

РЕЦЕНЗИЯ

*От проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, д.м.н.
Ръководител на Катедра по фармакология и клинична фармакология и
терапия*

*при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна,
ул. „Марин Дринов“ 55; тел. 052 677 078; e-mail: stefkavk@yahoo.com*

*Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „Доктор“ по научната специалност „Фармакология (вкл.
фармакокинетика и химиотерапия)“
на д-р Силвия Ганчева Маринова,
асистент в Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия
при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
на тема „Ефекти на витамин К при експериментален модел на
метаболичен синдром“*

Със заповед № Р-109-200/02.05.2018 г. на Ректора на МУ – Варна съм избрана за член на Научното жури, а със заповед № Р-109-244/18.05.2018 г. на Ректора на МУ – Варна съм определена да изготвя рецензия по процедура за защита на дисертационен труд на тема: „Ефекти на витамин К при експериментален модел на метаболичен синдром“ по докторска програма „Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)“, в професионално направление 7.1. Медицина от област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, на д-р Силвия Ганчева Маринова, асистент в Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Силвия Ганчева Маринова е родена на 20.12.1982 г. Тя придобива средно гимназиално образование в Природоматематическа гимназия „Св. Климент Охридски“ гр. Силистра през 2001 г. През 2007 г. завършва Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна като магистър-лекар, специалност медицина. През 2017 г. придобива специалност „Фармакология“.

От април 2015 г. е докторант на самостоятелна подготовка по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“ към Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия с научен ръководител доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м.

От месец март 2018 г. е административен асистент в Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия. Отговорник е по научната работа в катедрата, организира работата на студентския кръжок по фармакология.

Д-р Силвия Ганчева има участие в 4 научни проекта, финансирани от Фонд „Наука“ на МУ – Варна: „Витамин К статус и показатели на енергийния метаболизъм в експериментални и клинични условия“ – конкурсна сесия 2011 г.; „Фармакологично повлияване на витамин К-зависимия протеин остеокалцин при плъхове с метаболитен синдром – метаболитни и поведенчески аспекти“ – конкурсна сесия 2015 г.; „Роля на витамин К-зависимия протеин остеокалцин в регулацията на енергийния метаболизъм при жени с метаболитен синдром“ – конкурсна сесия 2017 г. с научен ръководител на тези проекти – доц. д-р М. Желязкова-Савова и „Експериментално проучване на ефектите на биологично активни вещества от растителен произход в модели на метаболитен синдром и чернодробна токсичност при плъхове с цел бъдещо разработване на лекарствени продукти или хранителни добавки“ – конкурсна сесия 2016 г. с научен ръководител проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н.

Д-р Ганчева владее английски език на много добро ниво. Има опит в експерименталната работа с опитни животни, владее манипулации и поведенчески тестове. Има умения за работа с аналитична апаратура: спектрофотометър, ELISA, HPLC.

Оценка на актуалността на темата

Витамин К, открит през 30-те години на миналия век, функционира като кофактор за посттранслационното карбоксилиране на глутаматни остатъци. Първоначално е известен като витамин на коагулацията. В последните години се установяват други функции на витамин К, свързани с участието му в карбоксилирането на екстрахепатални протеини, съдържащи глутаматни

остатъци, какъвто е остеокалциът. Екстрахепателните функции на витамин К се реализират в концентрации, които се получават при висок диетичен внос. Клинични проучвания показват, че субклиничният дефицит на витамин К води до остеопороза и съдова калцификация, нарушения в енергийния метаболизъм (метаболитен синдром и захарен диабет), тревожно-депресивни и паметови разстройства. Експериментални данни от последните години показват, че само некарбоксиланата форма на остеокалцин участва в регулацията на енергийния метаболизъм и при липса на тази форма се получава висцерално затлъстяване и инсулинова резистентност. В тази връзка суплементирането с витамин К би довело до намаляване на некарбоксиланата остеокалцин и влошаване на енергийния метаболизъм. Тук са противоречията между клиничните и експерименталните данни на този етап. Експериментите, включени в настоящия дисертационен труд, са посветени на изясняване на противоречивата връзка между витамин К, остеокалцин и енергиен метаболизъм.

