

## **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:

### **ФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ С АНЕТОЛ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕ**

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ на докторант в  
самостоятелна форма на обучение

**д-р Елис Рафаилова Гасанзадеева**

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-109-168/22.05.2024 г. на Ректора на МУ-Варна и с решение от заседание на Факултетния съвет на Факултет Медицина към МУ-Варна (протокол No 21/16.05.2024 г.), съм определена за член на Научното жури и като такава представям рецензията си на дисертационния труд на д-р **Елис Рафаилова Гасанзадеева** на тема „**Фармакологични проучвания с анетол в експериментален модел на затлъстяване**“

Представеният ми комплект материали на електронен/хартен 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**

Елис Рафаилова завършва средното си образование през 2012 г. в ГПЧЕ „Н.Й. Вапцаров“ в гр. Шумен. През 2018 г. се дипломира като Магистър по медицина на Медицинския факултет в МУ-Варна.

След кратък стаж като лекар в отделение по медицинска онкология към УМБАЛ «Дева Мария» в Бургас, през 2019 г. постъпва в Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при МУ-Варна – първоначално като хоноруван, а след това и като редовен асистент. Води упражнения по фармакология за студенти по медицина и дентална медицина и по клинична фармакология за студенти по медицина,

включително на тези от англезиковата програма. Владее английски и руски езици. Работи с основни функции на офис пакета и софтуер за статистическа и графична обработка GraphPad Prism.

### **Актуалност на разработвания проблем**

Затлъстяването е сред най-сериозните съвременни здравни проблеми в световен мащаб. Особено тревожни са тенденциите на непрекъснато му увеличаване сред деца и младежи. Призната е ролята му на рисков фактор за метаболитно-ендокринни, сърдечно-съдови, чернодробни, невродегенеративни и злокачествени заболявания във връзка с генерирането на хронично нискостепенно възпаление във висцералната мастна тъкан и чрез други механизми. Това определя значимостта на мерките, които могат ефективно да го ограничат или предотвратят. Преди да се търси медикаментозно решение на този проблем, което може да е свързано със сериозни нежелани ефекти, важна роля имат нефармакологичните подходи, особено за целите на превенцията. В това отношение, наред с физическата активност и калорийната рестрикция, здравословното хранене с насърчаване консумация на растителни продукти, е с доказано благоприятен ефект. С нарастваща популярност се ползват фитопрепаратите, с техните ценни качества като противовъзпалителни, антиоксидантни и други полезни свойства на базата на съдържащите се в тях биологично активни вещества. Все повече натурални продукти от растителен произход се подлагат на задълбочени научни изследвания, за да се докажат техните здравни ползи.

Анетолът като компонент на етеричните масла, съдържащи се в широко използвани подправки и напитки в националната ни кухня, представлява и медицински интерес. Настоящата работа е насочена към изясняване потенциалните полезни ефекти на този монотерпен в условията на експериментален модел на затлъстяване при плъхове.

### **Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите**

#### **Структура на дисертацията**

Дисертационният труд е написан на 157 страници. Изграден е според възприетите у нас стандарти и съдържа следните раздели: Въведение – 2 страници, Литературен обзор – 33 страници, Цел и задачи – 2 страници, Материал и методи – 9 страници, Собствени резултати с обсъждане – 72 страници, Изводи – 4 страници, Приноси – 1 страница, Списък на публикации и участия – 4 страници, Библиография (309 източника на английски, 2 на български език) – 22 страници. Работата е добре балансирана в структурно отношение. Липсва обобщена дискусия като съществена част от изложението.

#### **Литературна осведоменост**

Литературният обзор е обширен и добре структуриран. Показва добра осведоменост на дисертанта по изследваните проблеми. Включени са актуални съвременни данни: над



30% от цитираната литература е от последните 5 години, а повече от 50% са източници от последните 10 години.

Първата част разглежда затлъстяването като медицински проблем – коментират се дефиницията и епидемиологията, рисковите фактори, асоциираните социално-значими заболявания. Обсъждат се съвременните възможности за лекарствено повлияване, както и нефармакологични средства. Ненужно детайлно са описани хирургическите методи.

Следва изброяване на натурални продукти, съдържащи монотерпени и етерични масла или самите активни принципи, придружени от кратки цитати за полезните им метаболитни ефекти в различни аспекти. Тази част би могла да се представи по-цялостно, като се направи общ преглед на съединенията, обобщат се възможните механизми на действие и се илюстрират с конкретни примери, за да се постигне по-добра систематизираност.

Следващият раздел от литературния обзор е посветен на охарактеризирането на анетол от физикохимична, фармакокинетична и фармакодинамична гледна точка. Разгледани са известни до настоящия момент ефекти на анетол върху различни органи и системи, установени в експериментални постановки *ин vivo* или *ин vitro*, разкриващи органопротективния му потенциал. Отново, един по-обединяващ подход би бил удачен при представянето на тази информация.

Накрая в прегледа на литературата е отделено място на различните експериментални модели на затлъстяване и методите за предизвикването им.

