

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Илия Димитров Костадинов, дм

Катедра по фармакология и клинична фармакология, МФ, МУ-Пловдив

Относно: дисертационен труд на Весела Ангелинова Борисова-Ненова за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление: 7.1 Медицина, научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)

Тема: „Фармакологично проучване на поведенчески ефекти на *Chaenomeles maulei* при експериментални животни“

Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка

Катедра: „Фармакология и клинична фармакология и терапия“

Научен ръководител: проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, дмн, Ръководител Катедра „Фармакология и клинична фармакология и терапия“, Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна

Въз основа на Решение от заседание на Факултетния съвет при Факултет „Медицина“ към Медицински университет – Варна по Протокол № 26/15.07.2020 г. и със Заповед № Р-109-263/21.07.2020 г. на Ректора на Медицински университет – Варна съм избран за член на научно жури по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ на маг. фарм. Весела Ангелинова Борисова-Ненова. На основание Протокол №1/31.07.2020 г. съм определен да изготвя становище по горепосочената процедура.

Весела Борисова-Ненова е представила всички необходими документи съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника за развитие на академичния състав на МУ-Варна. Нямам забележки относно документите.

Биографични данни

Весела Ангелинова Борисова е родена на 07.07.1990 в град Ловеч. Завършва Езикова гимназия "Гео Милев" в град Добрич с профил "засилено изучаване на немски език". В периода 2009 – 2015 година учи фармация в МУ – Варна. В това време участва

в няколко студентски обменни програми. През 2012 г. провежда тримесечен стаж по програма "Еразъм" в Бари, Италия. През 2013 г. провежда стаж по биохимия в гр. Варшава, Полша; стаж по ботаника и фармакогнозия в Първи Московски държавен университет и взема участие в 19-ти Българо-австрийски летен колеж. През 2015 година се дипломира с отличие като магистър фармацевт към МУ - Варна, а през 2017 година завършва магистратура по здравен мениджмънт към същия университет. Владее немски, английски и руски език. От 2015 година до настоящия момент е асистент към Катедра „Фармакология и клинична фармакология и терапия“ при МУ – Варна. Със заповед № Р-109-59/20.02.2017 на Ректора на МУ – Варна е зачислена като докторант в самостоятелна форма на обучение по докторска програма по специалността „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия). Представен е протокол за успешно положен докторски минимум. Въз основа на заповед № Р-109-144/23.04.2020 на Ректора на МУ – Варна маг. фарм. Весела Борисова-Ненова е отчислена с право на защита.

Актуалност на тематиката

Дисертационният труд на маг. фарм. Весела Борисова-Ненова е посветен на актуален проблем, касаещ изследване терапевтичните ефекти върху централната нервна система на плодов сок от слабо проучен представител на род *Chaenomeles* - *Chaenomeles maulei*. Проучванията в тази насока имат важно научно и приложно значение. Получените резултати ще поставят основата за възможното приложение на изследвания плодов сок, като допълнителна терапевтична стратегия при болни с някои ментални разстройства (тревожност, депресия, деменция) и невродегенеративни заболявания. Тези състояния имат важно медико-социално значение поради факта, че засягат сравнително голям процент от хората в световен мащаб, водят до загуба на трудоспособност и се асоциират с влошено качество на живот и/или повишена смъртност.

Тревожните разстройства (паническо разстройство, генерализирано тревожно разстройство, посттравматично стресово разстройство, социална фобия, специфични фобии и др.) са сред най-разпространените ментални разстройства, като около 33,7 % от хората страдат от такова състояние поне веднъж в живота си. Тези разстройства са с най-висока честота при хората във възрастовата група 25 – 44 години и значимо намаляват след 65 годишна възраст. Депресията е друг значителен здравен проблем, които се характеризира с висока болестност и смъртност. В глобален мащаб от депресия страдат 264 милиона души, като заболяването често започва в млада възраст, а с напредване на възрастта честотата на депресивните епизоди се увеличава. Деменциите засягат близо 50 милиона от хората в световен мащаб и водят до силно влошаване качеството на живот,

настаняване на болните в социални институции и повишена смъртност. Възрастта е главният рисков фактор за появата и развитието на деменциите, и честотата им логично се увеличава във връзка с удължаване средната продължителност на живота.

