

# РЕЦЕНЗИЯ

на доц. д-р Иван Тодоров Ламбев, дм (пенсионер от 26.04.2010 г.), външен член

**ОТНОСНО** представения за защита дисертационен труд на **д-р Ана Пенчева Цакова** на тема *"Фармакологични подходи за повлияване на болката при различни експериментални модели. Основи за механизъм-насочено лечение"*, по докторска програма *"Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)"*, в професионално направление *"7.1. Медицина"* от област на висшето образование *"7. Здравеопазване и спорт"*.

## I. ПРОЦЕДУРНИ ВЪПРОСИ

Настоящата процедура и представеният комплект материали, свързан с нея, са в пълно съответствие с чл. 4, ал. 2 от Закона за развитие на академичния състав в Република България, чл. 2, ал. 2 от Правилника за прилагане на този Закон, чл. 5, ал. 2 във връзка с чл. 73 ал. 2 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и заповед № РК36 – 882/25.04.2016 г. на Ректора на МУ – София проф. д-р Вихра Миланова, дмн.

Докторанката е представила в срок всички необходими документи в принтиран вид, а дисертацията и автореферата – още и в електронна форма. *Структурата на рецензирания научен труд и на автореферата са съобразени със законовите изисквания. Нямам съвместни публикации с авторката.*

Д-р Ана Пенчева Цакова е задочен докторант към Катедрата по фармакология и токсикология при Медицински факултет, МУ – София. Нейни научни ръководители са чл.-кор. проф. д-р Мила Власковска, дмн и проф. д-р Славина Сурчева, дм.

Д-р А. Цакова е апробирала успешно своя дисертационен труд пред разширен състав на катедрения съвет при Катедра по фармакология и токсикология към МФ на МУ – София на 24 март 2016 г.

## II. ПРОФЕСИОНАЛНО РАЗВИТИЕ И КАЧЕСТВА

Д-р Ана Цакова е родена в гр. Габрово (1975 г.). Завършва природо-научна и математическа гимназия в родния си град (1993 г.), хуманна медицина (1999 г./диплома № 007947) в Медицински университет – София и бизнес администрация (2004 г.) в Софийски университет – София. От 2000 г. работи в българските представителства на фармацевтичните компании *Merck, Actavis EAD и Merck Sharp & Dohme Idea Inc.* в области като *остеопороза, кардиология, болка, онкология, захарен диабет и неврология, през което време активно участва в редица национални и международни конгреси в съответните области.*

Още като студентка проявява подчертан интерес към фармакологията и фармакотерапията, като активно работи в студентските *научни кръжоци по фармакология и вътрешни болести*. Има няколко участия в Студентски научни сесии. През 1998 г. печели първа награда на Студентски научна сесия у нас с проучване за нивото на профилактика за хепатити В при студентите по хуманна и дентална медицина в България.

Притежава много добри аналитични, компютърни и комуникативни умения, вкл. работа в екип. Усвоила е 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.

### III. АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

**Болката** е неприятно сетивно и емоционално преживяване, свързано с действително или потенциално тъканно увреждане. Тя е един от най-честите симптоми, поради който пациентите посещават лекаря. За нейното облекчение 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 – В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>); нефармакологични методи (хирургични, физични, биофизични); методи на алтернативната медицина (акопунктура, хомеопатия) и др.*

Изследванията върху различните видове болка, тяхната етиопатогенеза, методите и средствата за нейното овладяване са изключително актуални. Актуална е и темата на дисертационния труд, посветен на тези проблеми. Това се потвърждава и от справката на ЦМБ при МА – София за най-четените медицински публикации през последните 5 г., въведени в нейния Репозиториум. Тя показва, че дисертацията на д-р Н. Янев (2011) с подобна тематика, третираща проблема за болката обаче в друг аспект с научен ръководител чл.-кор. проф. д-р М. Власковска и консултант проф. д-р Сл. Сурчева, е сред най-четените (1224 пъти) публикации до началото на март т.г.

