

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Динко Недев Динев, пенсионер, гр. Стара Загора, ул. Хан Тервел, № 52, вх. О, ап. 16, член на научно жури и рецензент, съгласно заповед на Ректора на ТрУ № 4160 /12.12. 2022г. и решение на научното жури. Телефон за връзка 0888460456.

Дисертационен труд на тема: "Експериментални и клинични проучвания за оценка на регенеративния потенциал на еритропоетина върху костното зарастване" за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност Ветеринарна хирургия.

АВТОР: д-р Радина Наскова Василева-Минкова, асистент в катедра "Ветеринарна хирургия" на ВМФ при ТрУ- гр. Стара Загора

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Доц. д-р Цветан Минчев Чапръзов

През последните няколко години в нашата страна бяха разработени и успешно защитени няколко дисертации насочени към проучване възможностите за ускоряване на регенеративния потенциал, подобряване качеството и съкращаване сроковете при зарастване на фрактурите при домашните любимци. Обект на проучване са били автоложни костни присадки, алотрансплантати, богата на тромбоцити плазма, мезенхимни стволови клетки, концентриран костно-мозъчен аспират.

Настоящият дисертационен труд е ориентиран отново в тази важна теоретична и практическа област, като в конкретния случай научната хипотеза е развита на базата на еритропоетина. Еритропоетинът е кисел гликопротеин със сложна формула, циркулиращ в кръвта под няколко гликозидни изоформи с различен електрически заряд и биологична активност, от което произтичат и различните ефекти които се постигат след негово приложение. Това средство се прилага в хуманната медицина главно в случаите на анемия дължаща се на хронична бъбречна недостатъчност, като в последните години областите на приложение се разширяват. Във ветеринарната медицина е прилаган главно при котки и кучета в анемични състояния.

Посоченото по-горе ми дава основание да определя научната идея на този труд като перспективна, съвременна и актуална.

Основната цел която си поставя докторантката е да се проучи ефекта от прилагането на еритропоетина върху регенерацията при плоски и тръбести кости с критични дефети при плъхове и котки.

Дисертационният труд е в обем от 191 страници и е структуриран съобразно изискванията за такъв вид разработки – увод, литературен обзор, собствени изследвания, резултати, обсъждане, изводи, приноси, препоръки за практиката, научни публикации свързани с дисертацията, литературен указател. Отделните раздели са в приемливи съотношения.

Литературният указател включва 387 автори от които 14 на кирилица и 373 на латиница. Използвани са 51 литературни източника/13,2%/ от последните 5 години /2018 – 2022 г./.

Дисертацията е онагледена със 76 фигури и 14 таблици, всички те с много добро качество.

Заслужава да се отбележи добрия стил и прецизният медицински език.

В дисертационният труд няма данни за плагиатство!

Литературният обзор е правилно насочен и всеобхватен, като в него са посочени в детайли същността, функцията и приложението на еритропоетина във ветеринарната и хуманната медицината. Отделено е място за естеството на костната тъкан, начините на зарастване на костите и стимулирането на костната регенерация, методите за оценка на това зарастване. В края на раздела е направено обобщение на постигнатото до сега, посочени са насоките за разработване на дисертационния труд.

Изследванията са проведени през периода 2019-2021 г. върху 92 мъжки плъха, порода Wistar и 6 котки със спонтанни фрактури на бедрената кост, пациенти на хирургическа клиника на ВМФ гр. СтараЗагора. Подробно и точно са описани режима и начина на отглеждане на опитните животни, анестезиологичният и оперативният протокол.

Експериментите са проведени с разрешително за използване на опитни животни вписано в Регистъра на БАБХ под вх. № 241/04.09. 2022 г.

Използвани са три препарата за хуманно-медицинска употреба – *еритропоетин* /Binocrit®/ приготвен от овариални клетки на китайски хамстер; *колагенов носител* /Collacone®/ изграден на базата на свински колаген и *костозаместител* /BIOTECK®/ представляващ спонгиозни гранули от конски произход.

