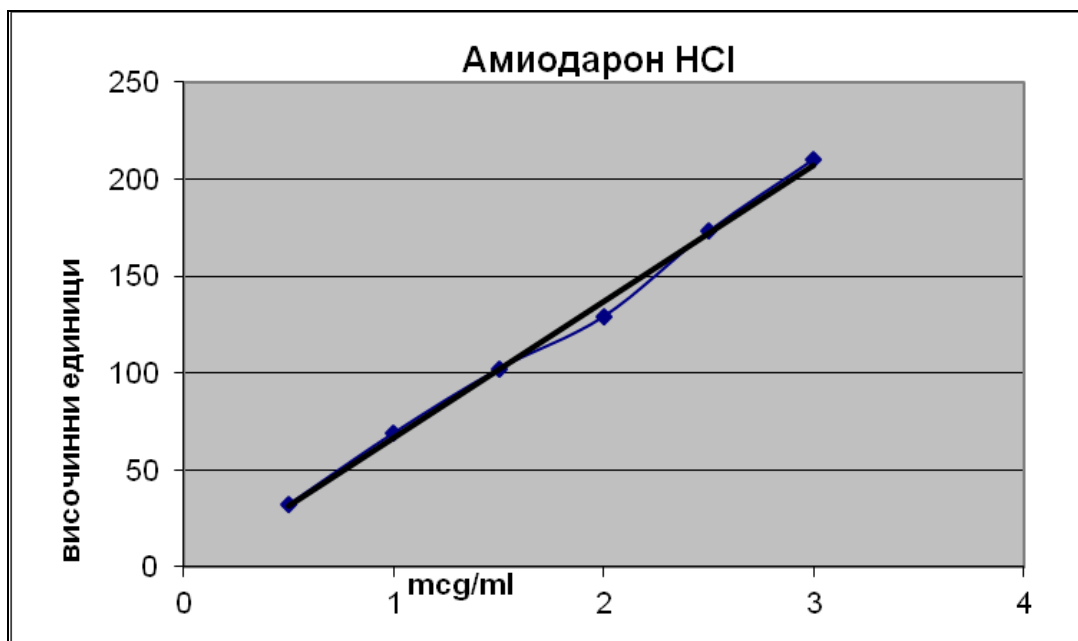
амиодарон хидрохлорид. Ползва се стандартен разтвор с концентрация 1 mg/mL в метанол с чистота за нуждите на градиентна HPLC. Използваното стандартно вещество е с параметри, както посочените в Таблица 1. Всеки резултат в Таблица 2 почива на осредняването на четири конкретни резултата, така че изследването се базира на общо 24 стойности. Тези стойности обхващат концентрационния интервал от субтерапевтичните до свръхтерапевтичните граници.

Таблица 2. Охарактеризиране на HPLC метода по ISO 18189

No	C $\mu\text{g/mL}$ добавена	Площ . 10^3	Приведена Площ . 10^3	Приведена C $\mu\text{g/mL}$ намерена
1	0,5	32	64	0,95
2	1	69	69	1,03
3	1,5	102	68	1,02
4	2	129	65	0,96
5	2,5	173	70	0,97
6	3	210	70	1,03
			X	0,993
			SD	0,037
			RSD %	3,8
			μ	0,993 \pm 0,017
			R²	0,9964
			Recovery	86%

В Таблица 2 е представена възпроизводимостта на течнохроматографския метод за определяне на амиодарон хидрохлорид в кръвната плазма на пациентите.

Резултатите от Таблица 2 са изобразени графично като калибрационна крива на Фигура 2.



Фигура 2. Калибрационна крива за Амиодарон HCl в кръвна плазма

Представената калибрационна крива се описва с уравнението

$$y=70,229x - 3,7333;$$

което при стойността за корелация $R^2=0,9964$ като цяло е много добър резултат. Минималната отрицателна стойност на отреза се дължи на високата дължина на вълната $\lambda = 215 \text{ nm}$, при която настъпват по-интензивни затихвания, поради близостта до вакуумния ултравиолет – $\lambda=200 \text{ nm}$ при полярна среда.

Хроматографските условия са метанол/дейонизирана вода (80:20) при скорост на потока $0,4 \text{ mL/min}$. Колоната е *Hypersyl Gold 150x4,6mm* при размер на пълнежа $5 \text{ }\mu\text{m}$. Дължината на вълната е $\lambda=215\text{nm}$, както бе споменато по-горе, инжекционният обем е $20 \text{ }\mu\text{l}$ в режим *full loop*. Времетраенето на хроматограмата е 10 min . Времето на задържане е $RT= 5,9102 \text{ min}$. Обемът на промиване на инжекционната система е $50 \text{ }\mu\text{l}$ метанол /дейонизирана вода (50:50) по указание на производителя.

3.2. Подход за клинико-офтальмологични изследвания

За целта и в хода на работата са ползвани апарати от последно поколение на водещата японска фирма *Top Con*, по-специално модел *SL-D7*, 30W халогенен биомикроскоп с Галилеева оптична система, оборудван с барабанно разположени на увеличтения от 6X, 10X, 16X, 25X и 40X. Благодарение на допълнителната приставка DC-3, апаратът има възможност за заснемане на безупречни изображения на роговицата и ендотела и способства за акуратно документиране на резултатите. Конвергиращите окуляри с 12,5 X увеличение благоприятстват контраста и удобството при получаване на стереоскопски образ. Светлинната цепка има плавно променлив вертикален размер от 14 мм до 0 мм и хоризонтален от 14 мм до 1 мм, като при 14 мм петното става кръгло.

Използваният видеорегистратор е 1/1,8 тип CCD, с ефективна разделителна способност малко над 8 мегапиксела.

По същество биомикроскопията представлява оглед под увеличение „*in vivo*“ на човешкото око. Извършва едно динамично обследване на всички макроскопски видими структури във всички пространствени измерения - по предно-задната ос, хоризонтално и вертикално. Голямо предимство е възможността за двуочно наблюдение, което осигурява триизмерна картина на изследвания. При прилагането на специализирани техники, умения, настройки и типове осветление, образът е ясен и увеличен в различна степен. Чрез дигиталната фотоприставка DC-3 8,13 мегапиксела е възможно коректно документиране, съхранение и обработка на получените образи.

При работата с биомикроскопа е важно да се съблюдават някои основни принципи, подчинени на водещото правило в медицината и в частност офталмологията, за системен ход на очното изследване.

Отнесени към работата с шпалт-лампа, се подхожда последователно по следния начин:

1. Първо се преглежда дясното око, после лявото.
2. Преминава се от директна (дифузна и фокусирана светлина) – към индиректна и специализирана (филтри, феномени, диафрагми и др.)
3. Преминава се от по-малко увеличение към по-голямо.
4. Започва се от по-повърхностно разположени тъкани с по-малка интензивност на осветяване към по-дълбоки с по-голяма.
5. Колкото по-повърхностно е разположен даден обект, възможните ъгли за оглед са повече, колкото по-дълбоко е разположен съответно ъгълът за оглед намалява (*до 0°).
6. Непрозрачните тъкани се изследват предимно с дифузно фокално осветление, докато за полупрозрачните и прозрачните е по-подходящо фокусирано, цепковидно осветление с променлива ширина на цепката и променлив ъгъл и всички останали видове осветление.
7. Работи се с динамично осветяване, динамично увеличение, променливи апертури, променлива „цепка“, различни филтри, приставки и др., както и чрез динамично позициониране на обекта на изследване спрямо биомикроскопа за постигане на по-добър изглед.
8. Ползва се диагностичната стойност имат всички оптични феномени - отражение, пречупване, загуба или разсейване на светлината, както и сенките от обекта на изследване или по съседство.

По препоръка на производителя се спазва следният алгоритъм за настройка на апарата:

1. Проверява се изправността на всички елементи на биомикроскопа.
2. Проверява се дали работи инструменталната масичка за повдигане и сваляне на целия апарат.
3. Подбрадникът се смъква на около 10 - 20 см под нивото на брадичката на пациента, който седи отсреща.
4. Проверява се мобилността на всички подвижни части - опората за брадичката, подвижността на основата, лоста за управление, рамото на осветителя и рамото на оптиката, застопоряващите механизми, барабанът с оптиката, бинокулярната част.
5. Оптиката се оставя на малко увеличение 0,6x или 10 x и се наглася перпендикулярно спрямо пациента, а рамото на осветителя се оставя свободно подвижно под ъгъл – 30-60°.
6. Проверява се лампата, подвижността на „цепката”, която се отваря вертикално с максимален размер по дължина и с яркост около 60-80% от най-възможната, проверяват се филтрите.

Съществено за добрия образ при подготовката на биомикроскопа, съобразяването с персоналните особености на изследващия. Това става по следния начин:

1. Определя се НЕ-водещото око на изследващия.
2. Постава се специален, окомплектован към апарата фокусиращ лост във фокусната равнина на апарата.
3. Завъртат се двата окуляра максимално на (+). Поглежда се през окуляра с неводещото око, така че през него да се вижда осветеното петно върху плоскостта на лоста. Подчиненото око, гледайки през окуляра петното, без доминантното да гледа през другия окуляр, тогава плавно се връща стойността на регулатора от “+” към “0”, докато се постигне максимално ясен образ.

4. Повтарят се описаните стъпки и за водещото око.
5. След което при две отворени очи се напасват двата окуляра на точното междузенично разстояние на изследващия, така че да се получи общ ясен стереообраз.
6. Фиксационният лост се отстранява и биомикроскопът е настроен за употреба.

Не на последно място по важност е и инструктажът на изследвания. Той отнема кратко време, но не бива да се пропуска, както според правилата на медицинската етика, така и заради значителното редуциране тревожността на пациентите преди почти всяка диагностична процедура. Намаляването на стреса увеличава кооперативността и улеснява провеждането на изследването. Обяснява се естеството на изследването - краткотраен безболезнен оглед на окото с възможно усещане за леко заслепяване и необходимост от задържане на мигането за части от секундата при евентуалното заснемане на образ.

1. Пациентът поставя брадата си във вдлъбнатината на подвижната част на подборадника, а челото му трябва да опира плътно рамката.
2. Наглася се височината, така че страничната марка да бъде на нивото на клепачната цепка.
3. Пациентът трябва да е в комфортна позиция, при нужда, се коригира височината и на инструменталната масичка, и на опората за брадичката.

Прегледът започва с общ оглед на кожата, околоочните придатъци и на окото, след това подробно се търсят и оглеждат евентуалните патологични отклонения. Започва се на малко увеличение, цепката се отваря максимално, осветителят е на около 30-40° в ляво или дясно.

Системата се придвижва максимално в ляво и бавно напред, така че през окулярите да се намери образ от дясното око.

Ползва се дифузно и фокусирано осветление с относително широк и динамичен ъгъл на разположение на осветителя - от 10-60°. Това означава, че по време на огледа, ъгълът на осветителя и позицията на основата се променят с цел да се освети по-добре оглежданият обект и да се премести фокусът на системата така, че да има максимално ясен образ точно от обекта на наблюдение.