### IV. НАУКО-МЕТРИЧЕН АНАЛИЗ

Настоящият труд е написан върху 153 стандартни страници формат А4, от които: съдържание – 3 стр., използвани съкращения – 1 стр., въведение – 3 стр., литературен обзор – 66 стр., цел и задчи – 3 стр., материал и методи – 15 стр., експериментални резултати – 24 стр., анализ и обсъждане – 14 стр., изводи – 2 стр., приноси – 2 стр., литература – 14 стр. и приложение – 2 стр. Дисертационният труд е онагледен със 17 таблици и 41 фигури (много от тях цветни и добре оформени). Той се чете без затруднения, ясен и аналитичен е. Литературната справка обхваща 220 източника (преобладаващата част през последните 10 г.), от които 2 на кирилица и 218 на латиница.

Собствените изследвания, свързани с дисертационната тема, са отразени в три статии, отпечатани през последните три години в реферативни западни списания. Техният *общ IF е 4.092*. В тези статии д-р Цакова е първи автор. През последните три години тя участва в 7 научни форума, като първи автор е в 2 доклада на конгреси в чужбина (от общо 5) и 1 у нас (от общо два). Един от докладите е отличен с *наградата на Международната асоциация*

за изследване на болката (IASP) на 15<sup>ия</sup> международен конгрес за болката (Буенос Айрес, 2014).

С темата на дисертационния труд са свързани 4 научно-изследователски проекта – два по линията на "Фонд научни изследвания" към МОН и два към Съвета за медицинска наука при МУ – София. Първият започва още в далечната 1996 г., а останалите съответно през 2010, 2011 и 2012 г. и всички са успешно завършени.

## V. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Обзорът обхваща около 43% от обема на представения труд. В него се дискутират различните видове болка според тяхната продължителност, етиология и локализация. С вещина се разглеждат мозъчните структури, нервните пътища, ноцицепторите и невротрансмитерите, участващи в алгогенезата и патогенезата на болковия синдром.

Описани и онагледени с цветни фигури са най-новите фармакодинамични и токсикодинамични механизми на действие на най-често използваните лекарства за овладяване на болката – нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС), ненаркотични аналгетици (анилиди, пиразолони, препарати, повлияващи калиевите или калциевите невронални канали) и опиоидни аналгетици с техните предимства и недостатъци.

В обзора се подчертава, че благоприятното повлияване на механизмите на периферна и централна сенситизация с НСПВС обуславя тяхната терапевтична ефективност при остра постоперативна болка, както и при лечение на хронична болка (вкл. туморна). Използването на някои НСПВС има място в лечението и превенцията на един от най-разпространените видове стомашно-чревни малигноми в наше време – колоректалният карцином. Това е свързано със стимулиране на апоптозата, потискане на клетъчния растеж, инхибиране на ангиогенезата и инхибиране на метастазите.

Подробно се разглеждат механизмите на развитие на опиоидния толеранс и зависимост (психическа и физическа) и последиците, свързани с несвоевременното им лечение. С разбиране се привеждат и дискутират съвременни експериментално-фармакологични и клинично-фармакологични литературни данни на водещи предимно чуждестранни изследователи. Отбелязва се, че невролептиците може да потиснат агресивността и психотичната компонента при абстиненция, но не и *непреодолимото желание (craving)* за приемане на опиоид. Фармакотерапията на опиоидната зависимост може да бъде оптимизирана с антагонисти на NMDA-рецепторите, които блокират хипертрофиралата глутаматергична трансмисия и пресинаптичното усвояване на допамин, от което непреодолимия стремеж към наркотика значително отслабва.

Специално внимание се отделя на нитроксидергичната модулация и нейната роля в клетъчния имунитет, опиоидния толеранс и зависимост. Задълбочено се дискутира етиологията, патофизиологията, патобиохимията и съвременната *фармакотерапия на социално значимите хормонално обусловени болкови синдроми при дисменорея и остеопороза* като примери съответно на висцерална и соматична болка. Подчертава се вредното влияние на дълготрайната глюкокортикоидна терапия, алкохола, тютюнопушенето и естрогеновия дефицит върху костното ремодилиране.

Отбелязва се, че средство на избор за овладяване на болезнена дисменорея са НСПВС, като селективните COX-2 инхибитори са предпочитани. Аргументирано и компетентно се защитава рационалността на патогенетично насочената фармакотерапия на менопаузалната остеопороза с различни групи лекарства: бифосфонати, селективни

естроген-рецепторни модулатори (сред които растителни алкохолни екстракти, съдържащи изофлавонови *фитостероли*), анти-RANKL моноклонални антитела, анаболи, паратхормон, калциеви и стронциеви препарати, и др.

## VI. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

В литературния обзор д-р Ана Цакова компетентно обосновава актуалността и важността на своя дисертационен труд като извежда неговата основна цел, точно и конкретно формулирана: *Оптимизиране аналгетичния ефект на синтетични и растителни продукти и подходи за намаляване на нежеланите лекарствени реакции при лечение на болката.*

Тази цел е насочена към: а) разработване на два експериментални модела на различна по тип *хормонално обусловена болка*: съответно модел на соматична болка при остеопороза със смесен механизъм и на висцерална болка при дизменорея с изразен ноцицептивен механизъм с оглед на тяхното патогенетично повлияване; б) повлияване на азотноксидната синтаза с оглед намаляване и облекчаване на предизвикваните от морфиномиметиците поведенчески прояви на зависимост (абстиненция, толеранс, имunosупресия). Отделните етапи на изследване са формулирани като конкретни задачи.

## VII. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Субстанциите L-аргинин и Genistein (фитоестроген), използвани при опитите, са доставени от фирмата Sigma-Aldrich. Експериментите са проведени върху нормотензивни имбредни плъхове, линия Wistar. При мъжките плъхове т.м е била от 240 до 250 g, а при женските от 180 до 185 g.

За фармакологични, имунологични, хистохимични, хистологични, рентгенологични и денситометрични изследвания са изолирани слезка, тимус (главен лимфоиден орган на имунната система), утерус, главен мозък, десен фемур и тибия и кръвен серум. Наборът от *in vivo* и *in vitro* експериментите и тяхната продължителност (за някои от тях 9 месеца) впечатлява. Описани са 12 изключително информативни метода, напълно адекватни на поставената цел и задачи, които включват:

- опиоидна толерантност и зависимост – поведенчески модел със специално разработена 16-мерна скала за оценка; кардиоваскуларен модел; конкавалин А-индуцирана пролиферация; апоптоза/ДНК фрагментация на тимоцити; експресия на невронална NO-синтаза;
- *in vitro* еквивалент на спастична висцерална болка при опростен хормонално симулиран дисменорея-подобен функционален модел *in vivo* при използване на изолирани сегменти от средната част на маточните рога на плъхове, овариектомирани 18 дни по-рано;
- модел на експериментална остеопороза на 48 плъха, получен три месеца след тяхното билатерално овариектомиране и последващо 90-дневно ежедневно третиране съответно с фитоестрогена генистеин (s.c.), алкохолен екстракт от пресни корени на българска целина (s.c.) и биофлавоноида кверцетин (p.o.).
- ELISA методи за определяне на IL-6 и RANKL (NF-κB) в кръвния серум;

- методи за изследване на ноцицепция (плантарен тест "гореща плоча", тест с упражняване на налягане върху задната лапка на плъх, карагинанов ексудативен оток на задната лапка на плъх);
- остеоденситометрични методи за изследване на костната плътност и диагностика на остеопороза;
- фитохимични методи за изолиране, пречистване и верификация на екстракт от *Apium nodiflorum* L. (българска целина);
- аналитични биостатични методи.

## VIII. РЕЗУЛТАТИ, АНАЛИЗ И ОБСЪЖДАНЕ

При *in vitro* изследванията с изолирани сегменти от средната част на маточните рога на овариектомирани плъхове,  $PGF_{2\alpha}$  потенцира евокираните с правоъгълни електрически импулси миогенни контракции 6 пъти по-силно в сравнение със спонтанните контракции при контролната плацебо група. При групата плъхове, симулираща *in vivo* хормонален дисменорея-подобен функционален синдром, това съотношение е 4.5:1 ( $p > 0.05$ ). След 30-минутна перфузия с 500 микромола метамизол на изолираните сегменти от маточен рог  $PGF_{2\alpha}$  увеличава едва 2.5 пъти амплитудата на евокираните миогенни контракции ( $p < 0.05$ ).

При модела с експериментална хормонално обусловена остеопороза, на осмия месец след овариектомията е установен статистически значим ефект ( $p > 0.05$ ) при групата женски плъхове, третирани със стандартизиран (по отношение съдържанието на феноли и флавоноиди) алкохолен екстракт от пресни корени на *Apium nodiflorum* L. при мониторираните параметри – телесна маса и костна плътност (изследвана чрез дензиометрия на фемур и тибия) в сравнение с контролите. Наблюдавани са характерни динамични промени в костната микроархитектура, прецизно описани и онагледени с лонгитудинални срези от проксималните части на фемур и тибия. Девем месеца след овариектомията обемът на костните трабекули в проксимална епифиза е намален съществено, като този ефект е по-силно проявен в тибиялната кост. Данните от изследваните хистоморфологични параметри на трабекуларната микроархитектура в епифизата и метафизата на фемур и тибия са статистически обработени. Демонстрирани са статистически значими благоприятни ефекти при групата овариектомирани плъхове с експериментална остеопороза, третирани с Genistein и стандартизиран алкохолен екстракт от *Apium nodiflorum* L. в сравнение с контролите, като при третираниите с алкохолния екстракт от целина плъхове терапевтичният ефект е по-силно изразен в сравнение с тези, лекувани с Genistein.

При същия модел е наблюдавано статистически достоверно увеличение на нивата на проинфламаторния IL-6 в серума на овариектомираните животни. Прилагането на екстракт от целина или Genistein предотвратява настъпващото след овариектомия увеличение на IL-6 и RANKL (рецепторен активатор на нуклеарен фактор каппа- $\beta$  лиганд) в серума. Последният влияе върху имунната система, регенерацията и ремоделирането на костната тъкан.

Ноцицептивният праг се понижава много силно при развитието на остеопороза след овариектомията. При тези условия антиноцицептивното действие на метамизол е силно проявено. Хроничното третиране с екстракт от целина или Genistein намалява достоверно засилената от остеопорозата болкова чувствителност.

В отделна серия експерименти, успоредно с изследване на поведенческите реакции, е изследвано влиянието на нитроксидергичните невротрансмитерни механизми върху аналгетичната активност на алкалоида морфин. Установено е, че ED<sub>50</sub> за аналгетичния ефект на морфин при *контролните (наивни) плъхове* е  $4.9 \pm 0.6$  mg/kg. При комбинирано прилагане на морфин и NO-инхибитора L-NAME ED<sub>50</sub> за аналгетичния ефект на морфин нараства повече от 3 пъти. *Тук трябва да подчетаем, че акуратното изчисляването на ED<sub>50</sub> е трудоемко и в последно време често се избягва, но по принцип именно то гарантира най-висока достоверност на получените резултати.*

Предварителното третиране с L-NAME напълно антагонизира развиването на толеранс към действието на морфин върху хемодинамиката. Хроничното прилагане на морфин потиска силно лимфоцитната пролиферация за разлика от L-NAME, предизвикващ многократно повишаване на лимфоцитната пролиферация. Хроничното комбинирано прилагане на морфин и L-NAME възпрепятства процеса на тимоцитна апоптоза, което се доказва с достоверно намаление на апоптотичните ултраструктурни промени в клетките на кортикалния тимусен слой. Блокирането на системата NOS/NO забавя развитието на толерантност към морфиновата аналгезия и може да намали интензивността на аверзивните реакции при хронично третиране с опиоиди.

