



## Рецензия

От проф. Спаска Ангелова Станилова, дбн

**Катедра Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика,  
Медицински факултет, Тракийски Университет, Стара Загора**

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, научна специалност „Фармакология“ (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“  
докторска програма – Фармакология

**Автор:** Лилия Жечева Пашова-Стоянова

**Катедра:** Физиология, патофизиология и фармакология; Медицински Факултет, Тракийски Университет – Стара Загора

**Тема:** ” Модулация на ренин-ангиотензиновата система при експериментално предизвикани метаболитни промени ”

**Форма на докторантурата:** редовна

**Научен ръководител:** Проф. Д-р Анна Найденова Толева, дм

**Научен консултант:** Доц. д-р Стефчо Радев Василев, дм

### **Общо представяне на процедурата**

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл.48 от Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски Университет и включва всички необходими документи, така както са изброени в Инструкциите.

Нямам забележки по представените документи.

Представеният труд съдържа литературна справка, цел и задачи, материали и методи; резултати; обсъждане, изводи, приноси и библиография. Дисертационният труд съдържа 156 страници. Включва 39 фигури и 20 таблици. Библиографията обхваща 175 заглавия, от които 3 на кирилица и 172 на латиница

### **Кратки биографични данни за докторанта**

Лилия Жечева Пашова-Стоянова е завършила Медицински Факултет към Медицински Университет-Варна през 2014г с придобита професионална квалификация: магистър - лекар, а от 1.10.2015 е асистент по фармакология в Медицински Факултет на Тракийски Университет. Като редовен докторант в същата катедра е зачислена от 01.04.2018г. като продължение на започнатата експериментална научна дейност.

### **Актуалност на тематиката**

Изследването е свързано с проучване на промените в основни компоненти на ренин-ангиотензиновата система при плъхове в модел на диетично индуцирани метаболитни нарушения, както и ефектите на суплементиране с vitD.

Всички опити с животни и изолиран от тях биологичен материал са проведени в Експериментална Лаборатория с Операционен Комплекс към Катедра Физиология, патофизиология и фармакология на Медицински Факултет, Тракийски университет, Стара Загора.

Ренин-ангиотензин-алдостероновата система е комплексна ендокринна система включваща ензими, протеини, пептиди и техните клетъчни рецептори, която заема ключова позиция в регулацията на артериалното налягане, водната и електролитната хомеостаза. Експресията на RAS компонентите в клетките на адипозната тъкан е свързващото звено с промените при развитието на метаболитен синдром.

В предвид научните данни по темата и представеният литературен обзор проведените изследвания от Лилия Пашова-Стоянова са подчертано актуални, както в теоретично направление, така и за конкретно медицинско приложение.

**Литературният обзор** е добре структуриран и систематизиран в съответствие с темата, което показва че дисертанта е запознат с постиженията на световната и наша наука по изследвания проблем, както и свързаните с изследването на проблема съвременни методи. Представени са подробни данни за компонентите на RAAS системата, тяхното активиране и физиологичните им последствия за организма; участието на системата в патогенезата, развитието и възникването на усложнения в хода на развитието на метаболитен синдром, както и възможностите за нейното модулиране чрез фармакологични средства. Описани са надлежно интрацелуларните сигнализации включвани от различните рецепторите за ангиотензин II при таргетните клетки. Така написаният литературен обзор е с приносен характер и дава солидна база за планиране и провеждане на собствените проучвания на докторанта в очертаната тематика.

**Целта на дисертационния труд** е точно и ясно формулирана и научно обоснована. Поставените задачи, седем на брой произтичат от основната цел на дисертацията и са реализирани изцяло в експерименталната част.

### **Методика на изследването**

В раздела „**Материали и методи**” са включени описанията на експериментите, които са реализирани в два последователни етапа:

1. Индуциране на метаболитни нарушения чрез високофруктозна диета и еднократно интраперитонеално инжектиране на streptozotocin – продължителност 12 седмици.
2. Индукция на метаболитни нарушения чрез високофруктозна диета и еднократно интраперитонеално инжектиране на streptozotocin и изследване на протективната роля на две дози витамин Д (500 UI/kg; 750 UI/kg) - продължителност 12 седмици.

