

## С Т А Н О В И Щ Е

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор”, област на висшето образование 7. „Здравеопазване и спорт”, професионално направление 7.1. „Медицина” по научна специалност „Фармакология”

**Автор на дисертационния труд:** маг. фарм. Андреян Георгиев Георгиев

**Тема на дисертационния труд:** In vitro ефекти на опиоидни аналгетици върху вискозо-еластичните характеристики на аортна стена от плъх при стареене и мелатонинов дефицит

**Член на научното жури:** проф. д-н инж. Светослав Ганчев Николов

### 1. Актуалност на изследвания проблем

Артериите са кръвоносни съдове, през които преминава кръвта от сърцето. Артериалната стена има три слоя (пласта). Вътрешният слой (*intima*) е съставен от епителни клетки, средният (*media*) от еластин и гладки мускули, а най-външният (*adventitia*) се състои основно от съединителна тъкан.

Разликата във функциите, размерът и съставът на артериите се променя в зависимост от разстоянието им до сърцето. Артериите, които са в непосредствена близост до сърцето, включвайки аортата, са относително големи и служат основно като кръвна тръба. Материалът на тези артерии е преобладаващо от еластин, като те не се проявяват само като пасивни тръби. Те непрекъснато променят диаметъра си, нарастват (променят размера си) и се ремоделират (променят съставките на материала си), за да се адаптират към промените в потока и налягането. Развитието на експериментални и теоретични модели на тези процеси свързани с хетерогенността и вискозността е основна цел на изследователите.

Чрез използването на статистически методи в медицинската практика и фармакологията могат да се получат строги доказателства за ефективността на методите за диагностика и лечение. Статистическият анализ може да повиши не само ефективността на даден нов метод за лечение, но и ефективността на работата на медиците.

Всичко това прави изследванията и анализите в дисертационния труд важни и актуални.

### 2. Степен на познаване на състоянието на проблема

Изследователските проблеми свързани с изучаването на деформирането на меките биологични тъкани са сред най-често срещаните в биомеханиката. Добре е известно, че меките тъкани са вискозоеластични композитни материали съставени от клетки и екстрацелуларни матрици, често аранжирани в сложни геометрии, обикновено изпитващи големи натоварвания при нормални и патологични условия. В биомеханиката непрекъснато възникват нови проблеми за решаване изискващи използването на все повече интелигентни и сложни аналитични, числени, експериментални и теоретични техники и подходи. Например, в областта на тъканното инженерство, което използва *in vitro* конструкции на естествени тъкани, би могло много добре да се възползва от анализ интегриращ нелинейното механично поведение на молекулярно, клетъчно, тъкано и органично ниво. Фактически, голяма част от биологичните тъкани показват (притежават) еластично (псевдоеластично) поведение

при едно задоволително широко вариране на условията. Ето защо, познаването на фундаменталните принципи на нелинейната еластичност е ключово в разбирането на биомеханиката на меките тъкани.

В литературния обзор на дисертационния труд (обем от 46 страници) са дадени основната структура и биомеханика на аортата; характеристиките на мелатонина и неговото значение за артериалната хомеостаза и патология; разгледано е влиянието на опиоидите върху артериите, както и значението на аортата от плъх като експериментален модел. След края на тази глава са формулирани целта и 3-те задачи в дисертационния труд. Те са свързани с *in vitro* изследване на изменението на вискозоеластичните характеристики на аортна стена от плъх в зависимост от възрастта, мелатониновия дефицит и концентрацията на опиоидни аналгетици.

Общият брой на цитираните източници в дисертацията е 341 (книги, статии, дисертации и ръководства, трите статии по дисертацията), всички на латиница, като по-голямата част са публикувани през последните 10-12 години. Това дава основание да се твърди, че докторант Андреян Георгиев много добре е изучил и познава съвременното състояние на изследвания проблем.

