



## РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационния труд

на

**асистент СЕВЕН РУЖДИ МУСТАФА,**

Докторант, в самостоятелна форма на обучение,  
Катедра “Хирургия, рентгенология, акушерство и гинекология”

ФАКУЛТЕТ „ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА“

ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ,

на тема:

**„Изследване на регенеративния потенциал на богатата на тромбоцити плазма и натриев хиалуронат с декспантенол при експериментално предизвикани язви на роговицата при зайци“**

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“  
област на висше образование б. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“  
професионално направление б.4. „Ветеринарна медицина“  
научна специалност: „Хирургия, рентгенология и физиотерапия на животните“

Научен консултант: доц. д-р Надя Златозарова Златева-Панайотова, д-р

Асистент Мустафа е роден на 1988 г. Средно образование завършва през 2007 г. в 18 СОУ „Уилям Гладстон“ с интензивно изучаване на китайски език, град София. През 2010 завършва медицински колеж „Йорданка Филаретова“, професионален бакалавър зъботехник към Медицински университет. През 2019 година се дипломира като Магистър ветеринарен лекар във Факултет по Ветеринарна медицина към Лесотехнически

университет. Владее английски език - слушане C1, четене C1, писане B1, турски език - слушане C1, четене C1, писане C1, и китайски език - слушане A2 четене A2 писане A2.

Носител на именна стипендия за постижения в овладяването на аграрните науки, вкл. ветеринарните науки и горското стопанство на името на акад. Дончо Костов за 2018/2019; Фондация „Еврика.

Асистент Мустафа е приложил и списък от 10 научни труда. Интерес представляват статиите свързани с патологията при змиите.

Дисертационният труд е написан на 164 стандартни машинописни страници и има следните раздели:

- Съдържание – 2 стр.;
- Списък на използваните съкращения – 2 стр.;
- Увод – 2 стр.;
- Литературен обзор – 39 стр.;
- Собствени изследвания – 13 стр.;
- Резултати – 41 стр.;
- Обсъждане – 30 стр.;
- Изводи – 1 стр.;
- Приноси и препоръки за практиката – 3 стр.;
- Публикации свързани с дисертацията -1 стр.;
- Установени цитирания на научни публикации, свързани с дисертационния труд – 1 стр.
- Литература – 27 стр.

#### **УВОД:**

В увода ас. Мустафа накратко е представил приложението на регенеративната медицина за лекуването на различни заболявания в организма, в частност в офталмологията. Прави кратко описание на богатата на тромбоцити плазма, хиалуроновата киселина и декспантенола и тяхното приложение при терапия на язви на роговицата. Основните насоки на последните проучвания са стандартизирането на техниките за приготвяне на PRP и установяване на най-ефикасната ѝ форма на приложение при очните заболявания, а именно активирана гел-форма, неактивираната течна форма във вид на очни



колири или инжективно въвеждане в различни сегменти на окото при различни патологии във ветеринарната офталмология

### **ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР:**

Литературният обзор обхваща 39 стандартни машинописни страници и включва 3 таблици и 7 фигури. В началото на литературния обзор асистент Мустафа прави подробно описание на анатомията на окото и детайлно отразява хистологичния строеж на роговицата и състава и функциите на слъзния секрет. В обзора са разгледани основните етиологични фактори причиняващи увреждания на роговицата - механични наранявания от попадане на чужди тела или паразити, рани на роговицата и възпалителни процеси на роговицата, които могат да са съпроводени с разязвяване и трудно възстановяващи се дефекти. От възпалителните процеси на роговицата подробно са описани механичните и химични етиологични фактори, предизвикващи деструкция на корнеята.

Ас. Мустафа подробно отразява известното в литературата относно клинична картина на язвите на роговицата и дигностичите методи. Голяма част от литературния обзор обхваща зарастването на уврежданията на роговицата на хистологично и цитологично ниво и особено ролята на растежните фактори и цитокините. Всеки един растежен фактор е описан детайлно. В раздел 1.5 Регенеративни терапии при лекуване на язви в роговицата, ас. Мустафа прави кратка ретроспекция на постигнатото в катедрата в тази област. В раздел 1.5.2. Приложение на автоложните кръвни деривати в офталмологията., Авторът накратко посочва известното до сега в литературата за богатата на тромбоцити плазма (PRP). Посочени са известните протоколи за добиване на PRP и изискванията на които тя трябва да отговаря. Литературният обзор би бил позачерпателен, ако в този раздел по-подробно бяха отразени експериментални и клинични проучвания относно приложението на PRP при язви на роговицата при човека и домашните любимци.

