

РЕЦЕНЗИЯ

относно защита на дисертационен труд на тема

Фармакологично проучване на поведенчески ефекти на *Chaenomeles maulei* при експериментални животни

за придобиване на научна степен „ДОКТОР“

по научната специалност „Фармакология“

на магистър фармацевт

Весела Ангелинова Борисова-Ненова

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

На основание на заповед No P-109-263/21.07.2020 г. на Ректора на МУ-Варна и с решение от заседание на Факултетния съвет на Факултет Медицина към МУ-Варна (протокол No 26/17.07.2020 г.), представям рецензията си на дисертационния труд на магистър фармацевт **Весела Ангелинова Борисова-Ненова** от Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия при МУ-Варна, на тема „***Фармакологично проучване на поведенчески ефекти на *Chaenomeles maulei* при експериментални животни***“ за придобиване на образователната и научна степен „ДОКТОР“

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният ми комплект материали на хартиен/електронен носител, в съответствие с Правилника на МУ-Варна за развитие на академичния състав, включва следните документи:

- Заявление до Ректора на МУ-Варна за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд
- Дисертационен труд
- Автореферат
- Автобиография в европейски формат с подпис на докторанта
- Заповеди за зачисляване в докторантура и за отчисляване с право на защита
- Списък на научните публикации по темата на дисертацията
- Копия на научните публикации (5 броя)
- Списък на участията в научни форуми
- Декларации за оригиналност и достоверност на приложените документи
- Протокол от проведен изпит за докторски минимум
- Протокол от Катедрен Съвет за гласуване на Научно Жури

Образование и професионален път

Весела Борисова завършва средното си образование през 2009 г. в Езикова гимназия „Гео Милев“ в Добрич със засилено обучение по английски и немски език. Висшето си фармацевтично образование получава във Фармацевтичния факултет на МУ-Варна през 2015 г. Завършила е и магистърска програма по Здравен мениджмънт (2015-2017 г.) към МУ-Варна. По време на следването си за кратко работи като технически оператор в аптека „Марешки“ Варна.

От 2015 г. постъпва като асистент в Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при МУ-Варна. Води упражнения по фармакология за студенти по медицина и дентална медицина, включително от англоезиковата програма. Владее английски и немски (ниво C1), френски (ниво B2) и руски (ниво A1) езици. Работи с основни функции на офис пакета и софтуер за статистическа и графична обработка GraphPadPrizm. По време на обучението си е участвала в стажове и образователни курсове в Австрия, Полша, Русия, Италия.

Актуалност на разработвания проблем

В съвременната медицина все по-настойчиво си пробива път тенденцията за внедряване и използване на природни продукти от растителен произход за целите на здравословен начин на живот, превенция и лечение на социално-значими заболявания. Със своите полезни свойства те могат да бъдат ценно допълнение в терапевтичната практика заради минималния риск от нежелани реакции. Предоставянето на научни доказателства за ефикасност и безопасност на такива продукти изисква задълбочени фармакологични проучвания и анализ. Дисертацията на Весела Борисова, с изследването на поведенческите ефекти на сока от *Chaenomeles maulei*, разширява научното знание за природните „лекарства“, които биха могли да помагат в борбата с някои невропсихични разстройства.

Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Структура на дисертацията

Дисертационният труд на Весела Борисова е написан на 192 страници. Изграден е в съответствие с възприетите у нас стандарти и включва разделите: Въведение – 3 страници, Литературен обзор – 57 страници, Цел и задачи – 1 страница, Материал и методи – 8 страници, Собствени резултати с обсъждане – 74 страници, Обобщена дискусия – 4 страници, Изводи и приноси – 2 страници, Списък на публикации и участия – 2 страници, Литература (398 източника на латиница и 2 на кирилица) – 36 страници. Работата е добре балансирана в структурно отношение.