### 3. Обща методика на извършените изследвания

В главата „Материали и методи“ (обем от 16 страници) са последователно описани: 1) използваните в експериментите животни (зdravi, мъжки Wistar плъхове) и препарати; 2) методите за изследване на вискозоеластичните характеристики – методът на принудените трептения и методът за изследване на съкратителната активност; 3) методите за статистически анализ на получените при експериментите данни – дескриптивни и сравнителни, и съответните компютърни софтуери Minitab и GraphPad Prism.

В следващата глава „Резултати“ (обем от 47 страници) са сравнени първоначално вискозоеластичните характеристики (средни стойности на  $E'$ -динамичния модул на еластичност и  $f_0$ - собствената честота на трептене) между 3-, 14- и 18-месечни здрави (sham-оперирани;  $n = 11; 7; 4$ ) и пинеалектомирани (pin-оперирани;  $n = 15; 7; 4$ ) Wistar плъхове без прилагане на опиоидни аналгетици. Резултатите в зависимост от еквивалентното кръвно налягане са представени от Фигури 11 до 14, и Таблицы 4 до 6. Отчетено е, че възрастта оказва значителен ефект върху  $E'$  на 18-месечните плъхове, но не и върху  $f_0$ . За двете отделни нива на еквивалентното кръвно налягане – 80,5 и 157,5 mmHg коефициентът на вискозни загуби ( $\beta$ ) не се различава значително между двете възрастови групи- 3 и 14 месечни. При изследване на влиянието на мелатониновия дефицит за три месечни животни от sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 4$ ) групите, не е открита съществена разлика между контролните измервания. В pin групата собствената честота ( $f_0$ ) нараства линейно с увеличаване на еквивалентното кръвно налягане (p), докато динамичният модул на еластичност ( $E'$ ) нараства експоненциално. При по-голяма извадка за sham и pin групите на 3-, 14- и 18-месечни плъхове, се установява, че в сравнение с sham операцията, пинеалектомията (мелатониновия дефицит) води до значително намален  $E'$  в 3- ( $p < 0.001$ ) и 18-месечните ( $p < 0.05$ ) възрастови групи, докато  $f_0$  е значително намалена само в 18-месечната група ( $p < 0.001$ ).

За изследване влиянието на опиоидните аналгетици фентанил и трамадол, и техният концентрационен ефект спрямо вискозоеластичните характеристики на аортни препарати са проведени експерименти със здрави (sham-оперирани) и пинеалектомирани (pin-оперирани) Wistar плъхове при две възрасти (3 и 14 месечни).

Установено е, че нарастващите концентрации на фентанил ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-7}$  mol/L) водят до много по-ниски стойности на  $f_0$  в сравнение с контролното измерване единствено при най-високата концентрация на фентанил от  $5 \times 10^{-7}$  ( $10^{-6.3}$ ) mol/L ( $p < 0.035$ ). Съществува линейно нарастване на  $f_0$  с увеличаване на еквивалентното артериално кръвно налягане. От своя страна,  $E'$  е значително по-нисък ( $p < 0.05$ ) при всички прилагани концентрации на фентанил в сравнение с контролното измерване в sham групата. В pin групата контролното измерване показва, че  $f_0$  е значително по-нисък след 30-минутната перфузия с чист хранителен разтвор ( $p < 0.015$ ), след последната приложена концентрация на фентанил, а  $E'$  е значително по-нисък в сравнение с контролното измерване в pin групата при  $10^{-7}$  mol/L фентанил ( $p < 0.035$ ).

Ефектът на трамадол в sham групата на 3 месечните плъхове при нарастващи концентрации трамадол ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ , и  $5 \times 10^{-5}$  mol/L) води до статистически значими промени само в  $E'$ , но не и в  $f_0$ . В групата на 3-месечните, pin-оперирани плъхове няма значителна промяна в средните стойности на  $f_0$  и  $E'$  спрямо контролните.