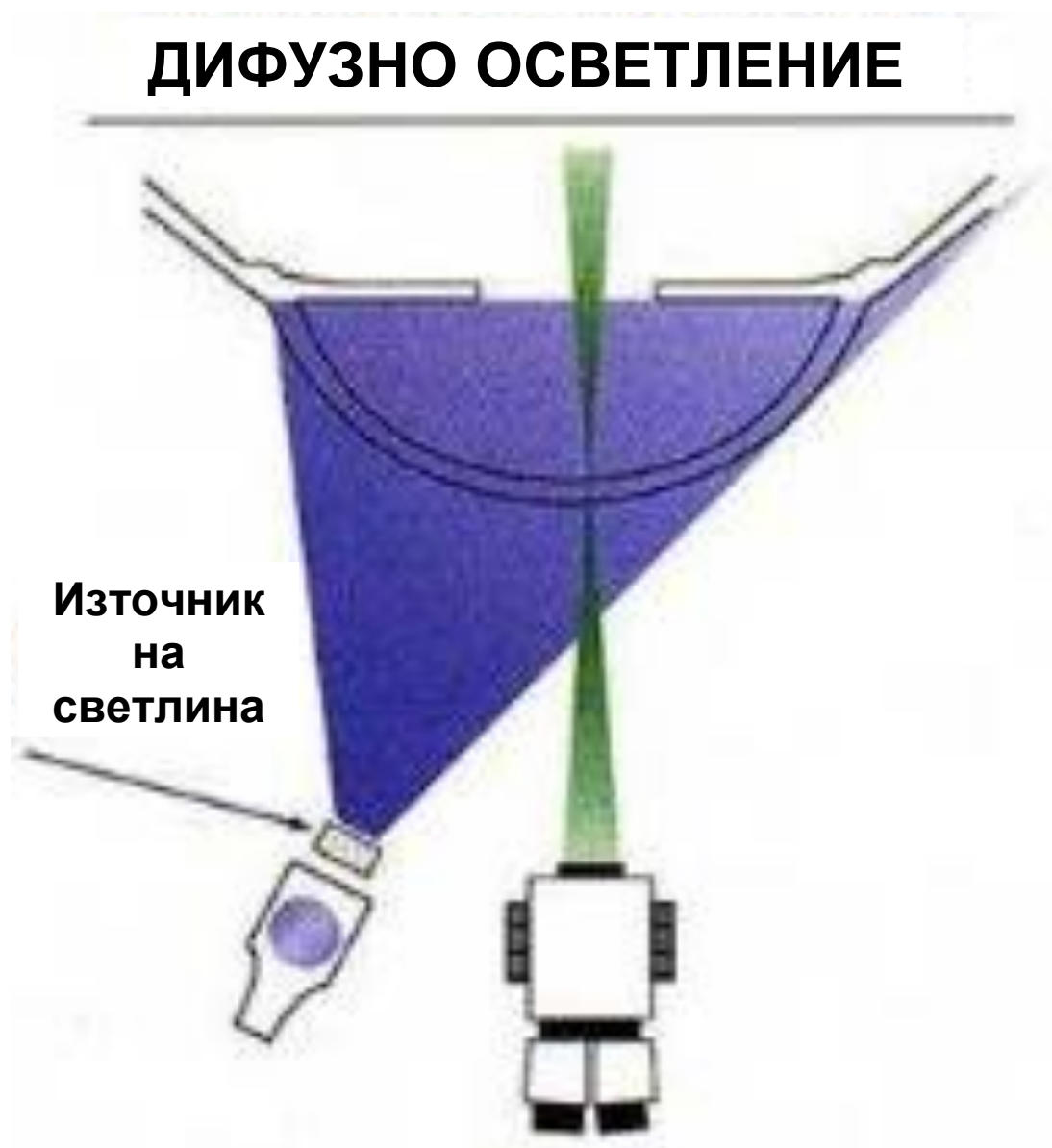


Схема 1. Метод за оглед на роговица с директно дифузно осветление

Увеличение:	16 х, 25 х
Широчина на цепката:	напълно отворена
Ъгъл на осветителя:	10-30°
Задно осветяване:	не
Дифузен филтър:	поставен
Филтри:	топлинен филтър (НА - heat absorption filter)
Яркост:	5

След общия план се обръща внимание на роговицата - най-изпъкналата прозрачна предна част на очния булб. Ползват се всички видове осветявания, но най-често - динамично с вертикален оптичен срез. “Цепката” е при максимално голяма апертура по дължина 12-14 мм.

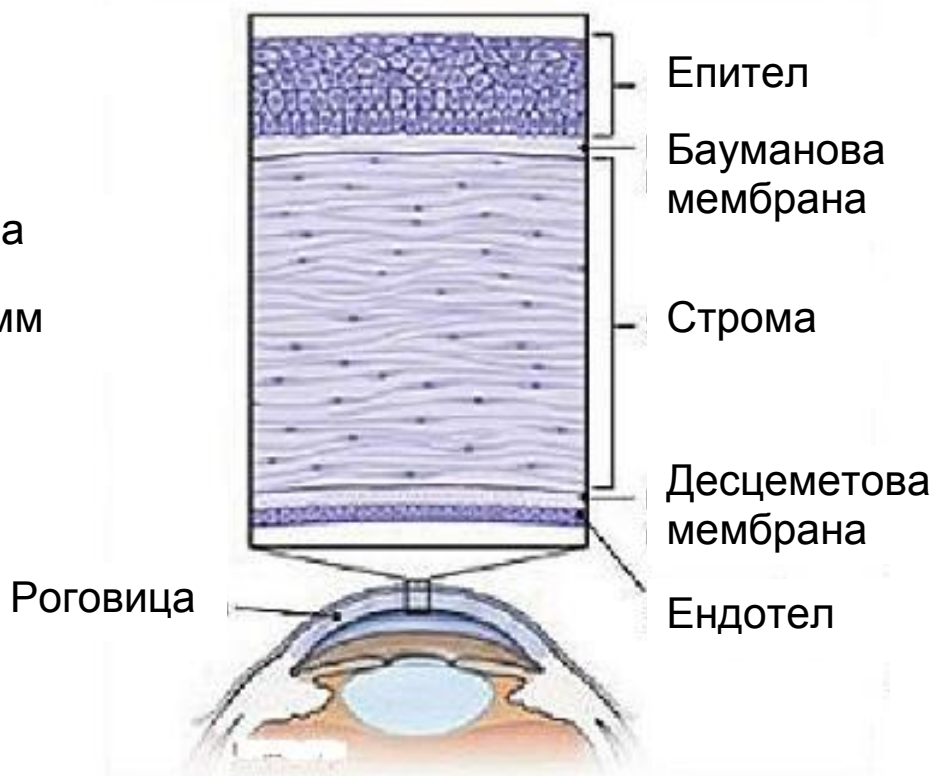
При оглед се вижда матов, опалесциращ, дъговидно извит паралелепипед (Фигура 3).

Роговица

5 слоя

дълбочина

0.5 – 0.8 мм



Фигура 3 - Строеж на роговицата

По-близо разположените рефлексии до осветителя са по-повърхностно разположени. По-далече разположените рефлексии са от по-дълбоко разположени структури. Ясно видими са два рефлекса. Първият най-изпъкнал рефлекс е от повърхността на роговицата. Вторият е от ендотела на роговицата. Разстоянието между тях е дебелината на роговицата. При наблюдение с цепка, най-повърхностно се вижда тънка, относително оптически празна ивица - слъзен филм. Следва тясна ивица – роговичен епител. Третата ивица е мястото на Баумановата мембрана. Четвъртата зона е най-широката част – стромата на роговицата. В нея могат да се видят включвания, уплътнения, тънки нишки – демиелинизирани нервни окончания и др. Следва особено тънка ивица – Десцеметовата мембрана с ендотела на роговицата. Те са трудноразличими.

Отлаганията от амиодарон се разполагат в долните слоеве на епитела, наричат се амиодаронова кераатопатия АКП и образуват характерна картина. Тя наподобява повърхност на водовъртеж, оттам и латинското наименование *cornea verticillata*. За изследването на долните дълбоки слоеве на епитела е удачно ползване на техниките за директно фокусирано осветление с цепка и индиректно осветление –схема 2 и 3, а за оглед на повърхностната строма - и методът на пълно вътрешно отражение схема 4.

ДИРЕКТНО ОСВЕТЛЕНИЕ

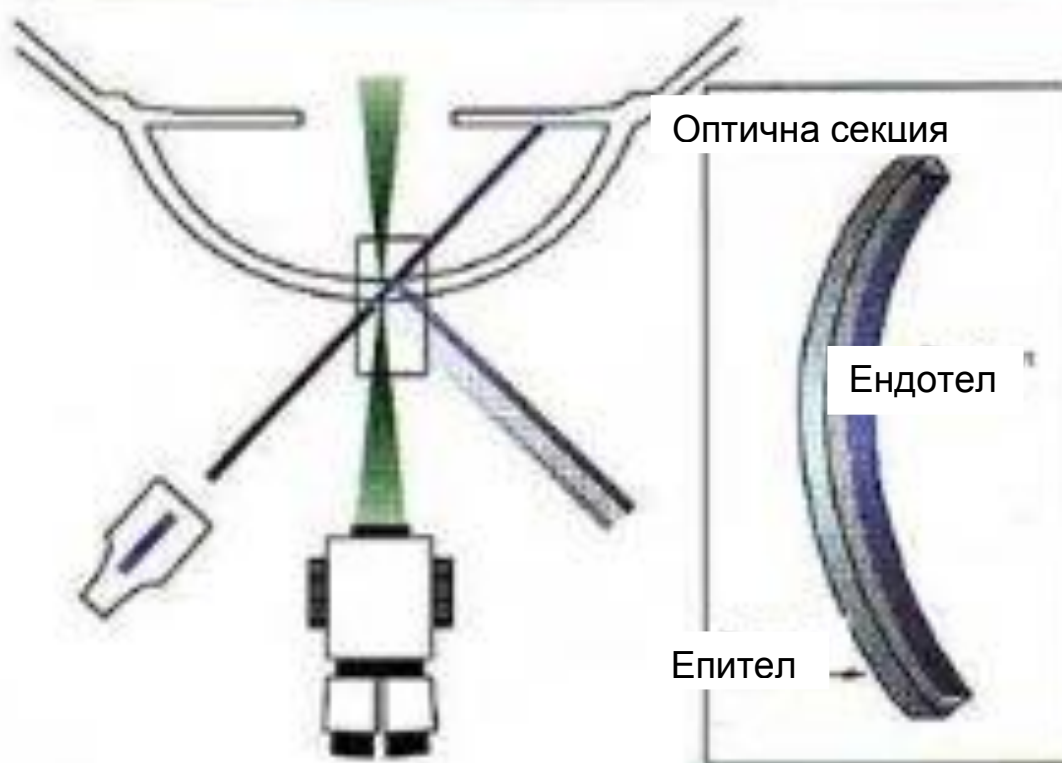


Схема 2. Метод за оглед на роговица директно фокусирано осветление

Увеличение: 16 х, 25 х

Широчина на щепката: тясна щепка при максимална апертура

Ъгъл на осветителя: 30-90°

Задно осветяване: да

Дифузен филтър: не

Филтри: топлинен филтър (НА - heat absorption filter)

Яркост: до 5 - макс* трябва да бъде контролирана
в зависимост от широчината на цепката.