Въз основа на анализ на литературните източници по целта на дисертационния труд асистент Севен Мустафа счита, че недостатъчно са изследвани методиките за получаване и прилагане на автоложни кръвни продукти при животните. Това налага извършване на допълни научни изследвания в това направление във ветеринарната медицина.



## **СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

### **1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Основната цел на дисертационния труд е да се направи сравнителна оценка на скоростта и степента на зарастване на експериментално предизвикани корнеални язви след прилагане на автоложна богата на тромбоцити плазма, натриев хиалуронат с декспантенол и хирургически метод на временното фиксиране на третия клепач при зайци.

Целта е добре формулирана и кореспондира със заглавието на дисертационния труд. За реализиране на поставената цел асистент Мустафа формулира 5 задачи.

1. Възпроизвеждане на язви на роговицата чрез химични и оперативни методи при експериментален животински модел – зайци;

2. Проследяване на ефекта от хирургическо лекуване при експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата чрез клинични, специфични офталмологични и образно-диагностични методи;

3. Проследяване на ефекта от приложението на натриев хиалуронат в комбинация с декспантенол при експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата чрез клинични, специфични офталмологични и образно-диагностични методи;

4. Проследяване на ефекта от приложението на:

а) богата на тромбоцити плазма под формата на очни капки

б) богата на тромбоцити плазма под формата на субконюнктивална инжекция при експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата чрез клинични, специфични офталмологични и образно-диагностични методи;

5. Хистологична оценка на ефекта от приложените терапии при зарастването на експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата.

### **2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

Експерименталните изследвания са проведени в периода 2022-2023 г. върху 28 броя зайци от породата бял новозеландски (*Oryctolagus cuniculus*), на възраст между 12 и 18 месеца, разпределени поравно от двата пола, със средно тегло  $3,1 \pm 0,4$  kg.

Експериментите са проведени в съответствие с Разрешително за използване на опитни животни №337/2022, на Комисията по етика към животните от Българска агенция по безопасност на храните, и съобразно с Европейската конвенция за протекция на



гръбначните животни, използвани за експериментални и други научни цели (ETS 123, Consil of Europe, 2007).

За реализиране на проучването авторът формира два експериментални етапи:

1. Предизвикване на язва на роговицата с химично изгаряне чрез натриева основа (Ch групи);

2. Предизвикване на язва на роговицата с механична травма (Tr групи):

И при двата етапи са формирани по 4 групи .

- Група MNF- Ch, Tr – положителна контрола, при която е приложена оперативна техника за временно фиксиране на третия клепач.
- Група HADP - Ch, Tr – експериментална група, при която е приложен натриев хиалуронат и декспантенол чрез накапване.
- Група PRPD - Ch, Tr – експериментална група, при която е приложена автоложна богата на тромбоцити плазма чрез накапване.
- Група PRPS - Ch, Tr – експериментална група, при която е приложена автоложна богата на тромбоцити плазма чрез еднократна субконюнктивална инжекция.

Богатата на тромбоцити плазма е получавана по метода базиран на Okuda et al. (2003), посредством двукратно центрофугиране в градиентна центрофуга PRP500 Tabletop Low Speed Centrifuge (Cence®, Xiangyi, China).

За предизвикване на химичните язви на роговицата авторът е използвал приготвен 1-моларен разтвор на натриева основа (1M NaOH), по метода, описан от Rajamane & Jeyalakshmi (2014).

Травматична язва е предизвиквана чрез повърхностна кератектомия достигаща до стромалния слой

Скоростта и характера на зарастване на язвите при положителната контрола и експерименталните групи са проследяване чрез клинични, параклинични и специфични офталмологични изследвания (офталмоскопия със процепна лампа (slit-lamp), оценяване на състоянието на роговицата, измерване на слъзната продукция, изследване на язвените дефекти с флуоресцинова проба.