Оценка на структурата на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд обхваща 166 страници и е добре структуриран както следва: Въведение – 2 страници, Литературен обзор – 39 страници, Цел и задачи – 2 страници, Материали и методи – 7 страници, Собствени резултати и дискусия – 77 страници, Изводи – 2 страници, Приноси – 1 страница, Списък на публикациите и участията, свързани с дисертационния труд – 3 страници, Цитирана литература – 25 страници. Онагледен е със 17 таблици и 37 фигури. Дисертационният труд е написан ясно, стегнато, на много добър литературен език.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор представя на високо ниво състоянието на проблема. Библиографията включва 352 литературни източника. От цитираните литературни източници над 50% са от последните 10 години. Обзорът показва високата литературна осведоменост на д-р Ганчева. Текстът на обзора е ясен и информативен. Той е разделен на три раздела: метаболически синдром, витамин К и остеокалцин. В първия раздел е дадена дефиниция на метаболически синдром, разгледани са промените във функциите на централната нервна система при този

синдром, посочени са индуцираните с диета експериментални модели на метаболитен синдром, както и централно-нервните проявление на метаболитния синдром при експериментални животни. Във втория раздел е разгледана подробно наличната в литературата информация за витамин К. Проследени са видовете, химическата структура и природните източници, фармакокинетиката и механизмът на действие на витамин К. Посочена е ролята на витамин К в коагулацията, както и са разгледани последствията от субклиничния дефицит на витамин К върху енергийния метаболизъм, нервната система, костното здраве, съдовата калцификация и злокачествените заболявания. Третият раздел от литературния обзор е посветен на остеокалцина от гледна точка на структура и синтез, участие в енергийния метаболизъм, ефекти върху нервната система, костите и фертилитета, разгледано е фармакологичното повлияване на нивото на остеокалцина.

Оценка на целта, задачите и методите

От литературния обзор логично произлиза целта на дисертационния труд, която е да се изследва ролята на витамин К и зависимия от него протеин остеокалцин в регулацията на енергийния метаболизъм, поведението и когнитивните функции при интактни опитни животни и при животни с метаболитен синдром.

Задачите за постигане на тази цел са ясно дефинирани. Има четири основни, доста обемни задачи. Първата задача е да се разработи модел на метаболитен синдром при плъхове, който да се охарактеризира чрез показателите на въглехидратния и липиден метаболизъм, чрез поведенчески отклонения в тестове за локомоция, тревожност, депресия и памет, чрез нивата на нивата на некарбоксилиран и карбоксилиран остеокалцин. Втората задача е при интактни животни и плъхове с модел на метаболитен синдром да се определят ефектите на витамин К върху енергийния метаболизъм и върху показатели за поведенчески и когнитивни функции. Третата задача е при интактни животни и плъхове с модел на метаболитен синдром да се изследва влиянието на антагониста на витамин К, warfarin, върху концентрациите на двете форми остеокалцин, върху енергийния метаболизъм и върху показатели на

поведенчески и когнитивни функции. Четвъртата задача е при интактни животни и плъхове с модел на метаболитен синдром да се изследва ефектът на alendronate, като инхибитор на костната резорбция, върху некарбоксилирания остеокалцин, върху енергийния метаболизъм и върху показатели на поведенчески и когнитивни функции.

Материалът и методите са адекватно подбрани, за да се постигнат целите и задачите на проучването. Опитите са направени върху лабораторни плъхове порода Wistar, за чието използване е получено разрешение от Комисията по етика при животните (КЕЖ) към Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) при Министерството на земеделието и храните.