Болестта на Алцхаймер е най-често срещаното невродегенеративно заболяване и най-честата причина за деменция. Болестта засяга близо 24 милиона души в световен мащаб и се предвижда броят им да се удвои в следващите 20 години. Най-засегнати са хората над 85 години, където заболяемост достига около 30 %. Паркинсоновата болест е второто най-често невродегенеративно заболяване (засяга около 2 % от хората над 65 години), при което годишната заболяемост е 10-15 на 100 000. Характеризира се основно с двигателни симптоми, но чести са и немоторните прояви, като деменция и депресия.

Фармакотерапията на менталните и невродегенеративните заболявания е свързана с риск от редица нежелани лекарствени реакции (включително лекарствена зависимост напр. при бензодиазепиновите анксиолитици) и лекарствени взаимодействия – фармакокинетични и фармакодинамични. Напредналата възраст при част от пациентите повишава риска от нежелани реакции и взаимодействия, както и определя редица противопоказания за прилагането на лекарства поради ко-морбидността. Друг проблем е липсата на оптимален терапевтичен отговор от конвенционалната фармакотерапия при част от пациентите. Всичко това обуславя необходимостта от търсенето на нови стратегии за лечение. В този контекст изследването на лечебни растения е алтернатива за изработването на лекарствени продукти с подобрена ефективност и намален риск от нежелани лекарствени реакции. Те биха могли да се използват като алтернатива на стандартната фармакотерапия или по-скоро като адюванти, които дават възможност за намаляване дозата на конвенционалните препарати.

Представителите на род *Chaenomeles* са използвани от векове при лечението на ревматизъм, анемия, подагра и сърдечно-съдови заболявания. Проучванията върху химичния им състав показват съдържание на множество биологично активни вещества. Най-голям потенциал за приложение в медицината имат екстрактите от плодове, които са и с най-високо съдържание на витамин С и други активни вещества. Установени са редица терапевтични ефекти за представителите на рода – хепатопротективен, противовъзпалителен, антимикробен, антиоксидантен, имуномодулаторен, противотуморен и в последните години невропротективен. Експерименталните данни сочат, че екстракт от плодовете на някои видове от рода (*Chaenomeles speciosa*, *Chaenomeles sinensis*) имат благоприятен ефект при експериментални модели на

увредена ЦНС. В литературата няма данни за невропротективните ефекти на *Chaenomeles maulei*, но такива могат да се очакват на базата на неговия химичен състав и данните за други представители на рода.

Познаване на проблема

Литературният обзор на дисертационния труд е написан въз основа на обширна литературна справка. Той обхваща 57 страници от дисертационния труд и се основава на над 200 литературни източника. Представеният обзор свидетелства за добрата осведоменост на докторантката по разработвания проблем и умението ѝ да систематизира и анализира данните от използваната литература. Обзорът е написан задълбочено и изчерпателно.

Литературният обзор на дисертационния труд е разделен на 6 части, които логично следват една след друга. В първата част е направена детайлна обща характеристика на видовете от род *Chaenomeles*, включваща ботанически данни, таксономия, номенклатура и химичен състав. Централно място в тази част имат естествено данните относно химичния състав и съдържанието на биологично активни вещества в плодовия сок от *Chaenomeles maulei*. Представена е и подробна информация относно химичната природа на съединенията за които се предполага, че са основните носители на биологична активност - флавоноиди, проантоцианидини, процианидини и фенолни киселини. Във втората част на обзора е разгледана фармакокинетиката на тези биологично активни вещества с акцент върху възможността им за резорбция при перорално прилагане на плодовия сок от *Chaenomeles maulei* и способността им да преминават кръвно-мозъчната бариера. Последното е предпоставка за мозъчна бионаличност и реализиране на ефекти в централната нервна система, каквито се очакват при настоящето проучване. По този начин докторантката умело обосновава и пероралния път на въвеждане на изследвания плодов сок при провеждане на експериментите.

Третата и четвъртата част от обзора са посветени на основните теории и патогенетични механизми при депресията и тревожните състояния. Подробно са разгледани моноаминната, невротрофичната и възпалителната теория в патогенезата на депресията. Анализирана е ролята на различни медиаторни системи, като серотонинергичната, допаминергичната и ГАМК-ергичната в патогенезата на тревожността. Посочена е и ролята на оста хипоталамус-хипофиза и про-инфламаторните цитокини в патофизиологията на тревожните разстройства. В петата част са анализирани и обобщени литературните данни относно общите патогенетични механизми между депресията и тревожните разстройства от една страна, и двете най-

чести невродегенеративни заболявания от друга – болест на Алцхаймер и паркинсонова болест. Данните относно патогенезата на депресията, тревожността и невродегенеративните състояния са представени с оглед на това, че биологично активните вещества в изследвания плодов сок могат повлияват различни аспекти в механизма на тези заболявания.

Литературният обзор напълно логично завършва именно с информация относно психофармакологичните и антиоксидантни ефекти на флавоноиди, проантоцианидини и фенолни киселини. Тези вещества се съдържат във високи концентрации в плодовия сок от *Chaenomeles maulei* и осъществяват невропротективен ефект, модулират моноаминергичната трансмисия (инхибират активността на MAO, блокират допаминовия транспортер и т.н.), повлияват хипоталамо-хипофизарно-адреналната ос и имат ефект върху синтеза на невротрофични фактори. Докторантката с голямо умение е анализирала точно тези данни от литературата, относно механизма на действие на съдържащите се в изследвания плодов сок флавоноиди, проантоцианидини и фенолни киселини, които са насочени към основните патогенетични механизми на депресията, тревожността и невродегенеративните състояния. По този начин тя обосновава, както несъмнената актуалност на дисертационния труд, така и очакваните ефекти на изследвания плодов сок върху тревожно-подобно, депресивно поведение и двигателната активност. В шестата част на обзора е направена и справка относно проучени досега ефекти на други видове от род *Chaenomeles* с акцент върху тези от страна на ЦНС.

В обобщението на литературния обзор докторантката прави логично заключение относно необходимостта от предклинично *in vivo* изследване субхроничната токсичност на плодов сок от *Chaenomeles maulei* и ефекта му върху тревожността, депресивно-подобно поведение и двигателна активност при експериментални животни. Това се обосновава от данните за химичния му състав и биологичната активност на съдържащите се в него фенолни киселини, флавоноиди и проантоцианидини.

Методика на изследването

В дисертационния труд е използван богат набор от *in vitro* и *in vivo* методики. Това е пряко доказателство за добрата практическа подготовка на докторантката.

Ин vivo експериментите са проведени върху мъжки бели плъхове порода Wistar. Използвани са 5 съвременни, информативни и широко използвани във фармакологията поведенчески метода – тест открито поле, тест за социално взаимодействие, повдигнат кръстосан лабиринт, принудително плуване и тест за разпознаване на обект. Това

позволява изследване и регистриране на редица ефекти на плодовия сок от *Chaenomeles maulei* върху ЦНС – двигателна активност, анксиолитичен, антидепресивен ефект и влияние върху разпознавателната памет. Използвани са три модела върху които са проведени споменатите тестове – нативни плъхове, животни с резерпин-индуцирана хипокинезия и такива с нарушен светлинен денонощен ритъм.

За регистриране антиоксидантна активност на изследвания плодов сок е използван *in vitro* метод за определяне нива на оксидативен стрес в мозъка чрез измерване концентрацията на субстанции реагиращи с тиобарбитуровата киселина. За определяне на чернодробна и бъбречна безопасност са използвани биохимични методи за измерване серумните нива на аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, алкална фосфатаза, креатинин и урея.

Извършена е компетентна и коректна статистическа обработка на получените резултати с помощта на статистически пакет GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, Inc.).

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е структуриран по изискванията за придобиване на ОНС „Доктор“. Написан е на 192 страници, от които въведение (3 страници), литературен обзор (57 страници), цел и задачи (1 страница), материали и методи (7 страници), собствени резултати и обсъждане (74 страници), обобщена дискусия (4 страници), изводи (1 страница), приноси (1 страница), списък с публикациите и участията, свързани с дисертационния труд (3 страници). Библиографската справка е написана на 37 страници и включва 400 автора, от които 2 на кирилица и 398 на латиница. Дисертационният труд е онагледен с 58 фигури и 13 таблици.

Целта е ясно и точно формулирана. За изпълнението ѝ са поставени 4 задачи.

