



СТАНОВИЩЕ

от

проф.д-р Юлия Николова, дм

Катедра Физиология, МФ, МУ-Пловдив

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

по професионално направление 7.1. Медицина,

докторска програма: Фармакология

(вкл.фармакокинетика и химиотерапия).

Автор: д-р Лилия Жечева Пашова-Стойнова, зачислена като докторант към катедра Физиология, патофизиология и фармакология в МФ при ТрУ - Стара Загора със заповед на Ректора 816/03.04.2018 г.

Катедра: Физиология, патофизиология и фармакология,
Медицински факултет, Тракийски университет - Стара Загора

Тема: "МОДУЛАЦИЯ НА РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВАТА СИСТЕМА
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ПРЕДИЗВИКАНИ МЕТАБОЛИТНИ
ПРОМЕНИ."

Научен ръководител: проф. д-р Анна НайденоваТолева, дм,

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

Комплекът документи, представен от докторант д-р Лилия Пашова-Стойнова, е в съответствие с изискванията за придобиване на ОНС „доктор“ в Тракийски университет – Стара Загора, съгласно Правилника на ТУ-Стара Загора.

Темата, избрана от д-р Пашова-Стойнова е актуална и основание за това са следните факти:

- Ренин-ангиотензин-алдостероновата система (RAAS) играе ключова роля в телесната хомеостаза – свързана е с междинната и продължителната

- регулация на артериалното налягане (АН), водно-солевия баланс и контрола на телесните течности;
- Дългогодишните научни дирения са довели и до откритието и на локални RAAS, нови метаболити, ензими и рецептори, участващи чрез паракринни и автокринни механизми във физиологичните функции на много органи и системи;
 - Възможностите за модулация на RAAS разкриват нови перспективи пред фармакологичната общност, свързвани с вероятното повлияване не само повишеното АН, но и на редица синдроми и заболявания, в основата на които са метаболитни нарушения;
 - Участието на RAAS във финия контрол на множество физиологични механизми и патологичните промени в тях при активирането или потискането ѝ, водещи до метаболитни нарушения, са свързани с развитието на ендотелна дисфункция, дислипидемии, нарушена инсулинова резистентност, метаболитен синдром(МС) и захарен диабет, артериална хипертония, сърдечно-съдови заболявания(ССЗ) и мозъчно-съдови инциденти;
 - Експерименталното модулиране на RAAS при модели на животни позволява задълбочено изучаване и дискутиране на патологични механизми - основа на нарастващите по честота сърдечно-съдови заболявания и мозъчно-съдови инциденти и разкриването на нови терапевтични подходи, повлияващи и качеството на живот;
 - Възможността, в зависимост от етапа на настъпилите промени, RAAS да бъде повлияна чрез немедикаментозни или медикаментозни средства – условие за преустановяване или забавяне на патологични промени, водещи до развитието на болестни състояния.

Защо докторантът д-р Пашова-Стойнова е насочил научните си дирения към експериментално индуциране на метаболитни нарушения за активиране на RAAS и към отговор на въпроса каква би била ролята на vit.D в условията на диетично индуциран МС. Диагностичните критерии за наличие на МС при възрастни индивиди са унифицирани от дефиницията на Международната Диабетна Федерация (IDF), обуславяйки базата за реална оценка на честотата и разпространението му. Нарастващото социално значение на МС го представя като комплекс от взаимно свързани рискови фактори за развитието на захарен диабет тип2 и ССЗ. Той се определя като съчетание от абдоминално затлъстяване, инсулинова резистентност с или без нарушения в глюкозния толеранс и повишено артериално кръвно налягане. RAAS поддържа телесната хомеостаза чрез контрол върху Na^+/K^+ метаболизъм, вътресъдовия обем и АН. Ca^{2+} регулиращите хормони и в частност vit.D, са свързани не само с физиологията на мускулите и костите, но и със сърдечно-съдовата система(ССС) и бъбреците. Задълбочените прочвания върху връзката между метаболитните нарушения, активираната RAAS и калциевата хомеостаза биха могли да начертаят нови ендокринни зависимости и да дадат механистични обяснения. Спектърът от физиологични ефекти на vit.D надхвърля ролята му на фактор, участващ в калциево-фосфорната хомеостаза и костния метаболизъм. Оказва се, че vit.D участва и

в клетъчната диференциация и имунитета, в поддържане на интегритета на съдовата стена и този на кардиомиоцитите, играе роля за инсулиновата резистентност, има антипролиферативен ефект, модулира RAAS.

