



С Т А Н О В И Щ Е

ОТ доц. д-р Иван Тодоров Ламбев, дм, Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет – София (п.к. 1431, ул. „Здраве“ 2)

НА дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“ в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт“, професионално направление „7.1. Медицина“ и докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Автор: асистент д-р Нина Димитрова Дончева

Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка

Катедра: Фармакология и лекарствена токсикология, ФФ, МУ – Пловдив

Ръководител Катедра: Проф. д-р Л. Пейчев, дм и мзм

Тема: „Сравнително експериментално изследване на аналгетично и противовъзпалително действие на средства, прилагани за съпътстваща терапия на болката“

Научен ръководител: Проф. д-р Дамянка Петева Гетова–Спасова, дм и дмн

1. Общо представяне на процедурата и докторантката

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита от разширен Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив, състоял се на 06.06.2016 г. Д-р Н. Дончева е *отчислена с право на защита* със Заповед № Р-1514/28.06.2016 г. на Ректора на МУ – Пловдив.

Настоящата процедура е съобразена с чл. 30^{та}, ал. 3 от Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България, чл. 31, ал. 1 от същия Правилник във връзка с провеждане на процедура за присъждане на ОНС „Доктор“ и заповед 1707/18.07.2016 г. на Ректора на МУ – Пловдив чл.-кор. проф. д-р Стефан Костянев, дмн.

Представеният комплект материали е в пълно съответствие с чл.115, ал. 1 от Процедурата за придобиване на ОНС „Доктор“ в МУ – Пловдив и Правилника на същия Университет от 06.11.2014 г. Докторантката е представила в срок всички необходими документи в принтиран вид, а дисертацията и автореферата – още и в електронна форма. Структурата на представения научен труд и на автореферата са съобразени със законовите изисквания. Нямам съвместни публикации с авторката.

Д-р Нина Дончева е родена в гр. Пловдив (1972). Завършва гимназия в родния си град (1991 г.) и хуманна медицина в Тракийски университет – Ст. Загора (диплома № 000715/1997 г.). От 2000 до 2002 г. работи като *участков лекар* в ДКЦ-1 – Пловдив, а от 2002 до 2007 г. е *медицински представител* във фармацевтичната компания "GlaxoSmithKline" у нас. От м.

юни 2007 г. (след конкурсен изпит) е *асистент* в Катедра „Фармакология и лекарствена токсикология“ при ФФ на МУ – Пловдив. През 2012 г. придобива *научната специалност Фармакология* (вкл. фармакокинетика и химиотерапия).

Общият трудов стаж на д-р Н. Дончева е 16 г., от които 9 г. *като асистент*. Тя е отговорник по административната дейност и катедрен администратор по качеството на обучение. Участва с *водене на практически упражнения* в обучението по фармакология на студенти по фармация, хуманна и дентална медицина, а също и по токсикология на студенти по фармация. Участва също в *семестриалните изпити* по фармакология и в подготовката на сборници с *тестове и рецептурни задачи*.

Активно участва в *научно-изследователската дейност на Катедрата*. Има 8 статии в реферативни журналы и 17 в конгреси, 6 разширени резюмета с импакт фактор и др. Д-р Нина Дончева *притежава много добри аналитични, компютърни и комуникативни умения, вкл. работа в екип*. Тя е усвоила *редица експериментално-фармакологични и други методи със специализирана научно-изследователска апаратура*. Владее говоримо и писмено *английски и руски език*, което ѝ позволява да борава бързо и лесно с научна литература.

2. Актуалност на тематиката и конкретните задачи, разработени в дисертацията

Болката е един от най-честите симптоми, поради който пациентите посещават лекаря. За нейното облекчаване и лечение, което е фундаментално право на всеки човек, се използват *лекарства от различни групи*: аналгетици (ненаркотични и опиоидни), противовъзпалителни средства (НСПВС и ГКС), някои антидепресанти и антиконвулсанти, анестетици (локални и общи), а също спазмолитици, централно действащи миорелаксанти, органични нитрати, адюванти средства (анксиолитици, невролептици, някои фитопродукти, невротропни витамини – В₁, В₆, В₁₂); нефармакологични методи (хирургични, физични, биофизични); методи на алтернативната медицина (акопунктура, хомеопатия) и др. Много често и особено *при редица социално значими заболявания болката (ноцицептивна или невропатична) е свързана с остър или хроничен възпалителен процес*.