Използвани са голям набор от биохимични тестове (инсулино-толерантен тест и глюкозо-толерантен тест) и показатели (триглицериди, холестерол, HDL-холестерол, инсулин и лептин, карбоксилиран и некарбоксилиран остеокалцин), както и множество поведенчески тестове за двигателна активност, тревожност, депресия и памет (открито поле, социално взаимодействие, принудително плуване, разпознаване на обект, разпознаване на място).

Резултатите са обработени чрез адекватни анализи: еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA с последващ Newman-Keuls пост тест) и двуфакторен вариационен анализ (two-way ANOVA с последващ Bonferroni пост тест), Student's t-test, корелационен анализ. Използвана е статистическата програма GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Оценка на собствените резултати

Получените резултати представляват голям брой от оригинални данни, които авторката интерпретира компетентно. За по-голяма яснота след всеки основен раздел от резултати е направено тяхното обсъждане, което много улеснява читателя. Резултатите са представени в четири раздела, които съответстват на четирите задачи. След четирите раздела има обобщена дискусия. Получени са модели на метаболитен синдром с висцерално затлъстяване, дислипидемия, инсулинова резистентност, като са използвани два вида диети – с повишено съдържание предимно на мазнини и с повишено съдържание на фруктоза и мазнини. Поради някои предимства на диетата, обогатена с мазнини

и фруктоза по отношение на повишаването на инсулиновите нива и чернодробните триглицериди, тя е използвана в последващите експерименти.

При експериментален модел на метаболитен синдром се понижава нивото на некарбоксилирания остеокалцин, като се открива връзка между некарбоксилирания остеокалцин и нивата на кръвна захар, от което се съди, че този протеин е въввлечен в енергийната регулация. Животните с метаболитен синдром проявяват признаци на тревожност и депресивно-подобно поведение, които са също количествено свързани с нивата на некарбоксилирания остеокалцин.

В използваната експериментална постановка на метаболитен синдром се установява, че витамин К2 оказва протективен ефект и предпазва третираните с него животни от развитие на метаболитен синдром и свързаните със синдрома тревожност и депресивно-подобно поведение. В същото време, третирането с витамин К стимулира процеса на карбоксилиране и по принцип води до намаляване на нивата на некарбоксилирания остеокалцин. В съответствие с това, витамин К би трябвало да влошава, а не да подобрява енергийния метаболизъм. Авторката търси обяснение за този положителен ефект на витамин К в други механизми, които не са свързани с карбоксилиране на $\text{gl}\alpha$ -протеини, като изразени антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти.

При плъхове, подложени на обогатена с мазнини и фруктоза диета, приложението на warfarin подобрява енергийния метаболизъм и предотвратява развитието на метаболитен синдром и придружаващите го тревожност, депресия и когнитивни нарушения. Д-р Ганчева търси обяснение на тези ефекти на warfarin в предизвиканото от него повишаване на нивата на некарбоксилирания остеокалцин, който, от своя страна, може да повлияе метаболитните и поведенческите симптоми.

Третирането на интактни плъхове и на плъхове, подложени на обогатена с мазнини и фруктоза диета, с alendronate води до понижаване на нивата на некарбоксилирания остеокалцин и до влошаване на показателите на енергийния метаболизъм. Бифосфонатът води до тревожност. Той нарушава когнитивните

некарбоксилирания остеокалцин и до влошаване на показателите на енергийния метаболизъм. Бифосфонатът води до тревожност. Той нарушава когнитивните функции на опитните животни, като в това отношение съществува синергизъм в действието на alendronate и висококалоричната диета.