Така, предизвикателството да се изследват експериментално модулираните морфологични и биохимични параметри на активираната RAAS и ефектите на vit.D при диетично индуциран метаболитен синдром генерира обосновано научните дерзания на д-р Л.Пашова-Стоянова в две направления: индуциране на метаболитни нарушения при мъжки и женски плъхове Vistar и регистриране на промени в параметрите и съкратителната гладко мускулна активност на стомашно-чревния тракт, отразяващи стимулираната RAAS и изследване на проактивната роля на vit.D при модулацията ѝ.

Структурата на дисертационния труд и на представения автореферат съдържа необходимите елементи, посочени в правилника на МФ, ТрУ - Стара Загора, подредени в общоприетата последователност. Дисертацията е написана на 156 страници, добре онагледена е с 20 таблици и 39 фигури.

Литературният обзор е обстоен и изцяло насочен към темата на дисертационния труд. Той се базира на 175 литературни източника – 3 на кирилица и 172 на латиница, като повечето от тях са от последните десет години. Цитираните само три български източника илюстрират ограничената информация по проблема в страната. Литературният обзор актуално отразява дискусията относно биомаркерите, свързани с MC, насочващи към метаболитна и сърдечно-съдова патология. Коментират се рисковите фактори и възможността да се предотврати или забави развитието на компонентите, свързани с определени метаболитни отклонения. Дискутира се и ролята на vit.D на мултифункционален прохормон, противодействащ на активираната RAAS. Така vit.D би могъл да стабилизира телесната хомеостаза и в частност – физиологията на ССС и бъбреците. Ролята на ниските нива на vit.D се дебатира при клинични проучвания, свързващи повишената активност на RAAS с процесите на възпаление и най-вече с патологията на ССС. Интересът към проблемите на метаболитните нарушения и активираната RAAS и ролята на vit.D обуславя и представените физиологичен и патофизиологичен аспекти на научното дирене, обосновавали идеята за дисертационния труд. Противоречиви са и данните относно биомаркерите, свързани с MC, посочващи повишен сърдечно-съдов риск, активираната RAAS и ролята на vit.D. Коментират се рисковите фактори и възможността да се предотврати или забави развитието на компонентите, свързани с определени метаболитни отклонения.

Изводите, произтичащи от литературния обзор са логична предпоставка за формиране на **целта на дисертационния труд**. Тя е подчинена на идеята на етап 1 да се индуцират метаболитни нарушения при мъжки и женски плъхове Vistar и да се проследят промените в някои морфометрични и биохимични показатели, активността на RAAS и свързаната с нея съкратителна активност на гладко мускулните клетки, изграждащи стомашно-чревния тракт и на етап2 да се изс-

ледва протективната роля на vit.D при индуцирани метаболитни нарушения при мъжки плъхове Vistar и ролята му за модулацията на RAAS.

Правилно изведена, **целта** на темата д-р Пашова-Стоянова се реализира чрез 7 на брой логично подчинени задачи.

Задачите, логично следващи поставената цел, са конкретно обосновани в седем пункта: индуциране на метаболитни нарушения, предизвикани чрез диетична манипулация с 15% разтвор на фруктоза и еднократно третиране с ниска доза стрептозодоксин при мъжки и женски плъхове Vistar, изследване на промените в морфометричните показатели, проследяване на промените в клиничко-химичните параметри на плазмената глюкоза, липидния профил и пикочната киселина, изследване на концентрациите на инсулина, ренина, ангиотензинII и vit.D, регистриране на съкратителната активност на гладко мускулните клетки в стомашно-чревния тракт, изследване на протективното действие на vit.D в различни дози при метаболитни отклонения и анализиране на взаимовръзката му с активираната RAAS.