Литературният обзор е последван от формулирането на цел и задачи на дисертационния труд. Целта е определена като изследване и обобщаване на фармакологичните ефекти на анетол, приложен перорално в нарастващи дози при плъхове в модел на затлъстяване, индуцирано от висококалорична диета. Задачите са разпределени в две групи: (1) Верифициране на затлъстяването в експерименталния модел, и (2) Изследване ефектите на анетол в този експериментален модел. Интересът е фокусиран върху множество показатели: физически параметри като телесно тегло и прием на храна, течности и калории; поведенчески промени; биохимични показатели; показатели на оксидативен стрес и антиоксидантна защита; тъканни индекси; хистологичен анализ на органи; имунохистохимични маркери за апоптоза и възпаление; карагенан-индуцирано остро възпаление.

### **Използвани методи и дизайн на експериментите**

Разнообразието на поставените задачи предполага и методично разнообразие. Действително, използваните методи са адекватно подбрани. Докато при рутинните фармакологични методи, като изследване на физиологични, биохимични, клинично-лабораторни и поведенчески показатели, информативната им стойност е *априори* ясна, но и специфично посочена, то при тестовите като имунохистохимично определяне на

индикатори за възпаление и, особено за апоптоза, които придават допълнителна тежест на изследването, е необходимо да се посочи целенасочено каква е работната хипотеза и защо се използват. Това би помогнало при обсъждането на резултатите.

За изследването са използвани 50 мъжки бели пъхове порода Wistar, разделени в 5 групи – контрола, затлъстяване (чрез висококалорична диета, ВКД), три групи със затлъстяване и третиране. Анетолът е прилаган ежедневно интрагастрално, в три различни дози (62.5, 125 и 250 мг/кг), разтворен в слънчогледово олио.

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 разрешение за работа с експериментални животни от Българската агенция по безопасност на храните (Разрешение №177/07.07.2017г.)

Експериментът е хроничен и трудоемък, с продължителност от 10 седмици. Приемът на храна и течности е отчитан през 3 дни, което е малко смущаващо, предвид ограничената трайност на свинската мас добавяна към храната. Телесното тегло е проследявано ежеседмично.

Статистическата обработка на резултатите е извършена с еднофакторен и двуфакторен вариационен анализ с пост-тест на Dunnett и тест за линейна зависимост, както и със Student's t-test. За последния, обаче, не става ясно, кога е използван, тъй като не е отбелязано.

### **Анализ и оценка на резултатите**

Собствените резултати са представени последователно и съответно на поставените задачи. Онагледени са с 38 фигури и 27 таблици. Всяка част включва резултатите от експерименталната постановка, представени в текст и илюстрирани в таблица и фигура, заедно с обсъждане.

Според мен резултатите от дисертационния труд са интересни, заслужават внимание и провокират въпроси. Открояват се следните полезни ефекти на анетол, демонстрирани в проучването:

- Намаляване на теглото при най-високата доза анетол (парадоксално на фона на по-висок прием храна и калории в сравнение с групата на ВКД)
- Подобряване на пространствената памет; тенденция към антидепресивно и антианксиогенно действие
- Тенденция към подобряване на глюкозния толеранс при най-голямата доза
- Тенденция към подобряване на антиоксидантната защита (повишение на СОД в серум и понижение на TBARS в мозъчен хомогенат)
- Мастна тъкан: понижение на индекса на мастната тъкан от най-голямата доза (индикатор за потискане на затлъстяването); хистологично установена доза-



зависима редукция на размера на адипоцитите; изразена апоптоза в мастна тъкан (BAX/Bcl-2 силно повишено при най-голямата доза, но също и при ВКД?)

- Черен дроб: повишаване на про-инфламаторния маркер MAC387 при ВКД и понижаване от малката доза анетол; BAX/Bcl-2 силно повишено при най-голямата доза (както спрямо контролата така и спрямо ВКД – интерпретация?)

В същото време, някои от изследваните показатели не се променят или демонстрират потенциал за влошаване спрямо ВКД (повишена консумация на храна и калориен внос; остро повишаване на кръвната захар от средната доза анетол на 30-та минута при глюкозно обременяване; повишаване на TBARS в серум от малката доза (спрямо контролата); повишаване на чернодробния индекс при средната доза; повишаване на ALT при средната доза). В повечето случаи авторът коректно отбелязва тези резултати, но оценъчният анализ би могъл да присъства в по-голяма степен.

Д-р Елис Рафаилова се е справила добре с обсъждането на резултатите по раздели, що се отнася до включването на достатъчно литературни източници с касателство към всеки отделен проблем. Все пак, остават висящи въпроси, които действително не са лесни за обяснение. Такъв е например случаят с доза-зависимо повишената консумация на храна и калории спрямо групата ВКД от третираните животни и парадоксално намаленото телесно тегло при най-високата доза анетол. На фона на многото цитирани разнопосочни проучвания, би могло да се направи опит за коментар на тези наистина трудни за анализ резултати.

