

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра по Клинична лаборатория

МИГЛЕНА ВАСИЛЕВА СМЕРИКАРОВА

**РАЗРАБОТВАНЕ И ВАЛИДИРАНЕ НА АНАЛИТИЧНИ
МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРАНСТИРЕТИНОВИ
КИНЕТИЧНИ СТАБИЛИЗАТОРИ В БИОЛОГИЧНА СРЕДА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователната и научна степен

„Доктор”

Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1 Медицина

Докторска програма: Клинична лаборатория

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

Проф. д-р Добрин Аврамов Свинаров, дмн

Доц. Ваня Николова Масларска, дф

София, 2023

Дисертационният труд съдържа 119 страници, 22 фигури и 17 таблици.

Цитирани са 284 литературни източника и 2 електронни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по клинична лаборатория на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в Катедра „Химия” на Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София.

Настоящото изследване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договор Д-121/24.06.2020г.

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра по клинична лаборатория, Медицински университет – София на 15.11.2022 г. и насрочен за защита към 07.02.2023 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 07.02.2023 г. в Катедра по клинична лаборатория, Медицински университет – София, ул „Св. Г. Софийски” 1, гр. София, пред научно жури в състав:

- 1. Проф. Бистра Цанева Калчева, дф**
- 2. Доц. д-р Милена Георгиева Велизарова, дм**
- 3. Доц. Бисера Димитрова Атанасова, дм**
- 4. Доц. д-р Даниела Иванова Герова, дм**
- 5. Доц. д-р Мария Борисова Иванова, дм**

Резервни членове:

- 1. Доц. д-р Марианка Генова Петрова-Яначкова, дм**
- 2. Проф. д-р Ивайла Недялкова Панчева-Кадрева, дх**

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по клинична лаборатория, Медицински университет – София и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет – София: www.mu-sofia.bg.

Забележка: Номерата на разделите, таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на същите в дисертационния труд.

Съдържание

Съдържание.....	3
Използвани съкращения.....	4
Въведение.....	6
1. Цел и задачи.....	7
2. Материали и методи.....	8
2.1. Материали.....	8
2.1.1. Апаратура.....	8
2.1.2. Реактиви.....	8
2.1.3. Клиничен материал.....	9
2.2. Методи.....	11
2.2.1. Анализ на спектрите на лекарствените вещества TAF и DIF и вътрешните стандарти - IS-T и IS-D.....	11
2.2.2. Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на TAF в кръвна плазма.....	12
2.2.3. Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на DIF в кръвна плазма.....	16
2.2.4. Статистически методи.....	19
3. Резултати и обсъждане.....	21
3.1. Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Tafamidis.....	21
3.1.1. Оптимизиране на метода за изследване.....	21
3.1.2. Валидиране на хроматографския метод.....	24
3.2. Прилагане на разработения метод за количествен анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза.....	31
3.2.1. Проследяване на плазмените концентрации на Tafamidis при българската кохорта пациенти носители на мутацията Glu89Gln.....	31
3.2.2. Обработка и анализ на получените резултати. Определяне на степента на корелация между плазмената концентрация на лекарствения продукт и някои клинични характеристики на избраната група пациенти.....	34
3.2.3. Проследяване и анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти носители на мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu.....	40
3.3. Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Diflunisal.....	44
3.3.1. Оптимизиране на метода за изследване.....	44
3.3.2. Валидиране на хроматографския метод.....	47
3.4. Ограничения свързани с прилагането на метода при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза.....	54
4. Заключение.....	55
5. Изводи.....	56
6. Приноси.....	57
7. Библиография.....	57
8. Публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	58
8.1. Публикации във връзка с дисертационния труд.....	58
8.2. Научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	58
9. Декларация за оригиналност.....	60
10. Благодарности.....	61

Използвани съкращения

КЕНИМУС – Комитет по етика на научните изследвания към Медицински университет София

НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства

АСН - ацетонитрил

AUC – площ под кривата плазмена концентрация/ време

COMP – Комитет по лекарствата сираци към ЕМА

CV% - коефициент на вариация

DIF - Diflunisal

EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина

ЕМА – Европейска агенция по лекарствата

FDA – Американска асоциация по храните и лекарствата

HQC – проба за качествен контрол с висока концентрация

ICH – Международна конференция по хармонизация на техническите изисквания при регистриране на лекарствени продукти за хуманна употреба

LLOQ – долна граница на количествено определяне

LOD – граница на откриване

LOQ – граница на количествено определяне

LQC – проба за качествен контрол с ниска концентрация

MP – подвижна фаза

MQC – проба за качествен контрол със средна концентрация

NLT – не по-малко от

NMT – не повече от

ODS – октадецилсилан (C18)

OS – октилсилан (C8)

Ph. Eur. – Европейска фармакопея

QC – проба за качествен контрол

SD – стандартно отклонение

siRNAs – малки интерфериращи РНКи

SP – неподвижна фаза

TAF - Tafamidis

TCA – трихлороцетна киселина

TFA – трифлуороцетна киселина

TTR – транстиретин

TTR-FAP – наследствена транстиретинова амилоидна полиневропатия

ULOQ – горна граница на количествено определяне

UV – ултравиолетова светлина

VIS – видима светлина

Въведение

Транстиретиновата амилоидоза, дължаща се на мутация в гена за транстиретин е сред най-честите наследствени амилоидози. Наличието на мутация в гена кодиращ синтеза на протеиновия тетрамер води до неправилно нагъване на белтъчните вериги и образуване на амилоидни фибрили отлагачи се в тъканите и водещи до фамилна амилоидна полиневропатия, фамилна амилоидна кардиомиопатия, див тип или сенилна амилоидоза. Транстиретиновата амилоидна полиневропатия е рядко заболяване с честота на разпространение 1.1/100000 в предимно засегнатите държави като Португалия, Швеция, Япония и Бразилия, а разпространението в САЩ и Европа се представя като 1/100000.

Най-разпространената мутация по света е Val30Met, като тя е и най-проучена до момента. В югоизточна Европа са установени няколко мутации като предимно доминиращи – Glu89Gln, Gly47Gln и Ser77Tyr. Мутацията Glu89Gln е характерна предимно за България и Италия, а проучванията върху нея са в етап на разработка. Установено е, че клиничният ѝ фенотип е различен от този на Val30Met като при нея се наблюдава смесено неврологично и кардиологично засягане.

Първото прилагано лечение в световен мащаб е чернодробната трансплантация, основавайки се на факта, че транстиретинът се синтезира в черния дроб. Неприложимостта на трансплантационното лечение в много от специфичните случаи в клиничната практика води до разработване на неоперативно лечение с използване на средства инхибиращи амилоидогенезата на различни етапи и стабилизиращи тетрамера на транстиретина. През ноември 2011г. одобрен от Европейската медицинска агенция е препаратът Tafamidis. Механизмът му на действие е захващане за T₄ залавните места на протеина и посредством това стабилизиране на тетрамера. Прилага се при първи стадий на заболяването, когато болните не се нуждаят от помощно средство при придвижване/ходене. Ефикасността на Tafamidis в забавянето на развитието на полиневропатията е доказана, а в момента се правят проучвания и върху ефекта му при кардиомиопатия. При болните с неврологично засягане, поставени на лечение с Tafamidis се наблюдава удължаване на преживяемостта с над седем години, а натрупаните до момента данни показват, че макар и доста по-кратко (около 3.5 г.) е наблюдавано удължаване на преживяемостта и при болните с доминираща кардиомиопатия, причинена от наследствена или сенилната амилоидоза (наречена още „див тип” амилоидоза). И в двата случая обаче съществена роля играе ранната диагноза

и ранното започване на лечение. Транстиретиновата амилоидна кардиомиопатия е все по-разпознаваема причина за сърдечна недостатъчност, но Tafamidis като първа одобрена от FDA терапия, често има високо доплащане от пациентите. За разлика от нея Diflunisal (нестероидно противовъзпалително лекарство), първоначално използван като противовъзпалителен продукт, днес се използва извън терапевтичната си насоченост при кардиомиопатия причинена от амилоидоза, но ефектът на двете терапии не е сравнен.

Анализът на лекарствените плазмени концентрации (нар. терапевтичен лекарствен мониторинг) дава възможност за оптимизиране на терапевтичната схема при всеки пациент, както и намаляване на нежеланите странични ефекти от медикаментите. Тъй като мутацията обект на изследването е сред най-редките в света, но има висока честота на проявление в България, това ни накара да насочим изследователската си работа към разработването на бърз, надежден и чувствителен HPLC метод за определяне на плазмените нива на Tafamidis при пациенти с Glu89Gln мутация и изследване на възможната връзка между нивата на плазмените концентрации и проследяваните клинични показатели по време на лечението.

1. Цел и задачи

Цел:

Разработване и валидиране на ефективни методи за анализ на Tafamidis и Diflunisal в кръвна плазма и прилагането им при пациенти носители на доминантната за българската популация мутация Glu89Gln, както и при носители на други по-редки мутации, за оценка на отговора на терапията въз основа на връзката между определените плазмени концентрации и специфични клинични показатели.

Задачи:

1. Разработване и валидиране на високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Tafamidis в кръвна плазма.
2. Разработване и валидиране на високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Diflunisal в кръвна плазма.
3. Доказване на практическата приложимост на разработения високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Tafamidis в кръвна плазма чрез определяне и проследяване на плазмените концентрации при българските пациенти с Glu89Gln и изследване на връзката между плазмената концентрация, някои клинични характеристики и хода на болестта.
4. Определяне и проследяване на плазмените концентрации на Tafamidis при българските пациенти с мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu.

2. Материали и методи

2.1 Материали

2.1.1 Апаратура

2.1.1.1 Течно-хроматографска система

Течно-хроматографска система „Shimadzu Prominence“, състояща се от квартернерна помпа LC 20AD, вакуум дегазер DGU-20A₅, автоматичен инжектор SIL-20A, темпериращо устройство CTO-20A и UV-VIS детектор SPD-20A. Резултатите са анализирани чрез използването на Lab Solutions софтуер.

2.1.1.2 UV-VIS Спектрофотометър

Thermo Scientific „Evolution 300“ UV-VIS спектрофотометър, работещ с ксенонова лампа и Dual Matched Silicon Photodiodes детектор.

2.1.1.3 Ултрацентрифуга

Heraeus „Biofuge Pico“ ултрацентрифуга с мощност 150 W и максимална скорост на ротора 13 000 rpm.

2.1.1.4 Други апарати

Ултразвукова вана с нагряване „Bandelin Sonorex“ ТК 52Н, с мощност 240 W, Kartell шейкър/миксер за епруветки (вортекс) ТК3S, хоризонтална клатачна машина с максимална скорост 500 rpm, универсална сушилня RS422, рН метър „Metrohm 723“, техническа и аналитична везна.

2.1.2 Реактиви

Субстанциите на лекарствените вещества Tafamidis (2-(3,5-dichlorophenyl)-1,3-benzoxazole-6-carboxylic acid; TAF) и Diflunisal (5-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxybenzoic acid; DIF) както и на вътрешните стандарти - Clofibric acid (IS-D) (2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoic acid) и 2-CBC (2-(2-chlorophenyl)-1,3-benzoxazole-5-carboxylic acid; IS-T) са закупени от „Sigma-Aldrich“ Germany. Органичните разтворители ацетонитрил и метанол HPLC grade, както и човешката плазма стандарт (plasma from human P9523) също са закупени от „Sigma-Aldrich“ Germany. Допълнителните реактиви като трифлуороцетна киселина (TFA), трихлороцетна киселина (TCA), амониев формиат, октансулфонова киселина, динатриев

хидрогенфосфат и натриев дихидрогенфосфат са закупени от „Merck” и „Sigma-Aldrich”. Всички реактиви, използвани при анализите, отговарят на изискванията за добра лабораторна практика.

2.1.3 Клиничен материал

Клиничната група се състои от диагностицирани болни, посещаващи Клиниката по неврология на УМБАЛ „Александровска” и включени в регистъра на наследствената транстиретинова амилоидна полиневропатия (TTR-FAP), с клинична симптоматика и носителство на една от установените в България мутации – Glu89Gln, Ser77Phe, Val30Met и Gly47Glu. Всички пациенти са дали информирано съгласие, съгласно установените изисквания на Комитета по етика на научните изследвания към Медицински университет София (КЕНИМУС).

Критериите за включване на пациентите са: възраст над 18 години, наличие на транстиретинова (TTR) амилоидоза стадий 1, генетично потвърдена мутация в TTR протеина причиняваща заболяването и провеждане на терапия с TAF (20 mg дневно). Критериите за изключване от проучването са: прогресия на заболяването в стадий 2, прекратяване на терапията с TAF или неспазване на терапевтичния режим.

Общият брой на пациентите е 60 с Glu89Gln (29 мъже и 31 жени), 7 с Ser77Phe (3 мъже и 4 жени), 4 с Val30Met (3 мъже и 1 жена) и 3 с Gly47Glu (1 мъж и 2 жени). Поради преобладаващото разпространение на мутацията Glu89Gln в България, пациентите са разделени в две големи групи – носители на Glu89Gln мутация и носители на не-Glu89Gln мутация. По време на проучването броят на пациентите в групата Glu89Gln намаля, тъй като 8 от тях бяха изключени поради прогресиране на заболяването до стадий 2 и прекратяване на терапията с TAF или преминаване към друга терапевтична схема (терапия с малки интерфериращи РНК; siRNA терапия). В Таблица 1 са обобщени демографските характеристики на пациентите включени в проучването.

Таблица 1. Демографски характеристики на пациентите с мутация Glu89Gln, включени в проучването

Характеристики		Стойност
Брой пациенти	(брой, N)	60
Възраст, години	медиана \pm SD (обхват)	58 \pm 8.2 (40-75)
Пол	мъже (брой,%)	29 (47.69%)
	жени (брой,%)	31 (52.31%)
Продължителност на терапията	медиана (обхват)	2.9 (0.9-8.6)
Брой проби за пациент	медиана (обхват)	5 (2-6)

SD: стандартно отклонение

Групата на болните с не-Glu89Gln мутация се състои от общо 14 пациента (7 мъже и 7 жени) на възраст между 34 и 79 г. и средна продължителност на провежданата терапия с TAF 3.9 г. В Таблица 2 са обобщени демографските характеристики на пациентите включени в проучването.

Таблица 2. Демографски характеристики на пациентите с не-Glu89Gln мутация, включени в проучването

Характеристики		Стойност
Брой пациенти	(брой, N)	14
Възраст, години	медиана \pm SD (обхват)	63 \pm 13.3 (34-79)
Пол	мъже (брой,%)	7 (50.00%)
	жени (брой,%)	7 (50.00%)
Продължителност на терапията	медиана (обхват)	3.9 (2.3-7.5)
Брой проби за пациент	медиана (обхват)	5 (3-6)

SD: стандартно отклонение

Проспективното клинично проучване е проведено за период от три години – март 2019 – март 2022 г., като рутинното проследяване на състоянието включва: определяне на неврологичния статус (сухожилни рефлексии, мускулен тонус, сетивни нарушения, хипотрофия и др.), ликворни и биохимични изследвания, невроофтальмологични изследвания, нервна проводимост на двигателни и сетивни влакна, хистопатологични изследвания, невроизобразяващи изследвания и ДНК анализ. Всички изследвания се провеждат в Клиниката по неврология при УМБАЛ „Александровска”, Лабораторията по ликворология и неврогенетика към същата клиника, както и Медико-генетична лаборатория „Геника”. Част от наличните данни за пациентите, събрани в тези звена, са използвани за проследяване на връзката между определените плазмени концентрации и клиничните характеристики на пациентите.

Пробите за проследяване на плазмените концентрации на TAF са взети по време на редовните болнични посещения на пациентите в лабораторията, на всеки 6 месеца. Като биологичен материал се използва плазма, отделена от венозно взета кръв с BD Vacutainer® EDTA епруветки. Пробите се центрофугират на стайна температура (25°C) в продължение на 15 минути при 1 500 rpm. Отделеният, след центрофугирането, супернатант (плазма) се прехвърля в пет криоепруветки с вместимост 1.5 ml, които се съхраняват при температура -75°C до момента на анализа.