Спецификата на многофакторния анализ на изследваните параметри обуславя осъществяването на експериментите на два етапа - *първи етап*, свързан с индуцирането на метаболитните нарушения при мъжки и женски плъхове Vistar на комбиниран диетичен модел с елементи на фармакологичен модел и втори етап, свързан с изследване на протективната роля на vit.D при създадения одел и връзката му с активираната RAAS. Опитните животни са поставени на високо фруктозна диета и еднократно са инжектирани със стрептозодоксин интраперитонеално. Експериментите и по двата етапа на научната разработка са съобразени с изискванията и са одобрени с протокол на Етичната комисия към ТрУ-Стара Загора и в съгласие с изискванията на Националните нормативни документи. Достоянство на дисертационния труд е апробирания комбиниран диетичен модел с елементи на фармакологичен модел за индукция на метаболитни нарушения и метаболитен синдром, както и експерименталните животни – брой и хетерогенност по пол. Опитните животни за реализиране на задачите по етап1 са разпределени в 4 експериментални групи, а за етап2 – в три.

Материалът и методите за осъществяване на поставените научни идеи са адекватни и подходящо съобразени с поставените цел и задачи. За реализирането на трите експеримента в хода на двата етапа са използвани полово зрели мъжки и женски плъхове Vistar, 50 на брой. Животните от всички експериментални групи са поставени при стандартизирани напълно еднакви условия в индивидуални клетки със свободен и неограничен достъп до храна и вода през цялото денонощие и редуване на 12 часови периоди –светло/тъмно. Отглеждането на животните е извършено съобразно препоръките на Европейската комисия за защита и хуманно отношение към лабораторните животни, с изискванията на Декларацията от Хелзинки за етичност в науката и със законовите и нормативни актове в НР България.

Антропометричните измервания(телесна маса, обиколка на талията, дължина от муцунката до опашката) са извършени коректно. Механичната активност на гладко мускулните препарати е измервана чрез датчици тип SEN-03-FSG1(Experimetria Ltd,Hungary), свързани с усилвантел. Гладко мус-

кулните отговори са дигитализирани и записвани чрез компютърна програма ISOSYS-Advanced 1.0. Дефинирани и анализирани са времеви параметри на гладко мускулната контракция като е извършен качествен и количествен анализ на ангиотензинII-индуцираната съкратителна активност на препарати от стомах и тънко черво. Изследването на *хормоните*, необходими за оценка на компонентите на МС, е описано коректно, като кръвта е осигурявана сутрин на гладно чрез затворена система за вземане на биологичен материал. *Клинико-химичните* показатели са изследвани чрез клинично-химичен анализатори с оригинални реактиви. Плазмената глюкоза е измервана сутрин на гладно с помощта на тест ленти и глюкомер, като кръвта е вземана от опашната вена след предварително затопяне на опашката в термостат. Чрез измерване на стойностите на плазмената глюкоза и инсулина на гладно е приложен хомеостатичния модел за оценка на инсулиновата резистентност – определен е НОМА- IR. На базата на стойностите на липидния профил са изчислени и атерогенни индекси. *Статистическите методи* са съобразени с естеството на задачите и дават сигурност за достоверност на данните при $p\text{-value}<0.05$. Ползвана е компютърна статистическа програма STATISTIKA, version 8, като данните са представени като средни стойности и стандартна грешка ($\text{mean}\pm\text{SEM}$). С n са означени броя на изследваните препарати от една група. Получените стойности са сравнени чрез Student t-test.