Интересни са и резултатите от изследването на про/анти апоптотичните фактори BAX и BCL-2 и тяхното съотношение в мастна и чернородоробна тъкан. Приветствам идеята за използването на тези сравнително иновативни маркери в дисертационния труд. Именно тук е добре да се знае какви са очакванията на автора и каква е неговата работна хипотеза при включването им. Например, в мастната тъкан, значимо повишеното съотношение BAX/BCL-2 се интерпретира като потенциално полезна възможност за намаляване на телесното тегло при затлъстяване, но не се коментира факта, че в самата група с ВКД отклонението на този показател е в същата посока. От друга страна, за аналогичното повишение на BAX/BCL-2 в черния дроб липсва коментар или оценка.

Обсъждането на резултатите по раздели дава възможност на автора да се фокусира върху съответната част от работата. Така се проявява способността на дисертанта да разглежда конкретните резултати в контекста на съществуващата вече информация и да търси и намира в литературата данни за съпоставка, както и за възможно обяснение чрез потенциални механизми, които не са изследвани в неговата работа, но имат отношение към проблема. В същото време, много от изследваните показатели са взаимно свързани и неизбежно, обсъждането на резултатите на един от тях опира до друг, който обаче, се коментира в отделен раздел. Например, невропротекцията, която в случая се манифестира чрез промнестичен ефект (един от изследваните показатели), може да се дължи на антиоксидантното действие (друг изследван показател). Точно тук

е ролята на общата дискусия, която да интегрира в едно цяло компонентите на проведеното изследване и да обобщи резултатите (в заложената цел на работата фигурира не само изследване, но и **обобщаване** на фармакологичните ефекти на анетола). Такъв обобщен анализ, за съжаление, не е представен.

Смятам, че важен критерий за качеството на едно научно проучване е коректното интерпретиране на статистическите данни. Според мен, работата няма да загуби от коментиране на резултатите такива, каквито са, независимо от това дали са в унисон или противоречат на основната идея и на очакванията на автора. Тенденциите, които се установяват в една или друга посока от статистически недостоверни резултати, също могат да допринасят за охарактеризирането на даден продукт, особено когато се разглеждат в подходящ контекст.

#### **Анализ и оценка на изводите и приносите**

Изведени са **два основни извода**, в съответствие с формулираните задачи. Първият документира верифицирането на експерименталния модел на затлъстяване, вторият надлежно сумира ефектите на анетол по отношение на изследваните показатели. Приемам изводите с уговорка относно категоричността на твърденията засягащи статистически несигнификантните резултати. Също така считам, че изводите следва да се представят не толкова фракционирано и фактологично, а по-компактно и обобщено, като им се придаде повече оценъчен характер, което би могло да компенсира отсъствието на финална дискусия.

**Приносите** са добре организирани и представени в шест пункта. Съгласна съм с оригиналния характер на резултатите.

#### **Оценка на публикационната активност**

Във връзка с дисертацията си д-р Елис Рафиалова е публикувала **пет пълнотекстови статии**. Във всички публикации тя е водещ автор. Представени са и 14 участия в научни събития у нас и в чужбина. Д-р Елис Рафаилова има и три награди от научни конференции, две от които са от конгреси на ECNP (35-ти във Виена 2022 и 36-ти в Барцелона 2023)

#### **Бележки, пропуски, препоръки**

Бих искала да направя уточнението, че критиките и препоръките, които отправям към автора, са принципни и целят постигане на по-добри резултати в бъдеще. Критичните бележки по никакъв начин не накърняват цялостното ми положително впечатление от работата. Най-съществените от тях бяха посочени по-горе. В допълнение, бих отбелязала още:

- В раздела "Собствени резултати и дискусия" смятам, че би било по-добре, ако в самото начало, след представяне на резултатите за телесно тегло, консумация на храна и течности и калориен прием, да се разгледат и резултатите от изследването



на мастната тъкан, тъй като именно чрез натрупването на висцерална мастна тъкан се верифицира моделът на затлъстяването и, съответно, ефектът на анетолa върху този показател е от най-голямо значение и осмисля останалите експериментални постановки.

- Сред литературните източници се откриват дубликати (поне осем референции се повтарят), докато някои, посочени в текста, липсват от списъка на литературата (напр. Tarry et al, 2010, стр. 118)
- Предварително изнесеният в началото списък със съкращения не е изчерпателен; много съкращения са въвеждани многократно в текста, други пък не са обяснени.
- На места е необходима редакция на текста, за да се подобри в стилово и езиково отношение.

### **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 Елис Рафаилова от постъпването ѝ в катедрата по фармакология в МУ-Варна. Проявява усърдие и трудолюбие както в учебно-преподавателската, така и в експерименталната работа. Сърдечна и усмихната, тя се радва на добро отношение от страна на колектива и студентите.

**В заключение, считам, че дисертацията на д-р Елис Рафаилова представлява интересен експериментален труд с оригинални научно-приложни приноси. Дисертантът показва добра информираност по изследваната проблематика, както и способност за самостоятелно провеждане на експериментално проучване. 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“. С тези аргументи давам своя положителен глас за присъждането на научната и образователна степен „ДОКТОР“ на д-р Елис Рафаилова Гасанзадеева.**

Варна

22. 06. 2024 г.

Рецензент:

Заличено на основание чл. 5,  
§1, б. „В“ от Регламент (ЕС)  
2016/679

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