Оценка на изводите

Приемам изводите, направени от д-р Силвия Ганчева. Те са в съответствие със получените собствени резултати, ясно потвърдени с изследването на множество параметри на енергийния метаболизъм и поведението на опитните животни. Третирането на млади мъжки плъхове порода Wistar с диета, обогатена с умерено количество животински мазнини и фруктоза, води до индукция на метаболитен синдром. Витамин К оказва протективни ефекти върху енергийния метаболизъм и поведението на плъховете. Кумариновият антикоагулант warfarin повлиява благоприятно енергийния метаболизъм и поведението на плъховете, вероятно в резултат на повишеното ниво на некарбоксилирания остеокалцин. Бифосфонатът alendronate има негативен ефект върху енергийния метаболизъм и поведението на плъховете, вероятно вследствие на пониженото ниво на некарбоксилирания остеокалцин. Витамин К и некарбоксилираният остеокалцин, упражняват благоприятни ефекти върху въглехидратния метаболизъм и поведенческите нарушения при метаболитен синдром, най-вероятно по различни механизми.

Оценка на приносите

Съществени приноси на дисертационния труд, които имат не само теоретична, но и приложна стойност, са:

- Разработен и верифициран е възпроизводим и икономичен диетичен модел на метаболитен синдром при плъхове порода Wistar.
- За пръв път е установена връзка между показатели на енергийния метаболизъм и нивото на некарбоксилирания остеокалцин при плъхове: в модел на метаболитен синдром нивата на некарбоксилирания остеокалцин са понижени, фармакологично повишеното ниво на некарбоксилирания остеокалцин (с warfarin) е съпроводено с подобряване на метаболитните и поведенчески показатели, а

фармакологично понижено ниво на некарбоксилация остеокалцин (с alendronate) е съпроводено с влошаване на метаболитните и поведенчески показатели.

- За първи път лекарствата warfarin и alendronate са охарактеризирани от гледна точка на ефектите им върху метаболитни и поведенчески показатели.
- За първи път е установено, че третирането с витамин К2 предотвратява развитието на метаболитен синдром и появата на тревожно-депресивно поведение при плъхове, подложени на диета, обогатена с мазнини и фруктоза.

Наукометричен анализ на дисертационния труд

Във връзка с дисертационния труд е представен списък от 6 публикации в пълен текст в сборници и медицински списания, като на всички д-р Силвия Ганчева е първи автор. Една от публикациите е в списание с импакт фактор. Общият импакт фактор на публикациите е 1.78. Резултатите от експериментите са докладвани на 15 научни форума, 6 от които в чужбина. Три от разширените резюмета са публикувани в списания с импакт фактор, като общият импакт фактор на участията е 12.717. На 11 от научните съобщения дисертантката е първи автор.

Оценка на автореферата

Авторефератът е написан прецизно на 79 страници и отразява напълно съдържанието на дисертационния труд. Той включва следните раздели: Въведение, Цел и задачи, Материали и методи, Собствени резултати и дискусия, Изводи, Приноси, Списък на публикациите и участията във връзка с дисертационния труд. Резултатите са онагледени с 33 фигури и 17 таблици.

Заклучение

Дисертационният труд на д-р Силвия Ганчева, изработен под ръководството и всеотдайната подкрепа на нейния научен ръководител, доц. д-р Мария Желязкова-Савова, д.м., е резултат от задълбочена и прецизна изследователска работа, в която коректно се регистрират, анализират и

фармакологични методи, модели и показатели, които позволяват да се направят адекватни изводи с фундаментален и приложен характер. Получени са оригинални данни за ролята на витамин К и некарбоксилирания остеокалцин в енергийния метаболизъм. Резултатите са задълбочено интерпретирани, което показва уменията на д-р Силвия Ганчева да анализира данните от проучванията. Авторката има добра теоретична и висока методична подготовка. Получени са приноси със значителна теоретична и научно-приложна стойност. Резултатите са отразени в 6 публикации и са докладвани на 15 научни форума.

Считам, че дисертационният труд отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и на Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет – Варна, и убедено ще гласувам положително за присъждането на образователна и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“ на д-р Силвия Ганчева Маринова.

Гр. Варна

05.07.2018 г.

Рецензент:



/проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н./