Собствените **резултати** са описани коректно, онагледени са чрез 20 таблици и 39 фигури и съответват на поставените задачи. Данните са представени от една страна чрез корелация между конкретните фактори, и от друга – зависимостите са обобщени по пол – отчитат се значими разлики между мъжките и женските екземпляри, без обаче да се регистрира съществени разлики вътре в групите. Отчитат се повишени нива на Ли индекса и в двете експериментални групи. Полово специфични разлики се отчитат и при морфометричните показатели – при мъжките индивиди са по-изразени. Отклоненията във въглехидратния метаболизъм се регистрират както при мъжките, така и при женските индивиди, поставени на високо фруктозна диета. Апробираният диетичен модел в края на експеримента води до повишаване на плазмената глюкоза, хипергликемия на гладно и инсулинова резистентност като по-високите концентрации на изследваните параметри се отчитат при мъжките индивиди. Нарушенията на липидния профил при приложената високо фруктозна диета се отразяват върху атерогенните индекси – при женските екземпляри е променен само само TG/HDL и LCI, докато при мъжките – различията са сигнификантни с изключение на общия холестерол и LCI. Липсват значими различия между мъжките и женските индивиди в стойностите на креатинина. По отношение обаче на пикочната киселина се установява, че има слабо проявени полово специфични различия и първоначално по-високи нива при женските индивиди. Активността на RAAS при мъжките индивиди е изявена само чрез повишени стойности на ренина, докато при женските са повишени стойностите не само на ренина, но и на ангиотензинII. Данните, представящи нивата на vit.D регистрират значими полово специфични разлики. Vit.D повлиява благоприятно липидния профил и въглехидратния метаболизъм. Групите, приемащи vit.D са с по-малко отношение та-

лия/дължина. След обременяване с фруктоза се отчита тенденция за понижаване на стойностите му и при двата пола. На изолирани препарати от стомах, илеум и ректум са отчетени разлики в отговора към ангиотензинII както между отделните групи по пол, така и между контролните и експерименталните животни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение на всяка величина.

Обсъждането съдържа анализ на резултатите, добра съпоставимост с други проучвания и практически послания. Д-р Лилия Пашова-Стоянова тълкува получените данни с лекота, показвайки свободно боравене с информацията по дискутираната проблематика. Адекватното осмисляне на материята ѝ дава възможност да анализира и синтезира собствените си данни, съпоставяйки ги с обсъжданите такива в коментиранияте от литературните проучвания.

Докторантът установява, че при прилагането на високо фруктозна диета женските индивиди са по-защитени от вредното въздействие на диетичния режим. Стойностите на лабораторните показатели при животните на високо фруктозна диета кореспондират с тези при експерименти след осем седмично обременяване с 10% разтвор на фруктоза. Женските индивиди показват по-добри показатели на липидния профил и въглехидратния метаболизъм – вероятната причина е протективното действие на естрогените. Получените от д-р Пашова-Стоянова резултати за активиране на рениновата секреция са в съответствие с данните при други изследвания на базата на модела на диетична манипулация с фруктоза при плъхове. RAAS е стимулирана по-изразено при женските индивиди – процес, вероятно свързан с потискане на ангиотензин конвертиращия ензим и разпадане на регулацията на системата. Взаимодействията между vit.D и естрогените при физиологични условия и при високо фруктозен диетичен режим не са все още напълно изяснени. При проведените експериментални постановки на регистриране на ангиотензинII индуцирана съкратителна активност на гладко мускулни препарати от стомашно чревния тракт, д-р Пашова-Стоянова съобщава за съответствие с получените от Touw и сътр. – разликата е в по-слабата двигателна активност на дебелото черво при мишки с диабет.

В проведените експерименти, д-р Пашова-Стоянова установява, че добавянето на vit.D благоприятства морфометричните показатели, въглехидратния метаболизъм и липидния профил, както и активността на RAAS при животните на високо фруктозна диета.

Обсъждането завършва с обобщение на рисковите фактори за развитие на MS и за благоприятното действие на vit.D и взаимодействието му с RAAS с идеята за превенция или минимизиране на риска от появата на инсулинова резистентност и метаболитни нарушения.

Изводите, 9 на брой, подробно отразяват представените от докторанта резултати и са в съответствие с поставените задачи. Конкретизирани и ясно формулирани са метаболитните отклонения в корелация с морфометрични и клиничко-химични параметри. Метаболитният синдром по отношение на оценката и компонентите му е интерпретиран коректно. Приложението на vit.D подобрява

предизвиканата от диетичната манипулация съкратителна дисфункция на препарати от стомах, илеум и ректум при различни дози. Установяват се различия в плейотропните ефекти от приложението на vit.D при приложените две дози – предполага се хетерогенност в активираните регулаторни механизми, свързани с рениновата секреция.