Литературна осведоменост

Литературният обзор е написан стегнато, в логична последователност, разкрива добрата осведоменост на дисертанта по изследваните проблеми. Включени са актуални съвременни данни: една трета от цитираната литература е от последните 5 години. Прегледът на литературата започва с обща характеристика на растението *Chaenomeles*

maulei: представена е ботаническа информация, направен е преглед на видовете от рода *Chaenomeles*, посочени са сравнителни данни за съдържащите се тях полифеноли, подробно са описани биологично-активните съединения открити в плодовете на *Chaenomeles maulei*. Следва обстойно разглеждане на фармакокинетиката на полифенолите като важен фактор за системната и мозъчната им бионаличност при орално приложение, с акцент върху активните принципи съдържащи се в изследвания плодов сок. Значително място е отделено на съвременното разбиране за патобиохимичните механизми на депресията и тревожността като потенциални таргети за въздействие; засегнат е и въпросът за връзката на тези психиатрични разстройства с невро-дегенеративните заболявания. Накрая са представени наличните към настоящия момент данни за психофармакологични и антиоксидантни ефекти на основните активни принципи съдържащи се в проучвания продукт – флавоноиди, проантоцианидини, фенолни киселини, както и известните досега ефекти на видовете от рода *Chaenomeles*. В обобщението на литературния обзор авторът прави преход от проучваните към неизследвани досега аспекти от активността на плодов сок от *Chaenomeles maulei* (ПСХМ), за да изведат целта и задачите на проучването. Целта е насочена към изследване на субхроничната токсичност, респективно, безопасността на ПСХМ, както и на психофармакологичните му ефекти при млади/здрави плъхове и при експериментални модели на тревожно-депресивно поведение и нарушена двигателна активност. Ясно са формулирани четири задачи за постигане на поставената цел.

Използвани методи и дизайн на експериментите

Използвани са разнообразни методи, подбрани съответно на поставените задачи. Те включват рутинни, общовъзприети психофармакологични тестове за изследване на двигателна активност, тревожна и депресивна симптоматика, работна памет, както и експериментални модели на повишена тревожност и депресивност на изследваните животни. Поведенческите модели индуцирани от резерпин и нарушен светлинен денонощен ритъм са подходящо подбрани като отразяващи важни рискови фактори от околната среда, на които е изложено психичното здраве на хората. Експериментите са хронични и с дизайн, позволяващ отчитане на ефекта на ПСХМ върху интактни животни при различен срок на третиране – по 2 и 4 седмици средно. От биохимичните методи в работата намира приложение определянето на субстанции реагиращи с тиобарбитурова киселина като показател на липидната пероксидация в мозък, предвид потенциалната роля на оксидативния стрес в изследвания модел на „патологични“ състояния предизвикани от резерпин, но методът не е адекватно описан в неговата информативност в съответният раздел на дисертацията. В „Материал и методи“ не са споменати и биохимичните методи за оценка функционалната активност на черен дроб и бъбреци, чиито резултати след това се съобщават и обсъждат. За статистическа обработка на резултатите удачно е избран анализът one-way ANOVA с пост-тест на Dunnett. Споменат е Student's t-test за сравнение на две независими групи, но не става ясно за кои случаи е приложен, тъй като във всички постановки групите са повече от две – 4 или 5. Методите са описани стегнато, но не винаги достатъчно точно и ясно – допуснати са известни пропуски при описанието на теста за социално взаимодействие, теста за разпознаване на обект, както и при интерпретацията на резултатите.

Използвани са значителен брой експериментални животни – мъжки бели пъхове порода Wistar, в условията на хроничен опит. ПСХМ 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) и с разрешение за работа с експериментални животни от Българската агенция по безопасност на храните (Разрешение 141/23.06.2016)

Анализ и оценка на резултатите

Собствените резултати са представени в три части и са онагледени от 48 фигури и 6 таблици. Всяка от частите, освен получените резултати от съответните експерименти, съдържа и обсъждане. По този начин се постига концентриран анализ и обобщение, насочени към съответната постановка. Откроява се способността на дисертанта да разглежда резултатите в контекста на съществуващата вече информация и да търси и намира в литературата данни за съпоставка, както и основание за възможно обяснение на потенциалните механизми.

