

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м.
Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия,
факултет Медицина, МУ-Варна

относно защита на дисертационен труд на тема:

ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТИТЕ НА ПЛОДОВ СОК ОТ *ARONIA MELANOCARPA* В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

на докторант в самостоятелна форма на обучение
д-р Мехмед Рейзов Абтулов

по област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт,
професионално направление 7.1. Медицина,
докторска програма „Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)“

На основание на заповед No P-109-282/08.07.2022 г на Ректора на МУ-Варна и с решение от заседание на Факултетния съвет на Факултет Медицина към МУ-Варна (протокол No 1/13.07.2022 г.), съм определена за член на Научното жури по горепосочената процедура и в качеството си на такава представям рецензията си на дисертационния труд на д-р **Мехмед Рейзов Абтулов** на тема „**Фармакологично проучване на ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в експериментален модел на метаболитен синдром**“

Представеният ми комплект материали на електронен/хартиен носител включва всички необходими документи в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за развитие на академичния състав на МУ-Варна.

Образование и професионален път на дисертанта

Мехмед Рейзов завършва средното си образование през 2011 г в СОУ „Христо Ботев“ в гр. Кубрат. Висшето си образование получава в Медицинския факултет на МУ-Варна, като се дипломира с отличен успех 5.86 през 2017 г. Завършил е курс по педагогическа и андрагогическа подготовка (2021 г).

През 2018 г. постъпва като асистент в Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при МУ-Варна. Понастоящем води упражнения по фармакология и по клинична фармакология за студенти по медицина, включително в англоезиковата програма. Владее английски език (ниво C1). Работи с основни функции на Офис пакета и софтуер за статистическа и графична обработка GraphPad Prism.

Актуалност на разработвания проблем

Дисертационният труд на д-р Мехмед Рейзов третира актуален проблем на съвременната медицина. Независимо от високата «цена» на метаболитния синдром (МС) като рисков фактор за редица кардио-метаболитни, чернодробни, невро-психиатрични и други социално значими заболявания, адекватната превенция и лечение на това често срещано състояние продължават да бъдат нерешен проблем. Съвременните познания за патогенетичните механизми, свързани с висцералното застлъстяване, натрупването на свободни мастни киселини, хроничното нискостепенно възпаление и оксидативния стрес, водещи до инсулинова резистентност, позволяват да се търсят подходящи терапевтични и/или профилактични средства. Сред потенциално полезните противовъзпалителни и антиоксидантни агенти са богатите на полифеноли природни биологично активни вещества от растителен произход. Вниманието на дисертанта е фокусирано върху действието на плодовия сок от *Aronia Melanocarpa* (ПСАМ) по отношение на различни проявления на МС при експериментални животни.

Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Структура на дисертацията

Дисертационният труд е написан на 158 страници. Построен е в съответствие с възприетите у нас стандарти и включва следните раздели: Въведение – 3 страници, Литературен обзор – 42 страници, Цел и задачи – 1 страница, Материал и методи – 10 страници, Собствени резултати с обсъждане – 50 страници, Изводи – 4 страници, Приноси – 2 страници, Списък на публикации и участия – 2 страници, Литература (409 източника на английски, 1 на български език) – 34 страници. Работата е добре балансирана в структурно отношение. Липсва обобщена дискусия като потенциално съществена част от изложението.

Литературна осведоменост

Литературният обзор е написан стегнато, в логична последователност, разкрива добра осведоменост на дисертанта по изследваните проблеми. Включени са актуални съвременни данни: около 25% от цитираната литература (103 източника) са от последните 5 години.

Прегледът на литературата е организиран в два големи раздела, посветени съответно на МС и *Aronia Melanocarpa*. В първата част МС, е обстойно разгледан от всички възможни гледни точки – дефиниции, епидемиологични данни, рискови фактори, патофизиологични механизми, асоциирана патология, диагноза, лечение – включително възможности за повлияване с биологично-активни вещества от растителен произход, както и съществуващи експериментални модели. В таблица №5 (стр. 38), която обобщава различните диетични модели на МС, е добре да се посочат ползваните литературни източници, независимо, че тази информация се съдържа в текста. Втората част на литературния обзор е посветена на подробно описание на

Aronia Melanocarpa: ботанически характеристики, фитохимични данни, полифенолно съдържание на плодовете, известните до този момент фармакологични ефекти на различни продукти (сок, екстракти) или съдържащите се в тях полифеноли.