Приносите: са с потвърдителен и оригинален характер. Дисертационният труд изследва взеимовръзката между RAAS и vit.D в условията на високо фруктозна диета – проучен е ефектът на витамина върху ангиотензинII повлияната съкратителна активност на гладко мускулните клетки, изграждащи стомашно-чревния тракт, както и върху пикочната киселина – приноси не само с оригинален, но и с научно-приложен характер.

На базата на представения дисертационен труд, изказвам удовлетворение от д-р Пашова-Стоянова. Тя е изградила способността да анализира и синтезира научната проблематика, да формулира научни съждения и да провежда научни експерименти, прилагайки адекватно съответната методология.

Списъкът с публикации по дисертационния труд включва 3 публикации и 8 участия в научни форуми.

Заключение: Дисертационният труд на д-р Лилия Пашова-Стоянова, докторант към катедра Физиология, патофизиология и фармакология при Медицински факултет на Тракийски университет – Стара Затора, „Модулация на ренин-ангиотензиновата система при експериментално предизвикани метаболитни промени“ е напълно завършен, методологично издържан, с научно-клинично приложение е и отговаря на изискванията за заемане на научната и образователна степен “доктор”.

Съвкупността от актуални дискутабилни проблеми, коректните методи на изследване, залегнали в планираната научна разработка, както и формулираните изводи – оригинални, с научно-приложен характер и със социално значимо звучене са предпоставка да препоръчам убедено на **уважаемото Научно жури** да гласува положително за присъждане на д-р Лилия Пашова-Стоянова Образователната и Научна Степен „Доктор“ в докторска програма по Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия).

12.08.2019 г.
Гр. Пловдив

(Проф.д-р Юлия Г.Николова, дм
катедра Физиология, Медицински факултет,
Медицински университет – Пловдив)

STATEMENT

by

Prof. Dr. Yulia Georgieva Nikolova, PhD, DSc

Department of Physiology, Medical University - Plovdiv

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

by professional field 7.1. Medicine,

doctoral program: Pharmacology

(including pharmacokinetics and chemotherapy).

Author: dr. Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova, enrolled as a PhD student in the Department of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology at Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora by order of the Rector 816/03.04.2018.

Department: Physiology, pathophysiology and pharmacology,

Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora

Topic: 'MODULATION OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN EXPERIMENTALLY INDUCED METABOLIC CHANGES.'

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

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

The set of documents, submitted by PhD student Lilia Pashova-Stoyanova, is in compliance with the requirements for acquiring a PhD at the Trakia University - Stara Zagora, in accordance with the Rules of Trakia University-Stara Zagora.

The topic chosen by Dr. Pashova-Stoyanova is up-to-date and is based on the following facts:

- The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays a key role in body homeostasis - it is associated with intermediate and long-term regulation of blood pressure (BP), water-salt balance and control of body fluids;
- Many years of scientific research have also led to the discovery of local RAAS, new metabolites, enzymes and receptors involved through paracrine and

autocrine mechanisms in the physiological functions of many organs and systems;

- The modulation capabilities of RAAS open up new perspectives for the pharmacological community related to the likely impact not only of elevated BP but also of a number of syndromes and diseases that underlie metabolic disorders;
- The involvement of RAAS in the fine control of multiple physiological mechanisms and the pathological changes in their activation or suppression leading to metabolic disorders are associated with the development of endothelial dysfunction, dyslipidemias, impaired insulin resistance, metabolic syndrome (MetS) and diabetes mellitus (DM), hypertension, cardiovascular disease (CVD) and cerebrovascular accidents;
- Experimental modulation of RAAS in animal models enables in-depth study and discussion of pathological mechanisms - the basis of increasing cardiovascular and cerebrovascular incidence and the emergence of new therapeutic approaches affecting quality of life;
- The possibility, depending on the stage of the changes, that RAAS may be affected by non-drug or drug means - a condition for the cessation or delay of pathological changes leading to the development of disease states.