За изследване ефекта на ЕПО са оформени следните три опитни постановки:

1. При плъхове /n=36/, експериментално на всяко животно, са създавани по два симетрични *калвариални костни дефекта* с диаметър 5 mm . Животните са разделени в три опитни групи, всяка включваща по 12 плъха. Плъховете от /

група са третирани както следва: ляв дефект – колагенов конус напоен с 49 UI ЕПО, десен – колагенов конус напоен с физиологичен разтвор; плъховете от II група, ляв дефект – костозаместител + колагенов конус + ЕПО, десен дефект - костозаместител + колагенов конус + физиологичен р-ор ; плъховете от III група, ляв дефект –само колагенов конус, десен –оставен празен, но животните са инжектирани IP с ЕПО в доза 4900 UI.

2. При плъхове /n=56/, – експериментално са създадени *критични дефекти /5 mm/ в диафизата на бедрената кост*, при предварително поставена метална планка с 5 отвора, като дефекта в костта е създаван със стоматологичен борер в средния, празен отвор на планката. Животните са разделени в 6 групи – една контролна/празен дефект/ и пет опитни-третирани IP с ЕПО в доза 4900 UI/kg; третирани с колагенов конус и физиологичен разтвор; колагенов конус напоен с 49 UI ЕПО; костозаместител + колагенов конус + физиологичен р-ор; костозаместител + колагенов конус + ЕПО в доза 49 UI.
3. При 6 котки със спонтанни фрактури на фемура - локално, в мястото на счупването, след остеосинтеза с планка и винтове, е поставен ЕПО в доза 1000 IU.

За отчитане на разликите между групите, както и динамиката на процесите в тях са приложени редица конвенционални и съвременни методи. Към тях трябва да се посочат клинични и параклинични показатели, проследяване на специфични костни маркери, хистологични, хистохимични, рентгенологични и СТ изследвания. Положително определям прилагането на един нов за ветеринарната медицина метод – ОСТЕОДЕНЗИТОМЕТРИЯТА. Считаю, че тези методи са добре подбрани и дават възможност за обективно оценяване на промените в костното зарастване в различни периоди при отделните експериментални групи.

Статистическата обработка на данните е извършена чрез дескриптивен статистически анализ /медиана, минимални, максимални стойности/, дисперсионен анализ- параметричен тест ANOVA, непараметричен тест на Mann-Whitney.

Резултатите от проведените изследвания са изложени на 37 страници, както в таблици, така и графично. На базата на получените резултати са направени 14 извода, изведени са 5 оригинални и 4 потвърдителни приноса, 4 препоръки за практиката.

Обсъждането е написано много добре и показва дълбочината на владене на материала. Потърсено е обяснение на всеки получен резултат, като е направена аналогия с резултатите на други автори.

По-важните заключения и приноси които се правят от докторантката на базата на проведените изследвания са следните:

1. Заклучава се, че ЕПО притежава остеоиндуктивен потенциал, както при експериментални модели при плъхове, така и при клинични пациенти /котки/. Оригинален принос.
2. Най-добър резултат е отчетен при локалното приложение на комбинацията ЕПО + колагенов конус + костен заместител /ксенограф/. Изказва се мнение, че ЕПО потенцира остеоиндуктивните качества на ксенографта от конски гранули. Оригинален принос.
3. По-добър ефект следва да се очаква след локално приложение на ЕПО, отколкото след интраперитонеално инжектиране. В същото време локалното му приложение не води до промени в общото състояние на организма, докато интраперитонеалното е свързано с повишаване стойностите на еритроцитите, хемоглобина и хематокрита. Оригинален принос.
4. Прилагането на денситометрията е прецизен метода за доказване здравината на новоформиращия се костен калус, при оценката на ефекта при различните експериментални групи. Оригинален принос за ветеринарната медицина.
5. До голяма степен верните преценки от ефекта на приложените препарати се дължат на проследяване промените в костните маркери отговорни както за формирането на новата костна тъкан, така и на тези отговорни за нейната обратна резорбция. Отбелязва се също, че стойностите на калция, фосфора и общата алкална фосфатаза не могат да бъдат използвани като маркери за костно нарастване. Оригинален принос.

