

РЕЦЕНЗИЯ

на доцент д-р Иван Тодоров Ламбев, дм, фармаколог

ОТНОСНО: представения за защита дисертационен труд на магистър фармацевт **АЛЕКСАНДЪР СЛОБОДАН КОСТОВСКИ**, редовен докторант към Катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – София на тема **„СРАВНИТЕЛНО ПРОУЧВАНЕ НА ЦИТОТОКСИЧЕН ЕФЕКТ И МЕХАНИЗМА НА ДЕЙСТВИЕ НА VENDAMUSTINE ПРИ IN VITRO ТЕСТ СИСТЕМИ”**

Процедурата е съобразена с чл. 4 ал. 2 от ЗРАС в Република България, чл. 2 ал. 2 от Правилника за прилагане на същия закон, чл. 5 ал. 2 във връзка с чл. 73 ал. 2 от Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и Заповед № Р-36-928/06.06.2012 г. на Ректора на Медицински университет – София.

Дисертационният труд е за придобиване на образователната и научната степен **«Доктор»** от направление «7. Здравеопазване и спорт», професионално направление «7.3. Фармация» и научна специалност «Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)». Той е апробиран и предложен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология при Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София.

Маг. фарм. Александър Костовски е редовен докторант към катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология при ФФ – София. Роден е през 1977 г. Гражданин е на Република Македония. Завършва висшето си образование по специалността **ФАРМАЦИЯ** във Фармацевтичен факултет на Медицински университет – София и придобива образователно-квалификационната степен **„магистър”** (диплом: серия МУС, № 008835, рег. № 7271/25.01.2001 г.). Положил е *успешно докторанския минимум* по фармакология. Владее *говоримо и писмено английски и български език*.

Представеният за рецензиране дисертационен труд съдържа 142 машинописни страници и отговаря на необходимата структура: литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, експериментални резултати, обсъждане, изводи и приноси. Получените резултати са онагледени с 46 таблици и 52 фигури. Библиографията включва 152 съвременни статии по темата на латиница. Много от тях са от последните 5–10 г. Дисертационният труд и авторефератът са написани на книжовен български език като използването на чуждици е минимизирано.

Дисертационният труд е разработен предимно в Катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология при ФФ – София. Получените експериментални резултати са обобщени в 3 статии, две на английски и една на български език (с общ IF 2.398). В двете статии на

английски език се отразяват и дискутират резултатите от оригинални експериментални изследвания, а статията на български език представлява обзор с научно практическо значение, пряко свързан с дисертационната тема. Една от статиите, отпечатана в *Cancer Res Clin Oncol* през периода от 2005 до 2011 г., е цитирана 7 пъти в престижни реферативни западни научни списания. Резултатите от експерименталните изследвания са докладвани на 4 научни форума в чужбина. В 3 от статиите и в 2 от резюмета на научните форуми колежата е първи автор. С дисертационния труд са свързани два грантови договора (№ 1-Д/2003 г. и № 5/2008 г.) на Съвета по медицинска наука при Медицински университет – София, допринесли за финансиране на по-голямата част от проведените експериментални изследвания, които в основаната си част са негово лично дело.

Около 20–25% от леталитета в западните страни се дължи на различни тумори. Сред тях голяма честота имат туморите на СЧТ, простата, гърдата и кръвта (остра левкемия, хронична лимфолевкемия). *У нас броят на онкоболните е над 250 000, а леталитетът – около 17 000/година.* С разпространение на тютюнопушенето, особено сред младежта, стреса и нездравословното хранене, а също с увеличаване на средната продължителност на живота тази тенденция все повече се засилва и се очаква в следващите години значително нарастване на *заболяемостта* от злокачествени тумори.

В комплексната противотуморна терапия използването на цитотоксични средства, наред с имуномодулатори, ендокринни и други методи на лечение заема важно място. Много често обаче цитотоксичната антинеопластична химиотерапия води до развитие на резистентност на туморните клетки и други тежки нежелани ефекти. Например ди-2-хлоретил алкилаторът циклофосфамид се отличава със значителен имуносупресивен и уротелотоксичен ефект. Един от механизмите за развитие на резистентност се корени в засиленото *възстановяване на ДНК от страна на туморните клетки*, което се наблюдава при химиотерапия с всички алкилатори, противотуморни антибиотици и някои от топоизомеразните инхибитори. Затова проучванията върху фармакодинамиката на вече внедрени в клиничната практика цитотоксични химиотерапевтици и разкриване на нови страни от техната фармако- и токсикодинамика продължават да са актуални и днес. Те имат голямо значение за разширяване на техния противотуморен спектър, по-пълно оползотворяване на противотуморния им потенциал, повишаване на тяхната ефективност и безопасност. Настоящият дисертационен труд решава тъкмо такива задачи.

