

РЕЦЕНЗИЯ

на доц. д-р Иван Т. Ламбев, дм, Катедра по фармакология и токсикология,
Медицински факултет, Медицински университет – София (itlambev@mail.bg)

ОТНОСНО представения за защита дисертационен труд на **д-р Диана Илиева Пендичева-Духленска** на тема *"Фармакогенетично проучване при амбулаторни пациенти с рекурентно депресивно растройство, лекувани със селективни инхибитори на обратното захващане на серотонин (СИСТ)"*, по докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“, професионално направление „7.1. Медицина“ и област на висшето образование „7. Здравеопазване и спорт“.

I. ПРОЦЕДУРНИ ВЪПРОСИ

Настоящата процедура и представеният комплект документи и материали, свързан с нея, са в пълно съответствие с чл. 4, ал. 2 от Закона за развитие на академичния състав в Република България и чл. 2, ал. 2 от Правилника за прилагане на този Закон, а също с чл. 9, ал. 1 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – Плевен и заповед № 1949/30.09.2016 г. на Ректора на МУ, Плевен – проф. д-р Сл. Томов, дмн.

Д-р Д. Пендичева-Духленска е докторант на самостоятелна подготовка към Катедра „Фармакология и токсикология“ при Факултет „Фармация“ на Медицински университет – Плевен. Темата на нейния дисертационен труд е *клинично-фармакогенетична и интердисциплинарна с научни ръководители* проф. д-р Надка Иванова Бояджиева, дмн (специалист по медицинска фармакология) и доц. Радка Петрова Кънева, дб (специалист по молекулярна биология).

Д-р Диана Пендичева е положила необходимите изпити и успешно е апробирала своя труд, чийто структурата е съобразена със законовите изисквания. Нямам съвместни публикации, свързани с настоящия дисертационен труд.

II. ПРОФЕСИОНАЛНО РАЗВИТИЕ И КАЧЕСТВА

Д-р Диана Пендичева-Духленска е родена през 1962 г. в гр. Плевен. Завършва гимназия с преподаване на руски език в родния си град (1980 г.) и висше образование – хуманна медицина, във ВМИ – Плевен (диплома № 001251/1986 г.). Работи като участъков терапевт в Районна поликлиника – гр. Пордим (1986–1989 г.), а от м. май 1989 г., след редовен конкурсен изпит, е назначена за асистент в Катедра „Фармакология“ към МФ, МУ – Плевен. През периода от 1995 до 2003 г. е ст. асистент, а от 2003 до 2015 г. – гл. асистент към същата Катедра. От 2016 г. е асистент в катедра "Фармакология и токсикология" към ФФ при МУ – Плевен. През 1993 г. придобива *специалност по фармакология* (диплома № 41282).

Общият трудов стаж на д-р Пендичева е 30 г., от които 26 г. като преподавател в Катедрата. От 26 г. тя води практически упражнения по фармакология със студенти по медицина българоезично обучение и от 16 г. – англоезично. Обучавала се е в експериментално фармакологични и клинично-аналитични умения съответно в Катедрата по фармакология и токсикология и в Катедрата по клинична фармакология и терапия при МФ на МУ – София, както и в Центъра по молекулярна медицина в Столицата.

Участвала е в редица краткосрочни квалификационни курсове по фармакология, клинична фармакология, медицинска генетика, биостатистика, съвременни дидактични технологии,

педагогика и други у нас и в чужбина, което е удостоверено със съответните сертификати. В резултат е натрупала 47.5 кредита.

Общият брой на **всички научни трудове**¹ на д-р Пендичева (вкл. и тези несвързани с дисертацията) към настоящия момент е 41, от които: *публикации* – 29 (13 свързани с експериментални изследвания съответно 7 на български и 6 на английски език, 16 обзори с научно приложен характер, 1 участие в монография) и 11 участия в учебници и тестове по фармакология, в това число 2 участия в учебник на английски език), *участия в научни форуми с публикувани резюмета* – 62 (44 у нас и 18 в чужбина), *участия в научно-изследователски проекти* – 11 (1 финансиран от фонд "Научни изследвания" при МОН и 10, финансирани от МУ – Плевен.

Общият IF на всички публикации на д-р Пендичева е 11,378. Тя има 10 цитирания от чуждестранни автори и една награда за най-добра постерна презентация в секция на Деветата регионална конференция на Европейски колеж по невропсихофармакология (2007 г. – София). В 22 от публикациите и в 28 от резюметата на научни форуми д-р Пендичева е първи автор.