(*при по-широка цепка, се намалява яркостта на осветителя и
обратното)

ДИРЕКТНО/ИНДИРЕКТНО ОСВЕТЛЕНИЕ

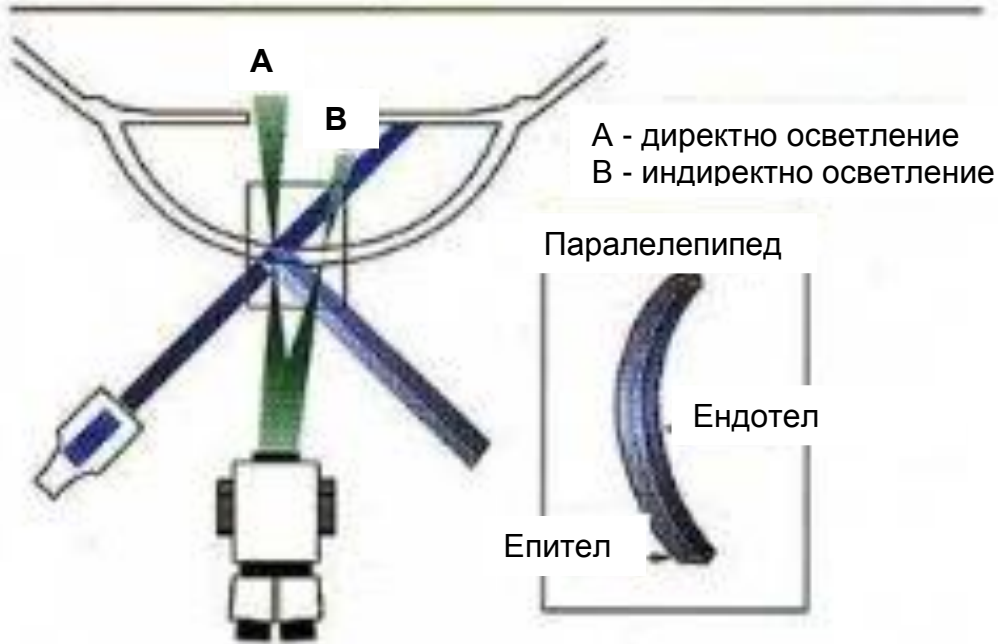


Схема 3.Метод за оглед на роговица с директно и индиректно осветление

Фокусът на оптиката е върху задната повърхност на роговицата, а се осветява ирисът.

Прегледът се прави динамично: като се променя позицията се оглежда цялата роговица, а като се променя ъгълът на осветяване и мястото на фокуса на оптиката се оглежда роговичната тъкан - от епитела до ендотела.

Увеличение: 25 х
Широчина на цепката: средно широка цепка
Ъгъл на осветителя: 30-60°* осветява се зона (най-често ирис),
която да стане вторичен източник на отразена светлина.
Задно осветяване: не
Дифузен филтър: не
Филтри: топлинен филтър (НА - heat absorption filter)

Яркост: 3-5 * трябва да бъде контролирана в зависимост от широчината на цепката. (*при по-широка цепка, се намалява яркостта на осветителя и обратното)

Огледът с пълно вътрешно отражение е напълно подходящ за изследване на стромата на роговицата **Схема 4**

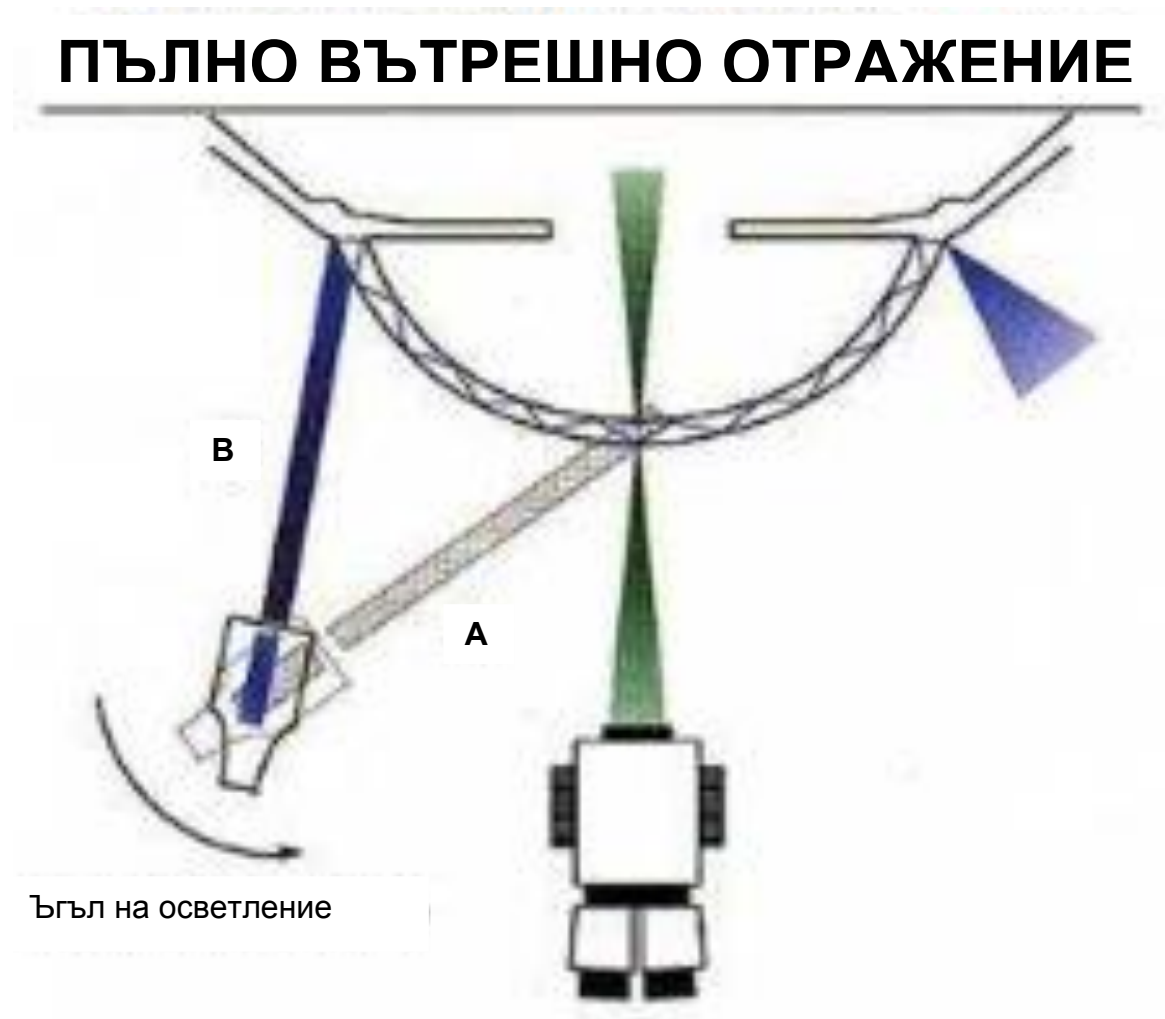


Схема 4 Метод за оглед на роговица чрез пълно вътрешно отражение

Увеличение: 25 x

Широчина на цепката: средно широка цепка

Ъгъл на осветителя: 60-90° осветява се прозрачна зона при лимба, която да проведе светлината и да служи за вторичен източник.

Задно осветяване: не

Дифузен филтър:	не
Филтри:	топлинен филтър (НА - heat absorption filter)
Яркост:	3-5 * трябва да бъде контролирана в зависимост от широчината на цепката. (*при по-широка цепка, намаляваме яркостта на осветителя и обратното)

Отлаганията от амиодарон АКП биват класифицирани според площта и плътността си в три степени:

I степен - начална: в долната третина на роговицата, под зеничния план се забелязват на голямо увеличение единични неясни, тънки линии, разположени интраепителиално, много фини, трудно разпознаваеми при по-малко увеличение

II степен: увеличаване броя на линиите и тяхното уплътняване с формиране типичен рисунък по типа на „котешки мустаци“, „палмов лист“ и пр., но те са разположени все още под зеничния план

III- степен: множество интраепителни и интрастромални отложения, в повечето случаи оформени спирално, подобни на „водовъртеж“, „отпечатък от пръст“ и пр., достигащи пред зеничния план

В литературата е описана и много тежка АКП, класифицирана като

IV степен – разпределение на отлаганията по цялата роговична дебелина, включително и по ендотела, които са груби, видими и на най-малко увеличение, разположени в зеничния план, които фактически не са открити по време на изследанията

Резултатите от извършените прегледи се описват и се сравняват с данните за ниво на амиодарон с цел да се достигне до изясняване връзката между роговичните отложения и плазмената концентрация на медикамента.

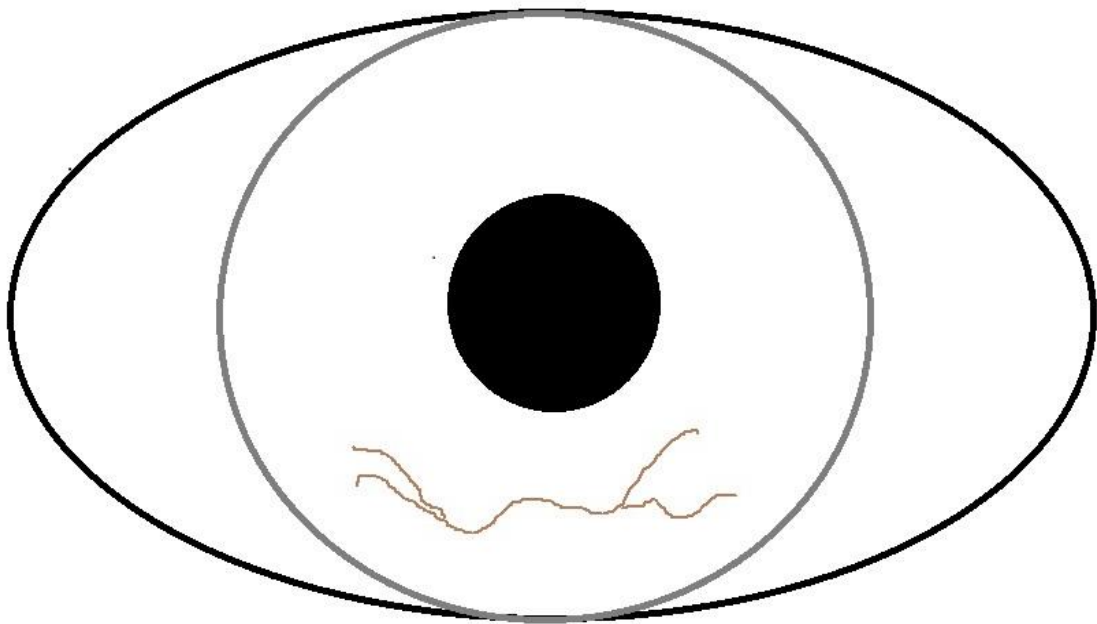


Схема 5 Кордаронова кератопатия I степен

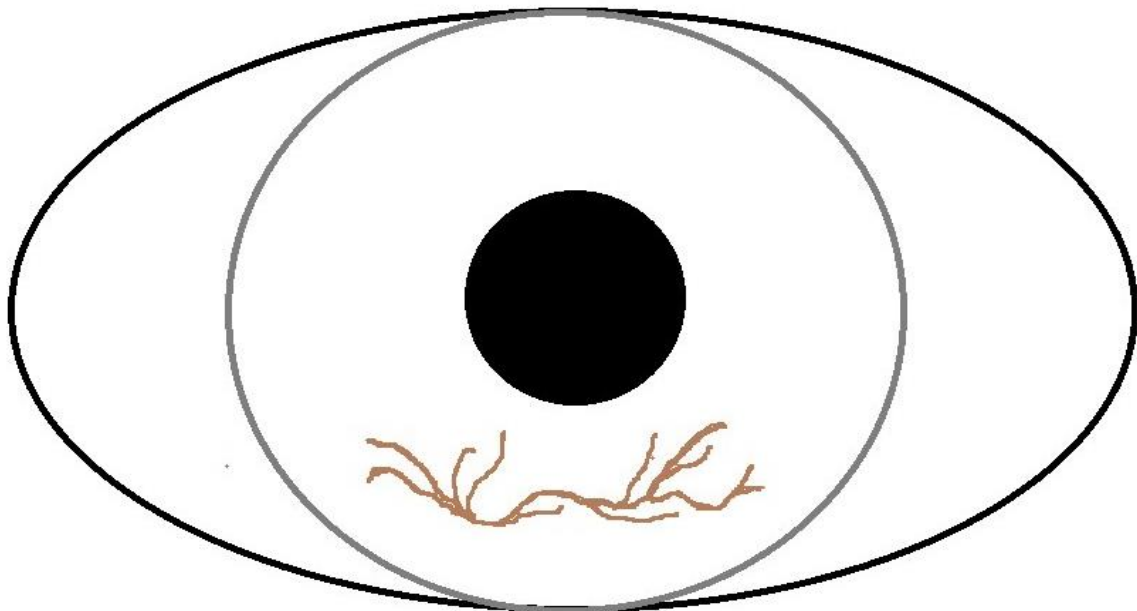


Схема 6 Кордаронова кератопатия II степен

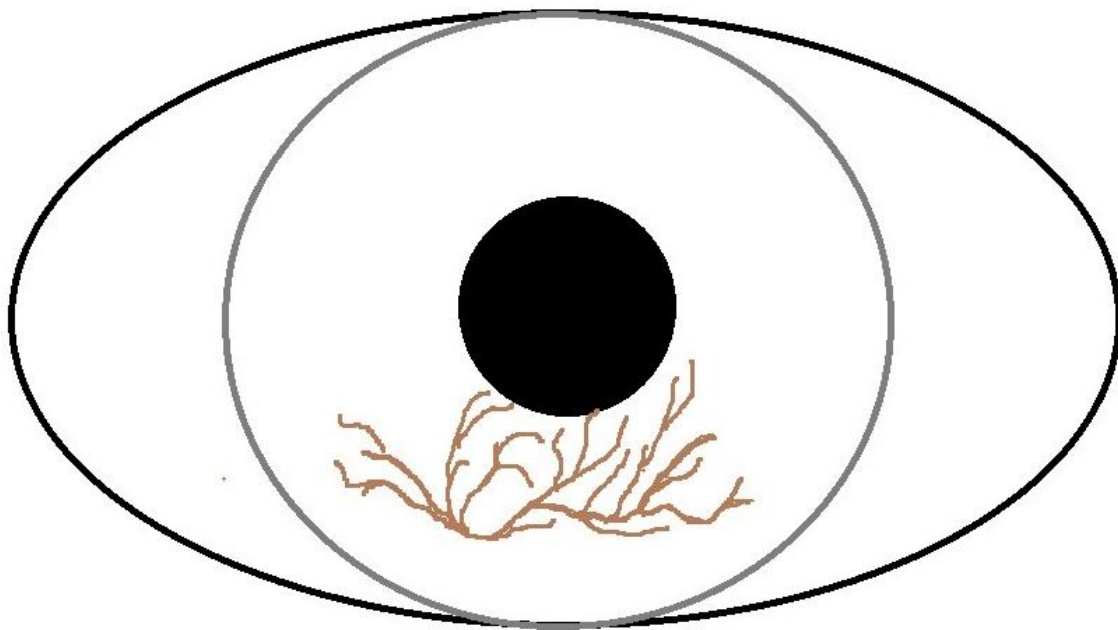


Схема 7 Кордаронова кератопатия III степен и клинична находка

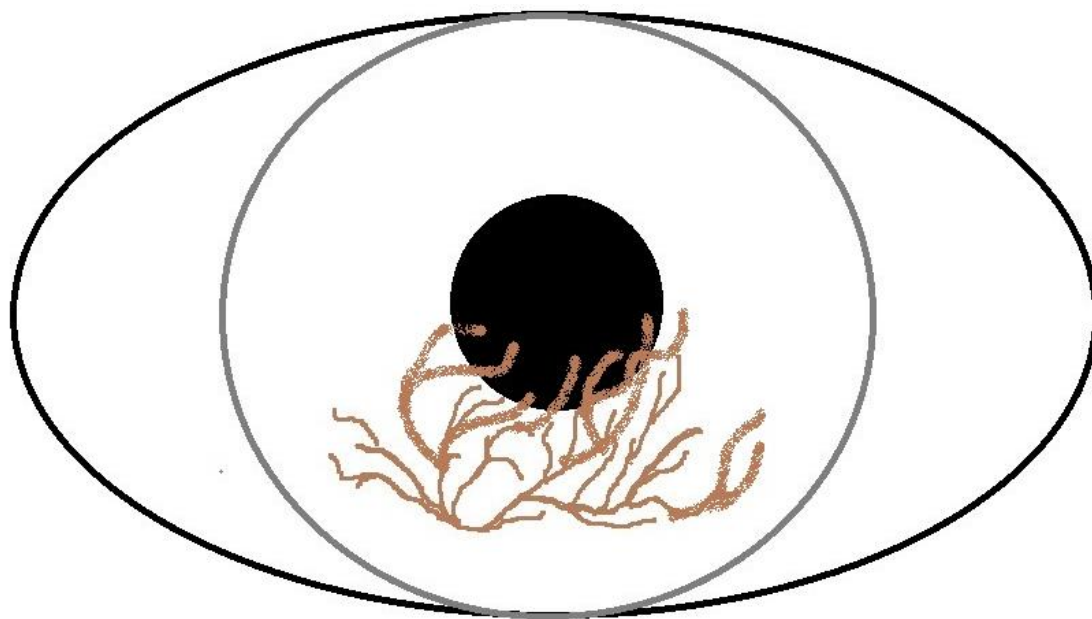


Схема 8 Кордаронова кератопатия IV степен

4. Експериментална част

Наблюденията при пациенти на лечение с амиодарон за връзка между наличното плазмено ниво на активното вещество и очни проявления, започва от 2006 г. Оттогава до средата на 2016 г. са изследвани общо 911 души, като конкретният период е от 20.06.2006 г.

до 20.06.2016 г. или близо десетгодишен период от време. Анализът на видовете пациенти говори, че повечето от тях са получавали амиодарон чрез перфузор по време на пролежаване в отделенията по кардиология или кардиохирургия. По време на болничния престой, те са били лекувани с амиодаронов хидрохлорид 150 мг в ампули от 3 мл по съответна дозова схема. Изполваният лекарствен продукт е Cordarone на фирмата Sanofi, както е отразено в документацията на болничната аптека.

Целта на тази терапия е била да се избегнат състоянията на вентрикуларна аритмия при постъпването им след усложнения или постоперативни смущения в сърдечната дейност. Почти всички пациенти след изписване от болницата спират приема на лекарствения продукт, а това обикновено отключва нови остри състояния и води до рехоспитализация.

В амбулаторни условия, достъпни за пациентите в аптечната мрежа лекарствени продукти, съдържащи амиодаронов хидрохлорид са Амиодарон Софарма, Амиодарон Актавис и Кордарон. Всички те са в таблетна форма, по 30 броя делими таблетки по 200 мг в опаковка. Те подлежат на частична реимбурсация за здравноосигурени хронично болни според наредбите на Националната Здравноосигурителна Каса. Има лица, които ползват за лечение внесени от чужбина аналози. При всички случаи водеща е терапевтична доза от 200 до 400 мг амиодаронов хидрохлорид дневно, помощните вещества в отделните препарати не са обект на коментар в настоящото изследване.

Пациентите, които стриктно приемат амиодарон след назначаване от лекуващия лекар, се оказват много малък брой хора. Анализът на данните от лабораторията сочи, че тези, които се придържат към предписания постоянен прием, произхождат от следните звена – амбулатория, клиника по вътрешни болести и по урология. В последната

те постъпват поради друг здравен проблем, но от преди това са се придържали към системен прием на предписаното лекарство.

Смисъл да се следи лекарственото ниво и да се правят скринингови офталмологични прегледи има при такива пациенти, защото дозовият режим за овладяване на остри епизоди в интензивните сектори и краткосрочната експозиция, не предполагат повиляване на окото, както са установили наблюденията.

За същия период от време при анализ на данните според гореизложената ситуация, годни за наблюдение се оказват само 123 пациенти, които са на системен дългосрочен прием на амиодарон, което съставлява около 13,5%.

HPLC изследванията са проведени с течен хроматограф *Surveyor* на американския производител *Thermo-Finnigan*. Детекторът е с диодна матрица, която обхваща интервала от 650 до 180 nm. В апарата е заложен софтуер, който стартира програма за пълно сканиране по всички дължини на вълната в рамките на посочения по-горе спектрален интервал. На практика се работи само при дължина на вълната $\lambda=215$ nm, защото там се установява липса на смущаващи пикове от странични вещества. Изборът на тази дължина на вълната е направен след сканиране на UV спектъра на амиодарон в целия обхват на диодната матрица. Абсорбционният максимум е резултат и от избора на течно-хроматографска колона *Hypersyl Gold*, която е високоспециализирана за анализ на лекарствени вещества в кръвни проби. За разлика от класическия UV спектър с обикновена кювета, при HPLC с диодна матрица и проточна кювета се получава спектър, който е съобразен с адсорбционно-десорбционните физико-химични равновесни константи на колоната. Постига се реалистичен подход за условията на хроматографския анализ. Наблюдаваният спектър отразява UV-абсорбцията на веществото при адсорбционния максимум на

хроматографския пик. Така възниква своеобразна двуменционална течна хроматография между адсорбция и десорбция на изследваното вещество и неговата UV абсорбция при реални условия.

Аналитичната работа при фиксирана дължина на вълната води до повишаване чувствителността с един порядък по данни на производителя. Използваният метанол е с чистота за градиентна HPLC работа, а дейонизираната вода е със стандартен състав от дейонизатор ELGA, съгласно фармакопейните спецификации.

При започване на работата преди десет години, когато е търсен подходящ адаптиран течно-хроматографски метод, са избрани хроматографски условия и подход, който бива описан през 2016 г. от M.Dong. В рамките на същия десетгодишен период Dong проучва възможността за създаване на модерни и универсални HPLC методи за изследване на лекарства в готови лекарствени продукти и плазма. Той установява, че за постигане универсален подход, е необходимо да се работи с малки дължини на вълната, ниски потоци на подвижната фаза, C-18 колони с повишена ефективност при адсорбция/десорбция, т.е. с фармацевтична специализирана насоченост и диодни детектори, работещи в режим на максимална чувствителност. По същество целта му е да ползват „динамични” UV спектри, а не „статични”. Съществена част от работата е свързана с използването на евтина подвижна фаза, като например метанол-вода. Една от причините за това е, че след икономическата криза от 2009 г, спадът в производството на акрилонитрил е води до рязко покачване на цените на ацетонитрила. Друг проблем с ацетонитрила е неговата токсичност в лабораторни условия, както и високата цена на обезвреждането му като отпадък. Проучването върху универсализиран подход предвижда избягването на елуентен градиент винаги, когато е възможно и да се работи изократно. Въпреки това следва да се ползват градиентни елуенти, защото така се

обезпечава безпроблемната работа при ниските дължини на вълната в детектора.

