

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 ПОВЕДЕНЧЕСКИ ЕФЕКТИ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ РАСТИТЕЛЕН ПРОИЗХОД В МОДЕЛИ НА ДЕПРЕСИЯ ПРИ ОПИТНИ ЖИВОТНИ

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

на докторант в самостоятелна форма на обучение

Милена Тодорова Салбашян

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-109-441/11.11.2022г. на Ректора на МУ-Варна и с решение от заседание на Факултетния съвет на Факултет Медицина към МУ-Варна (протокол No 75/02.11.2022 г.), съм определена за член на Научното жури. В качеството си на такава представям рецензията си на дисертационния труд на д-р **Милена Тодорова Салбашян** на тема „**Фармакологично проучване на поведенчески ефекти на биологично активни вещества от растителен произход в модели на депресия при опитни животни**“

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

Милена Тодорова завършва средно специално образование през 1987 г. в ИПЗК в гр. Варна като медицинска сестра. Висшето си медицинска образование получава в МУ-Варна през 1999 г.

Трудовият ѝ стаж включва 4 години работа като медицинска сестра в кардиологично отделение, а след дипломирането ѝ като лекар работи в гр. Добрич, последователно в ХЕИ и в амбулаторна индивидуална практика за първична медицинска помощ. През периода 2005-2013 г. пребивава в САЩ, където изпълнява длъжности като медицински асистент и флеботомист в различни здравни заведения. От 2015 г. постъпва като асистент в Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия на МУ-Варна.

Учебно-преподавателската ѝ дейност е свързана с провеждане на семинари по фармакология и по клинична фармакология за студенти по медицина, включително на тези от англоезиковата програма.

Има участие в три научно-изследователски проекта, посветени на фармакологично изпитване на биологично-активни вещества от растителен произход, един от които е тясно свързан с дисертационния труд.

Владее английски и руски езици. Работи с основни функции на офис пакета и софтуер за статистическа и графична обработка GraphPad Prizm, както и Corel Draw и Insta.

Актуалност на разработвания проблем

Дисертационният труд на д-р Милена Тодорова третира актуални проблеми на съвременната медицина, касаещи лечението и/или превенцията на психоневрологични заболявания. Тревожно-депресивните разстройства, както и невродегенеративните заболявания, с високата си честота и социалната си значимост, се оформят като водещи инвалидизиращи състояния наред със сърдечносъдовите и метаболитните заболявания. Терапевтичните резултати от приложението на конвенционалните антидепресанти, бензодиазепини и други специфични фармакологични препарати са често незадоволителни, а и съпроводени с нежелани лекарствени реакции, които ограничават тяхното използване. Това отваря вратите за научно търсене на нови възможности за лечение на афективните и когнитивни разстройства, включително въз основа на по-новите аспекти в разбирането на техните патогенетични механизми. Предвид натрупаните данни за участие на възпалението и оксидативния стрес в генезата на тези заболявания, наред с класическата роля на невротрансмитърния, хормонален и невротрофен дисбаланс, като потенциално полезни и относително безвредни се открояват природните биологично активни вещества от растителен произход, богати на полифеноли, с техните изразени противовъзпалителни и антиоксидантни свойства. Вниманието на дисертанта е фокусирано върху психофармакологичните ефекти на плодовия сок от *Aronia Melanocarpa* (ПСАМ) и съдържащи се в него фенолни киселини, в експериментални модели на тревожност, депресия, болка и паметов дефицит.

Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Структура на дисертацията

Дисертационният труд е написан на 177 страници. Построен е в съответствие с възприетите у нас стандарти и включва следните раздели: Въведение – 2 страници, Литературен обзор – 53 страници; Цел и задачи – 2 страница; Материал и методи – 12 страници; Собствени резултати с обсъждане – 49 страници; Изводи – 4 страници; Приноси – 1 страница; Списък на публикации и участия свързани с дисертационния труд – 2 страници; Литература (631 източника, вкл. 3 на български език) – 38 страници; Благодарности – 1 страница. Работата е добре балансирана в структурно отношение. Липсва обобщена дискусия като съществена част от изложението.

Литературна осведоменост

Литературният обзор е написан стегнато и следва логична последователност. Авторът показва добра осведоменост по изследваните проблеми. Включени са съвременни данни, като 36% от цитираната литература (227 източника) са от последните 10, а 8% (51 източника) – от последните 5 години.

Прегледът на литературата включва обстойна информация относно полифенолите от химическа гледна точка, като акцентът е поставен върху най-застъпените полифеноли в сока на *Aronia melanocarpa*. Разгледана е фармакокинетиката на тези биологично-

активни вещества, особено факторите, определящи сравнително ниската им бионаличност. Логично, специално внимание е отделено на преминаването на полифенолите през хемато-енцефалната бариера. Следва детайлно представяне на данните касаещи централните ефекти на полифенолите и конкретно, многобройните изследвания с *Aronia melanocarpa*, включително проведените през годините в Катедрата по фармакология във Варна. Проследените ефекти върху ЦНС са организирани в направленията, в които е разработена и самата дисертация, а именно: анксиолитични, про-когнитивни, антидепресивни, аналгетични. За всички тези ефекти са разгледани и потенциалните механизми, чрез които могат да се осъществяват.