2.2 Методи

2.2.1 Анализ на спектрите на TAF, DIF и вътрешните стандарти – IS-T и IS-D

2.2.1.1 Принцип на процедурата

Изследването на спектрите на лекарствените вещества е проведено с „Evolution 300” UV-VIS спектрофотометър. Определена е абсорбцията в UV областта от 200 до 350 nm при спектрална честотна лента 2 nm и спектрална разделителна способност 0.2 nm. Използвани са кювети от кварцово стъкло с оптичен път 10 mm. Органичният разтворител метанол, използван за приготвянето на тест разтворите на анализираните вещества е използван като сравнителен разтвор.

2.2.1.2 Приготвяне на разтворите за анализ

Приготвяне на изходен разтвор на TAF – TAF-SPM-SS - 500 mg/L: Субстанция TAF с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор на TAF – TAF-SPM-TS - 50 mg/L: От изходен разтвор TAF-SPM-S се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител до 20.0 ml (мерителна колба, клас А).

Приготвяне на изходен разтвор на IS-T – IS-T-SPM-SS - 500 mg/L: Субстанция IS-T с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор на IS-T – IS-T-SPM-TS - 50 mg/L: От изходен разтвор IS-T-SPM-SS се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител до 20.0 ml (мерителна колба, клас А).

Приготвяне на изходен разтвор на DIF - DIF-SPM-SS - 500 mg/L: Субстанция DIF с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор на DIF - DIF-SPM-TS - 50 mg/L: От изходен разтвор *DIF-SPM-SS* се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител до получаване на разтвор с концентрация 50 mg/L. Веднага след приготвянето на разтвора се сменя спектъра на лекарственото вещество.

Приготвяне на изходен разтвор на IS-D- IS-D-SPM-SS - 500 mg/L: Субстанция IS-D с маса 10 mg се разтваря в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор на IS-D – IS-D-SPM-TS - 50 mg/L: От изходен разтвор *IS-D-SPM-SS* се пипетира аликвотна част от 2.00 ml и се разрежда със същия разтворител 20.0 ml (мерителна колба, клас А).

2.2.1.3 Спектрофотометричен анализ

Снемането на спектрите на лекарствените вещества от разтвори *TAF-SPM-TS*, *IS-T-SPM-TS*, *DIF-SPM-TS* и *IS-D-SPM-TS* се осъществява непосредствено след приготвянето им. Наблюдаваните абсорбционни максимуми са: TAF - 300.5 и 308.5 nm, IS-T – 241.5 и 300.3 nm, DIF – 227.3 и 315.3 nm и IS-D – 225.7 и 278.6 nm. Получените спектри за веществата са включени в раздел 4, разглеждащ подробно валидирането на хроматографските методи за анализ.

2.2.2 Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на TAF в кръвна плазма

Разработването и валидирането на аналитичния метод е проведено във Фармацевтичен факултет на Медицински Университет София, съгласно изискванията на Европейската агенция по лекарствата (EMA) и Американската асоциация по храните и лекарствата (FDA) за работа в биологична среда.

2.2.2.1 Принцип на процедурата

Определянето на TAF в човешка плазма е проведено по метода на вътрешния стандарт след протеинна преципитация. Разделянето на търсеното лекарство

вещество и вътрешния стандарт – IS-T е осъществено с хроматографска колона RP-C18. Детекцията е UV при дължина на вълната 280 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA, разтворена в смес вода: ацетонитрил; анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза. Хроматограмите са обработени със специализирана програма; всички концентрации са представени в $\mu\text{mol/L}$.

2.2.2.2 Приготвяне на работни разтвори

Приготвяне на изходен разтвор на TAF – TAF-SS - 250 $\mu\text{mol/L}$: Изходният разтвор на TAF се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 7.7 mg в органичен разтворител - метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF1 – 5.0 $\mu\text{mol/L}$: От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 0.2 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF2 – 10.0 $\mu\text{mol/L}$: От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 0.4 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF3 – 20.0 $\mu\text{mol/L}$: От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 0.8 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF4 – 30.0 $\mu\text{mol/L}$: От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 1.2 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF5 – 40.0 $\mu\text{mol/L}$: От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 1.6 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF6 – 50.0 $\mu\text{mol/L}$: От разтвор TAF-SS се пипетира аликвотна част от 2.0 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор TAF7 – 100.0 µmol/L: От разтвор *TAF-SS* се пипетира аликвотна част от 4.0 ml и се разрежда с метанол до 10.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на изходен разтвор на IS-T – IS-T-SS - 365 µmol/L: Изходният разтвор се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 10 mg в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на работен разтвор на IS-T – IS-T-WS – 91.25 µmol/L: От разтвор *IS-T-SS* се пипетира аликвотна част от 25.00 ml и се разрежда със същия разтворител до 100.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на работен разтвор на TCA – TCA-WS – 0.06 mol/L: Изходният разтвор на TCA се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 500 mg в органичен разтворител - ацетонитрил до 50.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

2.2.2.3 Приготвяне на калибрационни разтвори и разтвори за качествен контрол

За приготвянето на разтворите за калибрация и контрол на качеството е използвана стандартизирана човешка плазма.

Разтворите за калибрация се приготвят чрез смесване на 400 µl чиста плазма и 100 µl от разтвори *TAF1*, *TAF2*, *TAF3*, *TAF4*, *TAF5*, *TAF6* и *TAF7*. Концентрациите на получените разтвори са описани подробно в Таблица 3. Приготвянето на разтворите се осъществява непосредствено преди анализа.

Таблица 3. Приготвяне на разтворите за калибрация в плазма.

Калибрационен разтвор	Концентрация ($\mu\text{mol/L}$)	Тест разтвор, използван за приготвянето
CS-TAF1	1.0	<i>TAF1</i>
CS-TAF2	2.0	<i>TAF2</i>
CS-TAF3	4.0	<i>TAF3</i>
CS-TAF4	6.0	<i>TAF4</i>
CS-TAF5	8.0	<i>TAF5</i>
CS-TAF6	10.0	<i>TAF6</i>
CS-TAF7	20.0	<i>TAF7</i>

Като разтвори за контрол на качеството при разработването и валидирането на метода са използвани разтворите CS-TAF1 (долна граница на количествено определяне, LLOQ), CS-TAF2 (проба за качествен контрол с ниска концентрация, LQC), CS-TAF3 (проба за качествен контрол със средна концентрация, MQC) и CS-TAF4 (проба за качествен контрол с висока концентрация, HQC).

В процеса на приготвяне, посочените обеми от изходните разтвори се пипетират и смесват внимателно с празната плазма, а получените проби се хомогенизират на вортекс за 2 min и се инкубират за 12 ч. при температура 37°C.

2.2.2.4 Пробоподготовка

Процедурата за пробоподготовка, използвана в този метод, включва следните стъпки: хомогенизиране на темпериранията плазма на вортекс за 1 min, смесване на аликвотна проба плазма с обем 160 μl с 40 μl от разтвор *IS-T-WS* и 800 μl разтвор *TCA-WS*, за преципитиране на протеините. Пробите се смесват на вортекс в продължение на 10 min, обработват се с ултразвук за 15 min и се разклащат на стайна температура (25°C) за 20 min при 500 rpm. За отделяне на супернатанта пробите се центрофугират в ултрацентрофуга за 10 min при максимална скорост - 13 000 rpm. След това 800 μl от супернатанта се филтруват през сиридж филтър (Whatman, PVDF филтър за спринцовка, 0,45 μm) и се анализират. Приготвянето на пробите се осъществява непосредствено след размразяването им при стайна температура.

2.2.2.5 HPLC анализ

Съгласно изискванията на ЕМА и FDA, всяка аналитична серия включва анализа на празна проба (стандартизирана чиста плазма), нулева проба (съдържаща разтвор на вътрешния стандарт), калибрационни стандарти (поне в 6 концентрационни нива), проби за качествен контрол (QC проби) (поне в три концентрационни нива) и определените за цикъла проби от пациенти. За провеждането на анализа е използвана хроматографска колона Purospher® RP-C18 (150 x 4.6mm, 5µm) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1) при стайна температура (25°C). Със системата е свързан UV детектор, като за анализа е избрана дължина на вълната 280 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA в смес вода: ацетонитрил, в обемно съотношение 42:58 (v/v), филтрувана през мембранен филтър с големина на порите 0.45 µm и дегазирана за 10 min с ултразвукова вана. Анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза със скорост на потока 1.0 ml/min и обем на инжектираните проби 20 µl. Времето за анализ на една проба е 25 min, а времената на задържане на TAF и вътрешния стандарт са съответно 15.9 min и 4.7 min. Представителни хроматограми са включени в раздел 3, разглеждащ подробно валидирането на хроматографския метод за анализ.

2.2.3 Високоэффективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на DIF в кръвна плазма

Разработването и валидирането на аналитичния метод е проведено във Фармацевтичен факултет на Медицински Университет София, съгласно изискванията на ЕМА и FDA за работа в биологична среда.

2.2.3.1 Принцип на процедурата

Определянето на DIF в човешка плазма е проведено по метода на вътрешния стандарт след протеинна преципитация. Разделянето на търсеното лекарствено вещество и вътрешния стандарт – IS-D е осъществено с хроматографска колона RP-C18. Детекцията е UV при дължина на вълната 230 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA в смес вода: ацетонитрил; анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза. Хроматограмите са обработени със специализирана програма; всички концентрации са представени в mg/L.

2.2.3.2 Приготвяне на работни разтвори

Приготвяне на изходен разтвор на DIF – DIF-SS - 600 mg/L: Изходният разтвор на DIF се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 60 mg в органичен разтворител - метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF1 – 2.4 mg/L: От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 0.02 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF2 – 60 mg/L: От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 0.5 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF3 – 120 mg/L: От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 1.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF4 – 240 mg/L: От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 2.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF5 – 360 mg/L: От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 3.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF6 – 480 mg/L: От разтвор **DIF-SS** се пипетира аликвотна част от 4.0 ml и се разрежда с метанол до 5.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на тест разтвор DIF7 – 600 mg/L: Изходният разтвор **DIF-SS** се използва за приготвяне на калибрационния стандарт.

Приготвяне на работен разтвор на IS-D – IS-D-WS – 1875 mg/L: Работният разтвор се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 187.5 mg в органичен разтворител – метанол. Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

Приготвяне на работен разтвор на TCA – TCA-WS – 10 mg/L: Изходният разтвор на TCA се приготвя чрез разтваряне на субстанция с тегло 500 mg в органичен

разтворител - ацетонитрил до 50.0 ml (мерителна колба, клас А). Разтворът се съхранява при температура 2-4°C.

2.2.3.3 Приготвяне на калибрационни разтвори и разтвори за качествен контрол

За приготвянето на разтворите за калибрация и контрол на качеството е използвана стандартизирана човешка плазма.

Разтворите за калибрация се приготвят чрез смесване на 400 µl чиста плазма и 100 µl от разтвори *DIF1*, *DIF2*, *DIF3*, *DIF4*, *DIF5*, *DIF6* и *DIF7*. Концентрациите на получените разтвори са описани подробно в Таблица 4. Приготвянето на разтворите се осъществява непосредствено преди анализа.

Таблица 4. Приготвяне на разтворите за калибрация в плазма.

Калибрационен разтвор	Концентрация (mg/L)	Тест разтвор, използван за приготвянето
CS-DIF1	0.48	<i>DIF1</i>
CS-DIF2	12.0	<i>DIF2</i>
CS-DIF3	24.0	<i>DIF3</i>
CS-DIF4	48.0	<i>DIF4</i>
CS-DIF5	72.0	<i>DIF5</i>
CS-DIF6	96.0	<i>DIF6</i>
CS-DIF7	120.0	<i>DIF7</i>

Като разтвори за контрол на качеството при разработването и валидирането на метода са използвани разтворите CS-DIF1 (LLOQ), CS-DIF2 (LQC), CS-DIF4 (MQC) и CS-DIF6 (HQC).

В процеса на приготвяне, посочените обеми от изходните разтвори се пипетират и смесват внимателно с празната плазма, а получените проби се хомогенизират на вортекс за 2 min и се инкубират за 12 ч. при температура 37°C.

2.2.3.4 Пробоподготовка

Процедурата за пробоподготовка, използвана в този метод, включва следните стъпки: хомогенизиране на темпериранията плазма на вортекс за 1 min, смесване на алоквотна проба плазма с обем 160 µl с 40 µl от разтвор *IS-D-WS* и 800 µl разтвор *TCA-WS*, за преципитиране на протеините. Пробите се смесват на вортекс в продължение на 10 min, обработват се с ултразвук за 15 min и се разклащат на стайна температура (25°C) за 20 min при 500 rpm. За отделяне на супернатанта пробите се центрофугират в ултрацентрофуга за 10 min при максимална скорост - 13 000 rpm. След това 800 µl от супернатанта се филтрат през сириндж филтър (Whatman, PVDF филтър за спринцовка, 0,45 µm) и се анализират. Приготвянето на пробите се осъществява непосредствено след размразяването им при стайна температура.

2.2.3.5 HPLC анализ

Съгласно изискванията на EMA и FDA, всяка аналитична серия включва анализа на празна проба (стандартизирана чиста плазма), нулева проба (съдържаща разтвор на вътрешния стандарт), калибрационни стандарти (поне в 6 концентрационни нива), QC проби (поне в три концентрационни нива) и определените за цикъла проби от пациенти. За провеждането на анализа е използвана хроматографска колона Purospher® RP-C18 (150 x 4.6mm, 5µm) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1) при стайна температура (25°C). Със системата е свързан UV детектор, като за анализа е избрана дължина на вълната 230 nm. Подвижната фаза представлява 0.1% разтвор на TFA в смес вода: ацетонитрил, в съотношение 42:58 v/v, филтрувана през мембранен филтър с големина на порите 0.45 µm и дегазирана за 10 min с ултразвукова вана. Анализът е осъществен чрез изократично елуиране на подвижната фаза със скорост на потока 1.0 ml/min и обем на инжектираните проби 20 µl. Времето за анализ на една проба е 10 min, а времената на задържане на DIF и вътрешния стандарт са съответно 7.3 min и 3.8 min. Представителни хроматограми са включени в раздел 3, разглеждащ подробно валидирането на хроматографския метод за анализ.

2.2.4 Статистически методи

Събраните данни от проведените анализи са обработени с помощта на програмата GraphPad Prism, software version 9 и Microsoft Excel, software version 2007.

- Изследваните параметри са представени като средна стойност, плюс-минус едно стандартно отклонение или медиана със съответния обхват на анализирани стойности.
- Дескриптивен анализ е използван за представяне на честотното разпределение на разглежданите признаци в табличен вид.
- Вариационен анализ е използван за изчисляване на средната стойност на определяния параметър и наблюдаваното разсейване, а за визуализация на получените резултати е използван графичен анализ.
- Т-тестът на Стюдънт е използван за проверка на хипотези за различие между две независими извадки, а за сравнение между няколко независими извадки - едностранен ANOVA тест.
- За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, е прието $p < 0.05$.

3. Резултати и обсъждане

3.1 Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Tafamidis

3.1.1 Оптимизиране на метода за изследване

Процедурата за оптимизиране на HPLC метода за количествено определяне на TAF е извършена на база три основни параметъра – неподвижна фаза (хроматографска колона, SP), подвижна фаза (MP) и UV детекция (дължина на вълната).

Изборът на колона зависи от предварителното познаване на физикохимичните свойства на анализираните вещества както и свойствата на биологичната матрица. Типът колона и дължината ѝ са оптимизирани при едни и същи хроматографски условия за да се получи най-добро разделяне на веществата за най-кратък период от време. Изпробвани са различни колони с обратни фази – октадецилсилан (ODS (C18)) и октилсилан (OS (C8)), като по-добра разделителна способност и чувствителност е установена при ODS в сравнение с OS. Две колони с различна дължина са използвани при разработването на анализа – 150 x 4.6 mm и 250 x 4.6 mm, но като по-подходяща за целите на разработвания метод е избрана колоната с дължина 150 mm във връзка с осигуряване на по-кратко общо време за анализ на всяка проба. Влиянието на размера на частиците на пълнежа също е изследвано, а като най-подходящ е определен 5 μm във връзка с осигуряването на стабилни и надеждни условия за анализ и избягване на риска от запушване на хроматографската колона по време на биологичния анализ. Избраната за анализа колона е Purospher[®] RP-C18 (150 x 4.6mm, 5 μm) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1).