В литературния обзор с голяма вещина се анализират, дискутират и обясняват онкоепидемиологията и патогенезата на хроничната лимфолевкемия, дефинирана като малигном, характеризиращ се с пролиферация и акумулация на функционално инертни дългоживеещи В-лимфоцити с морфология на зрели клетки. Със сериозни научни аргументи се обсъждат рисковите фактори и причини на това заболяване – генетични, вирусни, околната среда. Накратко се описват основните клинични симптоми и по-подробно главите клинично-лабораторни показатели, свързани с диагностиката на хроничната лимфолевкемия.

Дисертантът дискутира ефективността и безопасността на различни химиотерапевтичните протоколи, използвани при това заболяването към днешна дата. Посочва, че в терапията на хроничната лимфоидна левкемия в последно време все по-често се включва бендамустин. Подробно се описва механизма на действие на Bendamustine, вкл. влиянието му върху програмираната клетъчна смърт. Специално внимание се отделя на генната регулация на апоптоза, на ядрения хромозомно локализиран фосфопротеин p53, чиято свръхекспресия може да отключи механизмите на клетъчно стареене и апоптоза.

Специално внимание се отделя на предклиничните характеристики на бендамустина, на неговия метаболизъм и клинично приложение. Литературният обзор притежава определена теоретично-приложна стойност. Важен негов плюс е и специално направеното обобщение на литературните данни в синтетична форма.

Целта на дисертационния труд е формулирана ясно и конкретно: да се определи и прецизира противотуморния спектър на Bendamustine върху туморно-клетъчни популации с лимфоиден, миелоиден и епителен произход, а също да се изследва неговото влияние върху хепатоцитите, ДНК и хромозомния апарат на клетките в сравнение с широко използвани в онкологичната практика *алкилатори* (циклофосфамид, ломустин, митомицин) и флударабин. Много от избраните химиотерапевтици имат сходни показания, но различен токсикологичен профил. При три от препаратите – бендамустин, циклофосфамид и флударабин, *хроничната лимфоидна левкемия* е сред основните им показания, а при бендамустина и ломустина *болестта на Ходжкин* е общо тяхно показание.

За постигане на поставената цел са формулирани седем **основни задачи** и умело са подбрани **адекватни високоинформативни методи** за определяне на цитотоксичната ефективност на бендамустина, неговото влияние върху структурата на метафазни хромозоми в сравнение с митомицин и ломустин, електрофоретичен анализ на ДНК от цитозолна фракция на третирани клетъчни култури и поточна цитометрия за изучаване на влиянието върху апоптоза, токсикологично изследване върху хепатоцити от плъх за определяне *селективната цитотоксичност* на бендамустин и циклофосфамид, сравнително цитотоксично изследване на активността на бендамустин и флударабин върху първични култури от левкоцити *на пациенти с хронична лимфоидна левкемия и фармакокинетически анализ* на себестойността на терапията на същата левкемия въз основа на данни от *in vitro* онкограми. **Дозите** на използваните химиотерапевтици отговарят на тези на други автори. Овладени и използвани са **съвременни високотехнологични методи, като тези за работа с клетъчни култури**, което все още е голяма рядкост у нас.

Получените резултати са задълбочено и прецизно обсъдени. Накратко те могат да се обобщят до следното:

- При използваните експериментални *in vitro* модели клетките от епителен произход (MCF-7 и MDA-MB-231) показват резистентност към бендамустин, но туморно-клетъчните линии от лимфоиден произход (SKW-3, REN, DONN-2) проявяват висока чувствителност.