The PhD student Pashova-Stoyanova has directed her scientific pursuits to experimentally induce metabolic disorders to activate RAAS and to answer the question of what the role of vit.D would be in conditions of diet-induced MetS. The diagnostic criteria for the presence of MetS in adult individuals are unified by the definition of the International Diabetes Federation (IDF), providing the basis for a real assessment of its incidence and prevalence. The increasing social importance of MetS presents it as a complex of interrelated risk factors for the development of type 2 diabetes and CVD. It is defined as a combination of abdominal obesity, insulin resistance with or without impaired glucose tolerance and elevated blood pressure. RAAS maintains body homeostasis by controlling Na^+ / K^+ metabolism, intravascular volume and BP. Ca^{2+} regulating hormones, and in particular vit.D, are associated not only with the physiology of muscles and bones, but also with the cardiovascular system and the kidneys. In-depth studies on the link between metabolic disorders, activated RAAS, and calcium homeostasis could have drawn new endocrine dependencies and provided mechanistic explanations. The spectrum of the physiological effects of vit.D goes beyond its role as a factor involved in calcium-phosphorus homeostasis and bone metabolism. It turns out that vit.D is also involved in cell differentiation and immunity, in maintaining the integrity of the vascular wall and that of cardiomyocytes, plays a role for insulin resistance, has antiproliferative effect, modulates RAAS.

Thus, the challenge to investigate the experimentally modulated morphological and biochemical parameters of activated RAAS and the effects of vit.D in diet-induced metabolic syndrome reasonably generates the scientific reluctance of Dr. L. Pashova-Stoyanova in two directions: inducing metabolic disorders in male and female Wistar rats and recording changes in the parameters and contractile smooth

muscle activity of the gastrointestinal tract, reflecting stimulated RAAS and examining the protective role of vit.D in its modulation.

The structure of the dissertation work and of the submitted abstract contains the necessary elements, specified in the regulations of the Medical Faculty, Trakia University - Stara Zagora, arranged in the generally accepted sequence. The dissertation is written on 156 pages, well illustrated with 20 tables and 39 figures.

The literature review is thorough and entirely focused on the topic of dissertation work. It is based on 175 literary sources - 3 in Cyrillic and 172 in Latin, most of them from the last ten years. Only three Bulgarian sources cited illustrate the limited information on the problem in the country. The literature review currently reflects the discussion of MetS-related biomarkers targeting metabolic and cardiovascular pathology. The risk factors and the ability to prevent or delay the development of components associated with certain metabolic abnormalities are commented. The role of vit.D in the multifunctional prohormone counteracting activated RAAS is also discussed. Thus, vit.D could stabilize body homeostasis and in particular the physiology of CVS and kidney. The role of low levels of vit.D has been debated in clinical studies linking increased RAAS activity with inflammatory processes and, in particular, the pathology of CVS. The interest in the problems of metabolic disorders and the activated RAAS and the role of vit.D also determine the physiological and pathophysiological aspects of scientific research that underpin the idea of the dissertation. Also contradictory is the data on MetS-related biomarkers indicating increased cardiovascular risk, activated RAAS, and the role of vit.D. The risk factors and the ability to prevent or delay the development of components associated with certain metabolic abnormalities are commented.

The conclusions drawn from the literature review are a logical prerequisite for shaping **the purpose of the thesis**. It is subordinated to the idea of stage 1 to induce metabolic disorders in male and female Wistar rats and to monitor changes in some morphometric and biochemical parameters, RAAS activity and related contractile activity of smooth muscle cells forming the gastrointestinal tract and in step 2 to investigate the protective role of vit.D in induced metabolic disorders in male Wistar rats and its role in the modulation of RAAS.

Correctly stated, **the purpose** of the topic by Dr. Pashova-Stoyanova is realized through 7 logically subordinated tasks.

The tasks that logically follow the goal are specifically justified in seven points: induction of metabolic disorders caused by dietary manipulation with 15% fructose solution and single treatment with low dose streptozotocin in male and female Wistar rats, study of changes in morphometric parameters, monitoring of changes in the clinical and chemical parameters of plasma glucose, lipid profile and uric acid, study of concentrations of insulin, renin, angiotensin II and vit.D, registration of contractile the activity of smooth muscle cells in the gastrointestinal tract, the study of the protective action of vit.D in different doses at metabolic abnormalities, and the analysis of its relationship with activated RAAS.