#### 4. Приноси в дисертационния труд

Ще открия следните приноси:

- установено е, че модулацията на артериалните механични свойства при фармакологично въздействие с фентанил и трамадол, зависи от възрастта и наличието на мелатонинов дефицит. Ето защо при клинично прилагане трябва да се използва индивидуализиран подход при опиоидна аналгезия;
- установено е, че *in vitro* фентанил действа по неопиоиден и ендотел-независим механизъм като директно намалява вискозоеластичните характеристики в медиалния слой на аортната стена. Трамадол също действа върху вискозоеластичните характеристики независимо от ендотела, но с предполагаем опиоиден механизъм и противоположна посока на ефекта в зависимост от концентрацията.

#### 5. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантът е представил списък от три излезли от печат публикации: 1. Georgiev A, Kaneva M, Shikova L, Antonova M. Experimental estimation and comparison of viscoelastic characteristics of rat aorta *in vitro*. Ser Biomech. (2022), 36(1):86-97. doi:10.7546/SB.12.2022; 2. Georgiev A, Kaneva M, Shikova L, Mateeva P, Tchekalarova J, Antonova M. In Vitro Effects of Fentanyl on Aortic Viscoelasticity in a Rat Model of Melatonin Deficiency. Int J Mol Sci. (2024), 25(11):5669. doi:10.3390/ijms25115669; 3. Antonova M., Georgiev A, Totev T. A device for implementation of the forced oscillation method on strip preparations of biological tissues *in vitro* in prolonged experiments. J Theor Appl Mech, Sofia. (2024), 54:159-171. doi:10.55787/jtams.24.54.2.159. В тези публикации са отразени по-голямата част от резултатите в дисертацията. Всички статии са в съавторство с научния му ръководител и други учени и имат SJR. В две публикации докторантът е пръв автор. Публикационната дейност на маг. фарм. Андрейн Георгиев е добра и покрива напълно минималните задължителни изисквания посочени в правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БАН, и в частност в Института по невробиология при БАН.

Авторефератът отговаря на съдържанието на дисертацията.

#### 6. Критични бележки

Критичните ми бележки могат да се разделят на съществени и типографски.

**Съществените са:**

► приносите в дисертацията не са добре формулирани. При използване на статистика, характерът на изводите е вероятностен, като се дава оценка на вероятността на едно или друго предположение. От това, че всеки статистически метод се основава на собствени математични модели, то резултатите от него са верни дотолкова колкото този модел отговаря на действителността;

► чрез регресионния анализ може да се оцени как една променлива зависи от друга и какво е разсейването на зависимата променлива около права определяща зависимостта ѝ. При оценката съществуват доверителни интервали, чрез които се определя точността на предсказанията. От своя страна, чувствителността на дисперсионния анализ зависи от: броя на групите, тяхната големина (численост), нивото на значимост и величината на различие. В дисертацията тези неща не са изяснени.

**Типографските са:**

- в дисертацията се забелязват правописни и стилови грешки. Препоръчвам на дисертанта да ги поправи преди да предаде дисертацията в библиотеката и НАЦИД;
- фиг. 10 от дисертацията е неясна;
- номерацията на фигурите и таблиците в дисертацията и автореферата е различна, което затруднява читателя. В края на автореферата липсват цитираните литературни източници в него.

**7. Заключение**

Не познавам Андриян Георгиев Георгиев и нямам преки лични впечатления за академичното му развитие. Рецензираният дисертационен труд обаче ми дава убеждението, че той притежава необходимите качества и задълбочени познания по специалността. Смятам, че собствените му приноси в област на висшето образование 7. „Здравеопазване и спорт”, професионално направление 7.1. „Медицина” по научна специалност „Фармакология” са достатъчни за получаване на образователната и научна степен “доктор”. ***Поради това, давам положителна оценка на представения ми за становище дисертационен труд и препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди на маг. фарм. Андриян Георгиев Георгиев образователната и научна степен “доктор”.***

29.04.2026 год.  
гр. София

Изготвил становището:.....  
/проф. дн Светослав Г. Николов/

## ATTITUDE

on Doctoral thesis in the field of higher education 7. "Public health services and sport", professional direction 7.1. "Medicine", by scientific speciality "Pharmacology"