Зарастването на язвите са проследявани чрез съвременна оптична кохерентна томография (Anterior Segment Optical Coherence Tomography, AS-OCT). Методът позволява



получаване на обективна информация относно състоянието на роговицата. Проведени са и хистологични изследвания на роговиците при положителната контрола и експерименталните групи.

Получената първична цифрова информация е обработена със статистически анализи (статистически чрез еднофакторен вариационен анализ ANOVA (Predictive Analytics Software PASW®, SPSS, Version 19), като за разликите между отделните групи спрямо контролната се използва least-significant difference (LSD) post hoc test. Изчислени са коефициента на Фишер и ниво на значимост, като за статистически достоверни бяха приети разликите с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

Непараметричните резултати са обработени чрез непараметричен тест на Friedman, като и при този тест за статистически достоверни бяха приети разликите с ниво на значимост  $p < 0.05$ .

#### **РЕЗУЛТАТИ:**

Резултатите са представени подробно и ясно. Получените резултати са отразени в 15 таблици и 45 фигури. Поради голямия брой таблици и фигури ще се спра на тези които отразяват най добре поставената цел на дисертационния труд. В таблица 5 е представен качествния анализ на параметри в WB и PRP за накапване. Съдържанието на формените елементи в PRP - WBC са редуцирани с 91,8%, RBC са редукции с 99,5%. Концентрационният индекс на тромбоцитите в обогатената плазмата е равен на 4,75. Авторът доказва, че постигнатия концентрационен индекс на тромбоцитите в PRP притежава терапевтични свойства. Подобна е информацията в таблица 6 - Качествен анализ на параметри в WB и PRP за инжектиране.

В тези таблици съответните показатели са представени като средни стойности. Къде са таблиците с първичните стойности на тези показатели при всеки заек включен в изследването?

В раздел 3.2.3 Резултати от специалните офталмологични изследвания, (от фигури 13 - 20) са представени резултатите от изследванията с офталмоскопия с процепна лампа (slit-lamp) при първи етап (I с химическо изгаряне) (фигури 13-16) и втори етап (с механична травма) (фигури 17-20) при експериментално предизвикани язви на зайци. При всички групи с химическо изгаряне на първия ден се установява помътняване на роговицата в централната зона, с пълна непрозрачност и при дифузно, и при фокално



осветление. Изследването със слит-лампа показва значително удебеляване на роговицата в централната зона. Флуоресциновата проба е положителна, като язвеният дефект обхваща голяма централна зона. На 10-тия ден, след освобождаване на третия клепач (фигура MNF - Ch), се установява значителна непрозрачност, повлекла по роговичната повърхност и неравности по централната ѝ част; при групата с HADP-Ch на 10-тия ден ирисът е вече видим под оточната зона. Флуоресциновата проба на 10-тия ден е негативна, но отокът е все още установим; при групата с PRPD-Ch на 10-тия ден ирисът е вече видим под оточната зона. Флуоресциновата проба на 10-тия ден е негативна, но отокът е все още установим; при групата с PRPS-Ch на 10-тия ден се констатират единични повърхностни кръвоносни съдове при отделни случаи. Отокът е запазен и на последния ден. Флуоресциновата проба е негативна на 10-тия ден.

На фигури 17 - 20 са представени резултатите от инструменталната инспекция на зайците с травматична язва в роговицата. При всички групи с механична травма на роговицата на 1-вия ден се установява значителна загуба на гладкостта на роговицата, следствие от деепителизацията установена при изследването и с дифузно, и с фокално осветление, слит-лампата потвърждава неравната ѝ предна повърхност, флуоресциновата проба е положителна, като язвеният дефект обхваща голяма централна зона от роговицата. На 10-тия ден при групата MNF-Tr клепачните ръбове са отекли, роговицата е запазила прозрачността си с неравността по предната ѝ повърхност, не се установява удебеляване на слоевете със слит-лампата, която не показва, но потвърждава грапавата повърхност и промяна в сферичността. Не се установява неоваскуларизация на роговицата, флуоресциновата проба е положителна и задържа багрилото с висок интензитет. При групите с HADP-Tr, PRPD-Tr, PRPS-Tr на 10-тия ден не се установява неоваскуларизация, оток, помътняване и нарушаване на структурата на предната повърхност на роговицата.