The specificity of the multifactorial analysis of the parameters studied determines the implementation of the two-stage experiments - the first stage related to the induction of metabolic disorders in male and female Wistar rats of a combined dietary model with elements of a pharmacological model and the second stage related to the study of the protective role of vit.D on the created experiment and its relation to the activated RAAS. The test animals were placed on a high fructose diet and were injected once with streptozotocin intraperitoneally. The experiments at both stages of the scientific development are in compliance with the requirements and approved by a protocol of the Ethical Commission at Trakia University-Stara Zagora and in accordance with the requirements of the National regulatory documents. The merit of the dissertation is the approbated combined dietary model with elements of a pharmacological model for the induction of metabolic disorders and metabolic syndrome, as well as the experimental animals - sex and heterogeneity by sex. The experimental animals for the implementation of the tasks under stage 1 were divided into 4 experimental groups and for stage 2 - into three.

The material and methods for implementing the scientific ideas set out are adequate and appropriately tailored to the stated goals and objectives. For the three experiments, sexually mature male and female Wistar rats, 50 in number, were used in the two steps. Animals from all experimental groups were housed under standardized identical conditions in individual cells with free and unrestricted access to food and water throughout the day and alternating 12-hour periods - light / dark. Animal husbandry was carried out in accordance with the recommendations of the European Commission for the Protection and Welfare of Laboratory Animals, with the requirements of the Helsinki Declaration on Ethics in Science and with legal and regulatory acts in the Republic of Bulgaria.

Anthropometric measurements (body mass, waist circumference, length from snout to tail) were performed correctly. The mechanical activity of smooth muscle preparations was measured by sensors type SEN-03-FSG1 (Experimetria Ltd, Hungary) connected to an amplifier. Smooth muscle responses were digitized and recorded using a computer program ISOSYS-Advanced 1.0. Time parameters of smooth muscle contraction were defined and analyzed, as a qualitative and quantitative analysis of angiotensin II-induced contractile activity of gastric and small intestine preparations was performed. The study of the hormones needed to evaluate the components of MetS has been described correctly, with blood being provided in the morning in the fasted state through a closed biological material collection system. *The clinical-chemical parameters* were investigated by clinical-chemical analyzers with original reagents. Plasma glucose was measured on an empty stomach in the morning using test strips and a glucosomer, with blood taken from the tail vein after pre-warming the tail in a thermostat. By measuring the fasting plasma glucose and insulin values, a homeostatic model for assessing insulin resistance was applied - NOMA-IR was determined. Atherogenic indices were also calculated based on the values of the lipid profile. *Statistical methods* are tailored to the nature of the tasks and provide assurance of data accuracy at $p\text{-value} < 0.05$. The computer statistical program STATISTIKA, version 8 was used, the data being presented as mean values

and standard error (mean \pm SEM). N denotes the number of test preparations in one group. The values obtained were compared by Student t-test.

Own results are described correctly, they are presented through 20 tables and 39 figures and correspond to the tasks. The data are presented on the one hand by correlation between specific factors, and on the other - the dependencies are summarized by gender - significant differences between male and female specimens are reported, but no significant differences are registered within the groups. Increased levels of Li index were reported in both experimental groups. Gender specific differences are also observed in morphometric indicators - in male individuals they are more pronounced. Deviations in carbohydrate metabolism are reported in both male and female individuals on a high-fructose diet. The dietary model tested at the end of the experiment resulted in increased plasma glucose, fasting hyperglycemia, and insulin resistance, with higher concentrations of the studied parameters being reported in male subjects. Disorders of the lipid profile in the high fructose diet applied to the atherogenic indices - only TG / HDL and LCI were altered in the female specimens, whereas in males, the differences were significant except for total cholesterol and LCI. There are no significant differences between male and female individuals in creatinine values. However, with regard to uric acid, gender-specific differences and initially higher levels in female individuals were found to be mild. RAAS activity in males is expressed only by elevated renin levels, whereas in females, not only renin but also angiotensin II are increased. Data representing vit.D levels recorded significant sex-specific differences. Vit.D favorably affects the lipid profile and carbohydrate metabolism. The groups taking vit.D have less waist / length ratio. After fructose loading, there is a tendency to decrease its values in both sexes. Isolated preparations of the stomach, ileum and rectum showed differences in the response to angiotensin II between the different sex groups and between the control and experimental animals.