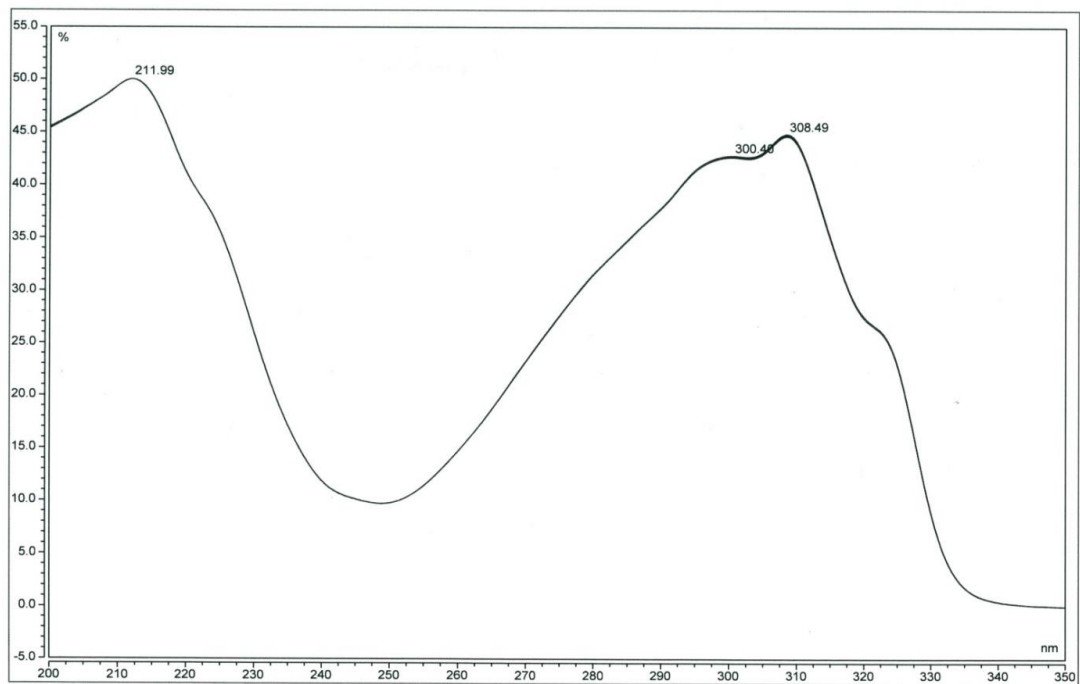
Според предварителните литературни данни са тествани различни състави и съотношения на разтворителите в подвижната фаза. Ацетонитрилът (ACN) показва по-добри резултати в сравнение с метанола (CH₃OH) по отношение на формата и площите на пиковете и затова е избран като предпочитан органичен разтворител. Изследвани са MP със състав 0.01 mol/L амониев формиат (HCOONH₄) : ACN, буфер pH = 2.1 : ACN и 0.1% TFA в смес вода : ACN. Незадоволителните резултати получени с първите две MP се изразяват в получаване на широки и асиметрични пикове на двете анализирани вещества (TAF и неговият вътрешен стандарт) и бавното им и неефективно елуиране. Най-добри резултати осигурява използването на третата MP - 0.1% трифлуороцетна киселина (TFA) в смес вода : ACN, а процентът на

органичният разтворител влияе пряко върху времената на задържане на анализите и съответно върху селективността на метода. След анализ на серия от различни съотношения в сместа вода : ACN (от 65 : 35 v/v до 35 : 65 v/v), най-подходящо се оказа 42 : 58 v/v, тъй като при него се наблюдава най-добро разделяне на вътрешния стандарт от компонентите на матрицата и се осигурява най-кратко аналитично време. Процедурата за анализ е разработена при изократично елуиране и скорост на потока 1.0 ml/min. Използването на по-ниски скорости на потока доведе до забавяне във времето за анализ, а по-високите – до намаляване на селективността. Оценено е и влиянието на температурата върху аналитичната процедура, но не е установено значително подобряване на хроматографските условия при повишаване на температурата до 40°C. За провеждането на количествения анализ е предпочетена стайната температура (25°C), като най-благоприятна и не криеща риск за стабилността на анализиранията вещества и матрицата.

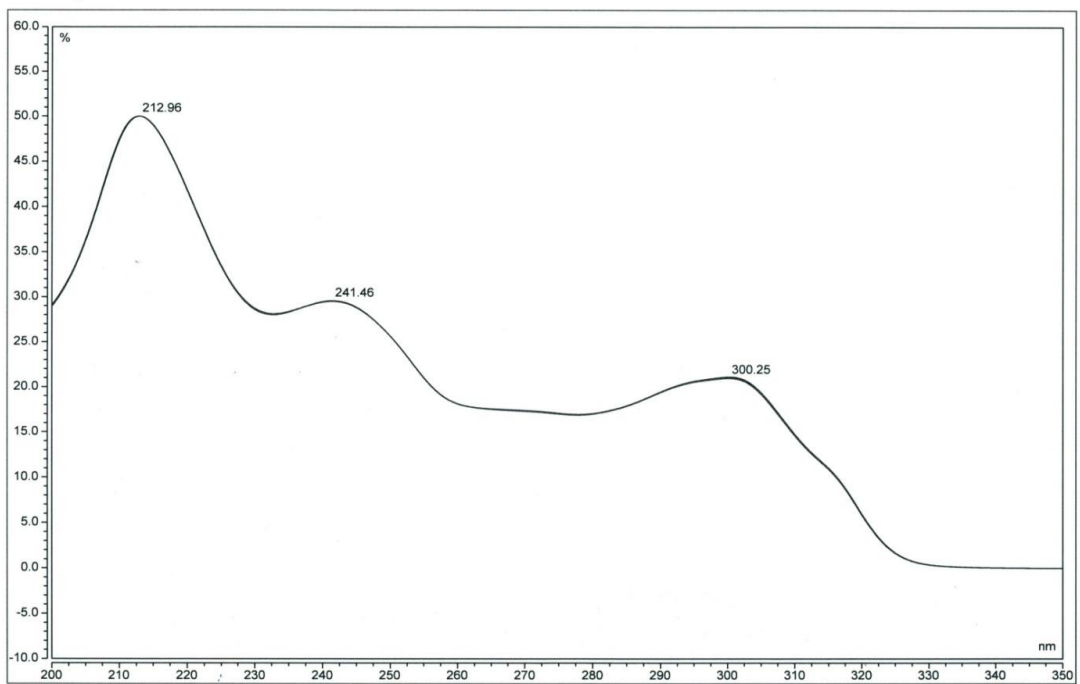
Използването на UV детекция при разработения метод и липсата на достатъчно литературни данни в тази област, наложи необходимостта от изследване на спектрите на анализите преди избора на подходяща дължина на вълната за анализ. Тъй като поглъщането на светлина може да варира в зависимост от вида на използвания разтворител, и двата спектъра бяха снети от разтвори на веществата приготвени в метанол (Фигура 1). Според получените спектри, най-подходяща за анализа е дължината на вълната 300 nm, но във връзка със специфичността на деутериевата лампа, като източник на светлина, във включения към хроматографската система UV детектор и нейното максимално излъчване при 280 nm като оптимална за анализа е избрана по-късата дължина на вълната.

Подготовката на пробите често е най-важната част от анализа и зависи до голяма степен от физикохимичните свойства на анализите, както и от вида на биологичната матрица. Повечето методи, прилагани за извличане, включват етап на утаяване на протеините или многократни екстракции. На база публикуваните литературни данни е оптимизиран и адаптиран метод за пробоподготовка на кръвната плазма, основаващ се на протеинна преципитация с помощта на 1% разтвор на трихлороцетна киселина в ACN, а допълнителното хомогенизиране на пробата на вортекс и ултразвукова вана е използвано за отстраняване на образувалите се протеинни агрегати в етапа на смесване. Пробите са допълнително разклащани за 20 min, а част от супернатанта отделен след центрофугирането е използван за анализ.

А.



Б.



Фигура 1. UV спектри на А. TAF и Б. вътрешния стандарт (IS-T)

3.1.2 Валидиране на хроматографския метод

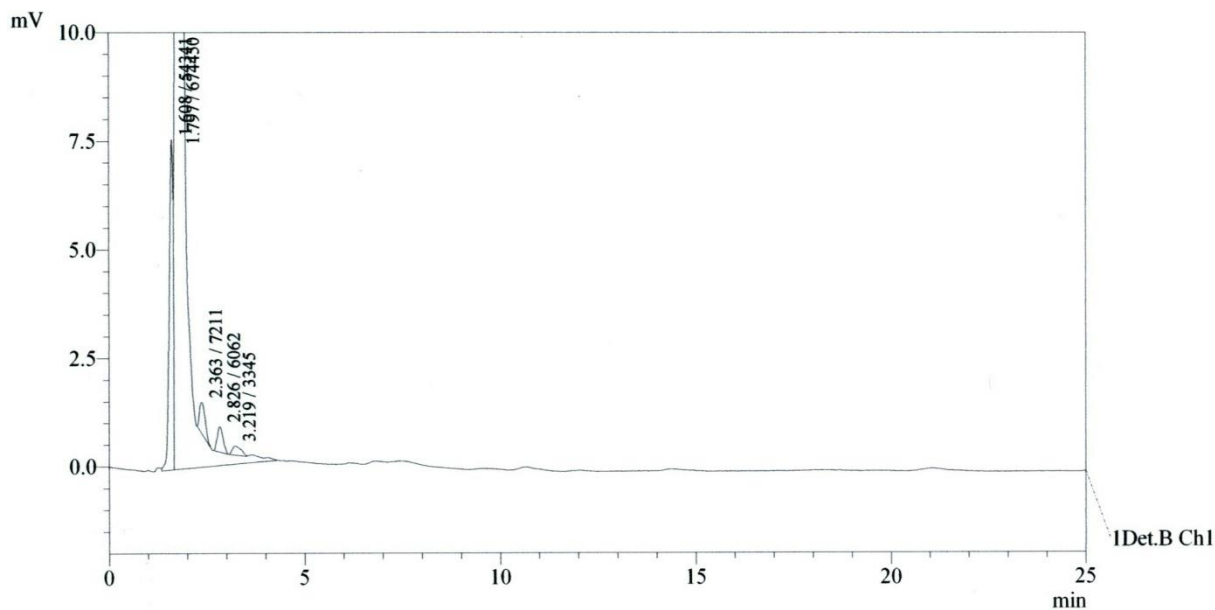
Валидирането на биоаналитичния метод за количествен анализ е осъществено съгласно Международната конференция за хармонизация (ICH) и ръководствата одобрени от ЕМА и FDA за периода 2018-2019 г. [1,2]. Включените за определяне референтни параметри са: селективност, специфичност, линейност, точност, прецизност, граници на откриване и количествено определяне.

3.1.2.1 Предварително зададени критерии за приемане

- Селективност и специфичност - оценена с шест отделни матрици на човешка плазма; допустими стойности са - не повече от 20% от отговора на анализа при LLOQ и не повече от 5% от отговора на IS в пробата LLOQ за всяка матрица.
- Линейност – в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация при LLOQ и в рамките на $\pm 15\%$ при всички останали концентрационни нива, при най-малко 75% от стандартите за калибриране; линейност в определения диапазон, с $R^2 > 0.99$.
- Точност, недостоверност и невъзпроизводимост - в рамките на $\pm 15\%$ от обявената концентрация, с изключение на LLOQ, където тя може да бъде в рамките на $\pm 20\%$.
- Аналитична серия - най-малко 67% от QC пробите и 50% от всяко концентрационно ниво трябва да бъдат в рамките на $\pm 15\%$ от номиналните стойности. Ако тези критерии не са изпълнени, серията се отхвърля.

3.1.2.2 Селективност и специфичност

Разработеният метод е доказан като селективен и специфичен. Не се наблюдава интерфериране от други компоненти (лекарствени вещества) или биолоичната матрица във времената на задържане на TAF и IS-T, които при оптимизираните хроматографски условия са добре разделени. Специфичността е потвърдена чрез анализ на шест различни празни плазмени проби, а представителна хроматограма е показана на Фигура 2. От нея ясно личи, че във времеви интервал от 4 до 25 min не се наблюдават допълнителни интерфериращи пикове във времената на задържане на двата анализа.



Фигура 2. Представителна хроматограма получена при анализа на празна проба

3.1.2.3 Линеиност

Линеиността на метода е доказана в концентрационния интервал 1.00 – 20.00 $\mu\text{mol/L}$ (7 концентрационни нива, трикратен анализ). Резултатите за точността при анализа на всяко концентрационно ниво попадат в интервала от 99.7 до 100.2%, което напълно покрива предварително зададените критерии за приемане (Таблица 5).

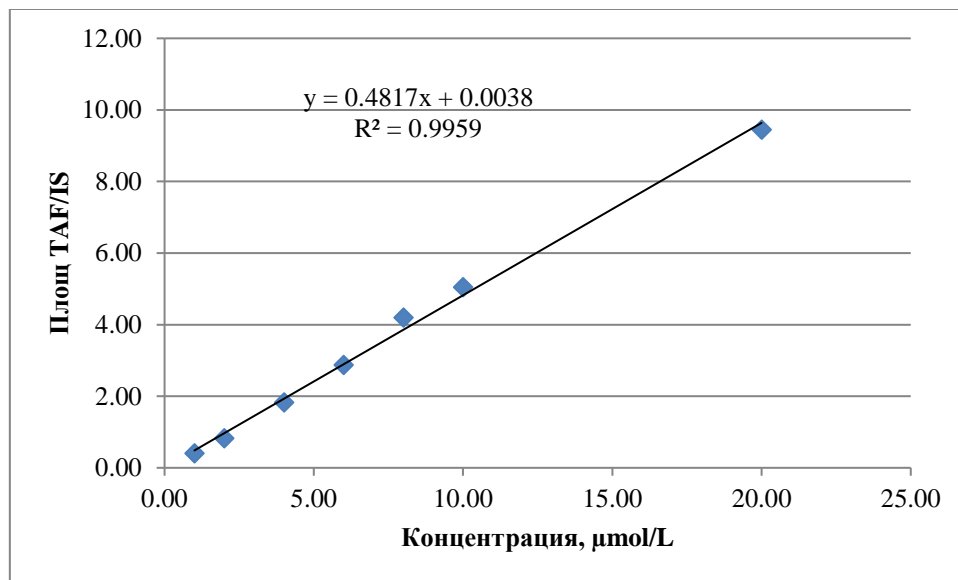
Таблица 5. Резултати за линеиност, точност и прецизност за калибрационната права на TAF (n=3)

Концентрация (C), $\mu\text{mol/L}$	СТАФ \pm SD	Прецизност (CV%)	Точност, %
1.00	0.998 ± 0.008	0.80	99.77
2.00	2.005 ± 0.009	0.45	99.76
4.00	4.012 ± 0.021	0.52	100.06
6.00	5.989 ± 0.023	0.38	99.82
8.00	8.009 ± 0.096	1.20	100.11
10.00	10.002 ± 0.043	0.43	99.92
20.00	19.960 ± 0.197	0.99	99.80

CV% : коефициент на вариация

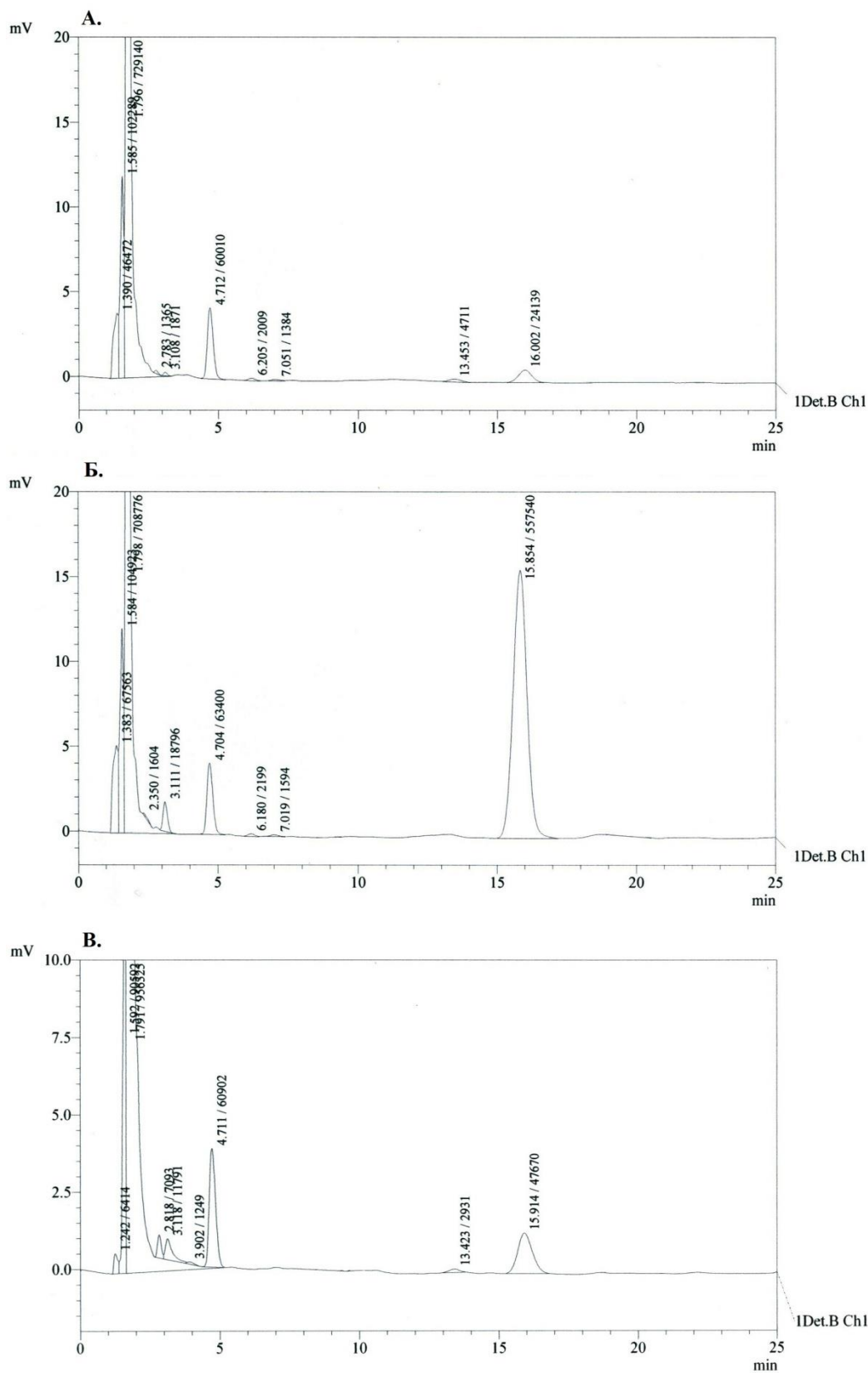
Калибрационната права е построена с помощта на линейна регресия в координати: отношение на площите на TAF и IS-T и концентрация на разтвора (Фигура 3). Полученият висок корелационен коефициент ($R^2 = 0.9959$) е показател за добра линеиност на метода, а ниската стойност на стандартното отклонение (SD) и

наклона ($y = 0.4817x - 0.0038$) са индикатори за значителната валидност на калибрационните точки, използвани за построяване на калибрационната права.



Фигура 3. Калибрационна права на TAF

Изследваните концентрационни нива са 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00 и 20.00 μmol/L TAF получени след смесването на чиста плазма с работен разтвор на лекарственото вещество, инкубиране при температура 37°C и продължаваща обработка на аликвотна част от разтворите, за получаване на пречистена проба готова за хроматографски анализ. На Фигура 4 А, Б и В са показани представителни хроматограми получени при анализа на най-ниския (LLOQ) и най-високия калибрационен стандарт (ULOQ), както и типична хроматограма получена при анализа на реална проба от пациент. Времената на задържане на TAF и IS-T са съответно 15.9 и 4.7 min.



Фигура 4. Представителни хроматограми на А. LLOQ, Б. ULOQ и В. проба от пациент с концентрация на TAF 1.97 $\mu\text{mol/L}$

3.1.2.4 Точност, достоверност и възпроизводимост

За валидиране на параметрите точност, достоверност и възпроизводимост са изследвани приготвените QC проби при 4 концентрационни нива в рамките на диапазона на калибрационната права: LLOQ (1.00 $\mu\text{mol/L}$), LQC (2.00 $\mu\text{mol/L}$), MQC (4.00 $\mu\text{mol/L}$) и HQC (6.00 $\mu\text{mol/L}$). Валидирането в рамките на серия е проведено чрез анализ на 6 отделни проби от четирите концентрационни нива в един ден, а между сериите - чрез повторен анализ на тези проби в продължение на 3 дни. Данните за неточността и недостоверността и невъзпроизводимостта на метода са обобщени в Таблици 6 и 7.

Таблица 6. Точност, достоверност и възпроизводимост в серия (n=6)

LLOQ = 1.00 $\mu\text{mol/L}$			LQC = 2.00 $\mu\text{mol/L}$		
Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%	Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%
1	1.01	1.00%	1	1.97	-1.47%
2	0.96	-4.17%	2	1.94	-3.13%
3	0.95	-4.52%	3	1.97	-1.53%
4	0.90	-10.00%	4	1.96	-2.22%
5	0.91	-8.96%	5	1.96	-1.77%
6	0.89	-11.00%	6	1.93	-3.42%
Average	0.94		Average	1.95	
d%	-6.28%		d%	-2.26%	
SD	0.05		SD	0.02	
CV%	5.32%		CV%	1.03%	
MQC = 4.00 $\mu\text{mol/L}$			HQC = 6.00 $\mu\text{mol/L}$		
Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%	Проба №	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	d%
1	4.00	0.06%	1	6.12	2.00%
2	4.04	0.89%	2	5.91	-1.50%
3	4.00	0.01%	3	6.00	0.00%
4	3.99	-0.32%	4	6.07	1.17%
5	4.00	-0.09%	5	5.98	-0.33%
6	4.03	0.75%	6	6.02	0.33%
Average	4.01		Average	6.02	
d%	0.22%		d%	0.28%	
SD	0.02		SD	0.07	
CV%	0.50%		CV%	1.16%	

Възпроизводимостта в серия е оценена чрез CV%, който е по-малък от 5.5% за всички изследвани нива на концентрация, а точността в серия – чрез процентно отклонение на средната получена концентрация спрямо претеглената (d%), варираща от -6.28 до 0.28%.

Междусерийният анализ също потвърди метода като точен и възпроизводим. Резултатите обобщени в Таблица 7 са групирани за всяка серия от анализи проведени в рамките на три последователни дни и показват CV% по-малък от 1.1% и d% между -8.00 и 0.11%.

Таблица 7. Точност, достоверност и възпроизводимост във време (n=6)

LLOQ = 1.00 µmol/L			LQC = 2.00 µmol/L		
Серия №	Концентрация, µmol/L	d%	Серия №	Концентрация, µmol/L	d%
1	0.92	8.00%	1	1.93	-3.37%
2	0.91	9.00%	2	1.92	-4.18%
3	0.93	7.00%	3	1.95	-2.31%
Average	0.92		Average	1.93	
d%	-8.00%		d%	-3.29%	
SD	0.01		SD	0.02	
CV%	1.09%		CV%	1.04%	
MQC = 4.00 µmol/L			HQC = 6.00 µmol/L		
Серия №	Концентрация, µmol/L	d%	Серия №	Концентрация, µmol/L	d%
1	4.01	0.15%	1	6.01	0.17%
2	3.99	-0.33%	2	5.97	-0.50%
3	4.02	0.50%	3	6.04	0.67%
Average	4.00		Average	6.01	
d%	0.11%		d%	0.11%	
SD	0.02		SD	0.04	
CV%	0.50%		CV%	0.67%	

В заключение може да се потвърди, че точността и прецизността, на метода, отговарят напълно на предварително зададените критерии за приемане.

3.1.2.5 Граница на откриване и граница на количествено определяне (LOD/ LOQ)

За определяне на LOD се използват два подхода – експериментален и изчислителен. Експериментално LOD се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 2 или 3:1, а изчислително по формулата: $LOD = (3.3 \cdot \sigma) / S$, където σ е стандартното отклонение на измерените стойности, а S е наклона на калибрационната права. Аналогично LOQ също може да бъде определена експериментално и изчислително. Експериментално LOQ се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 10:1, а изчислително по формулата: $LOQ = (10 \cdot \sigma) / S$. Определените стойности за LOD и LOQ са съответно 0.05 и 1.00 µmol/L,

доказващи възможността на разработения метод за приложение в клиничната практика и определяне дори на следи от лекарственото вещество в плазмата.

3.1.2.6 Тестове за пригодност на системата

Подбраните хроматографски условия осигуряват бързо и ефективно разделяне на TAF и IS-T, доказано чрез извършените тестове за пригодност на системата. За целта е направен шесткратен анализ на калибрационния разтвор с концентрация 4.00 $\mu\text{mol/L}$ избран за MQC проба и са определени параметрите: време на задържане (t_R), капацитетен фактор (κ), селективност (α), брой теоретични тарелки (N), степен на разделяне (R_S) и пикова асиметрия (tailing factor, T). Обобщените резултати получени след серията анализи са представени в Таблица 8. Определените параметри на хроматографската система, характеризиращи задържането и ефективността на разделяне, отговарят напълно на изискванията на Европейската фармакопея с получени стойности за $\kappa \geq 2.0$, $\alpha \geq 1.9$, $N \geq 2300$, $R_S \geq 4.0$ и $T \leq 1.2$.

Таблица 8. Резултати от теста за пригодност на системата

Параметър	Критерий за приемане	TAF	IS-T
Време на задържане (t_R)	-	15.93	4.71
Капацитетен фактор (κ)	Ph.Eur. NLT 2.0	10.46	2.40
Селективност (α)	Ph.Eur. NLT 1.0	1.91	1.92
Брой теоретични тарелки (N)	Ph.Eur. NLT 2000	5007	2347
Степен на разделяне (R_S)	Ph.Eur. NLT 2.0	9.49	4.05
Пикова асиметрия (tailing factor, T)	Ph.Eur. NMT 2.0	1.04	1.16

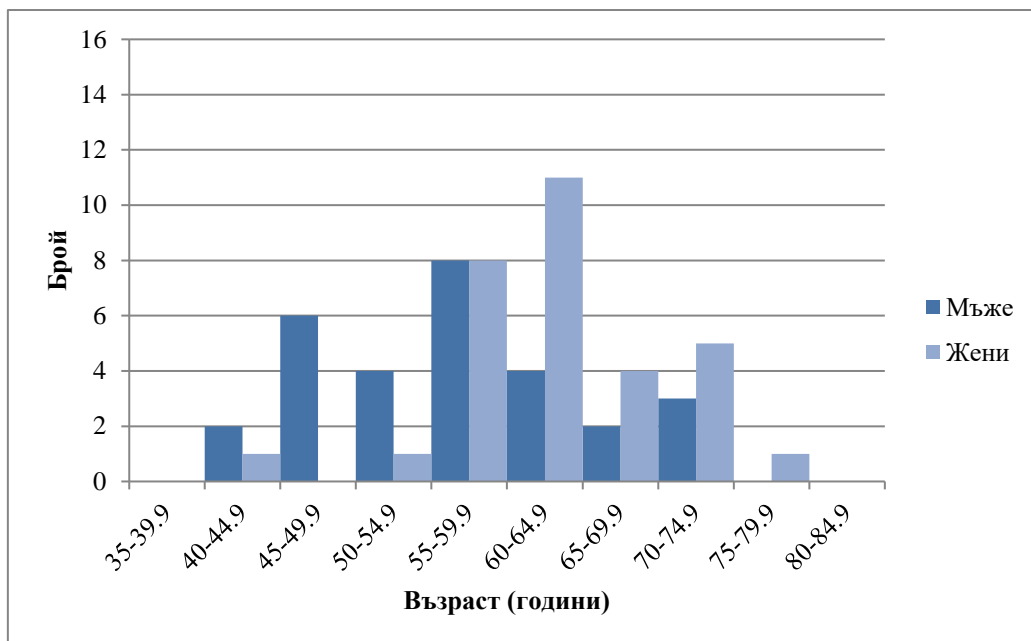
Ph. Eur.: Европейска фармакопея; NLT: не по-малко от; NMT: не повече от;

3.2 Прилагане на разработения метод за количествен анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза

3.2.1 Проследяване на плазмените концентрации на Tafamidis при българската кохорта пациенти носители на мутацията Glu89Gln

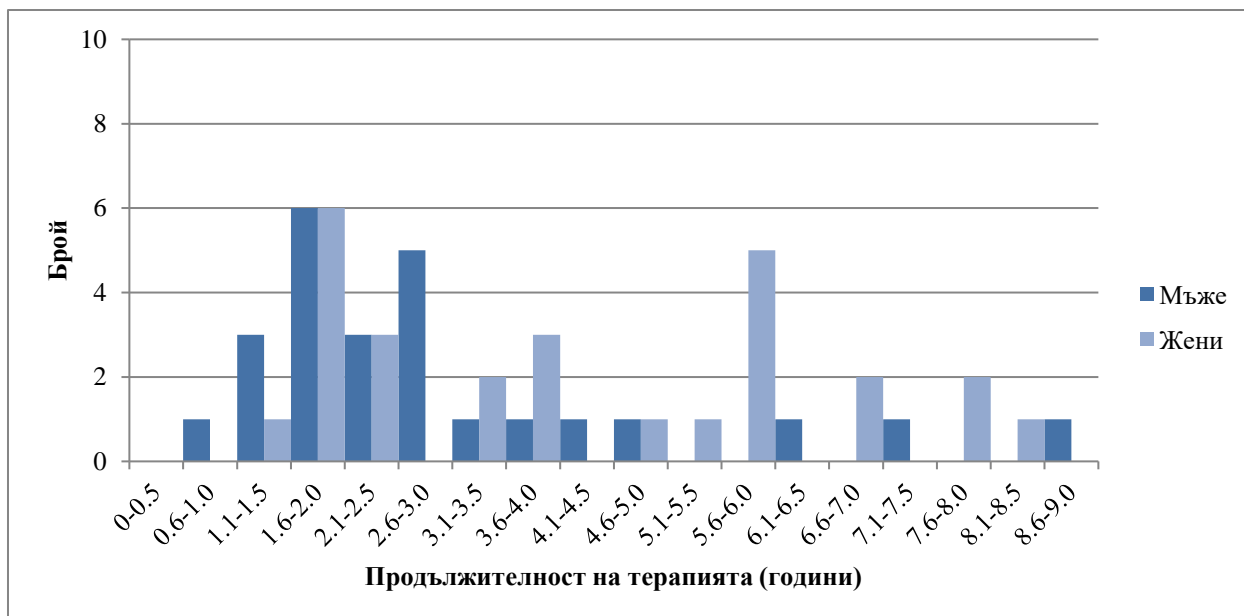
Проведеното проучване за определяне на средните плазмени концентрации при пациентите провеждащи терапия с ТАФ продължи три години (март 2019 – март 2022), на територията на два основни центъра – Клиниката по неврология към УМБАЛ „Александровска“ и Фармацевтичния факултет на Медицински университет – София. Рутинното вземане на кръв за проследяване на плазмените концентрации се извърши по време на редовните болнични посещения на пациентите на всеки 6 месеца. Одобрената терапевтична схема (20 mg препоръчителна дневна доза), за приложение на лекарствения продукт при пациентите с TTR амилоидоза, не предвижда корекции в дозовия режим във връзка с постигнатия ефект от терапията.

Общият брой на пациентите е 60 – 29 мъже (47.7%) и 31 жени (52.3%) на възраст от 40 до 75 години. На Фигура 5 е представено подробно разпределение на участниците в изследването по групи. Средната възраст на пациентите е 58 ± 8.2 години. Възрастовата група 55 – 59.9 години е с най-голям брой пациенти от мъжки пол (10), а групата 65 – 69.9 е с най-нисък брой (1). При жените 60 - 64.9 е с най-висок брой (13), следвана от групата 55 - 59.9 години с 9, а най-малко (1) е във възрастовите групи 40 - 44.9 и 50 - 54.9 години. Изводът, който може да се направи от представените данни е, че при жените възрастта на проявление и диагностициране на заболяването е значително по-висока, отколкото при мъжете. Причините за наблюдаването на тази тенденция е по-лекото протичане на заболяването при тях, както и дългият безсимптомен период, водещ до забавяне на диагнозата и започване на лечение.