В хода на експеримента са отчитани морфометричните показатели и нивата на кръвната захар на всички екземпляри седмично, а след приключването му са проведени останалите тестове. За определяне на хормоналните концентрации на инсулина, витамин Д, ренин и ангиотензин II са използвани ELISA китове. Проведени са и експериментите за регистрация и анализ на ангиотензин II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура.

Методологично работата е богата и от описанието и материалите илюстриращи резултатите е видно, че докторанта владее описаните методики.

**В раздела Резултати (18 стр.)** са подробно описани получените от експериментите данни, след статическа обработка, което позволява да се направят сравнения и подходящи изводи. Обема и представените графики и таблици са подходящи за илюстриране на резултатите от експериментална дейност. В първата глава от резултати са представени ефектите от прилагане на високофруктозна диета за индукция на метаболитни нарушения при мъжки и женски плъхове включващи: промени в морфометричните и биохимични показатели – плазмена глюкоза, липиден профил, пикочна киселина, креатинин, инсулин, ренин, ангиотензин II и vit D.

За отбелязване е експеримента за изследваната ангиотензин II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура при мъжки и женски плъхове, подложени на високофруктозна диета. Резултатите са изцяло оригинални и също добре илюстрирани със записи от експеримента.

Във втората част са представени същите показатели ,но след протекция на експерименталните животни с две дози от витамин Д, което позволява да се оцени ефекта на този витамин при развитието на експериментален метаболитен синдром.

**Дискусията** е представена на 21 стр и отново разделена на две глави, логично следващи представените резултати. Докторантът обсъжда подробно получените

резултати, като на моменти повтаря описанието в резултатите. По-голямо внимание е обърнато на потвърдителните резултати, което според мене малко затруднява изложението и бих препоръчала в бъдеще да обсъжда по-подробно оригиналните резултати.

В първата част на обсъждането са представени предимно потвърдителните изводи от апробираният модел на високофруктозната диета върху развитието на метаболитни нарушения, като е подробно обсъдено наличието на полово специфични различия както по отношение на морфометричните, така и в промяната на клинично-лабораторните параметри. Обсъдена е и проявата на полов диморфизъм в промяната на контрактилитета на гладката висцерална мускулатура на стомашно-чревния тракт. Докторантът прави обосновано заключение че метаболитните нарушения в резултат от високофруктозната диета водят до модификация на ангиотензин II-индуцираната интестинална активност и предизвикват градивна алтерация в дистална посока с най-сериозно и значително засягане на ректума.

Във втората част са обсъдени изследваните промени в ренин-ангиотензиновата система в условията на високофруктозна диетична манипулация при наличие на две различни дози от витамин Д. Поради плейотропният ефект на този витамин върху няколко системи, включително и при развитие на метаболитният синдром докторантката се е ориентирала към оценка на неговият протективен ефект. Обсъдени са разликите в резултатите от настоящият експеримент и някои литературни данни, като са представени хипотези за тяхното обяснение. Подчертани са наличните оригинални изводи за ефектът на витамин Д върху ангиотензин II-индуцирания контрактилитет на висцералната гладка мускулатура на стомашно-чревния тракт. За отбелязване е резултатът относно протективното влияние на витамин Д върху концентрацията на пикочната киселина в условията на диетична манипулация с високофруктозна диета.

Бих препоръчала на докторанта за бъдещата дейност при интерпретация на резултати от експериментален животински модел към съответните показатели при хора да обърща внимание на лимитиращи фактори при модела, които не позволяват пряка транслация в случая към свързаните с метаболитния синдром кардиогенни и метаболитни увреждания при човек. В дискусията този проблем не е обсъден.

В заключение представената Дисертация има актуален и приносен характер. Приемам научните изводи и приноси, така както авторът ги е формулирал: 5 потвърдителни и 3 с оригинален характер.

#### **Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Във връзка с дисертационният труд са представени 3 публикации, като две от тях са в списания с IF, с което се покриват изцяло изискванията на ТрУ- Медицински факултет, формулирани в Правилника за получаване на научно-образователната степен „Доктор”. Освен това докторанта е докладвал резултати в 8 научни форуми, като и е участвал в три научни проекта.