- При миелодно-клетъчните популации най-силно изразен е ефектът на бендамустин по отношение на CML-T1 и BV-173.
- Електрофоретичният анализ на ДНК от цитозолната фракция на третирани клетки от три различни клетъчни линии (SKW-3, HL-60 и BV-173) бендамустин предизвиква олигонуклеозомна ДНК-фрагментация, с което се изяснява наличието на апоптозен механизъм на действие.
- Цитофлуорометричният анализ показва, че бендамустинът способства формирането на хиподиплоидна фракция от апоптотични клетки, особено при лимфоидните и миелоидните клетъчни линии.
- Bendamustine се отличава с нисък кластогенен ефект за разлика от Mitomycin C и Lomustine.
- Bendamustine притежава по-слаба хепатотоксичност в сравнение с циклофосфамид, който освен това има и значителна уротелотоксичност.
- На оноавата на цитотоксичната ефективност на Bendamustine и Fludarabine върху първични левкоцитни клетъчни култури от кръв на болни с ХЛЛ е възможно да се търси корелация между ефекта на лекарството *in vitro* и неговата терапевтична ефикасност.
- Установена е в 90 % от случаите корелация между резултатите от онкобиограмите с Bendamustine и краткосрочните терапевтични резултати, изразена като клинично преценена частична ремисия.
- Фармакоикономическият анализ на база на МТТ-теста определя използването на Fludarabine като рентабилно, защото има по-ниски разходи за един повлиян пациент и води до значителен финансов ефект.

Изводите и приносите са формулира прецизно, поради което ги приемам без забележки. **Към представения за рецензия дисертационен труд и проекта за автореферат имам няколко КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ПРЕПОРЪКИ, които обаче не намаляват тяхната информативна и научна стойност.**

- Освен споменатите в началото на рецензията три научни публикации, свързани пряко с **дисертационния труд**, дисертантът прилага още 3 (2 на английски и 1 на български език), които са много интересни, защото са посветени на ангиогенезата и създаването на нови антиангиогени, на възможната локална химиотерапия на рака на пикочния мехур с алкилфосфохолини и куркумин, а също на изследване на цитотоксичната активност на новосинтезирани комплекси на лантана. Безспорно е, че *тези статии са пряко свързани с експерименталната онкофармакология и в това отношение представляват голям научен интерес, но те нямат непосредствено отношение към дисертационната тема.*
- В библиографията липсват български автори на кирилица, като например един от водещите наши онкотерапевти доц. д-р Асен Дудов¹, който е изследвал различни фармакологични подходи за модулиране на множествената лекарствена резистентност (2003). Уместно е също в

¹ Дудов, А. Изследване върху фармакологични подходи за модулиране на множествената лекарствена резистентност (MDR) на туморите. *Дисертация (дм)*, София, 2003.

обзора да се цитират лекарствени и/или фармакотерапевтични справочници, в които подробно са описани използваните химиотерапевтични препарати бендамустин, ломустин, митомицин, флударабин и циклофосфамид. Литературен източник № 77 е представен само като интернетски сайт, а е нужно да има и съответното заглавие.

- При извод 9 изразът «Анализирана е в 90% от случаите корелация...» е нужно преработено: «В 90% от случаите е установена корелация...»
- Представеният **проект за автореферат** беше прекалено кратък. Особено в частта му «Обсъждане». Първа и втора страница на автореферата и на дисертацията се нуждаеха от оформление съобразено с изискванията на Правилника на МУ – София, дадени на сайта на нашия университет. В отделни случаи не беше спазена международната метрична ситема, по-специално за милиграмите (mg), минутите (min) и часовете (h). Три от таблиците, отразяващи резултатите от фармакокинетичния анализ, в автореферата бяха трудно четливи и следваше да се преработят. След съответните препоръки това беше коригирано.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Почти всички мои критични бележки и препоръки са съобразени в представения на защита дисертационен труд и в отпечатания автореферат. **Дизайнът на проведените експерименти** е замислен и изпълнен така, че да се получат възможно повече експериментални данни, които са описани и дискутирани аналитично. **Направените изводи** и оценката за собствените приноси са формулирани ясно. Те отразяват същественото от получените експериментални резултати. **Авторефератът** отразява точно дисертационния труд.

Дисертационият труд на маг. фарм. Александър Слободан Костовски „Сравнително проучване на цитотоксичен ефект и механизма на действие на Bendamustine при *in vitro* тест системи” покрива напълно качествените и количествените критерии на ЗРАС за придобиване на образователната и научната степен «**Доктор**» от направление «7. Здравеопазване и спорт», професионално направление «7.3. Фармация» и научна специалност «Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)». Поради това убедено **предлагам** на членовете на почитаемото научно жури да гласуват със „**ЗА**”.

София, 02.06.2012 г.

Доц. д-р Иван Ламбев, дм:

