

# СТАНОВИЩЕ

на доц. д-р Иван Тодоров Ламбев, дм, фармаколог (пенсионер от 2010 г.)

**ОТНОСНО:** представения за защита дисертационен труд "Фармакологични изследвания върху механизми на невровъзпаление при епилепсия" на асистент д-р Евгений Юриев Харитов, докторант на самостоятелна подготовка към Катедра по фармакология и токсикология при МФ на МУ – София за придобиване на образователната и научната степен «Доктор» в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт" по професионално направление „7.1. Медицина" и научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)".

## I. ПРОЦЕДУРНИ ВЪПРОСИ

Процедурата по защитата е съобразена с изискванията на чл. 4 ал. 2 от Закона за развитие на академичния състав в Република България, чл. 2 ал. 2 от Правилника за неговото прилагане, 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, заповед на декана на МФ за отчисляване на докторанта с право да се яви на защита на дисертационен труд за присъждане на НОС "Доктор", издадена по предложение на ръководителя на Катедрата по фармакология и токсикология на Медицински факултет въз основа на решение на Катедрениния съвет с Протокол от 18.06.2015 г., утвърдено от ФС на МФ с Протокол № 39/19.06.2015 г., а също и заповед РК36–1292/29.06.2015 г. на ректора на МУ – София акад. В. Митев, дбн.

Научен ръководител на д-р Евгени Харитов е ръководителят на Катедрата по фармакология и токсикология – проф. Н. Бояджиева, дмн. Структурата на представения дисертационен труд и авторефератът към него са съобразени с изискванията на Приложение 2 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София. Нямам съвместни публикации с автора.

## II. ПРОФЕСИОНАЛНО РАЗВИТИЕ И КАЧЕСТВА

Д-р Харитов е роден през 1966 г в Столицата. Завършва гимназия в 14 ЕСПУ през 1984 г. и висше образование – хуманна медицина с отличен успех (диплома № 010752/13.10.1992 г.), в София. След успешно издържан редовен конкурсен изпит през 1995 г. постъпва като асистент в Катедрата по фармакология и токсикология при МФ, МУ – София и работи до 1998 г. вкл. От 1998 до 1999 г. е на специализация в *Universidad de Complutense – Madrid (Испания)*, в Катедрата по фармакология, където усвоява *in vitro* методи в областта на сърдечно-съдовата патология и изследва нови антихипертензивни субстанции.

От 2010 г. след втори редовен конкурсен изпит постъпва като асистент в Катедрата по фармакология и токсикология при МФ, МУ – София. Неговата годишна учебна натовареност по фармакология, превишава нормативната от 360 часа. Тя включва практически упражнения и семинари със студенти по хуманна и дентална медицина – българско и английско обучение, а също участие в семестриални изпити. Автор е на няколко глави от учебници по фармакология за хуманни и дентални медици, единият от които е на английски език, а също и на 9 статии в наши реферативни списания. Участва в редица научни форуми с 12 доклада.

Зачислен е за специализация по фармакология към отдела по Следдипломно обучение при МУ – София от 2013 г. Общият трудов стаж на д-р Е. Харитов по фармакология е 8 г. Владее писмено и говоримо английски, испански и руски език, което му позволява да борави бързо и лесно с научна литература. Има добри компютърни и музикални умения.

### III. НАУКО-МЕТРИЧЕН АНАЛИЗ

Настоящият труд е написан върху *118 нестандартни страници формат А4*, от които 46 са литературен обзор, 1 – цел и задчи, 3 – материал и методи, 22 – резултати от собствени изследвания, 14 дискусия, 1 – изводи, 1 – научни приноси, 3 – списък на публикации и резюмета на научни форуми и 17 страници – литература. Дисертационният труд е онагледен с 35 добре оформени фигури (12, свързани с обзора и 23 – с експерименталните изследвания) и 3 таблици.