Д-р Пендичева притежава *много добри аналитични, компютърни и комуникативни умения*, вкл. работа в екип. *Усвоила е голям брой съвременни експериментално-фармакологични, фармакогенетични, биостатистични и други методи* със специализирана научно-изследователска апаратура и софтуер, вкл. анализ на нуклеинови киселини, изолиране на ДНК, генотипиране, спектрофотометрия, високо ефективна течна хроматография и др.

Владее *говоримо и писмено английски и руски език*, което ѝ позволява да борави бързо и лесно с научна литература. Член е на Българския лекарски съюз, Българското национално дружество по фармакология, клинична фармакология и терапия, Българската медицинска хомеопатична организация и Международното дружество по психиатрична генетика (ISPG).

III. НАУКО-МЕТРИЧЕН АНАЛИЗ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Дисертационният труд е разработен през периода от 2009 до 2016 г. в сектор „Експериментална и клинична фармакология“ при МУ – Плевен и Центъра по молекулярна медицина в Столицата. Той е написан върху 137 стандартни страници формат А4 (от които 30 стр. са литературен обзор, 1 – цел и задачи, 16 – материал и методи, 29 – резултати, 6 – обсъждане, 4 – изводи и приноси, 22 – книгопис).

Онагледен е с 31 предимно цветни фигури и 30 таблици и 13 приложения. Книгописът обхваща 214 съвременни научни статии, от които 193 са на латиница и 21 на кирилица. Те са подредени и номерирани съгласно изискванията на редакторите на научните медицински списания в стил "Vancouver". От всички цитирани литературни източници 19 са на български автори, (16 на кирилица и 3 на латиница). Цитираните през последните 5 г. литературни източници са 20% от общия брой.

Получените резултати са обобщени в 2 научни статии на английски език и 4 на български език. Във всички 6 публикации д-р Пендичева е първи автор. Експерименталните изследвания са докладвани на 7 научни форума (4 у нас и 5 в чужбина). Във всички резюмета на доклади д-р Д. Пендичева-Духленска е също първи автор. С дисертацията са свързани 5 научноизследователски проекта, финансирани от МУ – Плевен, които са завършили успешно.

Дисертационният труд е написан на съвременен български език. Чете се лесно и увлекателно. Специфичните научни термини са представени с акроними, чието значение е обяснено в раздел „Използвани съкращения“.

IV. АКТУАЛНОСТ НА ПРОБЛЕМА

¹ Според Списъка на трудовете, приложени при апробацията.

Според редица биостатистични проучвания 10 до 25% от жените и 5 до 15% от мъжете страдат от депресия през различни периоди от своя живот. *Прогнозира се, че в развитите държави към 2020 г. депресиите ще заемат второ място след сърдечно-съдовите заболявания като причина за леталитет. Тази хипотеза се подкрепя все повече от зачестилите военни, техногенни и природни катастрофи (вкл. климатични изменения), а също от хронифициралата се световна икономическа криза, големите мигрантски потоци и постоянно нарастващата дезинформация във връзка с развиващите се социални процеси. Сред различните форми на депресия важно място заемат афективните разстройства. У нас те се срещат в 6.2% от населението (2013).*

Лечението на депресиите е комплексно – лекарствено, психотерпевтично и биофизично. В около 36% от случаите обаче остри афективни епизоди остават неадекватно повлияни след най-често стандарната 6-месечна терапия с психотропни средства, а при 60% от пациентите не се достига пълна клинична ремисия дори при сходни условия на заобикалящата среда. В около 38% от лекуваните болни с различни класове антидепресанти се развиват нежелани лекарствени реакции (НЛР).

Антидепресантите повишават синтеза на специфичен клетъчен протеин (а cyclic AMP response-element binding – CREB). Този протеин опосредства действието на цАМФ, като участва в регулацията на транскрипцията на гени, влияещи на други протеини, вкл. на произхождащия от мозъка невротрофичен фактор.

Предполага се, че една от съществените причини за недостатъчната ефективност на антидепресивната фармакотерапия се дължи на различния генотип на пациентите и от там на различния клиничен отговор към използваните лекарства. Фармакогенетичните проучвания целят изясняване ролята на рядко срещаните моногенни дефекти на отделни гени, които обуславят вътревидовите индивидуални различия в терапевтичния отговор, а също и поносимостта към определени лекарства, респ. техните НЛР и възможните нежелани взаимодействия. Всичко това прави настоящият дисертационен труд изключително актуален.

V. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Д-р Пендичева *оценява вярно състоянието на изследвания проблем* и използва творчески специализирани литературни източници. Това проличава особено ярко в литературния обзор. С *голяма вещина* се дискутират основни въпроси на съвременната фармакогенетика и фармакогеномика. Интересът към използване на фармакогенетичните методи в клиничната практика нараства с въвеждането на скъпите засега генни чипове, позволяващи генотипиране на метаболитни генетични биомаркери и улесняващи твърде много генетичния анализ.

Необходима е само една проба от тъкани или клетки (обикновено 3 до 5 ml венозна кръв) за извършване на генетичен анализ. Фармакогенетичните резултати могат да бъдат използвани за рационално прецизиране на началното лечение и прогнозиране на следваща терапия. При това е достатъчно еднократно генотипиране, което щади болния. Обръща се внимание, че *на този етап най-често се определят комбинирани, а не чисти мутации.*

Необходимо е резултатите от генотипирането да бъдат сравнявани с клиничния отговор спрямо лечението, наблюдаваните НЛР, крайния изход от терапията и самооценката на пациента за неговото състояние в хода на самото лечение. Разглеждат се различни видове ДНК-полиморфизми с методите за тяхното идентифициране и анализ, различните видове повторени ДНК-секвенции, единичните нуклеотидни замени и методите за определянето им.

Специално внимание се отделя на различни аспекти на психиатричната фармакогенетика и на съвременните проучвания, свързани с фармакотерапията на депресивните разстройства, които през последните 5 г. са обект на 4 високо специализирани западни издания. Подчертана е ролята и на български учени, изследвали генетичните варианти, свързани с риска за развитие на афективни разстройства, зависимост към алкохол, към хероин и др.

Отбелязва, че *понастоящем най-често се изследват 14 гена, които са фармакогенетично информативни при терапия с психотропни лекарства и резултатите от генотипирането на част от тях вече се прилагат за оптимизиране на терапевтичните режими*. Вариантите в структурата на 5 от тях, т.нар. „фармакокинетични гени“ (CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP1A2 и COMT), са предиктори за фармакокинетични междуиндивидуални разлики, докато вариантите в структурата на останалите 9, т.нар. „фармакодинамични гени“ (гени на норадреналинови, допаминови и серотонинови транспортери и рецептори) могат да променят лекарствения отговор.

Описват се полиморфизмите на CYP2D6-гена и фармакотерапия със SSRIs, а също полиморфизмът на произхождащия от мозъка невротрофичен фактор (BDNF) и фармакотерапията със SSRIs, вкл. *пароксетин*. Предимство на SSRIs е, че те предизвикват 3 пъти по-рядко НЛР в сравнение с другите класове антидепресанти. Посочва се, че *BDNF е протеин, модулиращ синаптогенезата, неврогенезата, невроналната диференциация и освобождаването на невротрансмитери в различни мозъчни области*. Той модулира също оцеляването на невроните в по-късна възраст. Генът на BDNF е вероятен потенциален кандидат-ген при депресивни разстройства и антидепресивна терапия.

VI. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия труд е формулирана ясно и подробно: Да се изследва честотата на генетични варианти на известни полиморфни кандидат-гени с отношение към фармакогенетиката на антидепресанти при български пациенти с рекурентно депресивно разстройство и здрави лица и да се проучи влиянието на установените полиморфизми върху клиничната динамика и индивидуалния терапевтичен отговор на пациентите при остро лечение със СИСТ (SSRIs).

Тя е изпълнена с подходящо подбрани задачи, предвиждащи: а) дедуктивен подбор и анализ на полиморфни фармакогенетични кандидат-гени по литературни данни, имащи пряко отношение към фармакотерапията на депресиите със SSRIs; б) избор на методи за генотипизиране и ДНК-анализ на избраните полиморфизми; в) генотипизиране на подбраните варианти в групата пациенти с рекурентно депресивно разстройство, лекувани със SSRIs, и в контролната група здрави неродствени лица; г) определяне и сравняване на алелната и генотипната честота на селектираните ДНК-полиморфизми при пациентите и здравите лица; д) изготвяне на индивидуални препоръки за ориентиран избор на антидепресант при следващ депресивен епизод за пациентите с проблемен генотип и др.

VII. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Дизайнът на проучването е свързан с изпълнение на специална програма, разделена на три етапа, предвиждаща 6-месечна терапия и наблюдение върху 99 пациента с рекурентно депресивно разстройство от двата пола на възраст от 18 до 64 г. и с продължителност на заболяването 3 и повече години при брой на депресивни епизоди два или повече.

