

**ДО ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНОТО ЖУРИ
ПРОФ. Д-Р ПЕТКО ПЕНКОВ МАРИНОВ, дм**

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема

„Нови аспекти в течнохроматографския анализ на Сареситабине в проби от биологичен и небιологичен произход”

от проф. д-р Камен Петров Канев, дмн

Предоставеният за рецензиране дисертационен труд на тема **„Нови аспекти в течнохроматографския анализ на Сареситабине в проби от биологичен и небιологичен произход”** е за присъждане на образователната и научна степен „доктор“. Разработката е в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление „7.3. Фармация”, научна специалност „Токсикология”. Поради естеството си, става въпрос за едно подчертано интердисциплинарно проучване върху възможностите за приложение на някои от съвременните инструментални методи за химически анализ за целите на клиничната токсикология и съдебната медицина. Конкретно, разглеждат се методите за идентификация и определяне на Сареситабине в биологични и небιологични проби, което по същество попада в съвременното научно направление „аналитична токсикология” (Analytical toxicology). Разглеждат се основните проблеми при реалното идентифициране и количествено определяне на Сареситабине за целите на спешната медицина, клиничната токсикология и химико-токсикологичната експертиза.

Дисертационният труд е посветен на важна и актуална тематика – съвременното лечение на злокачествени заболявания с медикаменти от флуоропиримидиновият клас цитостатици, с основен представител антинеопластикът Сареситабине (САР). Получените при разработването аналитични процедури и методики за откриване и количественото му определяне позволяват и своевременно представяне на резултатите на лекуващия лекар.

Дисертационният труд обхваща 166 стандартни машинописни страници и съдържа 36 фигури, 24 таблици и 2 схеми. Книгописът включва 313 цитирани литературни източника, от които 10 на кирилица и 303 на латиница. Основните резултати са отразени в 3 излезли от печат научни публикации, в които докторантът е водещ автор и в 7 участия, свързани с дисертационния, представени на национални и международни научни форуми.

При биомониторирането на САР и/или неговите метаболити, метод на първи избор се явява високоефективната течна хроматография, предшествана от подходяща процедура за пробоподготовка. Предпоставка за това са медико-правните последици, както и изискванията за висока аналитична надеждност на

фармако-токсикологичните изпитвания. Дисертационният труд има научно-приложен характер, като са предложени нови подходи за анализ на САР, съобразени със съвременните световни здравни норми и потребности.

Литературният обзор е представен на 45 страници. Развит е в няколко подраздела: актуални данни относно разпространението на раковите заболявания и употребата на цитостатични лекарства в световен мащаб; основни принципи и токсични аспекти на съвременното цитостатично лечение; същност на САР – базираната цитостатична терапия; критичен анализ на докладваните течнoхроматографски методи за качествено и количествено определяне на САР в проби от биологичен и необиологичен произход; изводи от литературния обзор. Следователно поставените цел и задачи за разработка и внедряване на методи за токсикологичен анализ се явяват актуални и от съществено практическо значение. Извършената литературна справка показва, че едно адекватно решение на поставените задачи може да бъде постигнато чрез използването на съвременните течнoхроматографски методи за анализ. За идентификация на целевите съединения и техните метаболити в биологични матрици като златен стандарт е възприета течната хроматография. Основните усилия са съсредоточени върху критичната преработка на наличните схеми за анализ, особено по отношение на пробоподготовката и валидирането на методиките, представляващи обект на настоящата дисертация, от които произтичат иманентно поставените цел и задачи. Цел на предствения дисертационен труд е да се разработят течнoхроматографски методи за: - Анализ на САР и неговия първи метаболит (5-DFCR) в плазмени проби от експериментални животни; - Проследяване повърхностното замърсяване с цитотоксичния агент САР в професионални условия; - Качествено и количествено определяне на САР в таблетни лекарствени форми. Във връзка с постигането на поставената цел, се предвижда да бъдат изпълнени следните групи задачи: 1. Разработване на селективен течнoхроматографски метод за определяне на САР и неговия метаболит 5-DFCR в състава на плазмени проби от експериментални животни; 2. Разработване на селективен течнoхроматографски метод за определяне професионалната експозиция с САР; - 3. Разработване на селективен течнoхроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми.

Литературният обзор представлява един обстоен и завършен сам по себе си преглед на темата. Проучени са основни аспекти в световен и национален мащаб като същите имат приносен характер. Освен повишаването на ефективността по отношение на текущо регламентираната дейност, внедряването на разработените методики за токсикологичен анализ ще допринесе за събирането на актуална информация и ще може да се осъществи токсикологичен мониторинг при лечението на остри интоксикации. Направеният задълбочен подробен анализ на посочените направления позволява на докторанта да идентифицира нерешените проблеми и новите

насоки на научноизследователска работа в областта.