До подобни условия на хроматографски подход е достигнато при натоящата работа по чисто емпиричен път, благодарение на подходящата апаратура от ново поколение в клиничната лаборатория и актуалните хроматографски консумативи.

Самият избор на колона 150 mm x4, 6 mm, 3 μ m d_p , се очертава като най-подходящ при положение, че

$$N=c(L/d_p)$$

където N е броят на теоретичните тарелки, L е дължината на хроматографската колона, c – константа, зависима от дължината на колоната, d_p е диаметър на частиците на пълнежа. Същевременно

$$\Delta p = c \cdot (d_{p2} / d_{p1})^2,$$

където Δp е разликата в налягането, d_{p2} и d_{p1} са първоначалният и крайният размер на частиците след многократно адсорбция и десорбция. Това означава, че работното налягане между помпата и входа на колоната може да достига 150-200 atm. Тъй като

$$N \approx 300 (L/d_p),$$

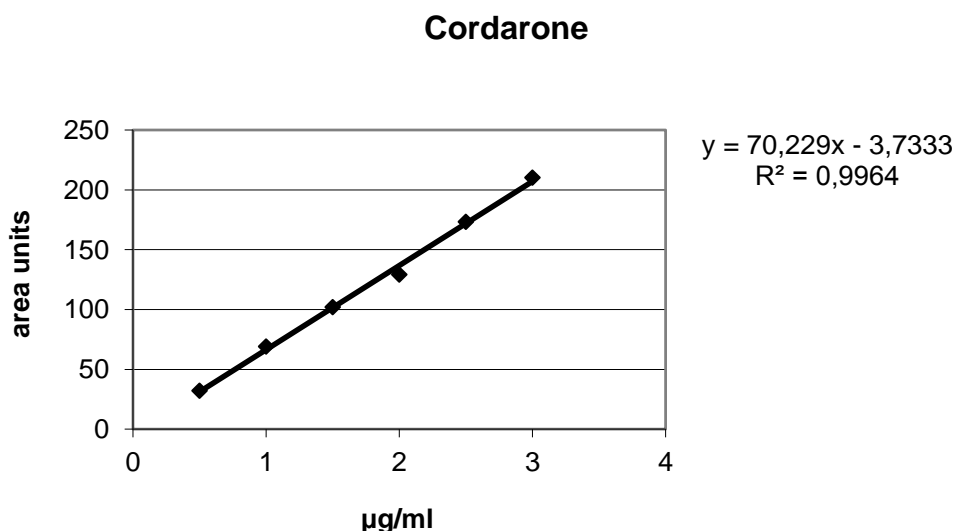
при колона 100 mm x4,6 mm, 3 μ m d_p , след минимален брой анализи, Δp би достигнало критичните стойности 150-200 atm, което би я направило неизползваема. Удвояването дължината на колоната повишава само с корен квадратен $\sqrt{\quad}$ или $1.10^{0.5}$ броя на теоретичните тарелки N . Така при положение, че $N= 15\ 000$, за колоните от двата споменати типа, чрез избор на по-дълга колона не може да бъде подобрена особено ефективността на метода.

Наличното производство на колони с висока разделяща способност и голяма продължителност на експлоатационен живот,

насочва експериментатора към търсене на по-евтини мобилни фази, използвани при изократен режим, нови пътища за детекция, като работа в по-ниски дължини на вълната например и оптимизация по отношение количеството използвана проба. Това са възможните начини за постигане на приемливи стойности за чувствителност и възпроизводимост, които да обезпечат адекватни резултати в параклиничната дейност.

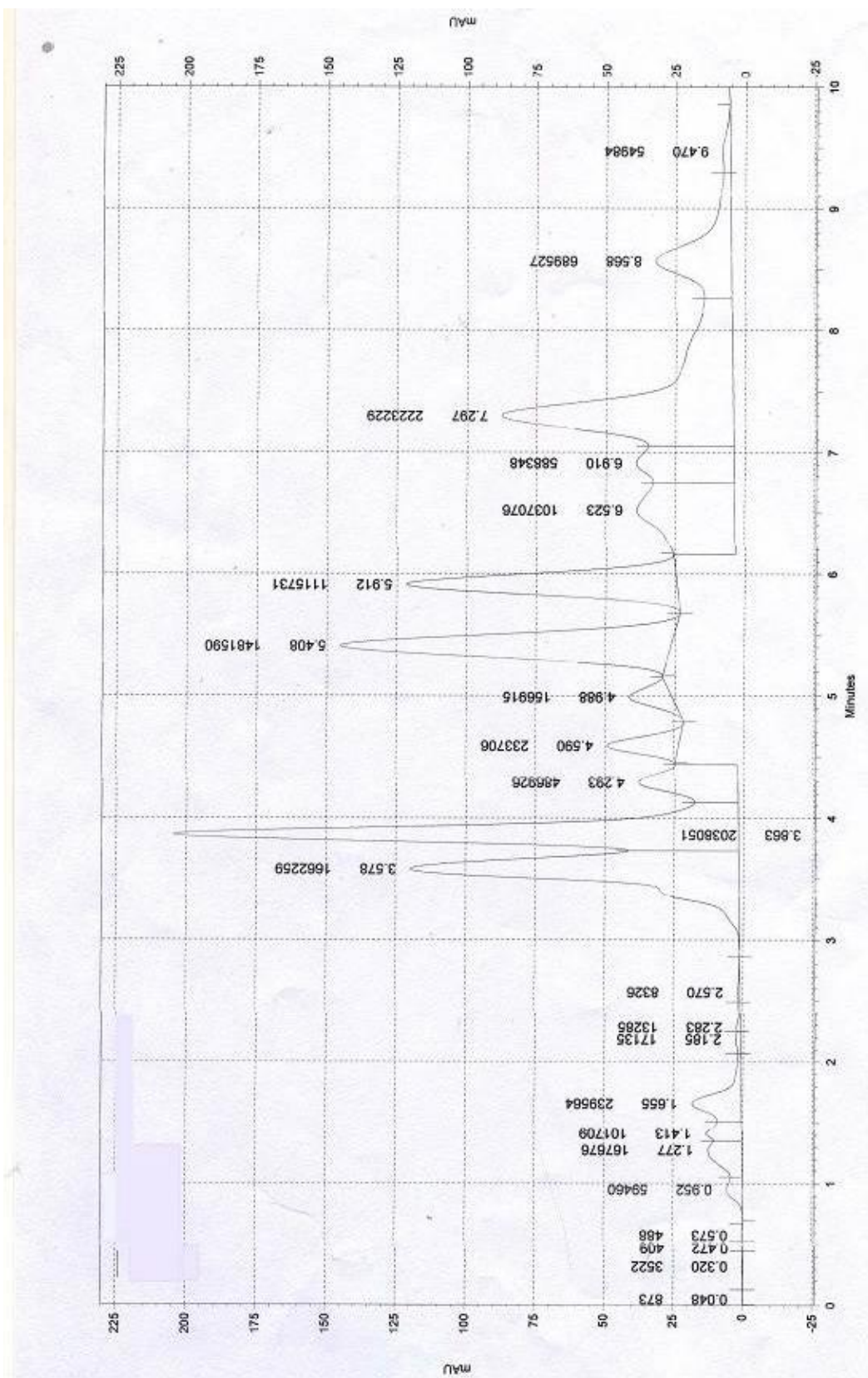
Важно е клинично-лабораторната работа да бъде оптимизирана до степен, че лесно и бързо да дава достоверни резултати. Една от причините известните HPLC методи да не се наложат в масовата практика е значителното финансово натоварване, което е необходимо да се намали.

Линейността на базата на 6 точки от по четири осреднявания – 24 резултата е проучена и представена на Фигура 4.



Фигура 4. Линейна графика за амиодарон при HPLC метод

Така приложената графика покрива обхвата от субтерапевтичните до надтерапевтичните нива за активната субстанция при пациентите. Типичната хроматограма на амиодарон в серум изглежда по следния начин (Фигура 5):



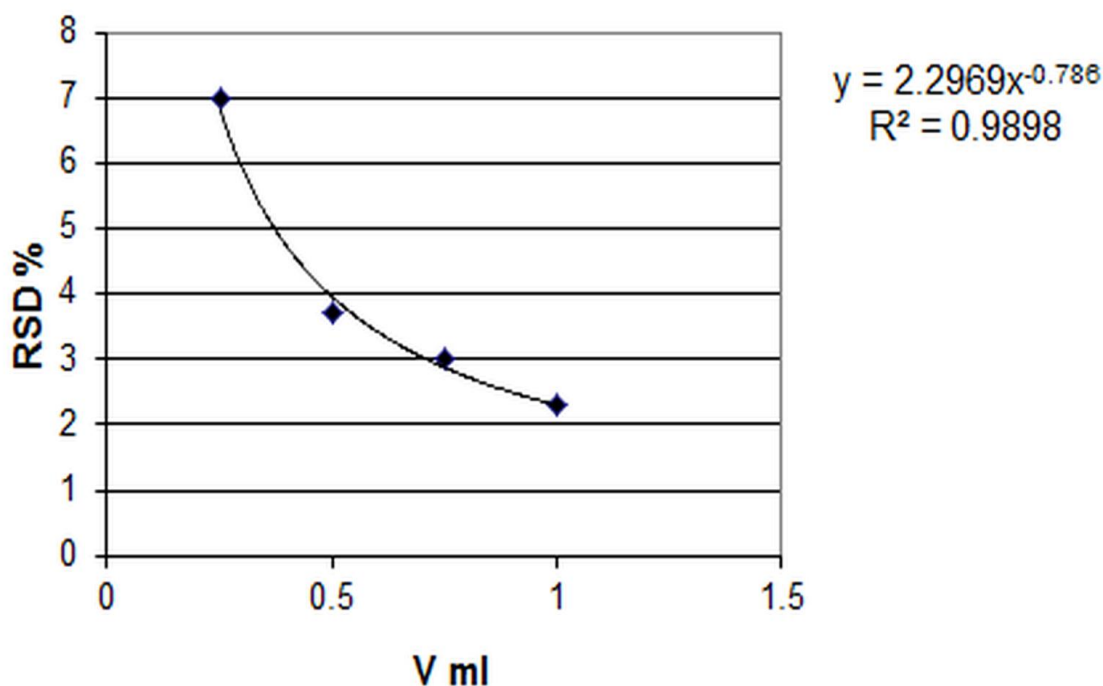
Фигура 5. Хроматограма на амиодарон в кръвна проба, времето на задържане е 5,408 min.

В авторските публикации по аналитични HPLC методи за амиодарон се посочва използване на различни количества кръвен серум. Фигура 6 показва зависимостта между относителното стандартно отклонение (RSD %) и количеството изследвана проба в mL. Оптимумът на графиката е при 0,7 mL проба и стойност на RSD=3,8%. Корелационното уравнение

$$y = 2,2969 \cdot x^{-0,7855} \text{ при } R = 0,9898, \text{ почива на анализ на 32 проби.}$$

Изчисляването на концентрацията става като се вземат предвид следните факти, свързани с фигура 5:

- Извлеченото активно вещество от 700 μ l плазма се концентрира до 20 μ l метанолен разтвор за аутосемплера, от което следва, че резултатът трябва да се умножи по 25.
- Аналитичният добив е 86 %, т.е. резултатът трябва да се умножи по 1,4.
- Поради работата с 700 μ l плазма, за да бъде крайният резултат в размерност mL, получената стойност пак се умножава по 1,4.