*Получените при експериментите резултати са коректно описани и онагледени. На фигурите са показани стандартната грешка и отклонение. Анализът и тяхното обсъждане е задълбочен. Дисертантът сравнява и съпоставя рационално своите резултати с тези на редица чуждестранни изследователи. Основната експериментална и писмена дейност по осъществяване на представения дисертационен труд е извършена от д-р Ана Цакова.*

## IX. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ. АВТОРЕФЕРАТ

**Изводите** и **приносите** (с методологичен и фундаментален характер) са формулирани ясно и обобщават точно постигнатите оригинални резултати. Затова ги приемам изцяло. **Аторефератът** отразява вярно същността на дисертационния труд. Той е е принтиран на 49 страници. Онагледен е с пет фигури и десет таблици. Негов плюс е фактът, че завършва с информативно *резюме на английски език*.

## X. КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ПРЕПОРЪКИ

Стр. 25 (3.2. *Трансмитери, ...*) от дисертационния труд е принтирана с размествания. При апробиране на настоящия дисертационен труд през м. март 2016 г. като рецензент направих критични бележки и препоръки, отнасящи се до оформяне на отделна страница "Използвани съкращения", извеждане в съдържанието на определени заглавия, посочване на производителите на използваните лекарствени продукти, намаляване на *англо-саксонски чуждици* ("алевиира", "интернализира", "синаспира", "таргетира", "тригерира"). Препоръчах авторефератът да завършва с *резюме на английски език*.

*Посочените бележки и препоръки имат повече формален, отколкото съдържателен характер и с нищо не намаляват научната стойност, приноси и достоинства на представения за защита дисертационен труд. С удовлетворение констатирам, че повечето от тях са съобразени.*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

(1) Темата на рецензията на научен труд "Фармакологични подходи за повлияване на болката при различни експериментални модели. Основи за механизъм-насочено лечение" е значима и актуална. Неговата цел е формулирана точно, а задачите са адекватно подбрани и прецизно изпълнени. Резултатите са коректно описани, анализирани и дискутирани. Изводите обобщават точно постигнатите оригинални резултати. Приносите имат методологичен и фундаментален характер.

(2) Дисертационният труд показва, че д-р Ана Цакова 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.

(3) Основната част от проведените изследвания и писмената теза са собствена разработка на дисертантката – д-р Ана Цакова, която между впрочем е един от изключително рядко срещаните се изследователи с две висши образования.

(4) Представените материали и дисертационни резултати покриват напълно качествените и количествените критерии на ЗРАСРБ, Правилника за приложения на този Закон и специфичните изисквания на Правилника на МУ – София за приложение на същия Закон.

(5) Установено е, че: а) блокирането на системата NOS/NO забавя развитието на толерантност към аналгетичното действие на морфин и отслабва интензивността на аверзивните (неприятни, негативни) реакции при хронично третиране с опиоиди; б) алкохолният екстракт от пресни корени на целина (*Apium nodiflorum* L.) има терапевтичен ефект при постклимактерична остеопороза, без да причинява съществени нежелани странични реакции, характерни за стероидните и НСПВС; в) създаден е експериментален модел на „*in vitro* еквивалент“ на спастична висцерална болка при хормонално симулиран дисменорея-подобен функционален синдром; г) създадена е качествено нова кумулативна скала за количествена оценка на интензивността на отделните симптоми при синдром на експериментални опиоидна толерантност и зависимост.

(6) Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено в настоящия дисертационен труд и в автореферата към него и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди на д-р Ана Пенчева Цакова** научната и образователната степен „**Доктор**“ в област на висшето образование „7. Здравеопазване и спорт“ по професионално направление „7.1. Медицина“ и научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия).“

София, 04.08.2016 г.

Рецензент:

  
(Доц. д-р Иван Ламбев, дм)