Фигура 5. Разпределение на пациентите с мутация Glu89Gln по пол и възраст

Продължителността на терапията, при включените в изследването пациенти, варира от 0.9 до 8.6 години. На Фигура 6 е представено подробно разпределението по групи. Средната продължителност на терапията отчетена при пациентите в началото на периода на проследяване е 2.9 години. Изводът, който може да се направи от представените обобщени данни е, че при жените средната продължителност на терапията е значително по-голяма, в сравнение с мъжете и причина за това е по-лекото протичане на заболяването и по-бавната прогресия в симптоматиката. При мъжете е установено значително по-бързо и агресивно прогресиране на заболяването до стадий 2, което от своя страна води до прекратяване на терапията с TAF.



Фигура 6. Разпределение на пациентите с мутация Glu89Gln по пол и продължителност на терапията

За периода на изследването са събрани общо 246 плазмени проби от пациентите носители на мутацията Glu89Gln, съхранявани при подходящи условия до момента на анализирането им. Измерените плазмени концентрации варират от 1.24 до 18.91 $\mu\text{mol/L}$ със средна стойност 5.13 $\mu\text{mol/L}$, $\text{SD} \pm 2.64 \mu\text{mol/L}$ и общ CV% 51.43%. Индивидуалният коефициент на вариация в плазмените нива при всеки пациент по време на проследяването е средно 18.50% (от 2.39 до 46.55%).

В Таблица 9 са представени индивидуалните характеристики на пациентите, включващи: пол, брой взети проби за периода, средна концентрация и коефициент на вариация. Анализът на обобщените данни в таблицата не показва значителна разлика в средните коефициенти на вариация в групите мъже/жени - 18.99% и 18.28%. Следователно индивидуалната вариация в плазмените концентрации не зависи от пола на пациентите и от броя събрани проби за анализ.

Таблица 9. Демографски характеристики и плазмени концентрации на пациентите включени в изследването

№	Пол	Брой проби	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	CV%	№	Пол	Брой проби	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	CV%
1	Ж	6	4.83	16.10	31	Ж	4	5.56	26.23
2	Ж	6	6.22	14.63	32	Ж	4	6.09	17.02
3	М	6	4.79	9.85	33	М	4	9.01	11.04
4	М	6	1.94	32.66	34	Ж	4	3.92	20.07
5	М	6	5.47	17.34	35	М	4	4.08	13.12
6	М	6	3.10	30.84	36	Ж	4	8.25	8.17
7	М	6	4.09	14.30	37	Ж	4	5.06	40.79
8	Ж	6	2.78	36.09	38	Ж	4	9.25	7.68
9	М	6	3.13	26.88	39	Ж	4	15.58	15.43
10	Ж	6	7.73	21.86	40	Ж	4	4.37	12.14
11	Ж	6	4.26	18.40	41	М	4	2.89	21.06
12	Ж	6	4.89	26.16	42	М	4	4.52	21.35
13	М	6	3.22	18.99	43	Ж	4	4.46	9.26
14	Ж	6	7.17	19.32	44	Ж	3	6.84	10.39
15	М	6	4.01	21.41	45	Ж	3	5.83	12.83
16	М	6	2.28	32.56	46	М	3	5.89	24.63
17	М	5	1.57	12.69	47	М	3	4.66	10.44
18	Ж	5	4.13	12.35	48	Ж	3	8.37	30.88
19	М	5	2.05	22.02	49	М	2	3.85	2.39
20	Ж	5	6.66	23.54	50	М	2	4.65	14.46
21	М	5	3.61	19.42	51	М	2	2.44	16.56
22	Ж	5	9.33	4.87	52	Ж	2	7.19	5.61
23	Ж	5	7.60	18.56	53	М	1	9.20	-
24	Ж	5	3.66	46.55	54	М	1	9.44	-
25	М	5	3.83	19.57	55	Ж	1	1.24	-
26	М	5	3.04	23.77	56	М	1	7.74	-
27	Ж	5	8.00	12.82	57	Ж	1	6.46	-
28	Ж	4	7.78	5.75	58	Ж	1	9.54	-
29	М	4	1.90	19.92	59	Ж	1	4.92	-
30	М	4	5.04	17.37	60	М	1	7.90	-

3.2.2 Обработка и анализ на получените резултати. Определяне на степента на корелация между плазмената концентрация на лекарствения продукт и някои клинични характеристики на избраната група пациенти

Статистическият анализ е извършен с помощта на GraphPad Software версия 9. Средните плазмени концентрации при всеки пациент са показани като средна стойност и SD, а вариабилността - като CV%. Сравнението на някои специфични параметри (абсолютни стойности или проценти) между отделните групи за целия

период на изследване се основава на анализа на дисперсията или t-теста. Едностранныят ANOVA тест и регресионният анализ са използвани за оценка на корелацията и потвърждаване или отхвърляне направените твърдения. *P*-стойност по-ниска от 0.05 се счита за статистически значима.

3.2.2.1 Плазмена концентрация и пол

Съществено влияние, върху плазмените концентрации на определено лекарство вещество, оказва полът на пациентите. За периода на проучването е направен анализ на зависимостта на измерените плазмени концентрации на TAF от пола; в анализа са включени пациенти с взети повече от 2 последователни проби (Таблица 10).

Таблица 10. Вариационен анализ на плазмената концентрация на TAF спрямо пола при болните с мутация Glu89Gln

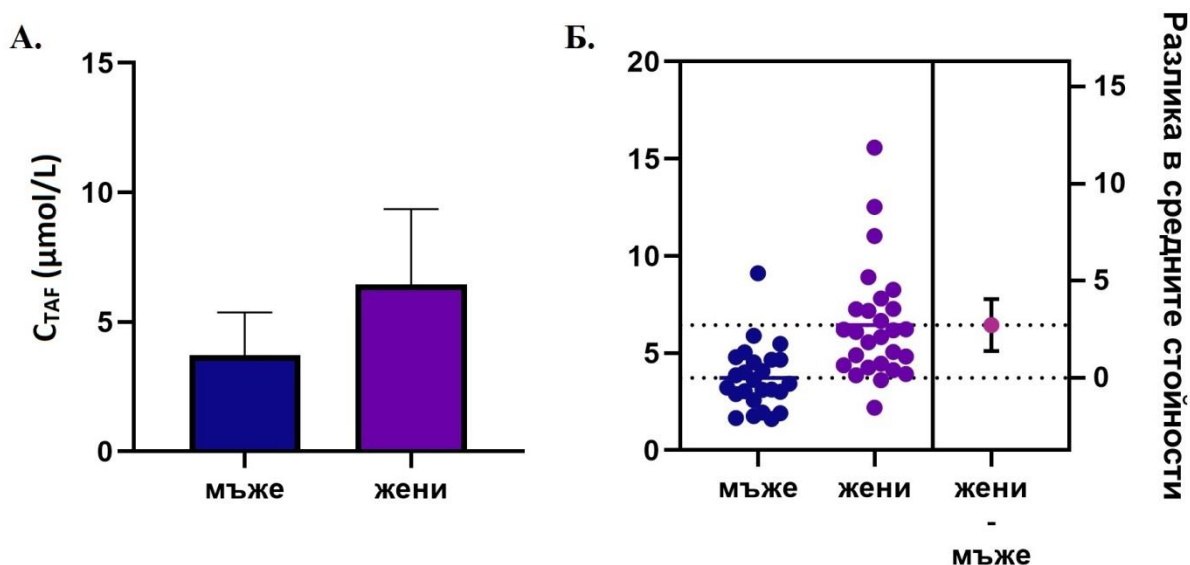
Група	Брой	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	SD	Min	Max
Мъже	25	3.80	1.59	1.57	2.78
Жени	27	6.51	2.55	9.01	15.58
Общо	52	5.21	2.53	1.57	15.58

При мъжете установената средна плазмена концентрация достига едва 58.37% от концентрацията при жените (Фигура 7 А и Б).

Получените резултати относно концентрационните нива в двете групи пациенти са обработени и анализирани чрез едностранин ANOVA тест за потвърждаване на статистически значимо различие в средните стойности ($p < 0.05$). Анализът потвърди работната хипотеза за статистическа значимост на разликата в двете концентрационни нива с ниво на сигнификантност $p < 0.0001$. Важно е да се отбележи клинично установения факт, че жените от наблюдаваната група развиват значително по-късно прогресия на процеса и то - с подчертано по-ниска агресивност. На основата на посочените статистически и клинични данни може да се издигне хипотезата, че изразеното забавяне на болестната прогресия при пациентите от женски пол се дължи и на практически двукратно по-високите равновесни плазмени концентрации на TAF в сравнение с мъжете. В подкрепа на тази хипотеза се явява и установената в нашето проучване зависимост между възрастта, плазмените концентрации и хода на болестта - при млади възрастни се наблюдава по-ранна и бърза прогресия при по-ниски

плазмени концентрации в сравнение с пациенти над 61 г. (виж следващия раздел – 3.2.2.2.) Тези наблюдения за първи път показват потенциала на фармакокинетичния лекарствен мониторинг за индивидуализация на терапията и за постигане на оптимални лечебни резултати. За целта са необходими допълнителни проспективни проучвания за изследване на връзката концентрация-ефект и за установяване на оптимална терапевтична концентрационна област на медикамента.

Анализът на вариабилността в двете групи (мъже/жени) не показва статистически значима разлика на средните стойности. Получените резултати са съответно $18.99 \pm 7.30\%$ за мъжете и $18.28 \pm 10.68\%$ за жените, а $p = 0.7831$. Следователно вариацията в концентрационните нива не зависи от пола на пациентите. Причините могат да бъдат няколко: различия в метаболизма, стойност на модифицирания индекс на телесната маса и прием на храна с лекарствения продукт, но най-важната от всички е стриктното спазване на дозовия режим по време на целия терапевтичен курс.



Фигура 7. Плазмени концентрации на TAF при пациенти от мъжки и женски пол. А. Средни концентрации със стандартно отклонение. Б. Графика за оценка на разликата в средните стойности.

3.2.2.2 Плазмена концентрация и възраст

За оценка на връзката между плазмените концентрации на TAF и възрастта, изследваната популация е разделена в три възрастови групи: млади възрастни (<50

години), пациенти на средна възраст (51 - 60 години) и пациенти в напреднала възраст (>61 години) (Таблица 11). В анализа са включени пациенти с взети повече от 2 последователни проби за анализ.

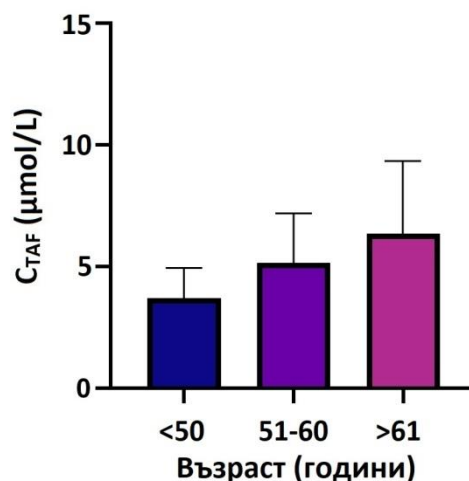
Таблица 11. Вариационен анализ на плазмената концентрация на TAF спрямо възрастта при болните с мутация Glu89Gln

Група	Брой	Средна концентрация, $\mu\text{mol/L}$	SD	Min	Max
< 50 години	12	3.84	1.27	2.05	6.84
51 - 60 години	22	5.03	2.26	1.57	9.33
>61 години	18	6.34	3.01	2.78	15.58
Общо	52	5.07	2.18	1.57	15.58

Резултатите от проведения вариационен анализ показват почти два пъти по-ниски нива на TAF в групата до 50 г. в сравнение с групата над 61 г. и минимална разлика в средните стойности между групите 51 - 60 г. и над 61 г. За периода на изследването не са установени разлики в експозицията на TAF във всички групи пациенти. Една от възможните причини за наблюдаваните повишени плазмени концентрации при възрастни над 61 г. трябва да бъде свързана с физиологични промени в организма, които водят до по-малък обем на разпределение на лекарственото вещество и до по-ниска скорост на метаболизма, а това от своя страна резултира в отчетена по-висока пикова плазмена концентрация, удължаване на плазмения полуживот, и забавена елиминация. За потвърждение на тази хипотеза е необходим подробен анализ и включване на допълнителни клинични показатели.

Прилагането на едностранен ANOVA тест за изследване на хипотезата за връзка между възрастта на пациентите с мутация Glu89Gln и определените концентрационни нива на TAF, даде положителен резултат. При предварително определено ниво на сигнификантност $p < 0.05$, полученият резултат от анализа е $p = 0.0235$, което потвърждава първоначалната работна хипотеза. (Фигура 8)

Пациентите под 50 годишна възраст показват среден коефициент на вариация $17.62 \pm 5.60\%$, между 51 и 60 г. – $19.45 \pm 9.98\%$, а над 61 г. – $17.91 \pm 9.89\%$. Едностранният ANOVA тест не показва сигнификантна разлика в средните стойности за трите групи ($p = 0.8111$), следователно хипотезата за връзка между индивидуалната вариабилност и възрастта се отхвърля.



Фигура 8. Оценка на връзката между плазмената концентрация на TAF и възрастта.

3.2.2.3 Плазмена концентрация и продължителност на терапията

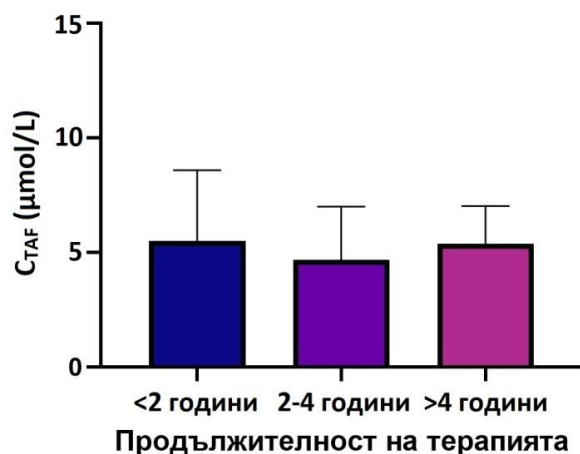
Относително дългият период на проведеното проучване осигури възможност и за оценка на връзката (зависимостта) между концентрационните нива на TAF в плазмата и терапевтичния период. За целта, включените пациенти са разделени в три групи. В група 1 попадат пациентите с терапевтичен курс до 2 г., в група 2 – пациентите с терапия между 2 и 4 г., а в група 3 – пациентите с терапия повече от 4 г. В анализа са включени пациенти с взети повече от 2 последователни проби.

Таблица 12 представя обобщените данни, събрани по време на анализите, за всяка група, с включена информация относно средната плазмена концентрация, стандартното отклонение, минималните и максималните отчетени стойности.

Таблица 12. Вариационен анализ на плазмената концентрация на TAF спрямо общата продължителност на терапията при болните с мутация Glu89Gln

Група	Брой	Средна концентрация, μmol/L	SD	Min	Max
< 2 г.	17	5.53	3.16	1.90	15.58
2 - 4 г.	18	4.71	2.47	1.57	9.33
> 4 г.	17	5.41	1.86	1.94	8.00
Общо	52	5.22	2.50	1.57	15.58

Наблюдава се минимално отклонение ($< 10\%$) на плазмените концентрации във всички групи от определената средна стойност за българската кохорта пациенти (Фигура 9).



Фигура 9. Оценка на връзката между плазмената концентрация на TAF и продължителността на терапията.

За изследване на хипотезата за връзка между стойностите на плазмената концентрация и продължителността на терапевтичния курс е приложен едностранен ANOVA тест. Резултатът от него не достигна предварително определено ниво на сигнификантност $p < 0.05$ ($p = 0.5941$), с което работната хипотеза се отхвърля.

Пациентите с продължителност на терапията с TAF под 2 г. показват среден коефициент на вариация $14.64 \pm 6.36\%$, между 2 и 4 г. – $19.74 \pm 10.07\%$, а над 4 г. – $21.03 \pm 9.25\%$. Едностранният ANOVA тест не показва сигнификантна разлика в средните стойности за трите групи ($p = 0.0878$), следователно хипотезата за връзка между индивидуалната вариабилност и продължителността на терапията трябва да бъде отхвърлена.