Проведените експерименти са много прецизно и коректно планирани и осъществени. Резултатите от тях са компетентно обработени статистически, детайлно описани и онагледени с 47 фигури и 6 таблици. Представянето на резултатите следва в логична последователност на поставените задачи и е обособено в три раздела: влияние на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху поведенческите тестове и биохимични показатели за чернодробна и бъбречна функция при здрави плъхове; ефекти на изследвания плодов сок върху плъхове с модел на резерпин-индуцирана хипокинезия и ефекти на сок от *Chaenomeles maulei* върху плъхове с нарушен светлинен денонощен ритъм. Всеки от разделите е последван от подробно обсъждане на получените резултати. Докторантката умело интерпретира получените резултати от поведенческите и

биохимичните тестове. Това е свидетелство за добрата ѝ осведоменост относно тяхната информативност и специфика. Тъй като в литературата има оскъдна информация относно ефектите на плодовия сок от *Chaenomeles maulei* получените резултати са съпоставени с резултатите на други автори, касаещи ефекта на лекарства с доказан психостимулиращ ефект и ефекта на съдържащите се в изследвания сок биологично активни вещества. Проличава умението на докторантката компетентно да анализира голяма по обем литература относно действието на отделните компоненти от плодовия сок и да направи предположения за евентуалния механизъм с който могат да бъдат обяснени наблюдаваните ефекти. В раздела обобщена дискусия в синтезиран вид са представени интерпретациите на получените ефекти, вероятния им механизъм и биологично активните вещества в плодовия сок от *Chaenomeles maulei*, които ги реализират.

Въз основа на получените резултати са направени 3 извода. Те са ясно и точно формулирани. Посочени са 4 приноса на дисертационния труд. Те са оригинални, имат не само научно, но и научно-приложно значение. За първи път е установено, че плодовия сок от *Chaenomeles maulei* повишава общата двигателна активност, има депресивно-подобен ефект и анксиолитичен потенциал при здрави плъхове без да уврежда чернодробната и бъбречната функция, и да води до промени в паметта, което има важно приложно значение с оглед използването му от здрави индивиди за повишаване на адаптивността и намаляване неблагоприятните последици от стреса. Установено е също така, че изследвания плодов сок антагонизира резерпин-индуцираната хипокинезия и понижава оксидативния стрес в мозъка; редуцира стрес-индуцираната хиперкинезия и има антидепресивно- и анксиолитично-подобни ефекти при модел на нарушен денонощен светлинен ритъм. Това обосновава ползата от по-нататъшни клинични проучвания върху плодовия сок от *Chaenomeles maulei* с оглед използването му като адювантна терапия при лечението на депресията, тревожните разстройства и невродегенеративните заболявания.

Автореферат

Авторефератът на дисертационния труд „Фармакологично проучване на поведенчески ефекти на *Chaenomeles maulei* при експериментални животни“ съдържа 84 страници, онагледен е с 36 фигури и 7 таблици. Той отразява в синтезиран вид основното съдържание на дисертационния труд.

Публикации и участия в научни форуми по темата на дисертационния труд

Маг. фарм. Весела Борисова-Ненова е приложила списък с 4 публикации и 7 участия в научни форуми по темата на дисертационния труд. Три от публикациите са на английски език. Две от публикациите са в български списания реферирани в Scopus (Folia Medica, Acta Medica Bulgarica), една в българско списание с IF (Bulgarian Chemical Communications, IF₂₀₁₇=0,238). От посочените научни форуми 2 са в чужбина и 5 в България. Във всички публикации и научни съобщения докторантката е първи автор.

Заклучение

Дисертационният труд на маг. фарм. Весела Борисова-Ненова е посветен на актуална и социално значима тематика. Докторантката има отлична литературна информираност върху изследвания проблем, овладяла е богат набор от съвременни ин витро и ин vivo методи за изследване, които използва при изпълнение на формулираните задачи. Получените резултати са последица от прецизно планирано и проведено научно изследване, документирани са точно и детайлно. Приносите на дисертационния труд имат научна и научно-приложна стойност.

Маг. фарм. Весела Борисова-Ненова е изграден специалист по фармакология, притежава задълбочени теоретични познания и практически умения, демонстрира качества за самостоятелно планиране и провеждане на научно изследване.

Представеният дисертационен труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на МУ – Варна. Убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’ на Весела Борисова-Ненова в докторска програма по специалността „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“.

11.09.2020 г.

Изготвил становището: 

(доц. д-р Илия Костадинов, дм)