Затова изследванията върху различните видове болка според тяхната патогенеза, локализация и етиология, методите и средствата за нейното овладяване са изключително актуални. Те са предмет на задълбочени изследвания както в чужбина, така и у нас, където през последните 5 г. бяха защитени две дисертации с ръководители чл.-кор. М. Власковска и проф. Сл. Сурчева, посветени на *механизъм-насоченото лечение на болката при различни експериментални модели*.

Изключително актуална е и темата на настоящия дисертационен труд, посветен на сравнителни експериментални изследвания на аналгетичното и противовъзпалителното действие на средства, прилагани за съпътстваща фармакотерапия на болката.

Основаната цел на д-р Нина Дончева е сравняване на аналгетичния и противовъзпалителния ефект на бенфотиамин (провитамин В₁ с висока перорална бионаличност), ендегенния антиоксидант тиоктова (алфа-липоева) киселина, антиконвулсанта габапентин и общия анестетик кетамин (антагонист на NMDA-рецепторите) при еднократно и многократно приложение при адекватно подбрани експериментални *модели на болка и на възпаление при плъхове*, всеки от които представлява **конкретна задача**. *Общото в използваните лекарства е, че те се прилагат като съпътстващо лечение на невропатична болка при захарен диабет, herpes zoster и др, която се*

наблюдава при около 1% от населението. А нейната фармакотерпия все още остава неефективна.

3. Познаване на проблема (литературен обзор)

Д-р Дончева оценява вярно състоянието на изследвания проблем и използва творчески специализираните литературни източници. Това проличава още във въведението (където се дефинира и класифицира болката) и най-ярко се разкрива в литературния обзор.

С вещина се дискутират участието на невротрансмитера глутамат (стимулиращ йонотропни и метаболотропни рецептори) и проинфламаторните цитокини (IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 и TNF- α) в патогенезата на болката и възпалението. Изтъква се, че NMDA-рецепторите медиат продължителните болкови реакции при експериментални модели и различни симптоми на хронична болка при клинични проучвания. IL-6 превръща активираните В лимфоцити в имуноглобулин-продуциращи лимфоцити. При това при остро възпаление IL-6 действа антиинфламаторно, а при хронично – проинфламаторно.

Уловени са много фини научни аргументи, с които се обосновава ефективността на препаратите бенфотиамин (блокиращ пътя на хипергликемично увреждане на периферните нерви), алфа-липоева киселина (проявяваща атиоксидантна и невропротективна активност), габапентин (потенциращ вероятно спиналния инхибиращ невротрансмитер глицин) и кетамин (блокиращ NMDA-глутаматните рецептори) при третиране на периферна невропатична болка и при възпаление.

Дискутират се различни експериментални модели за изследване на *остра ноцицептивна болка и възпаление*, предизвикани с дразнене най-често на задната лапка или опашката на гризачи с електрични правоъгълни прагови импулси, топлинни стимули (с лъчиста топлина, гореща вода или плоча, студени стимули), механични или различни химични стимули (например с вътрекожно инжектиране на формалин, интраперитонеално инжектиране на брадикинин, оцетна киселина) и др.

Отделно се дискутират експериментални модели на хронична периферна невропатична болка (аксотомия, хронична констриктивна травма, частично лигиране на седалищния нерв, лигиране на гръбначно-мозъчен нерв, крионевролизис на седалищен нерв, фотохимично- или лазерно-индуцирано увреждане на седалищен нерв и др.), а също експериментални модели на централна невропатична болка (ексцитотоксично или фотохимично увреждане на гръбначния мозък).

Специално внимание се отделя на различни *лекарствени невропатии* (предизвикани с някои химиотерапевтици, антиретровирусни средства и др.) и *болест-индуцираните невропатии* при експериментален захарен диабет, остеогенен и кожен карцином, varicella-zoster инфекция, етанолова невропатия.

4. Методика на изследването

Разделът "**Материал и методи**" е описан върху 10 страници (= 8% от дисертацията). Експерименталните изследвания са проведени в Катедрата по фармакология и лекарствена токсикология и в Научно-изследователския център по имунология към Катедрата по микробиология и имунология на Медицински университет – Пловдив, като последното е отбелязано по колегиален и етичен начин, вкл. с *изказване на благодарност*.

Експериментите са проведени върху 496 мъжки бели плъха порода Wistar с т.м. 170–220 g при стриктно спазване на изискванията и правилата за работа с лабораторни животни. В отделните групи са използвани по 8 животни. Бенфотиаминът е прилаган перорално, а алфа-липоевата киселина, габапентинът и кетаминът – i.p. При по-голямата част от опитите тези лекарства са прилагани в 3 различни дози, което позволява намиране на доза-ефект зависимост с висока степен на достоверност. За сравнение като еталонен ненаркотичен аналгетик при моделите на болка е използван *метамизол*, а при тези с експериментално възпаление – *диклофенак*. Аналгетичната активност на препаратите е изследвана както върху интактни плъхове, така също върху модел на невропатична болка с лигиране на седалищния нерв.