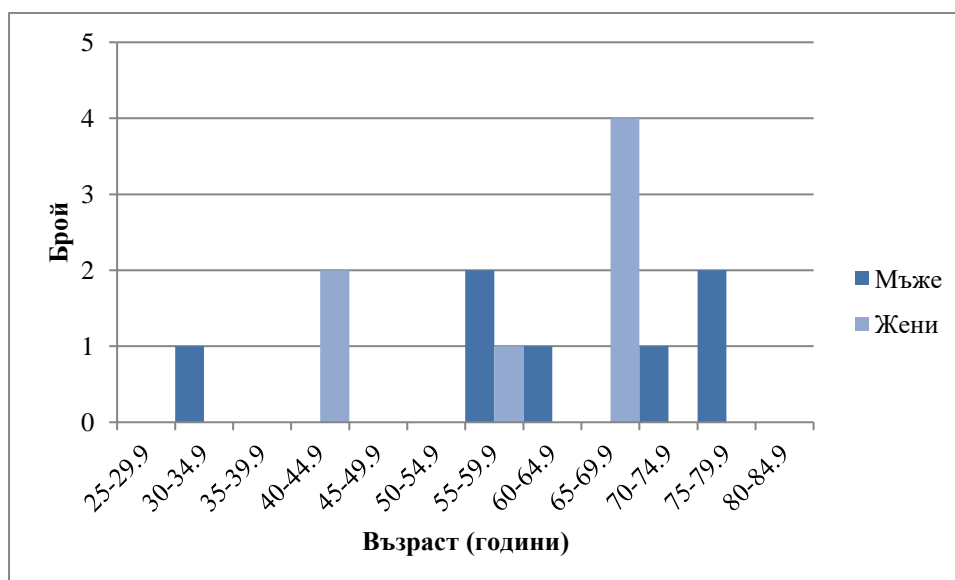
3.2.2.4 Ограничения на проучването

Както при всички проучвания, и тук са на лице някои съществени ограничения. Относително малкият брой пациенти включени в анализа може да повлияе върху възможността за откриване на статистически значими резултати, относно влиянието на различни фактори върху циркулиращите плазмени нива на TAF. Дизайнът на

изследването, и провеждането на проследяване по време на редовните клинични посещения на пациентите, възпрепятства възможността за определяне на максималните концентрационни нива, както и за определяне на площта под кривата (AUC). По-мощабни клинични проучвания, биха потвърдили или отrekli представените резултати относно мутацията Glu89Gln. Мониторингът на плазмената концентрация на TAF понастоящем не е често срещан в практиката, но в бъдеще би могъл да се използва като подход за индивидуализация на терапията с потенциал значимо да се забави хода на болестта и нейната прогресия.

3.2.3 Проследяване и анализ на плазмените концентрации на Tafamidis при българската група пациенти носители на мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu

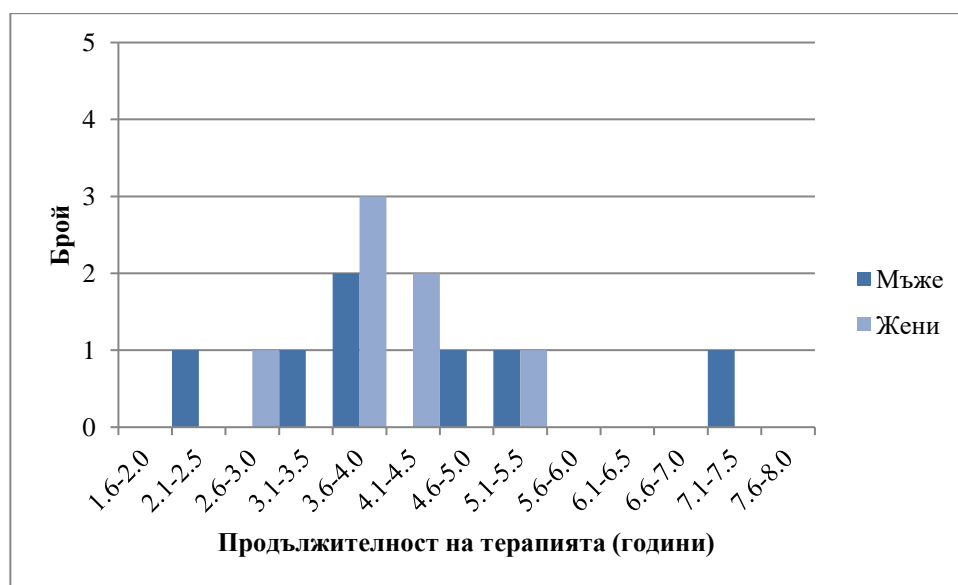
В периода на проучването са проследени плазмените концентрации на TAF при пациентите с транстиретинова амилоидоза, причинена от мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu – редки за България, но значително по-широкоразпространени в световен мащаб. Общият брой на включените болни е 14 – 7 мъже (50.0%) и 7 жени (50.0%) на възраст от 34 до 79 години. На Фигура 10 е представено подробно разпределение на участниците в изследването по групи. Средната възраст на пациентите е 60 ± 13.3 години.



Фигура 10. Разпределение на пациентите с мутации Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu по пол и възраст

Ниският брой на участниците определя неравномерното разпределение на данните показани на Фигура 10. Тук тенденцията описана за мутацията Glu89Gln, свързана с по-късно проявяване и диагностициране на заболяването при жените, не се запазва. При пациентите носители на трите описани мутации, се наблюдава приблизително изравняване на възрастта при мъжете и жените.

Продължителността на провежданата терапия с TAF варира от 2.3 до 7.5 години. Подробното разпределение по групи е представено на Фигура 11. Средната продължителност на терапията отчетена при пациентите в началото на периода на проследяване е 4.3 години. Не се наблюдава значително различие в средната продължителност на терапията при мъжете и жените. За съжаление, малкият брой пациенти в групата чувствително ограничава статистическата значимост на получените данни. Необходимо е потвърждаването на изводите, чрез задълбочен анализ с включване на по-голяма група пациенти.



Фигура 11. Разпределение на пациентите с мутации Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu по продължителност на терапията с TAF

За периода на изследването са събрани общо 70 плазмени проби, съхранявани при подходящи условия до момента на анализирането им. Измерените плазмени концентрации варират от 1.16 до 9.75 $\mu\text{mol/L}$ със средна стойност 4.84 $\mu\text{mol/L}$, SD \pm 2.21 $\mu\text{mol/L}$ и CV% 45.73% (Таблица 13).

При мъжете отчетената концентрация е $3.97 \pm 1.52 \mu\text{mol/L}$, а при жените - $5.51 \pm 2.07 \mu\text{mol/L}$. Въпреки голямата разлика в стойностите получени относно средните концентрации, едностранният ANOVA тест не показва статистически значимо различие – $p = 0.1393$, вероятно поради недостатъчния обем на наблюдението. Индивидуалният коефициент на вариация в плазмените нива при всеки пациент по време на проследяването е средно $23.86 \pm 11.65\%$ (от 7.14 до 42.13%), като отново не е установена статистически значима разлика в средните коефициенти на вариация в двете групи – мъже и жени. Получените средни стойности са съответно 19.90% и 27.82%, а $p = 0.2162$.

Таблица 13. Демографски характеристики и плазмени концентрации на пациентите включени в изследването

Пациент №	Пол	Мутация	Брой проби	Концентрация, $\mu\text{mol/L}$	CV%
1	М	Val30Met	6	5.34	7.14
2	Ж	Val30Met	6	5.63	30.16
3	М	Val30Met	5	4.74	32.25
4	М	Val30Met	5	5.51	42.13
5	Ж	Ser77Phe	6	6.73	30.79
6	М	Ser77Phe	6	2.64	9.83
7	Ж	Ser77Phe	6	7.68	14.11
8	М	Ser77Phe	5	3.43	15.51
9	Ж	Ser77Phe	5	3.99	39.01
10	М	Ser77Phe	4	4.69	15.49
11	Ж	Ser77Phe	4	7.94	27.03
12	М	Gly47Glu	4	1.42	16.95
13	Ж	Gly47Glu	4	2.45	38.15
14	Ж	Gly47Glu	4	4.12	15.48

При анализа на връзката между патогенния генетичен вариант причиняващ заболяването и възрастта на пациентите, продължителността на терапията, плазмените концентрации на TAF в българските пациенти се наблюдават няколко зависимости, типични за съответните мутации.

За носителите на Val30Met мутацията са характерни късно проявяване на заболяването (около 72 г.), средна продължителност на терапията 4.8 г. (показваща добър контрол на заболяването и поддържането на пациентите в стадий 1) и плазмена концентрация около $5.31 \mu\text{mol/L}$. Ser77Phe пациентите са на възраст около 62 г., с

терапия провеждана за период от около 4.1 г. и установени плазмени нива около 5.30 $\mu\text{mol/L}$. Мутацията Gly47Glu е значително по-агресивна в проявяването си в сравнение с предходните две. При нея налице е ранно начало на заболяването – около 39 г., средна продължителност на терапията с TAF около 3.6 г. и концентрационни нива на лекарственото вещество около 2.66 $\mu\text{mol/L}$ – два пъти по-ниски в сравнение с тези на носителите Val30Met. В съответствие с издигната от нас хипотеза за връзката между плазмените концентрации и хода на болестта (раздел 3.2.2.1.) е от съществено значение да се провери клинично дали агресивният ход при тези пациенти може да се забави с по-агресивна и индивидуализирана терапия постигаща равновесни плазмени нива над 5-6 $\mu\text{mol/L}$ от самото ѝ започване.

Данните получени от българската кохорта пациенти съответстват на публикуваните в литературата проучвания относно всяка отделна мутация - засегната група от населението, специфичности при проявяването на заболяването, възраст на пациентите, ефект от провежданата терапия с TAF и др. За съжаление, поради малкия брой на включените в изследването български пациенти, сравнителен анализ между отделните мутации не може да се направи, тъй като обособените групи нямат статистическа представителност. Въз основа на получените данни ще бъдат проследени наблюдаваните зависимости, но доказването им статистически е невъзможно.

За мутациите Val30Met и Ser77Phe е характерно късно начало на заболяването – след 65 г. и добро повлияване на пациентите от терапията със стабилизиране на състоянието и забавяне на прогресията в наблюдаваната симптоматика (дълъг терапевтичен курс с TAF), потвърдено и от изследването на българските пациенти, носители на тази мутация – средна възраст съответно 72 и 62 г. и продължителност на терапията около 4.5 г. Въпреки малкия брой болни с мутация Gly47Glu, разликата във възрастта е очевидна. В тази група средната начална възраст е с около 30 години по-ниска от тази в предходните две, а продължителността на терапията – около 1 г. по-малка. Описаните зависимости трябва да се свържат с агресивния ход на заболяването при Gly47Glu мутацията.

3.3 Високоэффективен течно-хроматографски метод за анализ на Diflunisal

3.3.1 Оптимизиране на метода за изследване

Процедурата за оптимизиране на HPLC метода за количествено определяне на DIF е извършена на база три основни параметъра – неподвижна фаза (хроматографска колона), подвижна фаза (MP) и UV детекция (дължина на вълната).

На база предварителното проучване относно физикохимичните свойства на анализираните вещества както и свойствата на биологичната матрица е направен изборът на няколко типа колони подходящи за анализа. По време на експерименталната работа са правени промени единствено в типа на пълнежа в колона и дължината ѝ, а всички останали параметри са запазени непроменени, за да се оцени единствено тяхното влияние върху хроматографското разделяне. Изпробвани са различни колони с обратни фази – ODS (C18) и OS (C8), като по-добра разделителна способност и чувствителност е установена при ODS в сравнение с OS. Две колони с различна дължина са използвани при разработването на анализа – 150 x 4.6 mm и 250 x 4.6 mm, но като по-подходяща за целите на разработвания метод е избрана колоната с дължина 150 mm във връзка с осигуряване на по-кратко общо време за анализ на всяка проба. Резултатите получени при използването на колони с размер на частиците на пълнежа 5 μm са задоволителни, осигурявайки стабилни и надеждни условия за анализ без риск от запушване на хроматографската колона по време на елуирането на биологични проби. Подходяща за анализа се оказва колоната използвана при анализа на TAF в биологична среда - Purospher[®] RP-C18 (150 x 4.6mm, 5 μm) оборудвана с предколона Guard Column ODS (TR-C-160-1).

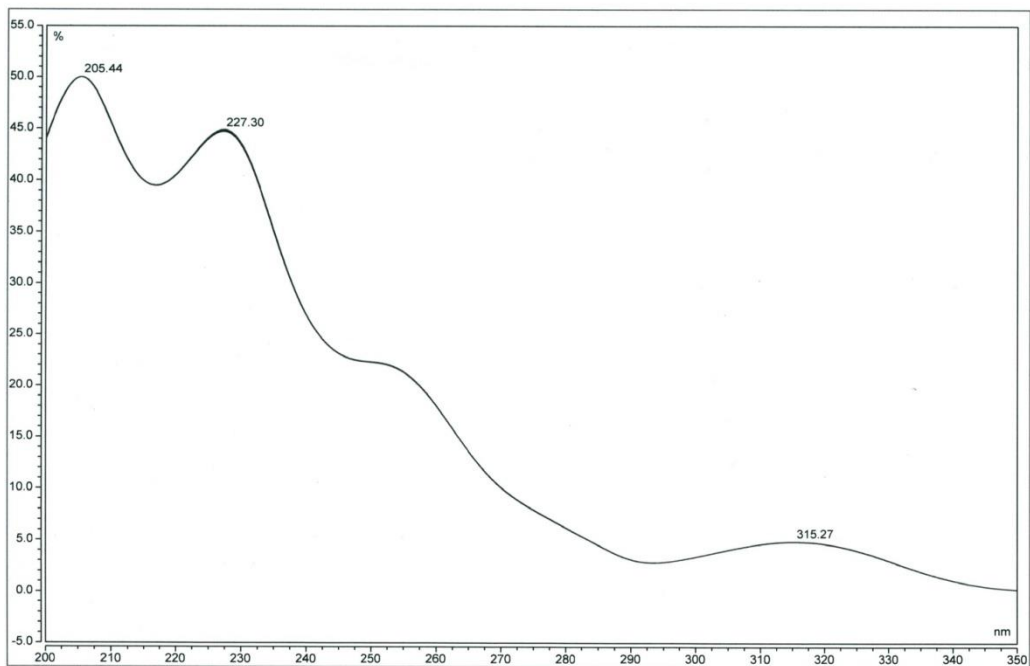
Съгласно предварително събраните литературни данни са тествани различни състави и съотношения на разтворителите в MP. Въпреки че в много от литературните източници, метанолът е предпочитан като органичен разтворител, резултатите получени вследствие на замяната му с ACN са също толкова добри по отношение на запазване на формата и площите на хроматографските пикове. Изследвани са MP със състав 0.01 mol/L HCOONH_4 : ACN, фосфатен буфер pH = 3 : ACN и 0.1% TFA в смес вода : ACN. Фазите съдържащи амониев формиат и фосфатен буфер pH = 3 не показват задоволителни резултати, а получените хроматографски пикове са широки, асиметрични и с прекалено кратко време на елуиране, което прави метода неприложим в биологична среда, тъй като ще се наблюдава едновременно

елуиране на един от двата целеви анализа (DIF и неговият вътрешен стандарт – IS-D) и компонентите на матрицата. Най-добри резултати са получени при използването на третата МР - 0.1% TFA в смес вода : ACN (МР използвана при анализа на TAF). Селективността на метода е оптимизирана чрез вариация в процента на органичния разтворител (от 60 : 40 v/v до 40 : 60 v/v). И тук отново подходящо се оказва съотношението 42 : 58 v/v, тъй като при него се наблюдава достатъчно добро разделяне на вътрешния стандарт от компонентите на матрицата и се осигурява най-кратко аналитично време. Процедурата за анализ е разработена при изократично елуиране и скорост на потока 1.0 ml/min. Използването на по-ниски скорости на потока води до забавяне във времето за анализ и нарушаване на пиковата симетрия. Оценено е и влиянието на температурата върху аналитичната процедура, но не е установено значително подобряване на хроматографските условия при повишаване на температурата до 40°C. Като най-благоприятна и не криеща риск за стабилността на анализиранията вещества и матрицата, стайната температура (25°C) е предпочетена за провеждането на количествения анализ.