Контролните неродствени лица, без психически заболявания са 142 от двата пола и възраст от 18 до 64 г. Спазени са строги *клинични и етични критерии* за включване в изследването. От всички участници в изследването е получено писмено информирано съгласие за генетични изследвания.

Проучването се отличава с редица предимства, гарантиращи висока степен на достоверност – хомогенност на извадката от пациенти и контроли от бялата европейска популация (самоопределили се като етнически българи), набирани от Централна и Северна България; стандартизиране на терапевтичен режим с един антидепресант (пароксетин, приеман перорално еднократно сутрин в денонощна доза, титрирана от 20 до 40 mg) и допустим прием в началото на лечението на ниска доза бензодиазепин (клоназепам – 0.5 до 1 mg p.o.); минимален

риск от вариране на диагностичната и терапевтичната оценка при мултицентрова психиатрична експертиза и др.

Изследвана е ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки. Използвани са адекватни съвременни методи за оценка на терапевтичния отговор и НЛР. Извършен е ДНК-генетичен анализ с изследване на девет полиморфизма на 4 гена: CYP2D6 ген (CYP2D6*4), CYP2C19 ген (CYP2C19*2, CYP2C19*17); SLC6A4 ген (5-HTTLPR, A/G SNP, Intron2VNTR), BDNF ген (Val66Met). Клинично-лабораторните изследвания са проведени на територията на Центъра по молекулярна медицина при МУ – София. Получените данните са обработени *статистически* със софтуер STATGRAPHICS PLUS for Windows и Excell (2003) при ниво на значимост на тестовете $p < 0.05$.

VIII. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Д-р Пендичева прецизно описва социодемографските и клиничните характеристики на изследвания контингент пациенти (30 мъже и 69 жени с рекурентно депресивно разстройство) и на здравите доброволци (49 мъже и 93 жени). В процентно отношение има голяма близост между двете изследвани групи относно разделението им по пол, което позволява получаване на данни с голяма степен на достоверност. Изследваните пациенти са количествено анализирани в проценти в зависимост от техния семеен статус, образование, местоживееене, трудова заетост, вредни навици (тютюнопушене, употреба на алкохол, суицидни намерения), стресогенни фактори, хоспитализации, честа смяна на антидепресанти, НЛР при предходно лечение, брой на остри афективни епизоди, телесна маса.

Биалелните генетични варианти са определени според закона на Харди-Вайнберг, което изключва големи неточности. Проверката е осъществена посредством точен статистически тест за разлика между очаквания и наблюдавания брой хетерозиготи в изследваната извадка. Тя не показва значими отклонения, което говори за това, че изследваните варианти на кандидат-гените са в равновесие и са информативни.

Извършен е сравнителен анализ на алелната и генотипната честота на установените полиморфизми при пациентите и контролите. В групите при мъжете няма статистически значима разлика. При пациентките е установена значима разлика в честотата само на алел 9 ($p < 0.01$). Проведен е регресионен анализ.

1. За първи път е осъществено оригинално фармакогенетично проучване за асоциираност на полиморфни кандидат-гени в хода на заболяването и проведеното лечение с антидепресанти от класа на SSRIs при 99 български пациенти с рекурентно депресивно разстройство.
2. Проучена е мултифакторната генеза на лекарствения отговор на антидепресанти и е проследено влиянието на унаследени и външни фактори върху изхода от терапия при добре характеризирани хомогенна извадка от пациенти.
3. Съставен и приложен е Въпросник за оценка на НЛР на антидепресанти, подходящ за амбулаторни условия и с официалното разрешение от Лондонски Кралски колеж на психиатрите да бъде ползван с позоваване за изследователски и клинични цели.
4. Разработена е детайлизирана методика на проучването, която е резултат на дългогодишно обмислян дизайн и основана на опита на международни и наши екипи. Това улеснява изследователската дейност на други български учени.
5. Анализирани са алелните и генотипни честоти на генетични варианти в метаболитните гени CYP2D6 и CYP2C19, кодиращи експресията на изоензими с водеща роля в метаболизма на психотропните лекарства, за които има международни препоръки за съобразено с лекарствения фенотип дозиране на SSRIs и трицикличните антидепресанти. Това може да послужат като ориентир в реалната клинична практика.