Списъкът на **публикациите, свързани с дисертацията**, съдържа 9 статии, излезли през последните две години, пет от които са отпечатани в български реферативни списания (*Българска неврология, Български реферативен журнал, Bulgarian medicine, Praemedicus*). Две от статиите са на английски език и 7 на български език. От 9-те статии, излезли през 2015 г., *три обобщават собствени експериментални изследвания, което покрива напълно количествените критерии на МУ – София, свързани с НОС "Доктор" в медико-биологичната област (Приложение 4 по ЗРАС)*. Останалите шест имат обзорен характер с подчертано научно-приложна стойност и *съгласно нормативните изисквания на МУ – София сумарно се равняват на 60% от една публикация (респ. 0.6)*. Те също са свързани с дисертационната теза, вкл. с нейната методология. *Във всички статии д-р Харитов е първи автор*. Засега няма цитирани публикации.

Списъкът от **участия в научни форуми** включва 12 доклада, дискутиращи собствени експериментални изследвания, непосредствено свързани с дисертационната теза. *Във всички доклади д-р Харитов е първи автор*. Те са представени на престижни научни форуми у нас (Албена, Ст. Загора, София, Пловдив) и чужбина (Москва) през периода от 2012 до 2015 г. Д-р Харитов участва като съизпълнител в **три гранта на МУ – София**, съответно през 2012, 2013 и 2015 г., свързани с дисертацията.

*Литературната справка* към представения труд включва 225 заглавия на английски език, подредени и номерирани съгласно изискванията на редакторите на научните медицински списания в стил "*Vancouver*". Седемдесет и седем заглавия са от последните 10 г., от които 31 са от последните 5 г. Всички цитирани статии са отпечатани в реферативни западни списания: *Brain Res., Epilepsy Behav., J Immunol, J Neurosci, Metabolism, Neurobiology, Pediatr Res, Trends Neurosci* и др.

### IV. АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

*Епилепсията е социално значимо заболяване, което се дължи на внезапна ексцесивна деполаризация на някои или на всички мозъчни неврони*. От различните ѝ клинични форми – локализирана (фокална или парциална), генерализирана, кластерна, *status epilepticus*, генуинна, симптоматична, психомоторна и други страда около 1% от човешката популация. Според биостатистиката от 30 до 50% от пациентите са резистентни към антиконвулсанти, което е важна причина да се търсят както нови лекарства, така също алтернативни методи за лечение (вкл. лазерна терапия, която обаче не във всички случаи е приложима).

Множество изследвания акцентират вниманието, че освен определени неврони при епилепсия се увреждат инфламаторно астроцитни и микроглиални клетки. Това в значителна степен е медирано от мозъчни цитокини. Глия-медираното възпаление може да предизвика гърчове. Последните също предизвикват възпаление. Уврежда се имунитетът и се оформя патологичен *circulus viciosus*.

В научната литература е описана ролята на невровъзпалението в патогенезата на епилепсията, но остава неясно възможно ли е чрез лекарства и/или с нефармакологични средства да се потисне този тип възпаление и да се въздейства върху епилептогенезата. *Темата на дисертационния труд е актуална и съвременна*.

## V. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор е структуриран в три взаимосвързани раздела. Анализирани са научните постижения относно етиопатогенезата и терапията на епилепсията. Направена е съвременна класификация на гърчовете и основните типове епилепсия. Дискутират се каинатния и пилокарпиновия модел като основни за предизвикване на епилептичен статус в експерименти на плъхове.

Изтъква се значението на хипокампа при епилепсия. *Хипокама е част от лимбичната система, която отличава млекопитаещите от рептилите.* Изяснява се ролята на проинфламаторните цитокини и глията в патогенезата на възпалението при епилепсия. Аргументирано е защитено схващането за *епилептогенезата*, стартираща още в ранна детска възраст и протичаща протрахирано безсимптомно в продължение на месеци и години, което вероятно е свързана с развитие на стерилно невровъзпаление. Това може да се обясни с развитие на промени във вродения имунитет, засягащи Toll-like (TLR) рецепторите и водещо до значително повишаване на иктафинната мозъчна активност.