Във връзка с дисертацията са публикувани 3 статии /едната под печат!/, с което се изпълнява едно от изискванията на ПрРАС на ТрУ .

Към така представения дисертационен труд имам незначителни забележки, тъй като голяма част от направените такива при предварителното обсъждане на дисертационния труд са взети под внимание и корегирани. И все пак такива имам!

1. Табл. №3 няма качествата за оригиналност за каквато претендира докторантката, нито пък за модифицирана такава, тъй като в нея са посочени конкретните автори при всяка от четирите отделни постановки.

2. При по-голяма част от фигурите /29-32; 46-49 ; 55-66/ липсва обяснение за същността на промените. Нещо повече, под фиг. 55-66 е написано „плъх” вместо „хистологична/хистохимична картина при”. Там плъх няма!
3. Раздели 5.1.4 и раздел 5.1.5 са със еднакви заглавия, а именно „Хистологични изслезвания”. Във вторият случай вероятно се касае за „ХИСТОХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ”.
4. Изводите са прекалено голям брой /14/, като някои е било възможно да отпаднат /7/, да бъдат обединени /№10 и 11/, а други в текста с който са представени третират общоизвестни научни факти/ 4, 7,8,13/ и би следвало да се преосмислят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Считам, че дисертационен труд напълно отговаря на изискванията на Закона и ПРАС на ТрУ за такъв род разработки и е изпълнил основната си задача, а именно да подготви докторанта за самостоятелна научна работа. В същото време са придобити значими теоретични знания в областта на ветеринарната хирургия и по точно в областта на костната патология. Високо оценявам удачната и добре развита научна хипотеза, експерименталният дизайн, приложените съвременни методи за обективизиране на костното зарастване, направените изводи, оригиналните и потвърдителни приноси.

Всичко това ми дава основание да дам своя положителен вот и да призова ФС на ВМФ да присъди образователната и научна степен „Доктор” на Радина Наскова Всилева-Минкова, асистент в катедра “Ветеринарна хирургия” на ВМФ при ТрУ в област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4.„Ветеринарна медицина”и научна специалност „ Ветеринарна хирургия”.

14. 02. 2023 г.

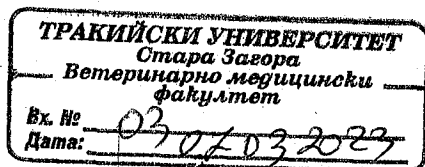
гр. Стара Загора

Рецензент:.....

/проф. д-р..... Динев/

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД



REVIEW

By prof. Dinko Nedev Dinev, DSc, retired, town of Stara Zagora, 52, Han Tervel Str., entr. O, ap. 16, member of scientific jury and reviewer, pursuant to order by the Rector of Trakia University No. 4160/12 Dec 2022 and resolution of the scientific jury. Contact telephone 0888460456.

Dissertation paper on: "Experimental and clinical studies for assessment of the regenerative potential of erythropoietin on bone recovery" for awarding PhD educational and scientific degree in field of higher education 6. Agrarian sciences and veterinary medicine, professional area 6.4. Veterinary medicine, scientific specialty Veterinary surgery.

AUTHOR: Dr. Radina Naskova Vasileva-Minkova, assistant professor at the Department of Veterinary Surgery at the Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University – Stara Zagora

SCIENTIFIC SUPERVISOR: Assoc.prof. Dr. Tsvetan Minchev Chaprazov

In the past few years, in our country, several dissertation papers have been developed and successfully defended aimed at researching the possibilities of accelerating the regenerative potential, improving the quality and shortening the healing time of fractures in pets. Autologous bone grafts, allografts, platelet-rich plasma, mesenchymal stem cells, concentrated bone marrow aspirate have been the subject of study.