*Author of doctoral thesis:* master pharm. Andreyan Georgiev Georgiev

*Subject of doctoral thesis:* In vitro effects of opioid analgesics on the viscoelastic characteristics of rat aortic wall during aging and melatonin deficiency

*Member of the scientific jury:* Professor DSc Svetoslav Ganchev Nikolov

### 1. Relevance of the problem

Arteries are the blood vessels that carry blood away from the heart. The wall of an artery consists of three layers. The inner layer (intima) consists of a single layer of epithelial cells, the middle layer (media) contains elastin and smooth muscle, and the outer layer (adventitia) is composed mainly of connective tissue.

Reflecting differences in function, the size and composition of arteries change with distance from the heart. Arteries near the heart, including the aorta, are relatively large and serve primarily as conduits of blood. The walls of these "elastic arteries" are dominated by elastin. Hence, arteries are not merely passive tubes. Besides actively changing their diameter, arteries grow (change size) and remodel (change material properties) to adapt to changes in flow and pressure. Developing theoretical models for these processes, while accounting for heterogeneity and viscoelasticity, is a challenging and ongoing endeavor

Using statistical methods in the medical practice and pharmacology give us resources to obtain rigorous proofs for efficacy of the diagnostic and medical treatment methods. With the statistical analysis can be increased not only the work efficacy of a method but also the work efficacy of medical mans.

Because of that the investigations and analysis in the dissertation are very important and actual.

### 2. Level of knowledge of the investigated problem

Problems involving the deformation of soft biological tissues are among the most challenging in biomechanics. Soft tissues are viscoelastic composite materials composed of cells and extracellular matrix, are frequently arranged in complex geometries, and routinely experience large strains under normal and pathological conditions. As the discipline of biomechanics matures, new problems continually appear that demand more and more sophisticated analytical and numerical solution techniques. For example, the field of tissue engineering, which deals with in vitro construction of natural replacement tissues, could benefit greatly from analyses that integrate nonlinear mechanical behavior at the molecular, cellular, tissue, and whole organ levels.

Although soft tissues actually are not elastic, investigators often incorporate elasticity as a simplifying assumption. In fact, many tissues exhibit approximately elastic (pseudoelastic) behavior under a fairly wide range of conditions. Hence, knowledge of the fundamental principles of nonlinear elasticity is crucial to understanding the biomechanics of soft tissues.

In the literature review of the doctoral thesis (quantity 46 pages) the basic structure and biomechanics of the thoracic aorta are represented.; characteristics of melatonin and its importance for the arterial homeostasis and pathology; it is considered the opioid analgesics influence under arteries and the Wistar rat thoracic aorta significance as an experimental model. Next, the goal and three tasks of the doctoral thesis are defined. They are: in vitro investigation of viscoelasticity of the rat aorta layer as function of the age, melatonin deficit and the opioid analgesics concentration.

The number of citations in the dissertation is 341 (books, papers, PhD thesis's and three papers from its dissertation). More of them are published in the last 10-12 years. Thus, I think that the PhD-student Andreyan Georgiev know very well the actual statement of the investigated problem.

### 3. General methods used in thesis investigations

In Section "Material and methods" (quantity 16 pages) are presented: 1) the used in experiments the health male Wistar rat and preparations; 2) the used methods for investigation of viscoelastic characteristics – the method of constrained oscillations and the method for investigation of contracting activity; 3) the methods for statistical analysis of the obtained experimental data – descriptive and comparative ones, and software's Minitab and GraphPad Prism.