В обобщението на литературния преглед се прави преход от проучваните досега към все още неизследвани аспекти от активността на ПСАМ, специално в контекста на МС. На тази база се извеждат целта и задачите на проучването. Целта е насочена към изследване и обобщаване на фармакологичните ефекти на ПСАМ при плъхове с диетично-индуциран МС. Ясно са формулирани задачите за постигане на поставената цел в две основни групи: 1. Индуциране и верифициране на МС; 2. Изследване на ПСАМ при плъхове с диетично-индуциран МС в няколко направления – психофармакологично и биохимично, оксидативен стрес, индекси на мастна тъкан, органни увреди, хистология и имунохистохимия (маркери за апоптоза и възпаление), карагенан-индуцирано остро възпаление.

Използвани методи и дизайн на експериментите

Използвани са разнообразни методи, адекватно подбрани на поставените задачи. Те включват както рутинни измервания и общоприети поведенчески тестове, така и оригинални методи, създадени и утвърдени в Катедрата по фармакология във Варна, а също и съвременни имунохистохимични подходи за охарактеризиране на зесегнатите органи при МС.

Използвани са 50 броя мъжки бели пъхове порода Wistar, разделени в 5 групи. ПСАМ е прилаган ежедневно, в три различни дози, чрез интрагастрална сонда. Всички процедури са провеждани в съответствие с националните и международни изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни (европейска директива 2010/63/EU); предоставено е и разрешение за работа с експериментални животни от Българската агенция по безопасност на храните (№177/07.07.2017г.)

Проведените експерименти по своя дизайн са хронични (10 седмици) поради времето, необходимо за настъпване на типичните за МС промени при прием на диета с високо съдържание на животински мазнини (свинска мас) и фруктоза. Това предполага продължителна работа по ежедневното обслужване (хранене, третиране) на животните и изисква търпение и отдаденост. Като пропуск при описанието на дизайна бих отбелязала, че не са посочени, в течение на периода на работа, точните моменти на извършваните тестове, освен, че поведенческите изпитвания започват след 8-ма седмица. Добре е да се представи схема, указваща кога във времето какъв експеримент е проведен, тъй като последователността в провеждането на тестовете и манипулациите е важна от гледна точка на възможното взаимно повлияване на резултатите от тях.

Използвани са класически поведенчески тестове за оценка на двигателна активност, пространствена памет, тревожност и депресивно-подобно състояние при плъхове. От биохимичните методи са приложени глюкозо-толерантен тест и определяне на

серумни триглицериди (ТГ), отразяващи съответно важни метаболитни отклонения в глюкозната утилизация и липидния статус. Тъй като за определяне на ТГ е използван стандартен тест, излишно е да се изброяват методичните подробности. Оксидативният стрес е оценяван чрез антиоксидантните ензими супероксиддисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза. Индексите на мастна тъкан са използвани за оценка на висцералното затлъстяване. Имунохистохимичните методи са съществено допълнение към хистологичното изследване на увредените при МС органи. Полуколичествено са определени експресията на про- и анти-апоптотичните протеини Вах и Bcl-2 в мастна и чернодробна тъкан, и на макрофагеалния маркер MAC387 в черния дроб като показател на реактивно възпаление. Ненужно подробно са описани имунохистохимичния протокол и други методични детайли.

За статистическа обработка на резултатите удачно са подбрани еднофакторен и двуфакторен вариационен анализ с пост-тест на Dunnett, както и Student's t-test. Не става ясно, обаче, при кой тест какъв статистически анализ е използван, тъй като това не е упоменато при всички резултати, например при отчитането на Вах (стр. 86) се посочва, че няма разлика между контролата и двете опитни групи МС+ПСАМ_{2.5} и МС+ПСАМ₁₀, макар че стойностите им видимо се различават.

Анализ и оценка на резултатите

Собствените резултати са представени в седем части в съответствие с поставените задачи. Онагледени са с 26 фигури и 22 таблици. Всяка част включва представяне на резултатите от съответната експериментална постановка, заедно с обсъждане. Обсъждането на текущите резултати позволява концентриран анализ и фокусиране върху специфичната част от работата, при което се откроява способността на дисертанта да разглежда получените резултати в контекста на съществуващата вече информация и да търси и намира в литературата данни за съпоставка, както и основание за възможно обяснение и търсене на потенциални механизми.