С получените резултати, авторът доказва, че терапевтичният ефект на приложените лечебни методи в известна степен зависи и от етиологичния фактор. Резултатите относно клинична офталмологична оценка при положителната контрола и експерименталните групи с химична роговична язва и с травматична роговична язва (таблица 14, 15) корелират с резултатите от изследванията с офталмоскопия с процепна лампа и с резултатите в динамиката в площта на язвения дефект при първи и втори етапи (таблица 18, 19).



В раздел 3.3 са отразени резултати (фигури 22 - 37) от проследяване на скоростта и характера на зарастване на роговицата чрез образно-диагностични изследвания, именно чрез аксиален скан на нивото на предната очна камера с роговица в трансверзален срез през централната ѝ част и 3D-реконструкция с гониоскопски изглед от нивото на предната повърхност на ириса. Чрез този образен метод се получава информация от по-дълбоки тъкани на предния сегмент по безконтактна и неинвазивна методика и идентифициран оток на роговицата, стромални структурни промени, неоваскуларизация и възпалително помътняване.

Резултати от хистологичните изследвания на роговиците при положителната контрола и експерименталните групи са представени на фигури 38-57. Отразени са хистологичните промени настъпващи след предизвикване на експерименталните язви и динамиката на оздравителните процеси в резултат на приложените средства за терапия.

Във всички представени резултати се установяват еднопосочна динамика. Всеки следващ метод надгражда информацията получена при изследване на експериментално предизвиканите язви на роговицата.

#### **ОБСЪЖДАНЕ:**

В раздел обсъждане д-р Мустафа умело съпоставя собствените резултати с тези на другите автори. В началото на обсъждането кандидата съумява аргументирано да посочи избора на новозеландския заек като животински вид, върху който е провел настоящото изследване. Умело е градира информацията, която се съдържа във всеки от използваните метод на изследване. Авторът е съумял отлично да интерпретира и съпостави информацията, която носи всеки един от получените резултати по време на изследванията.

В края на обсъждането асистент Севен Мустафа прави заключение, че настоящето проучване му дава основание да препоръча за приложение на тези средства с висок регенеративен потенциал върху реални пациенти в клиничната практика с компанияни животни.

Д-р Мустафа е посочил 7 извода, които в съкратен вид напълно отразяват получените резултати от автора. Приложил е 6 оригинални и 4 потвърдителни приноса и 4 препоръки за практиката.

Във връзка с дисертационния труд са посочени три публикации. Те са публикувани в следните списания; Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, vol. 6, No 1(10), 55 – 64



(ISSN 2534-9333) (e-ISSN 2534-9341) (2021)., Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, Online first, 20.12.2022 (e-ISSN 2534-9341) (2022). и Advance Research Journal of Multidisciplinary Discoveries, 80(2), 8 – 14 (e-ISSN-2456-1045) (2023). Трите статии са в съавторство с доцент Механджийски и доцент Златева.

Въпреки негативните обстоятелства, които се случиха в катедрата, д-р Мустафа успя в краткия период от време, през който трябваше да провежда експерименталните изследвания и същото време да води занятия, и днес ни представи един прекрасен научен труд. Това се дължи и на научните разработки в областта на регенеративната терапия, проведени преди това в катедрата.

Поставената цел е реализирана. Основание за това е достатъчният брой експериментални опити включени в изследването. Използвани са съвременни апарати и методики. Получените резултати са умело интерпретирани в раздела обсъждане.

#### **ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ:**

Д-р Мустафа е посочил 336 литературни източници, от които 9 на кирилица и 327 на латиница.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Дисертационния труд е завършено проучване на регенеративния потенциал на богатата на тромбоцити плазма и натриев хиалуронат с декспантенол при експериментално предизвикани язви на роговицата при зайци. В процеса на изпълнението на планираните задачи, докторантът значително е повишил знанията и уменията си в приложението на регенеративната медицина в очната патология.

**Предложеният дисертационен труд отговаря на изискванията за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ и предлагам на почитаемото научно жури да присъди ОНС „ДОКТОР“ на асистент СЕВЕН РУЖДИ МУСТАФА по научна специалност: „Хирургия, рентгенология и физиотерапия на животните“, област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина.**

02.08.2023 година

Изготвил рецензията:

(проф. Богдан ~~инес~~ ~~Амбилов~~ ~~д-р~~ ~~И~~)