Установени са интересни поведенчески ефекти на ПСХМ при интактни животни – стимулиращ локомоцията, анксиолитично-подобен и антидепресивно-подобен, обикновено в най-високата доза; в повечето случаи липсва доза-ефект зависимост дори когато всички дози са показали активност, на което, според мен, заслужава да се обърне внимание. Не винаги се наблюдава и успоредност или закономерност между двата срока на третиране, за което авторът търси възможно обяснение. Дискусията в тази част е доста подробна в опит да се анализират наблюдаваните ефекти. Те се свързват основателно със съдържанието на полифеноли, за които вече е показана подобна психофармакологична активност, а тя се приписва най-често на инхибиция на допаминов ре-ъптейк и МАО, макар че се коментират и други потенциални механизми, като ГАМК и алфа-адренергична модулация. Може да се предположи, че богатият по състав ПСХМ действа специфично във всеки конкретен случай (понякога дори противоположно) чрез различни механизми за сметка на различни свои конституенти. По отношение на чернодробните и бъбречните функции, ПСХМ е лишен от неблагоприятни ефекти и дори може да се разглежда в известен смисъл като хепатопротективен.

По-сложни за обяснение са резултатите от експериментално моделираните тревожно и/или депресивно състояния. Там или моделът се оказва неуспешен, или ефектите на ПСХМ са недостоверни. Изключение прави хиперкинезията, предизвикана от нарушен светлинен денонощен ритъм, където ПСХМ антагонизира ефекта, но интерпретацията в този случай остава трудна. Така ефектите на сока са по-малко убедителни в използваните модели на психопатология и представените резултати са по-скоро пожелателни, отколкото действителни, което е обяснимо, но въпросът е доколко това е приемливо. За всеки човек с опит в експерименталната работа е ясно, че винаги е налице риск нещо да не се получи според очакванията; в такива случаи коректното отношение изисква много внимателно коментиране на резултатите и избягване на безпочвени и категорични заключения.

Описанието на резултатите и тяхното обсъждане по раздели има своите основания и предимства. Обобщената дискусия, обаче, е тази, която може да придаде завършен облик на извършената работа. Тук могат да се обединят отделните части, да се изгладят евентуални противоречия, да се изгради цялостна картина на проучването. За съжаление, тази част от дисертацията не предлага подобен анализ на по-високо ниво, а само сбор от повторения на части от отделните раздели.

Дисертационният труд е написан на добър български език, чете се лесно, изложението е в голямата си част гладко и разбираемо. Въпреки това, някои пасажи звучат неясно, срещат се неоснователни или противоречиви твърдения (автореферат стр. 11-12 – метод SIT; стр. 52-53 – обсъждане ORT). Вместо някои повтарящи се чуждици, напр. ‚детектират‘, могат спокойно да се използват български термини; специфичното понятие ‚анхедония‘ неясно защо е заменено от ‚ахедония‘.

Анализ и оценка на изводите и приносите

Изведени са **три извода**, синтезиращи резултатите от проведените експерименти. Приемам безрезервно всичките шест пункта по първия извод, касаещи поведенческите и биохимичните ефектите на ПСХМ при здрави/млади животни, но имам известни резерви по отношение на останалите два извода, които касаят действието на ПСХМ на фона на резерпин и НДР.

Приносите на настоящия дисертационен труд са формулирани също в **четири пункта** и имат научно-приложен характер. Те са оригинални по своето естество, тъй като за първи път ПСХМ е изследван за психофармакологична активност и органна безопасност при интактни животни, както и за ефекти при плъхове подложени на различни неблагоприятни въздействия. В значителна степен те преповтарят изводите.

Работата предоставя свидетелства за очаквани ползи от консумацията на ПСХМ като безвреден природен продукт за поддържане на психофизиологичния статус. Разработването на фитопрепарат с потенциални терапевтични свойства ще изисква по-категорични доказателства на базата на допълнителни фармакологични проучвания.

Публикационна активност

Във връзка с дисертацията си м.ф. Весела Борисова е публикувала **четири пълнотекстови статии**, една от които в българско научно списание с импакт фактор. Във всички публикации тя е първи автор, което отразява личния ѝ принос. Представени са седем работи свързани с дисертационния труд, докладвани на национални и международни научни форуми.