Дисертантът изказва възможността за благоприятно фармакотерапевтично повлияване на тези процеси, вкл. посредством потискане биосинтеза на IL-1beta, IL-6 и TNF-alfa. Отбелязва, че съществуващите около 20 антиепилептични лекарства имат главно симптоматичен ефект върху гърчовете, но те не повлияват изграждащата се предиспозиция към спонтанни рекурентни гърчове в по-нататъшния ход на епилептогенезата. Обръща внимание, че статините и винпоцетинът притежават известна противовъзпалителна активност, свързана с потискане синтеза на проинфламаторни цитокини и затова от тях може да се очаква благоприятно въздействие върху конвулсивната активност.

Очертана е важната роля на циклооксигеназните изоезними в процесите на епилептогенеза и невровъзпаление. По този начин естествено възниква необходимостта да се сравнят възможните антиепилептични ефекти на селективните и неселективните циклооксигеназни инхибитори. Задълбочено се дискутират различни антиепилептични механизми на кетогенната диета (отслабване на невроналната възбудимост и др.) специално в детската възраст, чието използване обаче остава силно ограничено, тъй като е свързано с много рискове. С голяма вещина са описани основните показания за епилептична хирургия. Всяка от трите части на обзора завършва със заключение и изводи, от които по логичен път е изведена целта на дисертационната теза.

## VI. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта е да се изследват механизми на невровъзпаление при експериментална епилепсия чрез лекарствени и нефармакологични средства.** Затова са формулирани 8 основни задачи, които могат да се обобщят в следното: изследване влиянието на левитирацетам, валпроева киселина, винпоцетин, розувстатин, ибупрофен, целекобсиб и доксициклин при различни експериментални модели на епилепсия върху полово зрели и полово незрели мъжки бели плъхове, като се отчитат параметрите на гърчовете, преживяемостта на животните и показателите на невровъзпаление (вкл. проинфламаторните цитокини – TNF-alfa и IL-1beta в кръвната плазма и хипокампус), изследване влиянието на кетогенната диета върху концентрациите на TNF-alfa и IL-1beta в кръвната плазма и хипокампус. *Задачите са адекватни на поставената цел.*

## VII. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Прецизно се описват материалите (респ. използваните референтни лекарства, прилагани i.p.; епилептогенни субстанции и храни, вкл. състава на кетогенната диета), условията за етично провеждане на опитите върху бели мъжки полово незрели плъхове линия *Wistar*, двата основни експериментални модела на епилепсия (каинатен и пилокарпинов), редица ELISA методи, клинично-лабораторни и статистически методи. Общият брой на плъховете във всички опити е

120, а броят на животните в група варира от 4 до 7. Кратко и прецизно е описан експерименталният дизайн на всяка серия опити.

## VIII. АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Получените резултати са коректно описани и добре онагледени. На фигурите са показани стандартната грешка и отклонение, а също статистическата значимост. Приемам напълно описаните резултати с краткия, но рационален анализ към всеки от тях. В сбита и обобщена форма резултатите от експерименталните изследвания се свеждат до следното:

- Каиновата киселина повишава конвулсивната активност и нивата на проинфламаторни цитокини (TNF-alfa и IL-1beta). Предварителното прилагане на леветирацетам и валпроева киселина намалява нивата на тези цитокини в хипокампа, а също и иктафинната активност на мозъка. Това дава основание да се предположи, че приложени в латентния период на епилепсията, тези антиконвулсанти биха променили самия ход на заболяването и биха предотвратили поява на спонтанни рекурентни гърчове в по-късен етап от живота.
- Кетогенната диета има отчетлив антиконвулсивен ефект при по-продължително прилагане (9 седмично), което позволява прилагането на този диетичен подход само в случаите на фармакорезистентна епилепсия.
- Приложени в продължение на 7 дни при неонатален пилокарпинов модел на епилепсия, блокертът на холерстероловия биосинтез розувастатин и церебралният вазодилатор винпоцетин показват антиепилептични ефекти. Това позволява да се направи преподположението, че двете лекарства могат да се използват като *болест-модифициращи антиепилептични средства*.
- Доксициклин и целекоксиб действат синергично антиконвулсивно върху показателите за тежест на гърчовете, оценено по скалата на Racine, WDS и латентност на първия гърч. Комбинацията от доксициклин и целекоксиб потиска повишените от пилокарпин нива на IL-1beta при полово-незрели бели мъжки плъхове.
- Селективният COX-2 инхибитор целекоксиб има по-изразени антиконвулсивни и противовъзпалителни ефекти от неселективния COX-1/COX-2 инхибитор ибупрофен. Това показва по-важната роля на COX-2 в патогенезата на епилепсията и възможността за прилагането на селективни COX-2 инхибитори в комплексното лечение на епилепсията.

## IX. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводите и приносите отразяват получените резултати и са формулирани ясно. Почти всички са оригинални по своя характер. За първи път се установява, че:

- Препаратите леветирацетам и валпроева киселина повлияват нивата на проинфламаторните цитокини у полово незрели плъхове.
- Кетогенната диета има различно изразен терапевтичен ефект, който зависи от продължителността на нейното прилагане.
- Розувастатин и винпоцетин проявяват значима антиепилептична активност при полово незрели плъхове.
- Нестероидните противовъзпалителни средства целекоксиб и ибупрофен притежават антиепилептична активност при експериментални модели на епилепсия на бели плъхове.

## X. АВТОРЕФЕРАТ

Авторефератът *отразява прецизно и коректно същността на дисертационния труд*. Обемът му от 55 стр. е оптимален. Онагледен е с 22 информативни фигури и 3 таблици.

## XI. КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ

☞ При разкриване на процедурата за зачисляване на дисертанта в своя отзив направих 12 критични бележки и препоръки, които почти изцяло са съобразени. В настоящия момент сред цитираните автори в литературния обзор и дискусията обаче няма български изследователи. (напр. В. Георгиев, Д. Гетова, М. Лазарова от БАН и др.), работили както в областта на създаване на нови антиконвулсанти, така също в изясняване някои механизми на действие на въведени в клиничната практика препарати. Впрочем български изследователи задълбочено изследват епилептогенезата от години.

☞ Възможността за прилагане на селективни COX-2 инхибитори в комплексната терапия на епилепсия, изказана в извод 7, намирам за нереалистична поради тежките нежелани реакции, които тези лекарства могат да предизвикат особено при приложение по-дълго от две седмици.

☞ Авторефератът е ненужно обременен с преразказ на литературния обзор, което не се изисква от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София.

☞ *Направените критични бележки не засягат същността и научната значимост на представения за защита дисертационен труд.*

## XII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

(1) Темата на представения дисертационен труд е актуална и съвременна. Нейната цел е точно и конкретно формулирана. Етапите на изследването са представени като отделни задачи. Овладени са редица съвременни методи и са изпълнени достатъчно по обем експерименти. Резултатите, дискусията, изводите и приносите са коректно и аналитично представени. Текстът е ясен и се чете без затруднения. Съществува логическа и смислена връзка между отделните части дисертацията. В направената дискусия дисертантът акуратно сравнява и задълбочено анализира своите собствени данни с тези на голям брой водещи чуждестранни изследователи.

(2) Натрупаните експериментални данни са обобщени в три публикации в български реферативни списания. В 6 обзора с научно-приложна стойност се дискутират етиологията, патогенезата и терапията на епилепсията, а също основните експериментални модели на епилептичен статус на бели плъхове. През последните 3 г. д-р Харитов участва с 12 доклада в престижни научни форуми (11 у нас и 1 в Москва). Във всички 9 статии и 12 доклада, а също в 3 гранта към МУ – София той е първи автор.

(3) Авторефератът отразява в сбита и обобщена форма дисертационния труд. Научното изследване и неговото описание в статии, доклади, в самата дисертация и в автореферата са собствена разработка на дисертанта.

(4) Трудът на д-р Евгени Юриев Харитов **„Фармакологични изследвания върху механизми на невровъзпаление при епилепсия“** покрива *качествените и количествените критерии на ЗРАС за присъждане на образователната и научната 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)“*, поради което апелирам към почитаемите членове на научното жури да гласуват положително.

София, 04.09.2015 г.

Изготвил становището:

(Доц. Ив. Ламбев)