Фигура 6. Зависимост между RSD % и количество на пробата в mL

Тъй като $1,4^2 \approx 2$, а концентрирането е 35 пъти, S_s е площта на хроматографския пик действителната концентрация C_0 се пресмята по формулата:

$$C_0 = S_s / (35.1, 4.1, 4.1.103) = S_s / 70.1.10^3 = S_s.1. 10^{-3} / 70 \mu\text{g} / \text{mL}$$

Това означава, че S_s се взема от хроматограмата без последните три знака и се дели на 70.

Така при наблюдаваните 123 пациенти, след изчисляване на плазмените нива, разпределението им спрямо концентрация под, в и над терапевтичното ниво, е както следва в Таблица 3.

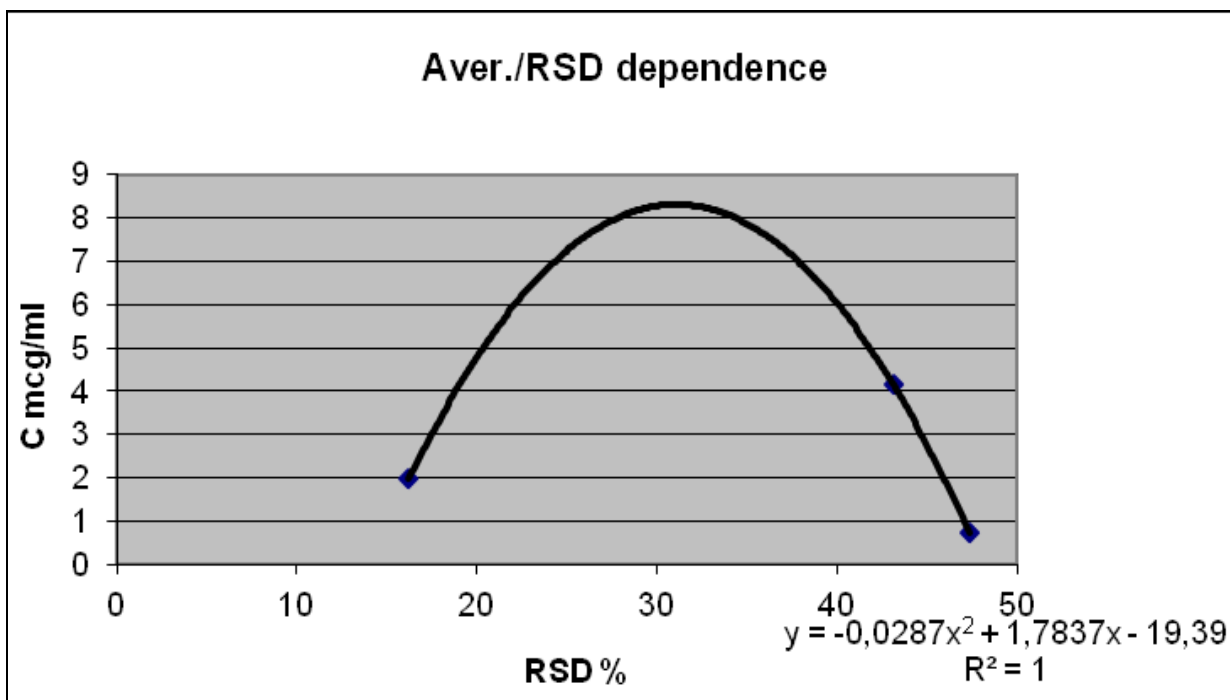
От Таблица 3 се вижда, че от проучените 123 пациенти, най-голяма е групата на лицата (46 бр.), дозирани в рамките на терапевтичния интервал, посочен според изискванията на лекарствените справочници, фармакопеите и на производителите.

Таблица 3. Разпределение по видове групи

№	Група според дозиране $\mu\text{g}/\text{mL}$	Брой	%	Средна стойност $\mu\text{g}/\text{mL}$	SD	RSD %
1.	0-1,5	40	29,7	0,74	0,35	47,3
2.	1,5-2,5	46	37,1	1,97	0,29	16,2
3.	>2,5	37	33,3	4,15	1,79	43,1

Следва групата на субдозирани лица (40 бр.) и свръхдозирани (37 бр.). Лицата, при които се наблюдава терапевтично действие на лекарствения продукт, са общо 83 човека.

При съпоставяне на средната плазмена концентрация и RSD, се открива следната зависимост, представена на Фигура 7:



Фигура 7. Графично полиномиално представяне на връзката между средната стойност на плазмената концентрация и RSD

Ясно се вижда, че най-ниската стойност за RSD се наблюдава при субтерапевтичните концентрации, съвсем малко по-висока е стойността за терапевтичните концентрации, а стойността на свръхтерапевтичните забележимо по-висока. Полиномиалното представяне е единственият възможен вариант за препарат, който показва стойности за $V_d=71$. При това се постига корелация $R^2=1$, благодарение на факта, че полиномиалното разпределение отчита обстоятелството, че кривата не може да свързва т.1 и т.2 без между тях да има положителен екстремум на представената функция.

Уравнението от Фигура 7
$$y = -0,0287x^2 + 1,7837x - 19,39$$

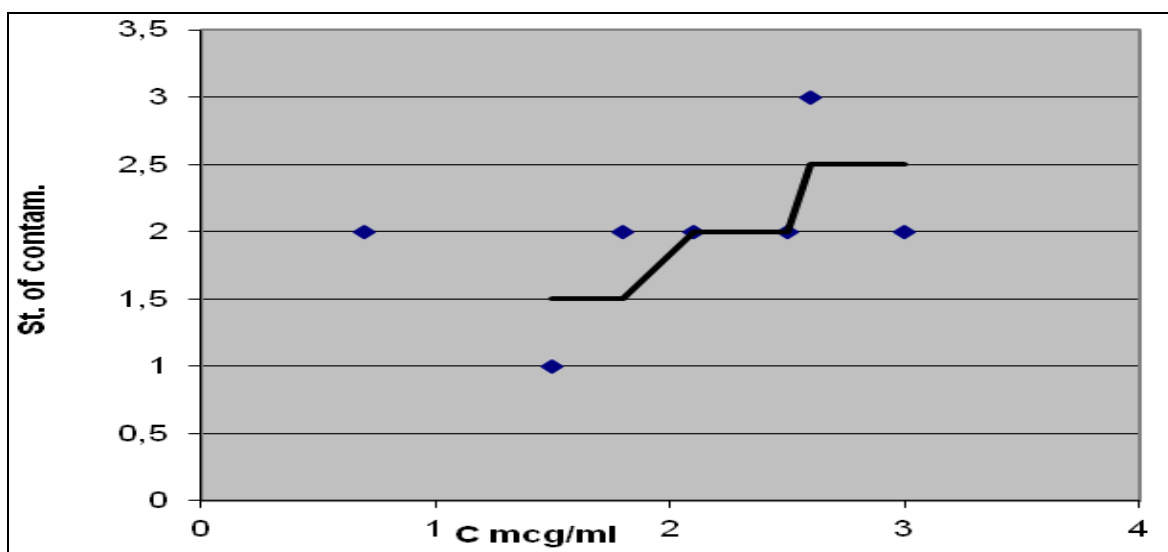
изразява факта, че елиминирането на амиодарон е бифазно. Основните пътища на елиминиране са жлъчната и фекалната екскреция. Бъбречната екскреция е минимална, под 1% от пероралната доза, която се появява непроменена в урината.

Таблица 4. Данни за плазмена концентрация и степен на роговично засягане

№	Концентрация в $\mu\text{g/mL}$	Степен на контаминация
1	0,7	2
2	1,5	1
3	1,8	2
4	2,1	2
5	2,5	2
6	2,6	3
7	3	2

На Таблица 4 са представени данните за седемте пациента с изразена АКП от първа, втора и трета степен, установени при преглед с биомикроскоп и съответната плазмена концентрация на амиодарон.

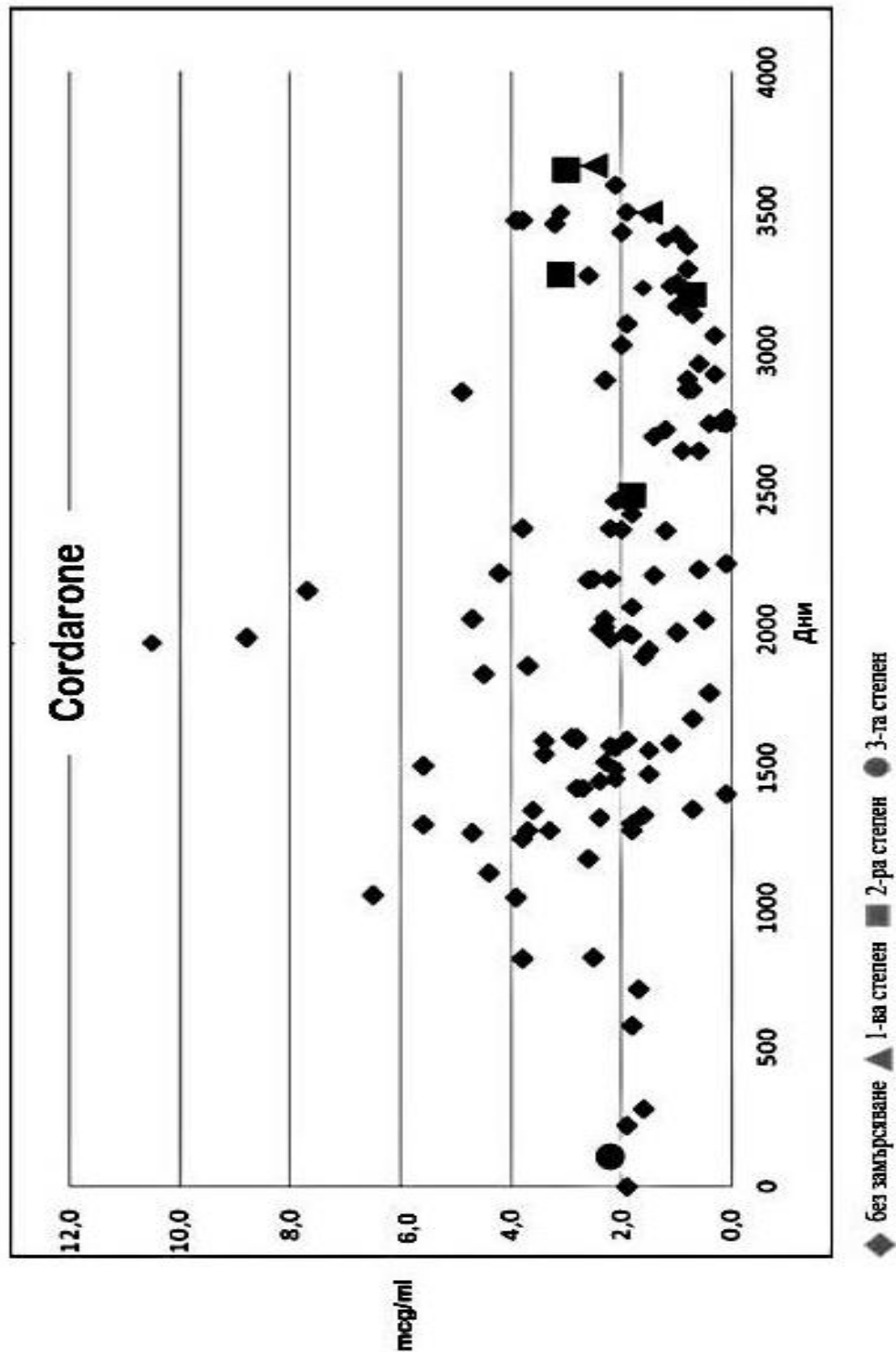
Графичното представяне на резултатите от Таблица 4 е показано на фигура 8.