Получените при експериментите резултати са коректно описани и онагледени. На фигурите са показани стандартната грешка и отклонение. Анализът и тяхното обсъждане е задълбочен. Дисертантката сравнява и съпоставя коректно и рационално своите

резултати с тези на редица чуждестранни изследователи. Основната експериментална и писмена дейност по осъществяване на представения дисертационен труд е извършена от асистент д-р Д. Пендичева-Духленска.

IX. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводите и приносите са формулирани ясно и обобщават точно постигнатите оригинални резултати. Приемам ги без съществени промени.

X. АВТОРЕФЕРАТ

Аторефератът отразява вярно същността на дисертационния труд. Негов плюс е анатоцията на английски език, което разширява възможността за обмен на информация.

XI. ЛИЧНИ ВПЕЧЕТЛЕНИЯ

Познавам д-р Диана Пендичева-Духленска от 24 г., от времето когато тя няколкократно специализираше експериментална фармакология в катедрата по фармакология и токсикология при МФ на МУ – София за придобиване на специалност, както и от нейните участия в разработване на учебници (на български и английски език) и тестове по фармакология, лекарствени и фармакотерапевтични справочници, участие в специализиран сайт по медицинска фармакология, а също и от изявите ѝ на научни форуми у нас.

Добре известни са ми нейната прецизност, колегиалност и висока отговорност към всяко обществено полезно дело, до което тя се докосва. Трудно оценим е например *големият личен принос* на д-р Пендичева в организиране и провеждане на последните десет МЕДИЦИНСКИ НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ в МУ – Плевен.

XII. КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ПРЕПОРЪКИ

При апробиране на настоящия дисертационен труд в своя отзив направих критични бележки и препоръки, отнасящи се до оформяне на отделна страница "Използвани съкращения", кратка дискусия върху епигенетиката на SSRIs, посочване на производителите на използваните лекарствени продукти, номериране и озаглавяване на всички таблици и съставяне на резюме към автореферата на английски език.

Посочените тогава бележки и препоръки имат повече формален, отколкото съдържателен характер и с нищо не намаляват научната стойност, приноси и достоинства на дисертационния труд. С удовлетворение констатирам, че почти всички те са съобразени.

ПРЕПОРЪЧВАМ в бъдещи изследвания с оглед вероятното участие в патогенезата на депресиите на хипоталамо-хипофизо-адреналната и хипоталамо-хипофизо-тиреоидната ос да се определят и сравняват серумните нива на съответните хормони при пациенти с рекурентно депресивно разстройство и здравите доброволци.

Поради безспорната задълбоченост, оригиналност и уникалност за нашата страна на проведеното научно изследване, **ПРЕПОРЪЧВАМ** д-р Д. Пендичева-Духленска в близко време да разработи и издаде монографичен труд "Фармакогенетика на антидепресантите", в който да отрази и своите оригинални изследвания в специален раздел "Фармакогенетика на SSRIs при български пациенти с рекурентно депресивно разстройство".

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

(1) Темата на научния труд е значима и актуална с интердисциплинарен характер. Тя представлява по същество *пионерно за нашата страна фармакогенетично изследване в областта на психиатрията*. Целта е формулирана точно. Задачите съответстват на поставената цел и са изпълнени в пълен обем. Получените клинично-фармакогенетични данни са коректно анализирани и дискутирани. Изводите обобщават правилно постигнатите оригинални и в много отношения уникални за страната ни *фармакогенетични* резултати.

(2) Дисертационният труд показва, че д-р Диана Пендичева-Духленска притежава задълбочени теоретични знания и висок професионализъм по научната специалност *„Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“*, като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

(3) Основаната част от проведените изследвания, продължили повече от 6 г., и писмената теза са нейна собствена разработка.


(4) Проведено е мащабно и резултативно клинично фармакогенетично проучване с висока степен на достоверност, обхванало 241 лица (99 пациента с рекурентно депресивно разстройство и 142 здрави добровлци):

- Посредством ДНК-анализ е получена достоверна информация за алелните и генотипните честоти на изследваните полиморфизми при извадка от амбулаторни пациенти с афективно депресивно разстройство.
- Проследена е връзката с терапевтичното повлияване и поносимостта към SSRIs, което ще допринесе за опознаване на факторите, определящи междуиндивидуалните разлики в размера на фармакотерапевтичния ефект.
- Проучването позволява да се разшири изследователската дейност и да се разработят индивидуални препоръки за ориентиран избор на антидепресивна терапия при пациенти с рекурентно депресивно разстройство.

(5) 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 Диана Илиева Пендичева-Духленска** 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, 29.11.2016 г.

Рецензент:


(Доц. д-р Ив. Ламбев, дм)