Results are presented as mean \pm standard deviation of each value.

The discussion contains an analysis of the results, good comparability with other studies and practical messages. Dr. Lilia Pashova-Stoyanova interprets the received data with ease, showing free use of the information on the discussed issues. Adequate comprehension of the matter enables it to analyze and synthesize its own data, comparing it with those discussed in the literature commentaries.

The PhD student found that when applying a high-fructose diet, female individuals were more protected from the harmful effects of the dietary regimen. Laboratory values for animals on a high-fructose diet correlated with those in the experiments after eight weeks of loading with a 10% fructose solution. Female individuals exhibit better lipid profile and carbohydrate metabolism - the likely cause is the protective action of estrogens. The results obtained by Dr. Pashova-Stoyanova for the activation of renin secretion are consistent with data from other studies based on the model of dietary fructose manipulation in rats. RAAS is more strongly stimulated in female individuals - a process likely to be associated with suppression of the angiotensin converting enzyme and a breakdown of systemic regulation. The interactions between vit.D and estrogens have not yet been fully elucidated under

physiological conditions and under a highly fructose dietary regimen. In the conducted experimental formulations for the registration of angiotensin-II induced contractile activity of smooth muscle preparations of the gastrointestinal tract, Dr. Pashova-Stoyanova reported compliance with those obtained by Touw et al. - the difference is the lower motor activity of the colon in mice with diabetes.

In the experiments conducted, Dr. Pashova-Stoyanova found that the addition of vit.D favored morphometric parameters, carbohydrate metabolism and lipid profile, as well as RAAS activity in animals on a high fructose diet.

The discussion concludes with a summary of the risk factors for the development of MetS and the beneficial effect of vit.D and its interaction with RAAS with the idea of preventing or minimizing the risk of insulin resistance and metabolic disorders.

The conclusions, 9 in number, reflect in detail the results presented by the PhD student and are in accordance with the tasks. Metabolic abnormalities correlated with morphometric and clinical-chemical parameters are specified and clearly formulated. The metabolic syndrome in terms of evaluation and its components has been interpreted correctly. The use of vit.D improves the contractile dysfunction induced by dietary manipulation of gastric, ileum and rectum preparations at different doses. Differences in the pleiotropic effects of administration of vit.D at two doses were observed - heterogeneity in the activated regulatory mechanisms associated with renin secretion is suggested.

The contributions: are confirmatory and original in nature. The dissertation examines the relationship between RAAS and vit.D in a high fructose diet - the effect of vitamin on angiotensin II, the impact of contractile activity on smooth muscle cells forming the gastrointestinal tract and on uric acid, not only original, but also of a scientifically applied character.

On the basis of the presented dissertation, I express my satisfaction with Dr. Pashova-Stoyanova. She has built the capacity to analyze and synthesize scientific issues, formulate scientific judgments and conduct scientific experiments, appropriately applying the appropriate methodology.

The list of dissertation publications includes 3 publications and 8 participation in scientific forums.

Conclusion: The dissertation work of Dr. Lilia Pashova-Stoyanova, PhD student at the Department of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology at the Faculty of Medicine at Trakia University - Stara Zagora, "Modulation of the renin-angiotensin system in experimentally induced metabolic changes", is fully completed, methodologically sound, with scientific and clinical application and meets the requirements for occupation of the scientific and educational degree "Doctor of Medicine".

The totality of current debatable issues, the correct research methods underlying the planned scientific development, as well as the formulated conclusions - original,

scientifically applied and of socially significant sound, are a prerequisite for recommending that the respected Scientific Jury vote positively for the award of dr. Lilia Pashova-Stoyanova Doctor with the Doctorate Educational and Scientific Degree in PhD program in Pharmacology (including Pharmacokinetics and Chemotherapy).

12.08.2019 г.

(Prof. Dr. Yulia Georgieva Nikolova, PhD
Department of Physiology, Medical University - Plovdiv)