Повечето от ефектите на ПСАМ, установени в настоящото проучване, имат потвърдителен характер, тъй като са очаквани на базата на предишни данни, но от гледна точка на терена, върху който се проявяват – експериментален диетично-индуциран МС, те могат да се разглеждат като оригинални. Подобряват се метаболитните показатели с тенденция към понижаване на кръвната захар при глюкозо-толерантния тест и с намаляване на ТГ; намалява висцерално затлъстяване; наблюдават се признаци за ограничаване на хисто-патологичните промени свързани с МС в мастната, чернодробната, миокардната тъкан и в кръвоносните съдове. Отчита се обрат и в поведенческите отклонения, установени при плъховете на висококалорична диета, засягащи пространствената памет и повишената тревожност. ПСАМ проявява и известно антиедемно действие при някои дози и времеви интервали по отношение на острото възпаление на задна лапа индуцирано от карагенан.

Интересни са имунохистохимичните резултати, определящи апоптотичния фенотип на мастната и чернодробната тъкан. Макар и не всички промени на Вах и Vcl-2 да са в очакваната посока, авторът съумява да портърси и намери рационално обяснение за получените данни, особено в адипоцитите. Ефектът на ПСАМ върху макрофагeалния фактор MAC387 в черния дроб представя анти-инфламаторната му активност в нова, непроучвана до този момент, светлина.

Описанието на резултатите и тяхното обсъждане по раздели има своите основания и предимства. Обобщената дискусия, обаче, е тази, която може да обедини отделните части, да изглади евентуални противоречия, да подведе под общ знаменател отделните компоненти. За съжаление, в дисертацията отсъства такова обединяващо звено, което да придаде завършен вид на работата.

Дисертационният труд се чете лесно, изложението в голямата си част е гладко, логично и разбираемо, незаависимо от някои допуснати грешки или неточности (виж по-долу).

Анализ и оценка на изводите и приносите

Изведени са **два основни извода**, съответно на формулираните задачи, всеки от които съдържа сумираните резултати от моделирането на МС и ефектите на ПСАМ по отношение на изследваните показатели.

Приносите на настоящия дисертационен труд са обобщени в седем пункта и следват изводите.

Както при обсъждането на резултатите, така и при извеждането на изводите и приносите смятам, че авторът трябва да бъде по-внимателен и убран по отношение категоричността на твърденията, които прави по отношение на получените резултати. Така, глюкозопонижаващият ефект не е статистически достоверен, независимо от ясната тенденция в тази посока. Що се отнася до потискането на оксидативния стрес, обективността изисква да се отбележат и други публикации, които, противно на настоящите резултати и цитираните в работата литературни източници, установяват логичното и очаквано понижение в активността на SOD при МС, и, съответно, изпитваните за антиоксидантна активност вещества повишават този показател – с други думи, известна условност в интерпретацията на резултатите би била по-адекватна. Аналогична е ситуацията с про-апоптотичния фенотип, който се наблюдава при най-високата доза ПСАМ на фона на МС, но в този случай дисертантът отговорно отчита противоречието и го подлага на анализ, вместо да го игнорира.

Приемам повечето приноси, включително техния оригинален характер.

Публикационна активност

Във връзка с дисертацията си Мехмед Рейзов е публикувал **четири пълнотекстови статии**, една от които в международно научно списание с импакт фактор. Във всички публикации той е първи автор – факт, отразяващ личния му принос. Представени са и

четири работи свързани с дисертационния труд, докладвани на национални и международни научни форуми.