Аналгетичният ефект на веществата е изследван при еднократно и многократно (14-дневно субхронично) приложение върху подходящи експериментални модели на ноцицептивна и невропатична болка, а също на възпаление. При липополизахарид-индуцирано възпаление получените данни са отчетени посредством ензимно-свързан имуносорбентен тест (ELISA), позволяващ количествено определяне на проинфламаторни цитокини (TNF- α , IL-6) в серума. Прецизно са посочени производителите на използваните тест-субстанции, реактиви и лекарства.

Оригиналният дизайн на експериментите и рационално подобрите методи на изследване позволяват постигане на целите и получаване на адекватен отговор на задачите на дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е принтиран на 127 *стандартни страници*, формат А4. Той е онагледен с 34 фигури и 15 таблици. Библиографията обхваща 238 *литературни източника*, два от които са на български език и 236 на латиница. От всички цитирани източници 73 са през последните 10 г. и 17 през последните 5 г.

Литературният обзор е написан на 40 страници (= 31.49% от цялата дисертация), което позволява нейното много добро качествено и количествено структуриране. Разделите "**Резултати**" (27 стр.), "**Обсъждане**" (20 стр.) и "**Заклучение**" (3 стр.) са разгърнати върху 50 страници, респ. обхващат около 40% от научния труд.

Получените експериментални данни са коректно описани и онагледени. На фигурите са показани стандартната грешка и отклонение. Анализът и тяхното обсъждане е задълбочен. Дисертантката аргументирано сравнява и рационално съпоставя своите резултати с тези на редица чуждестранни изследователи.

Изводите и приносите са формулирани ясно и обобщават точно постигнатите *оригинални резултати*. Тяхната достоверност е извън всякакво съмнение. Тя е свързана с много добро познаване на изследвания проблем, с рационалния избор на целта и задачите, прецизния дизайн на опитите, оптималния брой на животни във всяка група и статистическа обработка на получените данни, показващи висока степен на значимост (сигнификантност). В обобщена форма приносите на дисертационния труд се изразяват в следното:

А. Научни (фундаментални) приноси

- Установена е аналгетичната активност на *алфа-липоевата киселина*, *бенфотиамин*, *габапентин* и *кетамин* при еднократно и многократно прилагане при модели на болка, предизвикани с термичен, механичен и химичен стимул, а също при модел на хронична невропатична болка.

- Установена е противовъзпалителната активност на *алфа-липоевата киселина* и *габапентина* при еднократно и многократно прилагане при модел на карагинан (carrageenan)-индуцирано възпаление.
- *За първи път* е установена *противовъзпалителна* активност на антиконвулсанта *габапентин* при модел на остро ексудативно възпаление.
- Установени са сигнификантни промени в серумните нива на проинфламаторните цитокини TNF- α и IL -6 при многократно прилагане на *алфа-липоевата киселина*, *бенфотиамина*, *габапентина* и *кетамина* при липополизхарид-предизвикан модел на възпаление.

Б. Научно-приложни приноси, внедрими в клиничната практика

- Алфа-липоевата киселина проявява изразен аналгетичен ефект и продължителен противовъзпалителен ефект.
- Бенфотиаминът е подходящ като средство за потискане на остра и хронична невропатична болка, но той е лишен от противовъзпалителна активност.
- Габапентинът е ефикасно средство за лечение на болки от различен характер, приложен еднократно или многократно. Като противовъзпалително средство проявява ефект само при еднократно прилагане, поради което може да се приложи в клиничната практика за овладяване на остри възпалителни болкови прояви.
- Кетаминът притежава аналгетичен, но не и противовъзпалителен ефект.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторантката

С настоящия дисертационен труд *пряко са свързани* три публикации на английски език в реферативни научни списания, 7 участия в научни форуми и едно в научно-изследователски проект (спонсориран от МУ – Пловдив). В две от статиите д-р Н. Дончева е първи автор и в 1 – втори. Статията "Study the effects of ketamine on nociception and on learning and memory in rats", отпечатана във *Folia Medica* (2011) е цитирана през 2012 г. 3 пъти в реферативни научни журналы (*Behavioural Brain Research*, *European Journal of Pharmacology* и *Brain research bulletin*). Пет от научните форуми са проведени в чужбина (4 в Западна Европа, 1 в Турция) и 2 у нас. В 6 от тях д-р Н. Дончева е първи автор.

Общият импакт фактор на докторантката от участия в научни форуми с публикувани разширени резюмета в *престижни реферативни научни журналы* е внушителен (IF 20.121). *Основната част от проведените експериментални изследвания и писмената теза са собствена разработка на д-р Нина Дончева.*

7. Критични забележки и препоръки към проведеното изследване

А. Критични забележки

- Изразът "невропатна болка" следва да се промени в "невропатична болка", защото произхожда от английското прилагателно "neuropathic" ("neuropathic pain"). Същото се отнася за "диабетна болка" (diabetic pain – диабетична болка).
- У нас биофизиците използват термина "потенциал"-зависими калциеви канали, а не "волтаж"-зависими.
- Думата "asthenia" (стр. 14) се транскибира на български с "я" накрая: астения.

- На стр. 42 думите "екситотоксично" и "екситотоксичност" следва да се изпишат с "ксц" – "ексцитотоксично" и "ексцитотоксичност" (произлизат от "excitotoxicity")
- *Мерните единици* в един научен труд задължително се изписват според SI на латиница. В настоящия труд това не е направено на много места за милиграмите (mg), грамовете (g), килограмите (kg), часовете (h), минутите (min), секундите (s) и сантиметрите (cm). Освен това между числото, изразяващо дозата и мантисата трябва да има един празен интервал. Правилното например е "бенфотиамин 80 mg/kg", а не "бенфотиамин 80mg/kg", както е в много фигури.
- В дисертационния труд следва да се обясни как са избрани дозите на изследваните вещества (вероятно по литературни данни).
- Хроничното третиране предполага поне 3-месечно приложение на използваните препарати. Тяхното приложение в продължение на 14 дни следва да се разглежда като субхронично.
- В Правилника няма изискване авторефератът да завършва с резюме на английски език, но безспорно наличието на такова съществено би разширило възможностите за обмен на информация.

Дисертацията и авторефератът са написани на съвременен книжовен български език. Четат се без затруднения. Чуждиците в тях са сведени до възможния минимум. Посочените забележки имат предимно формален, а не съдържателен характер и с нищо не намаляват научната стойност, приноси и достойнства на дисертационния труд и автореферата.

Б. Препоръки

- *Въведението и обзорът са разработени като по учебник. Препоръчвам те с допълване на информация от разделите "Материал и методи" и "Резултати" да бъдат издадени като методично ръководство в електронен вид, за да служат на специализанти и докторанти при тяхната практическа подготовка по фармакология у нас.*
- Препоръчвам в бъдеще да се изследва аналгетичния ефект на препаратите *Milgamma N*[®] (бенфотиамин+пиридоксин+цианокобалмаин), парацетамол и метамизол при различни модели на невропатична болка като се определят и сравнят техните **средни ефективни дози (ED₅₀)**. Така окончателно обективно ще се изясни кой от двата препарата – парацетамол или метамизол, по-добре повлиява невропатичната болка и следователно може да се ползва като стандарт (еталон) за сравнение. Още повече, че по този въпрос сред изследователи и клиницисти съществуват различни често противоположни мнения, някои от които определено са комерсиални.

8. Автореферат

Авторефератът е разработен според изискванията на Правилника на МУ – Пловдив. Той е принтиран на 47 страници. Отразява вярно основните резултати, постигнати в дисертацията. Онагледен е с 21 фигури и 1 таблица.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

(1) Представеният дисертационен труд на тема „Сравнително експериментално изследване на аналгетично и противовъзпалително действие на средства, прилагани за съпътстваща терапия на болката” **съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания** на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за прилагане на този Закон. Представените материали и дисертационни резултати **напълно съответстват** на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилника на МУ – Пловдив за приложение на ЗРАСРБ.

(2) Дисертационният труд показва, че докторантката *д-р Нина Дончева* **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)”, като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Основната част от проведените изследвания и писмената теза са собствена разработка на дисертантката.

(3) Поради гореизложеното, **убедено давам своята положителна оценка на проведеното изследване**, представено в настоящия дисертационен труд и в автореферата към него и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди на ас. д-р Нина Димитрова Дончева образователната и научната степен „Доктор”** в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление „7.1. Медицина” и докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)”.

София, 16.08.2016 г.

Изготвил становището:


(Доц. д-р Иван Ламбев, дм)