**Заключение:** Представеният ми Дисертационен труд, съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати и отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ТрУ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Лилия Жечева Пашова-Стоянова притежава теоретични знания и професионални умения по научна специалност Фармакология като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване, представяне на резултати и тяхната интерпретация.

Поради гореизложеното, 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 Лилия Жечева Пашова-Стоянова в докторска програма по Фармакология и професионално направление „Медицина”.

14.08.2019 г.



/проф. Спаска Станилова, дбн/

## **Review**

**By Prof. Spaska Stanilova, PhD, DSc**

**Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora**

of dissertation for the award of the educational and scientific degree 'Doctor of Medicine'

Higher education area 7. Health and sports, professional field 7.1. Medicine, specialty "Pharmacology" (including pharmacokinetics and chemotherapy) "  
doctoral program - Pharmacology

**Author:** Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova

**Department:** Physiology, pathophysiology and pharmacology; Faculty of Medicine, Trakia University - Stara Zagora

**Topic: "Modulation of the renin-angiotensin system in experimentally induced metabolic changes"**

**PhD form:** full-time, regular

**Scientific Supervisor:** Prof. Dr. Anna Naydenova Tolekova, MD

**Scientific Advisor:** Assoc. Prof. Dr. Stefcho Radev Vasilev, MD

### **General presentation of the procedure**

The presented set of materials in paper and electronic form is in accordance with Article 48 of the Rules for the Development of Academic Staff at Trakia University and includes all the necessary documents as listed in the Instructions. I have no comment on the documents presented.

The presented work contains a literature review, purpose and tasks, materials and methods; results; discussion, conclusions, contributions and bibliography. The dissertation contains 156 pages. Includes 39 figures and 20 tables. The bibliography includes 175 titles, 3 of which are in Cyrillic and 172 in Latin.

### **Short biography of the doctoral student**

Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova graduated from the Faculty of Medicine at the Medical University of Varna in 2014 with a professional qualification: Master's Degree - Doctor, and from 1.10.2015 she is Assistant Professor of Pharmacology at the Faculty of Medicine of Trakia University. As a full-time PhD student in the same department she has been enrolled since 01.04.2018. as a continuation of the experimental research started.

### **Actuality of the theme**

The study is about exploring changes in major components of the renin-angiotensin system in rats in a model of diet-induced metabolic disorders, as well as the effects of vitD supplementation.

All experiments with animals and biological material isolated from them were carried out in the Experimental Laboratory with Operation Complex at the Department of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology of the Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora.

The renin-angiotensin-aldosterone system is a complex endocrine system comprising enzymes, proteins, peptides and their cellular receptors, which occupies a key position in the regulation of blood pressure, water and electrolyte homeostasis. Expression of RAS components in adipose tissue cells is the link with changes in the development of metabolic syndrome.

Taking into account the scientific data on the topic and the presented literature review, the research conducted by Lilia Pashova-Stoyanova is extremely relevant, both in theoretical direction and for specific medical application.

**The literature review** is well-structured and systematized in accordance with the topic, which shows that the PhD student is familiar with the achievements of the world and our science in the studied problem, as well as modern methods related to the study of the problem. Detailed data on the components of the RAAS system, their activation and their physiological consequences for the body are presented; the involvement of the system in the pathogenesis, development and occurrence of complications during the development of the metabolic syndrome, as well as the possibilities for its modulation by pharmacological agents. Properly described, the intracellular signaling involved by the various angiotensin II receptors in the target cells has been described. The literature review written in this way has a positive character and provides a solid basis for planning and conducting the PhD student's own research in the outlined area.

**The purpose of the dissertation** is precisely and clearly formulated and scientifically substantiated. The tasks set, seven in number, stem from the main purpose of the dissertation and are fully realized in the experimental part.

### **Research methodology**

**The Materials and Methods section** includes descriptions of the experiments that were implemented in two sequential stages:

1. Induction of metabolic disorders by high-fructose diet and single intraperitoneal injection of streptozotocin - duration 12 weeks.
2. Induction of metabolic disorders by high-fructose diet and single intraperitoneal injection of streptozotocin and examination of the protective role of two doses of vitamin D (500 UI / kg; 750 UI / kg) - duration 12 weeks.