Обобщението на литературния преглед завършва с формулиране на все още непроучени психофармакологични аспекти на сока от *Aronia melanocarpa*, по-специално при експериментални модели на овариектомия и олфакторна булбектомия при плъхове.

На тази база се извеждат целта и задачите на проучването. Като цел е посочено: „Фармакологично проучване на ефекти на биологично активни вещества от растителен произход (плодов сок от *Aronia melanocarpa* и фенолни киселини) в експериментални модели на поведенчески нарушения при опитни животни, предизвикани чрез овариектомия и булбектомия“. Целта, както може да се очаква, отразява точно съдържанието на дисертацията, докато заглавието в известна степен е подвеждащо, поставяйки акцент само върху депресията, моделирана от използваните експериментални постановки.

Задачите за постигане на поставената цел могат да се разгледат в две групи, в зависимост от използвания модел – всъщност именно така са докладвани и резултатите в дисертацията (макар и да са формулирани като 4 отделни задачи):

- Моделиране на поведенчески промени чрез овариектомия (ОВ) и на този фон изследване ефектите на ПСАМ и хлорогенова киселина (ХГК) с оглед повлияване на двигателна активност, тревожност, депресивно-подобно поведение и болева чувствителност.
- Моделиране на поведенчески промени чрез олфакторна булбектомия (ОБ) и на този фон изследване ефектите на фенолните киселини (хлорогенова, ферулова и галова) с оглед повлияване на тревожност, обучение и памет.

Материали, методи и дизайн на експериментите

Използвани са 30 мъжки и 70 женски бели пъхове порода Wistar, с тегло 200-240 г, отглеждани при температура 20-25°C и 12-часов цикъл на светлина/тъмнина, с неограничен достъп до храна и вода.

Всички процедури са провеждани в съответствие с националните и международни изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни (европейска директива 2010/63/EU) и в съгласие с правилата на комисията по етика при Института по Невробиология, Българска Академия на Науките (регистрация FWA 00003059 от американското министерство на здравеопазването и човешките ресурси).

Прилаганите методи са адекватно подбрани съобразно поставените задачи. Те включват утвърдени поведенчески тестове за оценка на двигателна активност (открито поле), тревожност (тест за социално взаимодействие и повдигнат кръстосан лабиринт), депресивно-подобно поведение (тест за принудително плуване), памет и обучение (метод за обучение с активно двупосочно избягване и метод за обучение за пасивно

избягване), болева чувствителност (гореща плоча). Тези поведенчески тестове са прилагани на фона на определена продължителност на третиране на опитните плъхове (според постановката), след като животните са се възстановявали от приложената хирургическа интервенция.

Хирургическите процедури включват двустранна овариектомия при женски плъхове и двустранна олфакторна булбектомия при мъжки плъхове. Оперативните интервенции са описани кратко и ясно, посочени са взетите профилактични антибактериални и антихеморагични мерки и предоставения срок за възстановяване (14-15 дни). Двустранната олфакторна булбектомия е верифицирана макроскопски след приключване на поведенческите тестове. За всяка от постановките са включени по две контролни групи – фалшиво оперирани (ФО) и нетретирани ОВ / ОБ. Дозите на ПСАМ са 5 и 10 мл/кг и вероятно са базирани на предишни експерименти в катедрата. Използван е сок, приготвян от свежи плодове на *Aronia melanocarpa* чрез смилане, намачкване, изстискване, филтриране и консервиране с калиев сорбат (1.0 g/l), съхраняван при 0°C до момента на използването му. Посочен е съставът на използвания сок по литературни данни.

По своя дизайн постановките представляват хронични експерименти. При овариектомираните животни третирането с ПСАМ или ХГК започва 14 дни след операцията и продължава минимум 30 или 75 дни, след което в рамките на 4 дни се осъществяват различните поведенческите тестове в определена последователност. Булбектомираните плъхове са третирани в продължение на 14 дни с фенолните киселини, считано от 15^{ия} ден след интервенцията, в дози 20 мг/кг, като не е посочено основанието на използването на тази доза.

За статистическа обработка на резултатите се посочва използването на еднофакторен и двуфакторен вариационен анализ с пост-тест на Dunnett, както и на Student's t-test при сравняването на две независими групи. Резултатите са представени като средна стойност \pm SEM и статистическа достоверност при $p < 0.05$. Не става ясно, обаче, при оценката на кои резултати е приложен двуфакторен вариационен анализ и кога Student's t-test, тъй като тази информация отсъства при представянето на резултатите.

Анализ и оценка на резултатите

Собствените резултати са организирани в две основни части в съответствие с използваните модели. Онагледени са със 17 фигури и 9 таблици. Всяка част включва представяне на резултатите от проведените експерименти към съответната постановка, овариектомия или булбектомия, заедно с обсъждане. Обсъждането на текущите резултати позволява концентриран анализ и фокусиране върху конкретно извършената работа, 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 и основание за възможно обяснение на потенциални механизми.