The present dissertation paper is oriented again in this important theoretical and practical area, and in the specific case the scientific hypothesis is developed on the basis of erythropoietin. Erythropoietin is an acidic glycoprotein with a complex formula, circulating in the blood under several glycosidic isoforms with different electrical charge and biological activity, from which the different effects that are achieved after its administration derive. This remedy is used in human medicine mainly in cases of anaemia due to chronic kidney failure, and in recent years the fields of application have been expanding. In veterinary medicine, it is mainly used in cats and dogs in anemic conditions.

The above gives me reason to define the scientific idea of this work as forward-looking, modern and up-to-date.

The main goal of the PhD student is to study the effect of the erythropoietin administration on the regeneration in flat and tubular bones with critical defects in rats and cats.

The dissertation paper has a volume of 191 pages and is structured according to the requirements for this type of work - introduction, literature review, own research, results, discussion, conclusions, contributions, recommendations for the practice, scientific publications

related to the dissertation paper, reference. The separate sections are in acceptable proportions.

The literature index includes 387 authors, of which 14 in the Cyrillic and 373 in the Latin alphabet. A total of 51 literature sources/13.2%/ from the last 5 years /2018 – 2022/ were used.

The dissertation paper is illustrated with 76 figures and 14 tables, all of them of very good quality.

The good style and precise medical language are noteworthy.

There is no plagiarism in the dissertation paper!

The literature review is well-targeted and comprehensive, detailing the nature, function and application of erythropoietin in veterinary and human medicine. A place is devoted to the nature of the bone tissue, the ways of bone recovery and the stimulation of bone regeneration, the methods of evaluating that recovery. At the end of the section, a summary of what has been achieved so far is made, the guidelines for the development of the dissertation paper are indicated.

The investigations were conducted during the period 2019-2021 on 92 male Wistar rats and 6 cats with spontaneous fractures of the femur, patients of the surgical clinic at the Faculty of Veterinary Medicine, Stara Zagora. The mode and manner of keeping the experimental animals, the anaesthetic and operative protocol are described in detail and precisely.

The experiments were carried out with a permit for the use of experimental animals entered in the Registry of the Bulgarian Food Safety Agency under reg. No. 241/04 Sep 2022.

Three preparations for human medical use were used – *erythropoietin* /Binocrit®/ prepared from Chinese hamster ovary cells; *collagen carrier* /Collacone®/ built on the basis of swine collagen and *bone substitute* /BiOTECK®/ representing cancellous granules of equine origin.

To study the effect of EPO, the following three experimental setups were designed:

1. For rats /n=36/, experimentally in each animal, two symmetrical *calvarial bone defects* with a diameter of 5 mm were created. The animals were divided into three experimental groups, each including 12 rats. *Group I* rats were treated as follows: left defect – collagen cone soaked with 49 UI EPO, right – collagen cone soaked with saline solution; *Group II* rats, left defect - bone substitute + collagen cone + EPO, right defect - bone substitute + collagen cone + saline solution; *Group III* rats, left defect – collagen cone only, right – left empty, but animals were injected IP with EPO

at a dose of 4900 IU. A difference between left and right defects was sought in this group? The question arises - doesn't intraperitoneally injected erythropoietin also affect the left empty bone defect?

2. For rats /n=56/, – experimentally, *critical defects /5 mm/* were created in *the femur diaphysis*, with a previously placed metal plate with 5 holes, and the bone defect was drilled with a dental drill in the middle, empty hole of the plate. The animals were divided into 6 groups - one control /empty defect/ and five experimental - treated IP with EPO at a dose of 4900 UI/kg; treated with collagen cone and saline solution; collagen cone soaked with 49 UI EPO; bone substitute + collagen cone + saline solution; bone substitute + collagen cone + EPO at a dose of 49 UI.
3. In 6 *cats* with spontaneous femur fractures - locally, in the fracture site, after osteosynthesis with a plate and screws, EPO was applied at a dose of 1000 IU.