Бележки, пропуски, препоръки

Бележките и препоръките, които отправям към автора, не омаловажават работата по същество и не променят положителната ми оценка като цяло. Те по-скоро целят да обърнат вниманието на младия човек, посветил се на научно-изследователска дейност, било към важни конкретни детайли, които не бива да се подценяват, било към принципни положения, за които смятам, че е добре да се държи сметка. Наред с вече отбелязаното, бих добавила следното:

- В раздела „Материали и методи“
 - ✓ В теста за пространствена памет не е посочено *как* се отчита изучаването на предметите от плъхове, какви са точните критерии за това.
- В раздела „Резултати и обсъждане“
 - ✓ Още веднъж ще си позволя да отбележа, че евентуалното присъствие на общо заключително обсъждане би повишило значително достойнствата на работата.
 - ✓ Работата би спечелила от логична гледна точка, ако първо се представят метаболитните, антиоксидантни и противовъзпалителни резултати, а след това поведенческите ефекти на ПСАМ, като се следва не хронологията на експериментите, а природата на МС – още повече, че обяснението на полезните психофармакологични ефекти включва именно благоприятното повлияване на метаболитните показатели, оксидативния стрес и възпалението.
 - ✓ Резултатите от глюкозо-толерантния тест се разглеждат само като глюкозо-понижаващи, но не и от гледна точка на подобрената утилизация на глюкоза.
 - ✓ Повечето от резултатите са представени в текст, фигура и таблица, което е излишно.
 - ✓ Откриват се някои несъответствия между цитираните публикации в текста и тези в библиографския списък, напр. Wang Z et al, 2020; Chambel et al, 2015; Piotrowska-Kempisty et al., 2020 (стр. 108) са пропуснати в списъка на литературата и обратно, източници от списъка не са посочени в текста, напр. Dreiseitel et al, 2009; Figueira et al, 2017; Heimet al, 2002; Sathyapalan et al, 2010.
- Език и стил
 - ✓ При описание на теста за социално взаимодействие е споменато *подстригване?!* (вероятно грешка) като един от отчитаните показатели.
 - ✓ Неадекватно са използвани някои преводни термини, напр. ‘формулировки’ за продукти на *Aronia melanocarpa*, като сок или екстракт (стр. 43); ‘администрация’ на екстракт вместо ‘приложение’ (стр. 49)
 - ✓ Сродни думи са използвани по различен начин, напр. ‘антидепресанто’-подобен ефект (стр. 51, 53) и ‘депресивно’-подобно поведение.

- ✓ Използвани са различни граматични времена в хода на изложението – на фона на преобладаващото сегашно време, имунохистохимичното изследване е описано в минало време.
- ✓ Някои съкращения са въведени повече от веднъж (напр. МС, ПФ), а други изобщо не са (напр. тези при описанието на имунохистохимичните методи)
- ✓ На стр. 76 изречението "... МС нарушава глюкозния контрол и вероятно предизвиква ИР ..." се нуждае от редакция.

Оценка на автореферата

Авторефератът, написан на 78 страници, отговаря на изискванията на нормативната уредба и отразява коректно съдържанието на дисертационния труд.

Лични впечатления от кандидата

Познавам д-р Мехмед Рейзов от постъпването му в катедрата по фармакология в МУ-Варна. Винаги ме е впечатлявало усърдието, с което се впуска във всяко начинание и поставена задача. Проявява инициативност, старателност и отговорност не само в научната, но и в преподавателска си работата със студентите. Неговите презентации за онлайн семинарите по фармакология и по клинична фармакология се отличаваха с комплексност, логична последователност и актуалност. Показва респект към мнението на по-опитните си колеги, не се притеснява да задава въпроси. С упоритостта и трудолюбието си и с интереса си към новостите в медицинската наука и практика, д-р Мехмед Рейзов се очертава като обещаващ млад научен работник.

В заключение, считам, че дисертацията на д-р Мехмед Рейзов Абтулов представлява актуален научен труд с интересни резултати и оригинални приноси. Авторът се представя като млад специалист с добра научно-теоретична подготовка, с нагласа и желание към развитие и самоусъвършенстване. С представената работа се разкриват професионалните възможности на автора за самостоятелно провеждане на експериментално проучване, за анализиране и интерпретиране на получените резултати. Наукометричните показатели удовлетворяват изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за развитие на академичния състав в МУ-Варна за присъждане на научната и образователна степен „ДОКТОР“. **Всичко това ми дава основание да гласувам убедено ЗА присъждането на научната и образователна степен „ДОКТОР“ на д-р Мехмед Рейзов Абтулов.**

Варна

16.08.2022 г.

Рецензент:



/Доц. д-р Мария Д. Желязкова-Савова, д.м./