Фигура 8. Връзка между плазмена концентрация и степен на АКП, представяни при променлива средна стойност

Полученото графично изображение представлява грубо приближено опростен сигмоид. Това говори косвено, че настоящото изследване е обхваща достатъчно голям брой подопитни лица, за да бъде изяснена връзката между плазмена концентрация и АКП при пациентите, като са предразположени към проява на тази нежелана реакция на лекарствен продукт, съдържащ амиодарон.

Проведените десетгодишни наблюдения за връзката между степента на контаминация и плазменото ниво на активното вещество са изобразени на Фигура 9.



Фигура 9. Разпределение на групата проследявани лица според плазменото ниво на амиодарон във времето

Прави впечатление, че изследванията се интензифицират след първите две години. Причината за това е, че клиницистите набират наблюдения в хода на лечението, които показват липса на директна зависимост между назначената доза и постигнатия терапевтичен ефект, както и нежеланите лекарствени реакции. За амиодарон лекарственото мониториране на диаграмата показва действителното съдържание на активното вещество в плазмата, а не предполагаемото според пероралната дозировка. Това е сериозно преимущество пред другите проучвания, упоменати в литературния обзор, които почиват на сравнения на ефектите с приетата доза, но не и с действителното количество. Разпределението на лицата гравитира около препоръчителната терапевтична доза в рамките на 1,5-2,5 $\mu\text{g/mL}$, т.е. $2\pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$. Както по-горе в Таблица 3 е показано, има стойности, които са под и над терапевтичните. Особено впечатление прави, че има лица с концентрация над 4,0 $\mu\text{g/mL}$, най-високата е 10,4 $\mu\text{g/mL}$. Проучени са причините за тези аномалии и е установено, че се дължат основно на:

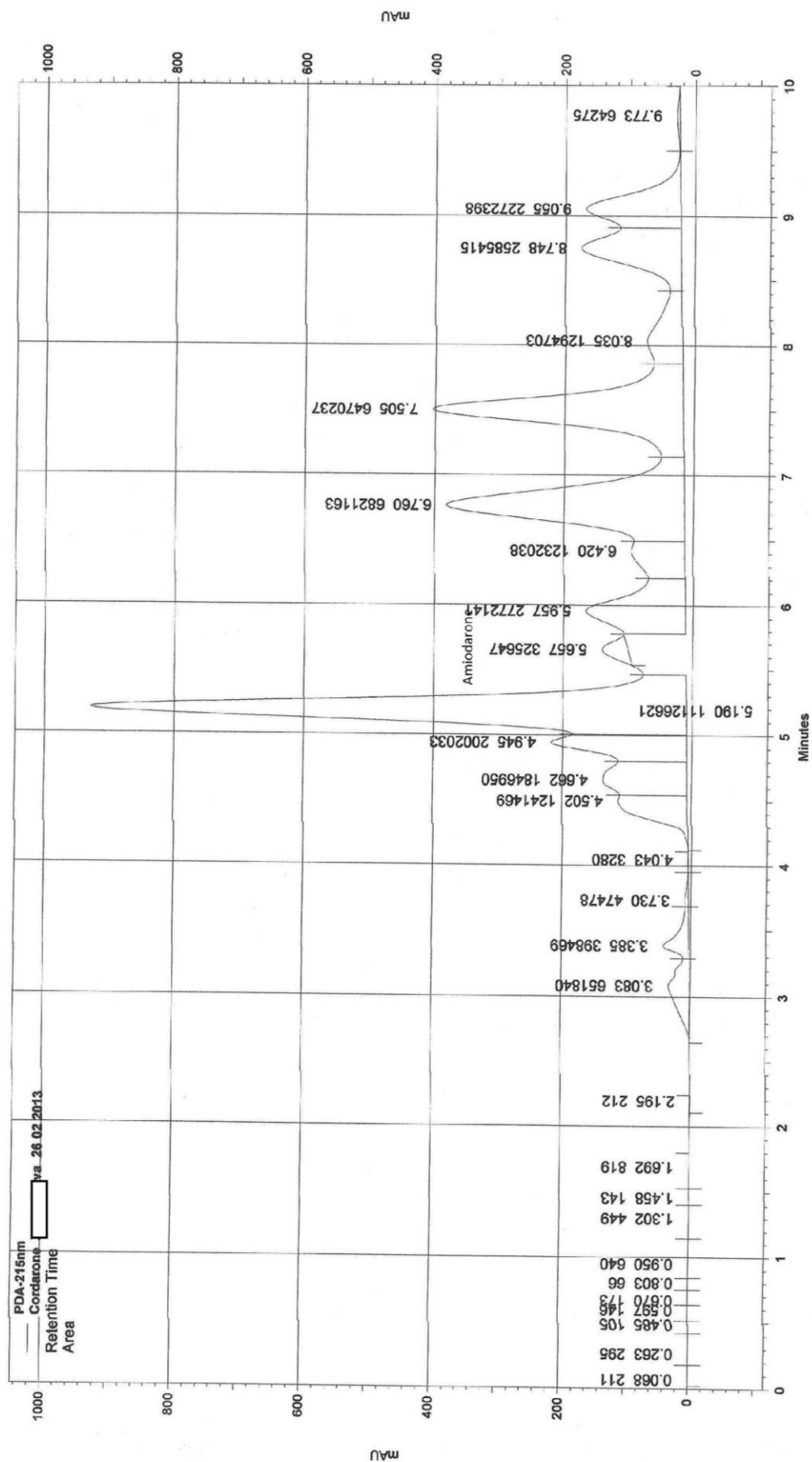
- Допълнително възникнали смущения в елиминирането на активното вещество
- Самоволна промяна на дозата
- Прием на лекарствения продукт в необичайно време - преди вземане на кръв, което компрометира C_0 .

Сходни обстоятелства обясняват и стойностите на ултраниски плазмени концентрации.

От наблюдаваните пациенти, дългосрочно приемащи амиодарон, след обстоен офталмологичен преглед 7 души са показали различни степени на роговични отлагания АКП. Това съставлява 5,7 % от мониторираните. Има и един човек с много тежки очни усложнения, за когото лекуващите лекари никога не са назначавали плазмено изследване

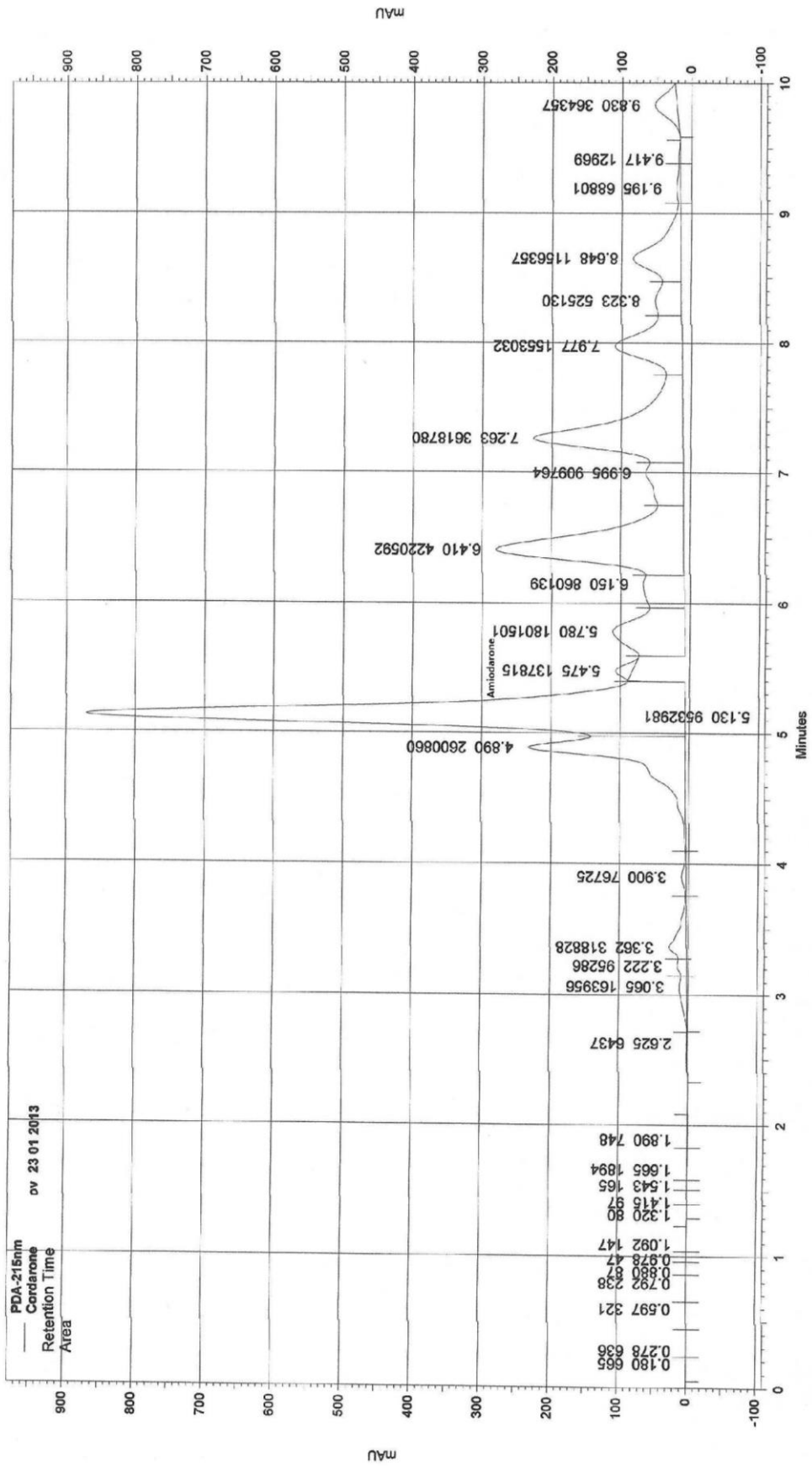
на амиодарон. Лицето е преминало очен преглед по собствено желание, поради оплаквания от силно намалено зрение, където е установена АКП III степен и заради това приемът на лекарствения продукт е прекратен. Вероятно продуктът не е мониториран, поради ниската перорална дозировка, заради което няма обективни данни за плазмената му концентрация. Статистически вероятно тя е била около 1,9 µg/mL.

Примери за хроматографско изследвани серумни концентрации на амиодарон при пациенти от гореописаните групи са представени на следващите Фигури 10-13.



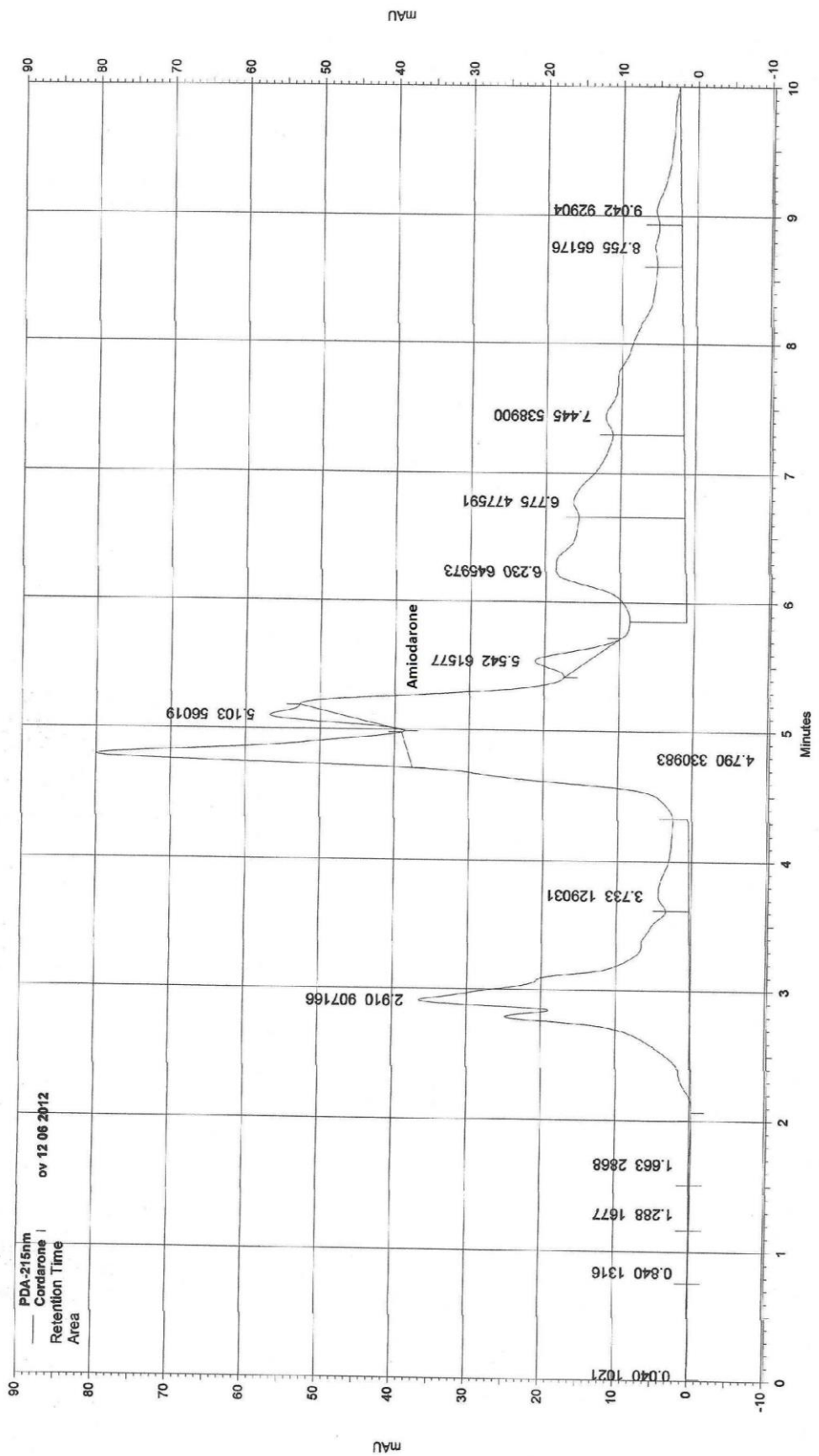
C:\Surveyor HPLC\HPLC test\Data\Cordarone [redacted] va 26.02.2013.dat, PDA-215nm

Фигур 10. Хроматограма на серум на свръхдозиран пациент с 4,6 µg/mL



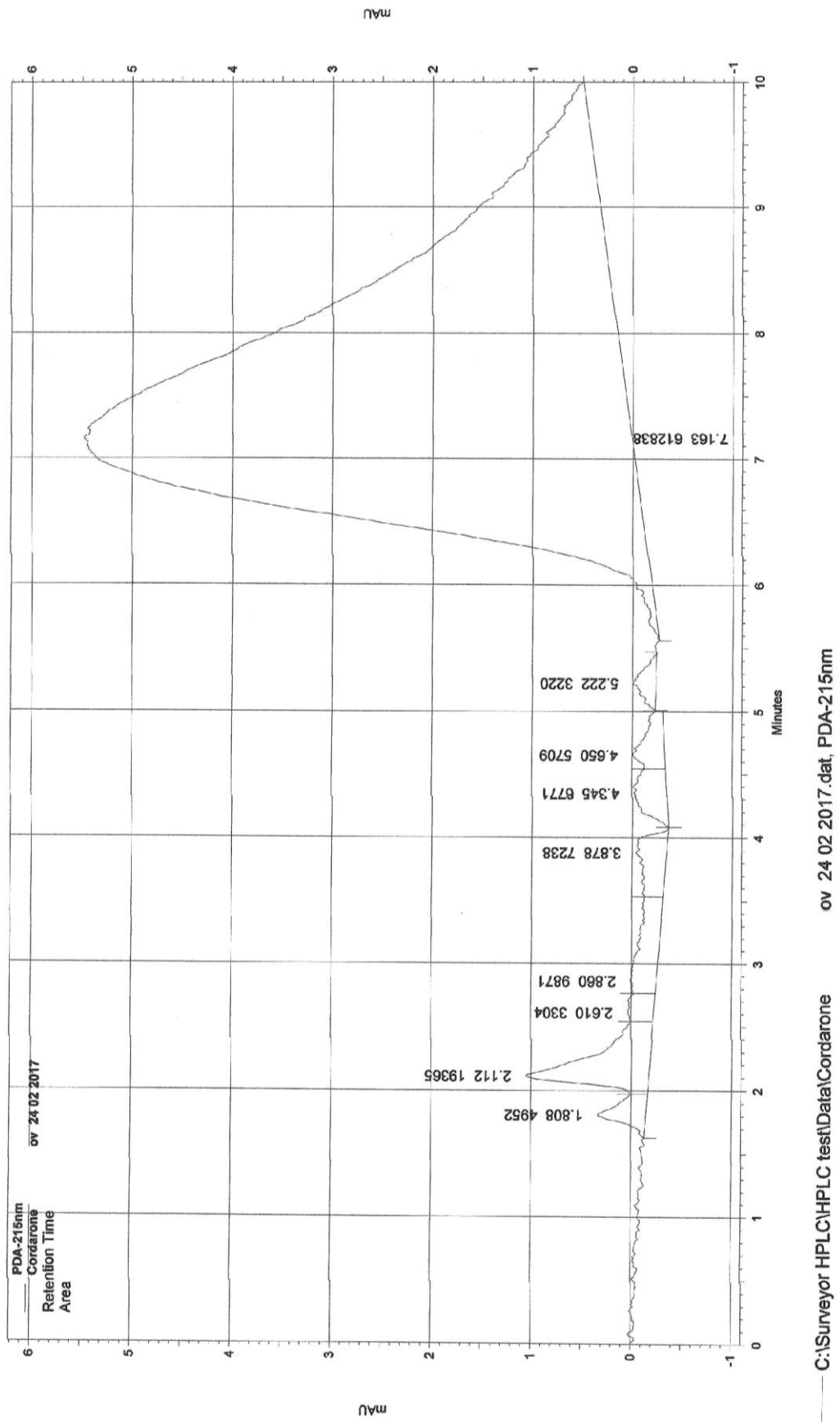
C:\Surveyor HPLC\HPLC test\Data\Cordarone ov 23 01 2013.dat, PDA-215nm

Фигура 11. Хроматограма на серум на нормодозиран пациент с 2,0 µg/mL



C:\Surveyor HPLC\HPLC test\Data\Cordarone ov 12 06 2012.dat, PDA-215nm

Фигура 12. Хроматограма на серум на субдозиран пациент с 0,9 µg/mL



Фигура 13. Хроматограма на серум на пациент със самоволно прекратен прием без наличие на амиодарон в пробата

5. Заключение

Настоящата работа разглежда проблема за роговичната отложения и амиодароновата кератопатия АКП при пациенти на терапия с амиодарон по повод нарушения на сърдечния ритъм. Те са съпоставени не с дозовия прием, както е била практиката досега, а с реалните плазмени нива, установени с HPLC метод. Съотнасянето на контаминацията с плазмените нива сочи, че очните прояви са с двойно по-висока честота, отколкото при сравняване с предписания дозов прием. Това е особено валидно за съвременните практики в кардиотерапията. Понастоящем се работи със значително по-ниски дози 100-200 mg дневно спрямо по-старата практика, когато се предписваха 400-800 mg дневно, а в редки случаи дори до 1000 mg. Цели се избягване на нежеланите реакции на лекарствения продукт, предимно тежки ендокринни смущения, без да се лишава пациентът от ефективна терапия, която е от жизнено важно значение.

Самото лекарствено мониториране на амиодарон позволява полесно да се поддържа пациентът в терапевтични граници, а модерните офталмологични профилактични методи съдействат за избягване на сериозно застрашаване на окото, което често се negliжира. Тези усложнения се откриват едва в тежка напреднала фаза, когато за купирането им се налага силно смъкване дозата на амиодарон в противоречие с терапията, необходима за сърденото заболяване. Така ритъмното нарушение се поддържа успешно и не се увеличава кардиологичният риск за болните.

6. Изводи

1. Направена е съпоставка между данни от съвременната офталмологична диагностика и показанията от лекарственото мониториране на лекарствения продукт , съдържащ амиодрон.
2. Приложен е адаптиран опростен и ускорен HPLC метод за определяне концентрацията на активното вещество амиодарон в кръвна плазма.
3. Тежестта на роговичните поражения не е в пряка връзка с плазмената концентрация на активното вещество при продължителен прием.
4. В рамките на десетгодишен период на наблюдение са съпоставени очните отлагания в роговиците и плазменото ниво на активната субстанция.
5. При проведените изследвания върху 911 пациенти за гореспоменатия период, са установени 123 случая на перманентна терапия с амиодарон съгласно добрата лечебна практика и при 7 пациентни са установени клинично значими случаи на контаминация, възлизаща на 5,7%.
6. Като се сравнява засягането на роговицата при препоръчания дозов режим, това възлиза на 2 пъти повече от досегашните литературни експериментални данни.

9. Приноси

1. Съпоставяне на данните от очното състояние амиодаронова кератопатия АКП с данните от лекарственото мониториране.
2. Разработване на бърз и опростен HPLC метод, позволяващ системно проследяване на голям брой пациенти.
3. Чрез комбинирана офталмологична и клинична диагностика, своевременно контролиране на ефективната дозировка и избягване нуждата от внезапна и застрашаваща пациента промяна в режима преди проявата на сериозни нежелани лекарствени реакции.
4. Съчетаване на периодичната фотодокументация, стойностите от HPLC и предписаната перорална дозировка за оптимален продължителен антиаритмичен ефект.
5. В резултат - значително улесняване контрола и схемите на антиаритмичната терапия при сърдечноболните, нейната безопасност и ефективност.

10. Списък на публикациите по дисертацията

1. S. Stoykova, W. Tashkov; Monitoring of Cordarone Dosage Variations by HPLC-UV Detection in Case of Nonhospitalized Patients, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 68 No 12, (2015), 1527-1532
2. S. Stoykova, W. Tashkov; Corneal Changes due to the Treatment with Amiodarone and their Connection with the Plasma Concentration of the Medication when Analysed with HPLC, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 5,7, September – October (2016), 2538- 2542
3. С. Стойкова, В.Ташков, К.Братанов; „Промени в роговицата вследствие продължително лечение с амиодарон“ Национална Конференция с международно участие "Оптометрия и очно здраве" Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, 04-06 ноември 2016