Целта и задачите са актуални и адекватно формулирани и решаването им води до решаването на поставения проблем, който произтича иманентно от посочените нерешени проблеми в литературния обзор.

Разделът „Собствени резултати и обсъждане” обстойно и научно обосновано анализира и изследва трите основни направления – 1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR в проби от миша плазма; - 2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с САР; - 3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми. Независимо, че всяко едно от тези направления намира приложение в химико-токсикологичния анализ и се използва в ежедневната практика, трите направления са организирани при изложението в три отделни раздела, тъй като практическото им приложение формира трите основни компонента. Това разделение се обуславя както от валидирането на съответните методики и така и от общественото значение на събираните епидемиологични данни.

В раздела течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR в проби от миша плазма са установени множество фактори, повлияващи пусковия стадий от каскадата на активиране на САР. Методиката за валидиране е разработена върху серия проби от кръвна плазма, предварително обработени ("затровени") чрез добавянето на аналитичен стандарт оптимизиране на всички преаналитични и аналитични етапи способстват за постигнатето на удовлетворяващи резултати в условията на проведения *in vivo* експеримент. Представените данни са аргумент за възприемането на апробационния етап като успешен. Тя се оказва подчертано устойчива по отношение на отклонения от номиналните параметри - обеми, концентрации и съотношения на използваните реагенти; някои стъпки при кондиционирането и промиването изобщо могат да бъдат пропуснати без фатални последици за анализа. Всъщност анализа на цялото разнообразие е сведено до няколко етапа с минимум възможни алтернативи: два принципни подхода при подготовката на пробата и два принципни подхода при химическата дериватизация.

Обобщено, резултатът може да бъде представен по следният начин, а именно на база наблюденията можем да заключим, че предложеният поток за работа следва да бъде от полза при *in vivo* изследвания, свързани с проследяване първия стадий на пролекарствено активиране, както и такива, насочени към преодоляване САР-обусловената гастро-интестинална токсичност с помощта на селективни CES2-инхибитори. Зачестяването на установени множество фактори, повлияващи пусковия стадий от каскадата на активиране на САР, свидетелства за нарастващия брой едностранни нуклеотидни полиморфизми, сочени като важен индикатор за терапевтичния ефект и профила на безопасност на пролекарството.

В следващата глава докторанта анализира адаптирането, оптимизирането

и валидиране на аналитични методики за определяне на цитостатични вещества. Хроматографската идентификация на токсичната нокса е в помощ на правилната диагноза и отстранява елементите на несигурност при избора на профилактично-терапевтичния подход. При идентификацията на повечето онко медикаменти, съобразявайки се с молекулния състав, физикохимичните свойства и стабилността на обекта на анализ – САР, се очертава, че HPLC е най-удачен метод за точно и прецизно определяне на ниски концентрации от анализа в състава на смивни проби. Поради тази причина най-удачна е точно тази аналитична техника в съчетание с детекция в ултравиолетовата област за целите на проучването си. Съобразно правилата за осигуряване на безопасни условия са адаптирани съчетанието от подвижна и неподвижна фаза, използвани при анализа на биологични проби. Количественото определяне в кръвна плазма се извършва чрез HPLC по оптимизирана методика чрез два детекционни подхода, съответно приложими и валидирани, като количественото определяне става по метода на външния стандарт. Работата с един и същ метод дава възможност да се извърши мониторинга непосредствено след интензивна научноизследователска дейност с участието на САР.

Безспорно една от най-силните страни на дисертационния труд е изработването на интегриран подход за приложение на разработените аналитични процедури от практиката. За решаването на тази задача са разгледани, оценени и анализирани поетапно, както специализираните подходи при пробовземане, извличане на активната съставка и детекцията ѝ, така и медицинска информация и компютърните информационни технологии. Получените резултати осигуряват от една страна на проведените тестове за точност и прецизност от друга също затвърждават надеждността на адаптирания метод.. Очевидната необходимост от устойчивото им доказване при покриването на критериите за пригодност на системата за анализ, постигнатите резултати са категорично доказателство за удачното комбиниране на процедури в преданалитичния и аналитичния етап и потвърждава валидирането на включените аналитични процедури. В тази връзка докторантът предлага последователен алгоритъм, подходящ за специализираното аналитично звено в съответното здравно заведение, при което специалистите да са сигурни в повторемостта на резултатите – токсиколози, лекари с токсикологичен опит или такава насоченост, фармацевти, химици и др.

Съществена част от приноса на докторанта е адаптиране и опростяване на процедурите за пробоподготовка на биологичните проби, оптимизиране на подхода по отношение на времеемкост и себестойност на анализите и валидиране на окончателните аналитични методики. Освен това предлага и апробирани и внедрени в практиката работни протоколи за бърз и прецизен анализ на най-често срещаните на конкретен вид проби със физикохимичните свойства на антинеопластика, налагащи употребата на лични предпазни средства. Предназначението на информационните резултати от токсикохимическите изследвания е да запазят биологичните проби достатъчно дълго за медицински нужди. Освен това предложението от докторанта

аналитичен вариант съдържа медицинска информация свързана с комплекса от симптоми. Реализираните на този тип методи по-скоро дава информация за замърсяването на работната среда, като потенциален източник на излагане без да доказват наличието на цитостатици и/или техни метаболити в организма на работещия персонал. Уместно е въвеждането на предложената методика в друго звено, да бъде предхождано от предварителна оценка на пригодността на процедурата, особено в случаите, в които се използва друг тип материал за пробонабиране; при които се изследват и друг тип повърхности; когато се използва друг десорбционен разтворител или ако методиката се взаимства за определянето на друг цитотоксичен агент, съобразно с обективното състояние на проблема с цитостатичната експозиция.

В третата глава авторът е разработил течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР в таблетни състави. Предложената аналитична процедура е съобразена с производствените спецификации и природата на лекарствената форма. Данните, получени от анализа на серия стандартни и тестови разтвори на САР са използвани за обща оценка на така предложенния метод, както и за неговото валидиране. По този повод са изпълнени оптимизационни задачи, касаещи преданалитичния и аналитичния етап на работа, което позволява на докторанта да заключи, че аprobационният етап е успешен, както и че представеният аналитичен протокол за работа може да бъде използван КК-изпитвания, удостоверяващи количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми.

Въз основа на рекапитулация на получените резултати и концентрираното им обобщаване в синтезиран вид докторантът прави заключението, че представеният аналитичен протокол може да бъде част от изпитвания за биеквивалентност, мониториране количеството на САР в процеса на съхранение, както и при съмнение за произхода на продукта.

Много подходящо приносите са изведени в отделна глава, което позволява да се открий по-силно значимостта на дисертационния труд за регламентираната дейност относно дозо-зависимите ефекти на хронична цитостатична експозиция при здрави хора. Представените приноси са с оригинален научен, научно-приложен и потвърдителен характер, общо 9 на брой. Съгласен съм с изложените приноси, които са значими за дейността с цитостатици и ефекта от замърсяването на работната среда, като са резултат на извършена за първи път дейност в България с конкретни научно-приложен и практичен характер. Препоръчително е приносите да се разделят, съобразно характера им.

Съвсем коректно, в главата „Изводи”, в 3 точки докторанта е посочил изводите относно трите основни раздела на дисертационния труд. Смущаващ е броят им 9 към първия раздел, 7 към втория и 5 към третия или общо 22 извода. Разбира се, подсказката в тази насока включва и оказващите научно ръководство за придобиването на образователно-научната степен „доктор”

Критичните ми бележки, отнасящи се до стойността на дисертационния труд касаят елементи от структурното оформление. Считаю, че на места в глава

„Изводи” и глава Приноси” се повтаря част от информацията, но това не намалява значителната ѝ стойност, но не дава основание за определянето на приносите като такива с оригинален характер, както и бройката на направените изводи.

Авторефератът е съставен съобразно изискванията, като отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд. По темата на дисертационния труд са публикувани основните резултати в 3 излезли от печат научни публикации, в които докторантът е водещ автор. Материали по темата са презентирани и в 7 научни форума, в страната и чужбина. Научните публикации са издадени в авторитетни издания. Докторантът има и участие в научен проект „Изследване влиянието на специфични карбоксилесте-разни инхибитори върху ефективността на химиотерапията с Сареситабин“, съвместен научен проект (2019 г. – днес) на Катедра Фармакология, токсикология и фармакотерапия (към Фармацевтичен факултет на МУ-Варна) с Институт по Експериментална Морфология, Патология и Антропология с Музей (към Българска академия на науките, гр. София).

В заключение, считам че представеният дисертационен труд на тема **„Нови аспекти в течнохроматографския анализ на Сареситабин в проби от биологичен и небиологичен произход”** е на актуална тема. Разработката е в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление „7.3. Фармация”, научна специалност „Токсикология”. Научната стойност произтича от направените проучвания, изводи и препоръки, както и от приносите. Трудът е аналитичен и завършен в заключенията си. Езикът е гладък, ясен и точен. Притежава необходимите наукометрични качества за присъждане на образователната и научна степен „доктор”, в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление „7.1. Медицина”, научна специалност „Токсикология”.

Давам положителна оценка на работата и препоръчвам на председателя и членовете на уважаемото научно жури да гласуват за присъждане на образователната и научна степен „доктор” на маг. фармацевт Станила Серъжева Стоева, Медицински университет, „Проф. д-р Параскев Стоянов” - Варна.

РЕЦЕНЗЕНТ:

/проф. д-р Камен Канев/, Началник
на Катедра „Токсикология”, ВМА – София