A number of conventional and modern methods have been applied to account for the differences among the groups, as well as the dynamics of the processes in them. These should include clinical and paraclinical indicators, follow-up of specific bone markers, histological, histochemical, radiological and CT studies. I determine as positive the application of a new method for veterinary medicine - OSTEODENSITOMETRY. I believe that these methods have been well chosen and provide an opportunity to objectively evaluate the changes in bone recovery in different periods in the separate experimental groups.

The statistical processing of the data was carried out by descriptive statistical analysis /median, minimum, maximum values/, dispersion analysis - parametric ANOVA test, non-parametric Mann-Whitney test.

The results from the conducted research are presented on 37 pages, both in tables and graphically. Based on the results, 14 conclusions have been drawn, 5 original and 4 affirmative contributions, 4 recommendations for the practice have been made.

The discussion is very well written and shows a depth of mastery of the material. An explanation of each obtained result was sought by analogy with the results of other authors.

The more important conclusions and contributions made by the PhD student based on the conducted research are the following:

1. It is concluded that EPO has osteoinductive potential, both in experimental models in rats and in clinical patients /cats/. An original contribution.
2. The best result has been reported with the local application of the combination EPO + collagen cone + bone substitute /xenograft/. It is suggested that EPO potentiates

the osteoconductive properties of the horse granule xenograft. An original contribution.

3. A better effect should be expected after local administration of EPO than after intraperitoneal injection. At the same time, its local application does not lead to changes in the overall state of the body, while intraperitoneal administration is associated with an increase in the erythrocytes, hemoglobin and hematocrit values. An original contribution.
4. The application of densitometry is a precise method for proving the strength of the newly formed bone callus, in the evaluation of the effect in the different experimental groups. An original contribution to veterinary medicine.
5. To a large extent, accurate assessments of the effect of the applied preparations are due to tracking changes in bone markers responsible for both the formation of new bone tissue and those responsible for its reverse resorption. It is also noted that calcium, phosphorus and total alkaline phosphatase values cannot be used as markers of bone recovery. An original contribution.

In connection with the dissertation paper, 3 articles were published /one in print!/, which is in compliance with one of the requirements of the Rules for development of the academic staff at Trakia University.

I have minor comments on the submitted dissertation paper, since a large part of those made during the preliminary discussion of the dissertation paper have been taken into account and corrected. And yet I have some!

1. Table No. 3 does not have the qualities of originality that the PhD student claims, nor is it a modified one, since it names the specific authors for each of the four separate designs.

2. For most of the figures /29-32; 46-49; 55-66/ there is no explanation of the nature of the changes. Moreover, under fig. 55-66 "rat" is written instead of "histological/histochemical picture of". There is no rat there!

3. Sections 5.1.4 and section 5.1.5 have the same titles, namely "Histological research". In the second case, it probably refers to "HISTOCHEMICAL RESEARCH".

4. The conclusions are too many in number /14/, some could be omitted /7/, to be combined /No.10 and 11/, and others in the text with which they are presented treat generally known scientific facts /4, 7, 8, 13/ and should be reconsidered.

CONCLUSION

I believe that the dissertation paper fully complies with the requirements of the Law and the Rules for development of the academic staff at Trakia University for this type of works and has fulfilled its main task, namely to prepare the PhD student for individual scientific work. At the same time, significant theoretical knowledge has been acquired in the field of veterinary surgery and more precisely in the field of bone pathology. I highly appreciate the appropriate and well-developed scientific hypothesis, the experimental design, the applied modern methods for objectification of bone recovery, the conclusions drawn, the original and affirmative contributions.

All this gives me the reason to give my positive vote and invite the Faculty Board of the Faculty of Veterinary Medicine to award PhD educational and scientific degree to Radina Naskova Vasileva-Minkova, assistant professor at the Department of Veterinary Surgery at the faculty of Veterinary Medicine at Trakia University in field of higher education 6. Agrarian sciences and veterinary medicine, professional area 6.4. Veterinary medicine and scientific specialty "Veterinary surgery".

14 Feb 2023
Stara Zagora

Reviewer:.....
/Prof. I /

заличено съгл.

чл. 23 от ЗЗЛД