In the course of the experiment, the morphometric parameters and blood glucose levels of all specimens were taken into account weekly, and the rest of the tests were performed after completion. ELISA kits were used to determine the hormonal concentrations of insulin, vitamin D, renin and angiotensin II. The experiments for the registration and analysis of angiotensin II - induced contractile activity of visceral smooth muscle preparations were also carried out.

Methodologically, the work is rich and from the description and materials illustrating the results it is evident that the PhD student is proficient in the methods described.

**The Results section (18 pages)** details the data obtained from the experiments after static processing, which allows comparisons and appropriate conclusions to be drawn. The volume and the graphs and tables presented are appropriate to illustrate the results of the experimental activity. The first chapter of the results presents the effects of applying a high-fructose diet for the induction of metabolic disorders in male and female rats, including: changes in morphometric and biochemical parameters - plasma glucose, lipid profile, uric acid, creatinine, insulin, renin, angiotensin II vit D.

Of note is the experiment for the investigated angiotensin II-induced contractile activity of visceral smooth muscle preparations in male and female rats subjected to a high-fructose diet. The results are completely original and also well illustrated with records from the experiment.

The second part presents the same indicators, but after the protection of experimental animals with two doses of vitamin D, which allows to evaluate the effect of this vitamin in the development of experimental metabolic syndrome.

**The discussion** is presented on 21 pages and again divided into two chapters, logically following the results presented. The PhD student discusses the results obtained in detail, repeating the description of the results at times. More attention has been paid to the confirmatory results, which in my view is a little difficult to explain and I would recommend discussing the original results in more detail in the future.



The first part of the discussion presents mostly the confirmatory conclusions of the tested model of the high-fructose diet on the development of metabolic disorders, discussing in detail the existence of sex-specific differences in both morphometric and clinical-laboratory parameters. The manifestation of sexual dimorphism in the alteration of the contractility of the smooth visceral musculature of the gastrointestinal tract is also discussed. The PhD student concludes that the metabolic disorders resulting from the high-fructose diet lead to a modification of angiotensin II-induced intestinal activity and cause alternation in the distal direction with the most serious and significant effect on the rectum.

The second part discusses the studied changes in the renin-angiotensin system under conditions of high-fructose dietary manipulation in the presence of two different doses of vitamin D. Due to the pleiotropic effect of this vitamin on several systems, including in the development of the metabolic syndrome, the PhD student was oriented towards evaluating its protective effect. The differences in the results of the present experiment and some literature data are discussed and hypotheses are provided to explain them. The original findings on the effect of vitamin D on the angiotensin II-induced visceral smooth muscle of the gastrointestinal tract are outlined. Of note is the result regarding the protective effect of vitamin D on the concentration of uric acid under conditions of dietary manipulation of a high-fructose diet.

I would recommend to the PhD student when interpreting the results of an experimental animal model to the relevant indicators in humans, to pay attention to the limiting factors in the model that do not allow direct translation in this case of cardiogenic and metabolic disorders related to the human metabolism. This issue was not discussed in the discussion.

In conclusion, the presented Dissertation is of current and informative character. I accept the scientific conclusions and contributions as formulated by the author: 5 confirmatory and 3 original.

#### **Assessment of dissertation publications**

In connection with the dissertation, 3 publications were presented, two of them in journals with IF, which fully cover the requirements of the Medical University, formulated in the Regulations for obtaining the Doctoral degree. In addition, the PhD student reported results in 8 scientific forums and participated in three scientific projects.

**Conclusion:** The dissertation submitted to me contains original scientific and applied scientific results and meets the requirements of the Law on the Development of the Academic

Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for the implementation of the Law and the corresponding Rules of Trakia University.

The dissertation shows that the PhD student Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova possesses theoretical knowledge and professional skills in the specialty Pharmacology, demonstrating qualities and skills for independent research, presentation of results and their interpretation.

Because of the above, I give my **positive assessment** for the research presented by the dissertation reviewed above, abstract, achieved results and contributions, and propose to the venerable scientific jury to award the educational and scientific degree 'Doctor of Medicine' to Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova in PhD program in Pharmacology and professional field "Medicine".

14.08.2019 г.

/ Prof. Spaska Stanilova, PhD, DSc /