Резултатите от проведените експерименти имат потвърдителен характер, доколкото анксиолитичната, антидепресивната, аналгетичната и анти-амнестична активност на ПСАМ и фенолните киселини са изпитвани и установени през годините в Катедрата по фармакология на МУ Варна. Новото в случая са моделите, при които са тествани тези ефекти. Формулирането на задачите предполага самостоятелно описание на тези модели като индуциращи очаквани поведенчески промени, но наблюдаваните

отклонения са представени заедно с резултатите от въздействието на приложените активни субстанции.

В обсъждането на резултатите от приложението на ПСАМ и фенолните киселини в различните поведенчески тестове са коментирани механизмите, чрез които могат да се обяснят получените благоприятни ефекти. Оценявам положително факта, че в значителна степен обсъждането е фокусирано върху специфичните патогенетични механизми, които отличават именно използваните експериментални модели като генератори на поведенчески промени, различни от други тригери на тревожност, депресия или когнитивни смущения, и съответно, върху участието на подходящи механизми на действие на изпитваните вещества в наблюдаваните ефекти.

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

Анализ и оценка на изводите и приносите

Изводите са организирани в две основни направления, съответно на експерименталните модели, и отразяват коректно и концентрирано получените резултати. Включват по 4 пункта за овариектомията и за олфакторната булбектомия, обобщаващи получените данни за изследваните поведенчески показатели при всеки модел, както и детайли касаещи дози и продължителност на третиране. Изводите маркират установените седативни, анксиолитични, антидепресивни и аналгетични ефекти на ПСАМ и хлорогенова киселина при овариектомираните плъхове и антагонизиращите ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини по отношение на хиперактивността, тревожността и паметовия дефицит индуцирани от олфакторна булбектомия.

Приемам така формулираните **приноси**, акцентуирани върху оригиналния характер на установеното в експерименталната работа на настоящия дисертационен труд.

Публикационна активност

Във връзка с дисертацията си д-р Милена Тодорова е публикувала **четири пълнотекстови статии**, една от които в международно научно списание с импакт фактор. В две от публикациите тя е първи автор. Свързани с дисертационния труд са и девет участия в национални и международни научни форуми, от които пет са публикувани като абстракти в престижни международни научни издания с импакт фактор.

Бележки, пропуски и препоръки

Бележките и препоръките, които отправям към автора, не променят положителната ми оценка като цяло и не омаловажават работата по същество, а имат по-скоро характер на добронамерена и градивна критика целяща придобиване на полезен опит и осъвършенстване.

- Структура и съдържание
 - ✓ Съществува несъответствие между формулировката на заглавието и на целта; последната по-адекватно отразява съдържанието на работата.
 - ✓ Личното ми мнение е, че всяка дисертация трябва да завършва с кратко заключително обсъждане, което да обедини отделните части, да оформи облика на работата като цяло и да ѝ придаде завършен вид. Наличието на такова общо обсъждане в случая би повишило научната стойност на дисертационния труд.

- ✓ Повечето от резултатите са представени в текст, фигура и таблица, което е излишно, тъй като не предоставя допълнителна информация.
 - ✓ Използваният статистически анализ трябва да бъде посочен при представянето на отделните резултати.
 - ✓ Откриват се библиографски източници, които фигурират в списъка, а не са посочени в текста, напр. Hozumi S et al, 2003; Jancsar SM and Leonard BE, 1984; Moriguchi S et al, 2009; Slotkin et al, 1999; Imwalle et al, 2005; Ito et al, 2008; Mar A et al, 2000; Mazzucco et al, 2006.
- Език и стил
 - ✓ Допуснати са буквални повторения на изречения, групи от изречения или отделни абзаци от литературния обзор в обсъжданията или между различните обсъждания в отделните части на дисертацията.
 - ✓ Откриват се правописни грешки.

Оценка на автореферата

Авторефератът, написан на 83 страници, отговаря на изискванията на нормативната уредба и отразява коректно съдържанието на дисертационния труд.

Лични впечатления от кандидата

Познавам д-р Милена Тодорова от постъпването ѝ в Катедрата по фармакология в МУ-Варна. Тя е тиха и скромна, старателна и прецизна в работата си, отговорна при изпълнение на задълженията си като изследовател и преподавател. Приветлива и усмихната, тя се радва на уважението на колегите си.

В заключение, считам, че дисертацията на д-р Милена Тодорова представлява актуален научен труд с интересни резултати и оригинални приноси. Те допринасят за разширяване на психофармакологичната характеристика на сока от *Aronia melanocarpa* и на отделните фенолни киселини, както и за възможността за клиничното им оползотворяване. Дисертантът демонстрира добра научно-теоретична подготовка, способност самостоятелно да провежда експериментално проучване и да анализира 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 в полза на присъждането на научната и образователна степен „ДОКТОР“ на д-р Милена Тодорова Салбашян.**

Варна

09.01.2023 г.

Рецензент:



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