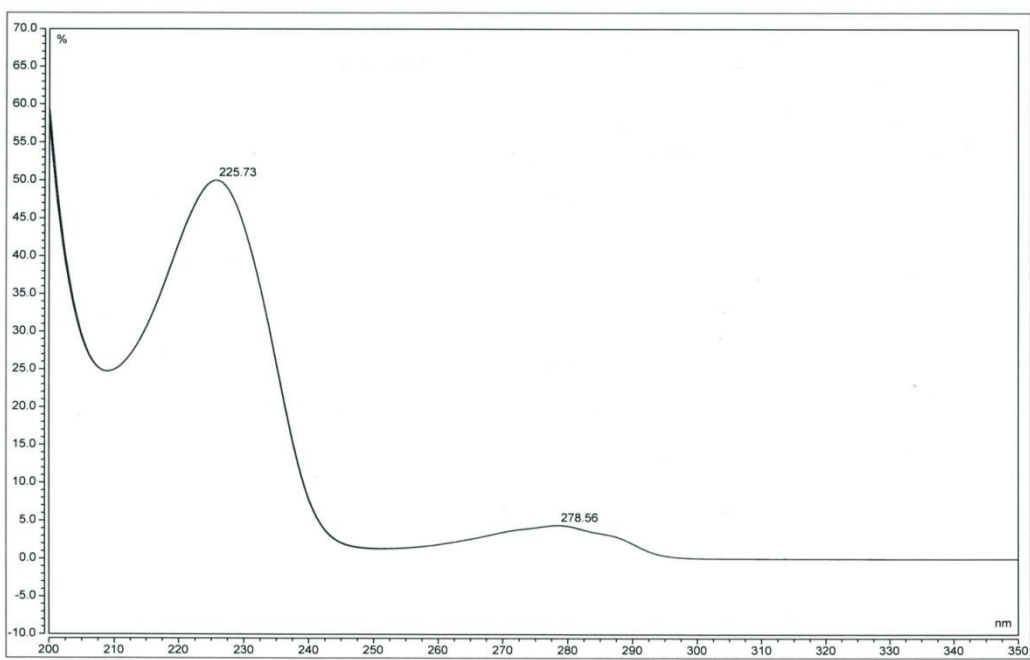
Изборът на оптимална дължина на вълната на UV детектора е базиран на получените спектри на анализите, снети от разтвори на веществата приготвени в метанол (Фигура 12). Като най-подходяща за анализа е определена дължина на вълната 230 nm с наблюдавана максимална абсорбция и при двете вещества и едновременно с това минимално поглъщане от страна на органичните разтворители. Проявените сходства във физичните и химичните отнасяния на TAF и DIF дават възможност за използване на еднакви хроматографски условия за количествения им анализ и възможност за едновременното им определяне при необходимост.

Оптимизираният метод за пробоподготовка използван при анализа на TAF е въведен за приложение и в количествения анализ на DIF. Процедурата се основава на протеинна преципитация с помощта на 1% разтвор на трихлороцетна киселина в ACN, допълнително хомогенизиране на пробата на вортекс и ултразвукова вана, разклащане за 20 min и използване на част от супернатанта, отделен след центрофугирането, за анализ.

А.



Б.



Фигура 12. UV спектри на А. DIF и Б. втрешния стандарт (IS-D)

3.3.2 Валидиране на хроматографския метод

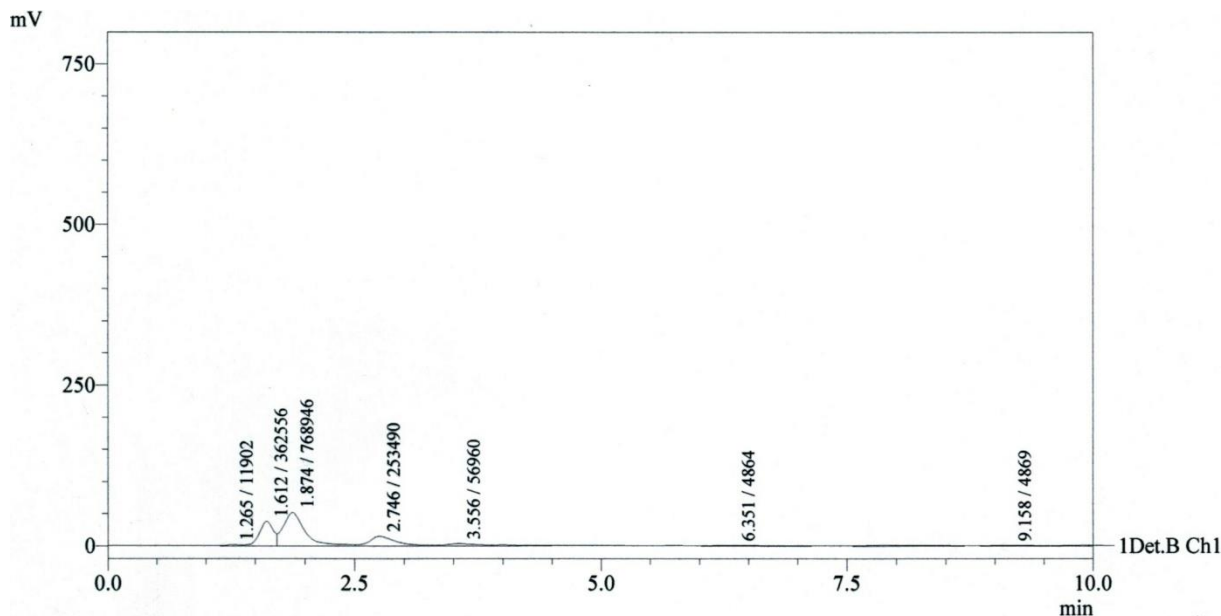
Валидирането на биоаналитичния метод за количествен анализ е осъществено съгласно ICH и ръководствата одобрени от ЕМА и FDA за периода 2018-2019г [1,2]. Включените за определяне референтни параметъри са: селективност, специфичност, линейност, точност, прецизност, граници на откриване и количествено определяне.

3.3.2.1 Предварително зададени критерии за приемане

- Селективност и специфичност - оценена с шест отделни матрици на човешка плазма; допустими стойности са - не повече от 20% от отговора на анализа при LLOQ и не повече от 5% от отговора на IS в пробата LLOQ за всяка матрица.
- Линейност – в рамките на $\pm 20\%$ от номиналната концентрация при LLOQ и в рамките на $\pm 15\%$ при всички останали концентрационни нива, при най-малко 75% от стандартите за калибриране; линейност в определения диапазон, с $R^2 > 0.99$.
- Точност, недостоверност и невъзпроизводимост - в рамките на $\pm 15\%$ от обявената концентрация, с изключение на LLOQ, където тя може да бъде в рамките на $\pm 20\%$.
- Аналитична серия - най-малко 67% от QC пробите и 50% от всяко концентрационно ниво трябва да бъдат в рамките на $\pm 15\%$ от номиналните стойности. Ако тези критерии не са изпълнени, серията се отхвърля.

3.3.2.2 Селективност и специфичност

Разработеният метод е доказан като селективен и специфичен. Не се наблюдава интерфериране от други компоненти (лекарствени вещества) или биологичната матрица във времената на задържане на DIF и IS-D, които при оптимизираните хроматографски условия са добре разделени. Шест различни празни плазмени проби са анализирани за доказване на специфичността на метода, а представителна хроматограма е показана на Фигура 13. От нея ясно се вижда, че във времеви интервал от 3.5 до 10 min не се наблюдават допълнителни интерфериращи пикове във времената на задържане на двата анализа.



Фигура 13. Представителна хроматограма получена при анализа на празна проба

3.3.2.3 Линеиност

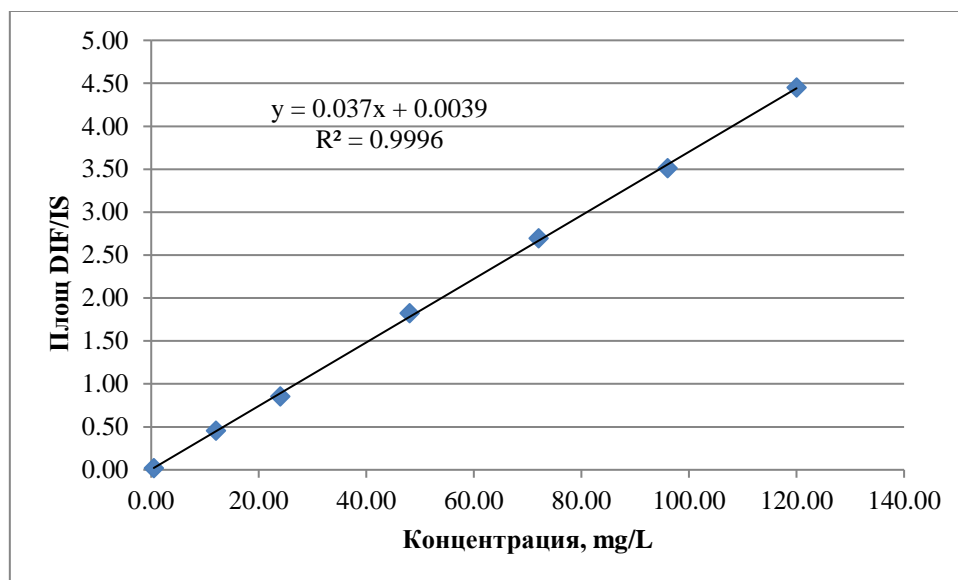
Линеиността на метода е доказана в концентрационния интервал 0.48 – 120.00 mg/L (7 концентрационни нива, трикратен анализ). Резултатите за точността при анализа на всяко концентрационно ниво попадат в интервала от 94.0 до 100.7%, което напълно покрива предварително зададените критерии за приемане (Таблица 14).

Таблица 14. Резултати за линеиност, точност и прецизност за калибрационната права на DIF (n=3)

Концентрация (C), mg/L	$S_{DIF} \pm SD$	Прецизност %	Точност %
0.48	0.50±0.00	0.63	100.13
12.0	12.57±0.03	0.26	100.58
24.0	23.51±0.06	0.27	94.02
48.0	50.33±0.62	1.24	100.65
72.0	74.42±0.74	0.99	99.23
96.0	96.91±1.83	1.89	96.91
120.0	122.88±1.76	1.43	98.30

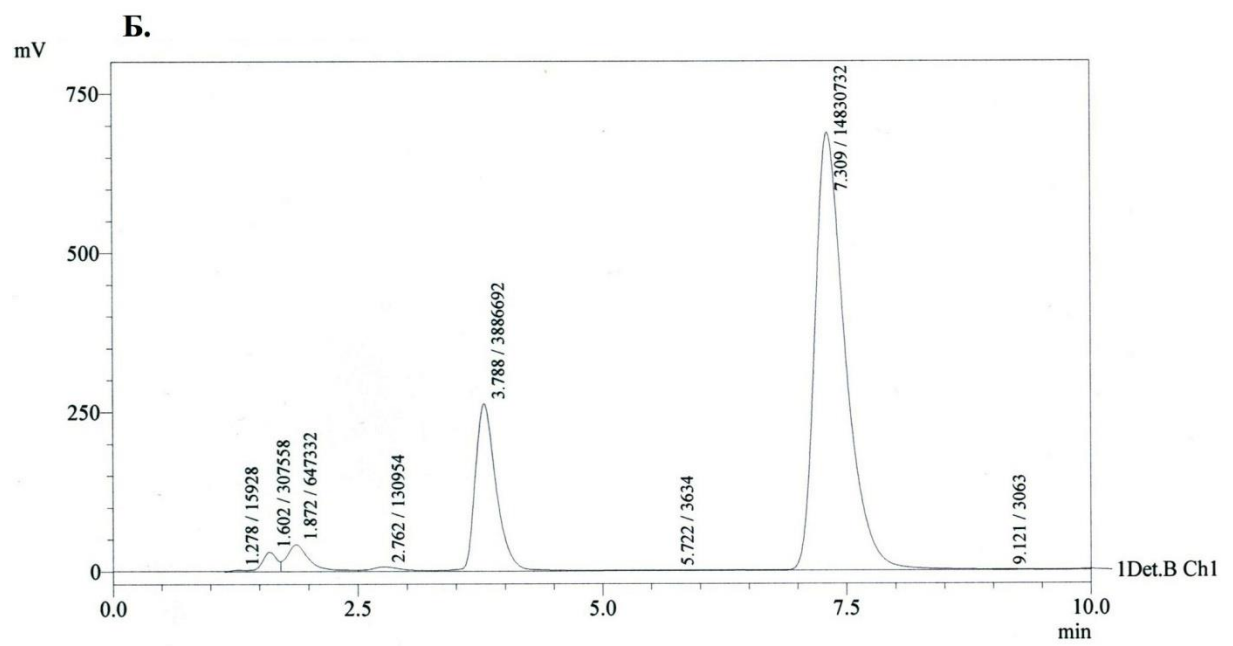
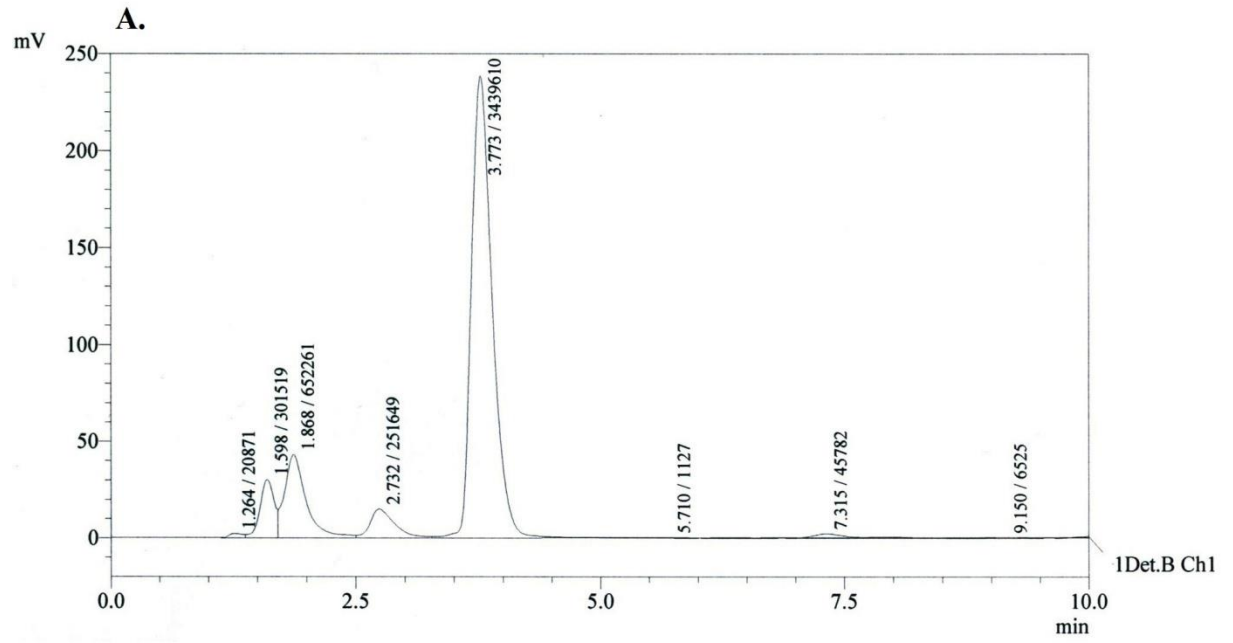
Калибрационната права е построена с помощта на линейна регресия в координати: отношение на площите на DIF и IS-D (S_{DIF}/S_{IS-D}) и концентрацията на разтвора (Фигура 14). Полученият висок корелационен коефициент ($R^2 = 0.9996$) е показател за добра линеиност на метода, а ниската стойност на стандартното отклонение (SD) и наклона ($y = 0.037x - 0.0039$) са индикатори за значителната

валидност на калибрационните точки, използвани за построяване на калибрационната права.



Фигура 14. Калибрационна права на DIF

Изследваните концентрационни нива са 0.48, 12.00, 24.00, 48.00, 72.00, 96.00 и 120.00 mg/L DIF получени след смесването на чиста плазма с работен разтвор на лекарственото вещество, инкубиране при температура 37°C и продължаваща обработка на аликвотна част от разтворите, за получаване на пречистена проба готова за хроматографски анализ. На Фигура 15 А и Б са показани представителни хроматограми получени при анализа на най-ниския (LLOQ) и най-високия калибрационен сандарт (ULOQ). Времената на задържане на DIF и IS-D са съответно 7.3 и 3.8 min.



Фигура 15. Представителни хроматограми на А. LLOQ и Б. ULOQ

3.3.2.4 Точност, достоверност и възпроизводимост

За валидиране на параметрите точност, достоверност и възпроизводимост са изследвани приготвените QC проби при 4 концентрационни нива в рамките на диапазона на калибрационната права: LLOQ (0.48 mg/L), LQC (12.00 mg/L), MQC (48.00 mg/L) и HQC (96.00 mg/L). Валидирането в рамките на серия е проведено чрез анализ на 6 отделни проби от четирите концентрационни нива в един ден, а между сериите - чрез повторен анализ на тези проби в продължение на 3 дни. Данните за неточността и недостоверността и невъзпроизводимостта на метода са обобщени в Таблици 15 и 16.

Таблица 15. Точност, достоверност и възпроизводимост в серия (n=6)

		LLOQ = 0.48 mg/L				LQC = 12.00 mg/L	
Проба №	Концентрация, mg/L	d%	Проба №	Концентрация, mg/L	d%	Проба №	Концентрация, mg/L
1	0.48	-0.08%	1	12.18	1.53%	1	48.42
2	0.50	3.41%	2	12.03	0.29%	2	47.98
3	0.47	-1.39%	3	12.24	1.99%	3	48.14
4	0.51	5.34%	4	12.15	1.25%	4	47.92
5	0.49	2.62%	5	12.08	0.68%	5	47.95
6	0.48	-0.01%	6	11.95	-0.43%	6	48.48
Average	0.49		Average	12.11		Average	48.14
d%	1.65%		d%	0.88%		d%	0.29%
SD	0.01		SD	0.11		SD	0.23
CV%	2.04%		CV%	0.91%		CV%	0.48%
		MQC = 48.00 mg/L				HQC = 96.00 mg/L	
Проба №	Концентрация, mg/L	d%	Проба №	Концентрация, mg/L	d%	Проба №	Концентрация, mg/L
1	48.42	0.87%	1	94.83	-1.21%	1	94.83
2	47.98	-0.04%	2	93.95	-2.13%	2	93.95
3	48.14	0.29%	3	95.94	-0.06%	3	95.94
4	47.92	-0.16%	4	95.22	-0.81%	4	95.22
5	47.95	-0.10%	5	96.30	0.32%	5	96.30
6	48.48	0.89%	6	97.40	1.46%	6	97.40
Average	48.14		Average	95.61		Average	95.61
d%	0.29%		d%	-0.41%		d%	-0.41%
SD	0.23		SD	1.21		SD	1.21
CV%	0.48%		CV%	1.27%		CV%	1.27%

Възпроизводимостта в серия е оценена чрез CV%, който е по-малък от 2.1 % за всички изследвани нива на концентрация, а точността в серия – чрез процентно

отклонение на средната получена концентрация спрямо претеглената (d%), варираща от -0.41 до 1.65%.

Междусерийният анализ също потвърди метода като точен и възпроизводим. Резултатите обобщени в Таблица 16 са групирани за всяка серия от анализи проведени в рамките на три последователни дни и показват CV% по-малък от 2.1% и d% от -1.57 до 1.46%.

Таблица 16. Точност, достоверност и възпроизводимост във време (n=6)

LLOQ = 0.48 mg/L			LQC = 12.00 mg/L		
Серия №	Концентрация, mg/L	d%	Серия №	Концентрация, mg/L	d%
1	0.47	-1.43%	1	12.43	3.57%
2	0.49	1.82%	2	12.10	0.82%
3	0.48	0.47%	3	12.00	-0.01%
Average	0.48		Average	12.18	
d%	0.29%		d%	1.46%	
SD	0.01		SD	0.23	
CV%	2.08%		CV%	1.89%	
<hr/>					
MQC = 48.00 mg/L			HQC = 96.00 mg/L		
Серия №	Концентрация, mg/L	d%	Серия №	Концентрация, mg/L	d%
1	47.82	-0.38%	1	96.22	0.23%
2	48.14	0.30%	2	92.60	-3.55%
3	47.95	-0.10%	3	94.65	-1.40%
Average	47.97		Average	94.49	
d%	-0.06%		d%	-1.57%	
SD	0.16		SD	1.82	
CV%	0.33%		CV%	1.93%	

В заключение може да се потвърди, че точността и прецизността, изчислени за пробите LLOQ и QC, отговарят напълно на предварително зададените критерии за приемане.

3.3.2.5 Граница на откриване и граница на количествено определяне (LOD/ LOQ)

За определяне на LOD се използват два подхода – експериментален и изчислителен. Експериментално LOD се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 2 или 3:1, а изчислително по формулата: $LOD = (3.3 \cdot \sigma) / S$, където σ е стандартното отклонение на измерените стойности, а S е наклона на

калибрационната права. Аналогично LOQ също може да бъде определена експериментално и изчислително. Експериментално LOQ се определя след серия от разреждания при съотношение сигнал/шум 10:1, а изчислително по формулата: $LOQ = (10 \cdot \sigma) / S$. Определените стойности за LOD и LOQ са съответно 0.05 и 0.48 mg/L, доказващи възможността на разработения метод за определяне на следи от лекарственото вещество в кръвна плазма.

3.3.2.6 Тестове за пригодност на системата

Подбраните хроматографски условия осигуряват бързо и ефективно разделяне на DIF и IS-D, доказано чрез извършените тестове за пригодност на системата. За целта е направен шесткратен анализ на калибрационния разтвор с концентрация 48.00 mg/L избран за MQC проба и са определени параметрите: време на задържане (t_R), капацитетен фактор (k), селективност (α), брой теоретични тарелки (N), степен на разделяне (R_S) и пикова асиметрия (tailing factor, T). Обобщените резултати получени след серията анализи са представени в Таблица 17. Определените параметри на хроматографската система, характеризиращи задържането и ефективността на разделяне, отговарят напълно на изискванията на Европейската фармакопея с получени стойности за $k \geq 2.0$, $\alpha \geq 1.3$, $N \geq 2500$, $R_S \geq 2.2$ и $T \leq 1.5$.

Таблица 17. Резултати от теста за пригодност на системата

Параметър	Критерий за приемане	DIF	IS-D
Време на задържане (t_R)	-	7.31	3.78
Капацитетен фактор (k)	Ph.Eur. NLT 2.0	4.75	2.03
Селективност (α)	Ph.Eur. NLT 1.0	1.35	1.69
Брой теоретични тарелки (N)	Ph.Eur. NLT 2000	2725	2517
Степен на разделяне (R_S)	Ph.Eur. NLT 2.0	2.87	2.29
Пикова асиметрия (tailing factor, T)	Ph.Eur. NMT 2.0	1.45	1.39

Ph. Eur.: Европейска фармакопея; NLT: не по-малко от; NMT: не повече от;

3.4 Ограничения свързани с прилагането на метода при българската група пациенти с транстиретинова амилоидоза

До момента DIF има издадено разрешение за употреба от FDA, за приложение на територията на Съединените Американски Щати като нестероидно противовъзпалително лекарство средство (НСПВС), но все още тече процедура за одобряването му от ЕМА като лекарство „сирак” при транстиретинова амилоидоза.

Във връзка с положително становище на ЕМА, изготвено на 12.05.2022 г. от Комитета по лекарствата сираци (COMP) и изпратено към Европейската комисия на 20.05.2022 г., на 24.06.2022 г. е издадено разрешение за вписването на DIF в регистъра на лекарствата сираци под № EU/3/22/2640. [3]

В България, към настоящия момент, DIF не се използва като част от терапевтичната схема при лечение на TTR амилоидоза. Поради тази причина възниква временна невъзможност за прилагане на разработения надежден, бърз и ефективен метод за количествено определяне на лекарственото вещество в биологична среда (кръвна плазма) и адаптирането му в рутинната клинична практика за анализа на пациентски проби. Методът е разработен авансово и ще бъде приложен за количествен анализ и проследяване на плазмените концентрации при българските пациенти с амилоидоза, веднага след завършване на процеса по одобрението му за EU и възможността му за използване в клиничната практика. Несъмнено получените данни по време на терапевтичния лекарствен мониторинг, биха били полезни в контрола на терапията и развитието на усложнения.

4. Заключение

Транстиретиновата амилоидоза е рядко заболяване, чиято терапия е непрекъснато проучвана, изследвана и подобрявана. Целта на настоящото проучване е чрез използването на налични лабораторни и инструментални изследвания да се осъществи клиничен анализ на една от отделните форми на заболяването, причинена от специфична мутация в TTR гена. Патогенният генетичен вариант Glu89Gln е характерен предимно за Балканския регион и област Сицилия в Италия, а сравнително ниския брой на носителите води до ограничения във възможностите за анализ на характерните ѝ проявления и клинични показатели.

Прилаганата терапевтична схема при диагностициран първи стадий на заболяването включва използването на лекарственото вещество Tafamidis с фиксирана доза 20 mg/ дневно при клиничните случаи с проявления на полиневропатия и 61 mg/ дневно - при кардиомиопатия. За определяне на реалните плазмени нива на лекарственото вещество в българската кохорта пациенти носители на Glu89Gln мутацията е разработен течнохроматографски метод за количествено определяне. Разработеният метод е валидиран съгласно изискванията на Международната конференция по хармонизация по параметрите селективност, линейност, точност, прецизност, граница на откриване и граница на определяне, а получените резултати, отговарят напълно на изискванията на Европейската фармакопея. Намерените оптимални хроматографски условия за анализ на Tafamidis са подходящи и за количествено определяне на НСПВС – Diflunisal, прилагано извън разрешението му за употреба при транстиретинова кардиомиопатия.

Лекарственото мониториране позволява поддържане на лекарственото вещество в терапевтични граници, а съпоставянето на установените концентрационни нива и специфични клинични показатели може да се използва за предсказване на бъдещото развитие на клиничните прояви при отделните пациенти, прогресията на заболяването във времето и индивидуализацията на дозовия режим с потенциал да се забави още по чувствително прогресията.

5. Изводи

- 5.1** Разработен и валидиран е високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Tafamidis в кръвна плазма, отговарящ на всички индустриални и клинични изисквания за терапевтичен лекарствен мониторинг.
- 5.2** Разработен е и е валидиран високоефективен течно-хроматографски метод за количествено определяне на Diflunisal в кръвна плазма, отговарящ на всички индустриални и клинични изисквания за терапевтичен лекарствен мониторинг.
- 5.3** Изследваната в продължение на три години връзка между плазмената концентрация на Tafamidis и някои клинични характеристики на пациентите с доминантната Glu89Gln мутация показва статистически и клинично значимо въздействие на пола и възрастта, с потенциал за индивидуализиране на терапията.
- 5.4** Проследените за период от три години концентрации на Tafamidis при българските пациенти с мутациите Val30Met, Ser77Phe и Gly47Glu показваха аналогична тенденция за възрастово и полово обусловени въздействия, които не достигнаха статистическа значимост поради малкия брой наблюдения.

6. Приноси

- 6.1 Разработен и валидиран е надежен и бърз метод за количествен анализ на Tafamidis в биологична среда – кръвна плазма, позволяващ адаптирането му за системно проследяване на голям брой пациенти.
- 6.2 Разработен и валидиран е надежен и бърз метод за количествен анализ на Diflunisal в биологична среда – кръвна плазма, позволяващ приложението веднага след разрешението за употреба като транстиретинов инхибитор.
- 6.3 В продължение на 3 години са проследени концентрационно български пациенти, диагностицирани с транстиретинова амилоидоза - група от 52 болни с генетично потвърдено носителство на мутацията Glu89Gln, както и помалобройна кохорта с други три минорни мутации, всички лекувани с Tafamidis, при които се доказаха възможностите на фармакокинетичния мониторинг като подход за оптимизиране на терапията.
- 6.4 За първи път се установи връзка между равновесните плазмени концентрации, пола и възрастта на пациентите, показваща потенциал за забавяне на болестната прогресия чрез индивидуализация на дозовия режим.
- 6.5 Въз основа на проведените наблюдения и установените връзки се формулира хипотеза за зависимостта между плазмените концентрации и хода на болестта с предложение те да се поддържат в прицелния диапазон от 5-6 $\mu\text{mol/L}$.

7. Библиография

1. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Bioanalytical Method Validation: Text and Methodology M10, Current Step 2b version, June 2022. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf
2. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. May 2018. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration [cited: August 2022]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
3. ema.europa.eu [Internet] European medicines agency, Science medicine health, EU [cited 2022 September 21] Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-22-2640>

8. Списък на публикациите и участията, свързани с дисертационния труд

8.1 Публикации в научни списания

- 8.1.1 Smerikarova M, Bozhanov S, Maslarska V, Tournev I.** Determination of Tafamidis Plasma Concentrations in Amyloidosis Patients with Glu89Gln Mutation by HPLC-UV Detection. *J Chrom Sci*, 2022; 60(9):840-847. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab132> , **IF(2021)=1.555**
- 8.1.2 Smerikarova M, Bozhanov S, Maslarska V.** A brief review of analytical methods for the estimation of TTP kinetic stabilizers in pharmaceutical formulations and biological matrices. *Int J Appl Pharm*, 2022; 14(5):14-21. <https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i5.45612> , **SJR(2021)=0.181**
- 8.1.3 Smerikarova M, Bozhanov S, Maslarska V.** Validation of Rapid and Simple HPLC-UV Method for Diflunisal Determination in Bulk Drug and Human Plasma. *Indian J Pharm Edu Res*, 2023; 57(1):xx-xx – одобрена за печат, **IF(2021)=0.683**

8.2 Участия в научни конференции

- 8.2.1 Представен е постер на международната конференция „2020 International Conference on Biotechnology and Bioengineering”, 10th ICBB Dec. 16-18, 2020 Webinar (online) на тема „Analytical Methods for the Determination of the Transthyretin Kinetic Stabilizer Tafamidis in Biological Fluids: A Review.”** с публикувано резюме в допълнение към редовно издание на списание *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*.
Smerikarova M, Bozhanov S, Maslarska V. Analytical Methods for the Determination of the Transthyretin Kinetic Stabilizer Tafamidis in Biological Fluids: A Review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021, 128:14-14, **IF(2020)=4.084**

8.3 Участия в научни проекти

- 8.3.1 Проект на тема „Отговор на терапията с Tafamidis при наследствената транстиретинова амилоидоза дължаща се на патогенния генетичен вариант Glu89Gln характерен за българската кохорта пациенти със смесен фенотип.“** с ръководител на проекта: доц. Ваня Николова Масларска и членове на колектива: проф. Ивайло Людмилов Търнев, доц. Мариана Василева Господинова-Миланова,

доц. Цветанка Петрова Дончева, гл. ас. Вера Илиева Дамянова, гл. ас. Драгомира Николаева Николова, гл. ас. Станислав Руменов Божанов, **ас. Миглена Василева Смерикарова. Финансираща организация - Медицински Университет – София, СМН; № на Договора и година на стартиране - Д-121/24.06.2020 г.** Получените научни резултати по проекта са оценени с „отличен”.

9. Декларация за оригиналност

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Долуподписаната, Миглена Василева Смерикарова, докторант на самостоятелна подготовка в Катедра по клинична лаборатория на Медицински факултет, Медицински университет – София, във връзка с провеждането на процедура за придобиване на образователна и научна степен „доктор” в Медицински университет – София

Декларирам, че:

1. Представеният дисертационен труд съдържа оригинални резултати, получени при проведени от мен научни изследвания (с подкрепата и съдействието на научните ми ръководители).
2. Използваните литературни източници са надлежно и подробно цитирани в библиографията, без нарушение на авторските права.
3. Резултатите и приносите, представени в разработката, са оригинални и не са заимствани от изследвания и публикации, в които нямам участие.
4. Настоящата дисертация не е прилагана за придобиване на научна степен в друго висше училище, университет или научен институт.

Дата: 30.11.2022 г.

гр. София

Декларатор:.....

10.Благодарности

Изказвам своята дълбока признателност и сърдечни благодарности към научните ми ръководители проф. д-р Добрин Аврамов Свинаров, дмн и доц. Ваня Николова Масларска, дф за напътствията и професионализма в осъществяването на дисертационния труд. Благодаря за споделените опит, знания и вдъхновение!

Благодаря на проф. д-р Ивайло Людмилов Търнев, дмн, началник на Клиниката по неврология при УМБАЛ „Александровска”, д-р Стайко Сарафов, Лабораторията по ликворология и неврогенетика към същата клиника и колегите, с които работих пряко, за съдействието по реализирането на настоящия труд!

Благодаря на моето семейство за обичта, подкрепата и търпението!!!