Критични бележки, препоръки и въпроси

Бележките и препоръките, които отправям към автора, не омаловажават работата по същество и не променят цялостната ми положителна оценка. Те по-скоро целят да обърнат вниманието на младия човек, посветил се на научно-изследователска дейност, било към важни практически детайли, било към принципни положения, за които е добре да се държи сметка. Те могат да му бъдат полезни в бъдещи проекти за разширяване на настоящото проучване и въобще. Наред с вече отбелязаното, бих добавила следното:

- В раздела „Материали и методи“
 - Не е обяснено *как* се отчита социалното взаимодействие; *какви* животни се включват фактически в изпитването – с *еднакво* или *различно* третиране, *групово* или *индивидуално* отглеждани (тъй като тези фактори се коментират от автора като важни за крайния резултат). Твърди се (в обсъждането), че поведението на всеки плъх се влияе от това на партньора му и че двойката се отчита за единица – така ли е процедирано?
 - В теста за разпознаване на обект не е посочено *как* се отчита изследването на предметите от плъховете, какви са точните критерии за това.
 - В статистическата обработка на резултатите от първата група експерименти би могъл да се приложи анализът two-way ANOVA, който да вземе под внимание и фактора продължителност на третиране.
- В раздела „Собствени резултати“ за повечето от експериментите резултатите са представени в текст, фигура и таблица, което е ненужно повторение.
- Считам, че липсата на ефект на ПСХМ върху паметта не позволява аналогията с психостимуланти, каквато се внушава в обсъждането.
- В постановката на резерпин-индуцирана хипокинезия, освен локомоция, се отчитат и други поведенчески и биохимични показатели. В този смисъл, намирам за по-правилно моделът да се означава като „Резерпин-индуцирани промени“ в съответните показатели.
- Резултатите от поведенческите експерименти биха били по-убедителни, ако бяха използвани положителни контроли (животни третирани със стандартни анксиолитици и антидепресанти), за да се придобие впечатление за сравнителната ефикасност на ПСХМ.

Имам следните въпроси към дисертанта:

- Каква е информативната стойност на тоталното време на опознаване в теста за разпознаване на обект?
- В постановката „Нарушен светлинен денонощен ритъм“ какво е основанието да се приеме, че повишената двигателна активност е израз на тревожност? В цитраната работа на Wang et al, 2014, поведенческите промени вследствие на лек хроничен стрес се описват като изразена *хиполокомоция* в открито поле, заедно с депресивна симптоматика – намалено предпочитание към сукроза и повишена неподвижност при принудително плуване. Има ли друг източник, чиито данни за променена двигателна активност се *„потвърждават“* от резултатите в този експеримент (автореферат, стр. 74, ред 5)?

Лични впечатления от кандидата

Познавам Весела Борисова от времето на нейното следване като отлична студентка, с разностранни изяви извън учебната дейност, включително за кратко и участие в експерименталната работа на катедрата. Правеше впечатление липсата на обичайния страх и притеснение, характерно за студентите, при боравене с опитните животни, както и грижовното и внимателно отношение към тях. Проявяваше интерес към изследваната проблематика и имаше идеи за собствени проучвания. Така, още по време на следването

си, Весела демонстрираше вкус към научно-изследователска работа. След постъпването ѝ като асистент в Катедрата, м.ф. Борисова се изявява и като амбициозен млад преподавател. Добрата езикова подготовка ѝ позволи много скоро да се включи в англоезиковото преподаване.

В заключение считам, че дисертацията на м.ф. Весела Борисова представлява актуален научен труд с интересни резултати и оригинални приноси. Тя се разкрива като млад научен работник с добра теоретична подготовка, с професионални възможности и умения 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“. **Всичко това ми дава основание да дам гласа си в подкрепа на придобиване на научната и образователна степен „ДОКТОР“ от магистър фармацевт Весела Борисова.**

Варна
10.09.2020 г.

Рецензент:



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