In the next Section "Results" (quantity 47 pages) the viscoelastic characteristics (average values of  $E'$  - dynamical module of elasticity and  $f_0$  - natural frequency of oscillation) for 3-, 14- and 18 monthlies health sham,  $n = 11; 7; 4$  and pin.  $n = 15; 7; 4$  rats when the concentration of opioid analgesics is zero. The corresponding results (which depend from the blood pressure) are shown in Figs. 11, 12, 13 and 14q and Tables 4,5 and 6. It is taken into consideration that the age has only a considerable effect for  $E'$  of 18 monthly rats. For both different blood pressure levels 80,5 и 157,5 mmHg the coefficient ( $\beta$ ) of loss of viscosity is one and same for the both age groups – 3 and 14 monthlies. Investigating the melatonin deficit for 3 monthlies rats from sham ( $n = 3$ ) и pin ( $n = 4$ ) groups, it is obtained that some essential difference between control measures is missing. For pin group  $f_0$  linearly increase and  $E'$  increase exponentially. For a larger excerpt of sham and pin groups from 3-, 14- и 18- monthlies rats it is obtained that in result of melatonin deficit decrease dramatically  $E'$  for 3 ( $p < 0.001$ ) and 18 ( $p < 0.05$ ) monthlies rats. Note that  $f_0$  is essentially small only for 18 monthlies group ( $p < 0.001$ ).

For investigation of the influence of fentanyl and tramadol, and its concentration effect about viscoelasticity of the aorta preparations experiments with healthy 3 and 14 monthlies (sham and pin) Wistar rats are made. It is obtained that increased fentanyl concentrations ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-7}$  mol/L) provoked very small values of  $f_0$  in comparison with the control measurer only for the highest concentration of fentanyl from  $5 \times 10^{-7}$  ( $10^{-6.3}$ ) mol/L ( $p < 0.035$ ).  $f_0$  linearly increase in result of increasing of the equivalent arterial blood pressure. On the other hand,  $E'$  is essentially smaller ( $p < 0.05$ ) for all used fentanyl concentrations comparing with the control measure in the sham group.

The control measure in pin group shown that  $f_0$  is very small after 30 min perfusion with pure nutritive solution ( $p < 0.015$ ), after the last applied concentration of fentanyl. Also,  $E'$  is very smaller comparing the control measure in pin group for  $10^{-7}$  mol/L фентанил ( $p < 0.035$ ).

The tramadol effect in the sham group of 3 monthlies rats ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ , и  $5 \times 10^{-5}$  mol/L) provoke considerable changes only in  $E'$ . In the pin group of 3 monthlies rats the average values of  $f_0$  and  $E'$  are approximately one and same.

#### 4. Contributions in doctoral thesis

I will remark only few of them:

- it is established that the modulation of the arterial mechanical properties with pharmacological influence of fentanyl and tramadol depends from the age and the melatonin deficit. Hence, in clinical application of opioid analgesics an individual approach must be applied;
- it is established that in vitro fentanyl acting independently under the viscoelasticity of the aorta layer- the middle layer (media). The tramadol also acting under the viscoelasticity independently from the outer layer (adventitia), but with opioid method and a opposite direction of the effect which depends from the concentration.

#### 5. Estimation of publications

PhD student Andreyan Georgiev is presented three papers:

1. Georgiev A, Kaneva M, Shikova L, Antonova M. Experimental estimation and comparison of viscoelastic characteristics of rat aorta in vitro. Ser Biomech. (2022), 36(1):86-97. doi:10.7546/SB.12.2022;
2. Georgiev A, Kaneva M, Shikova L, Mateeva P, Tchekalarova J, Antonova M. In Vitro Effects of Fentanyl on Aortic Viscoelasticity in a Rat Model of Melatonin Deficiency. Int J Mol Sci. (2024), 25(11):5669. doi:10.3390/ijms25115669;
3. Antonova M., Georgiev A, Totev T. A device for implementation of the forced oscillation method on strip preparations of biological tissues in vitro in prolonged experiments. J Theor Appl Mech, Sofia. (2024), 54:159-171. doi:10.55787/jtams.24.54.2.159 .

In these papers are included all important results from the doctoral thesis. All papers are written with coauthors and with his supervisor assoc. professor M. Antonova and have SJR. In two papers Andreyan Georgiev is first author. He has a very good publishing activity which satisfy minimal requirements pointed in official documents of BAS and Institute of Neurobiology, BAS.

The autoreferat has the same information as the doctoral thesis.

#### 6. Critical remarks

My critical remarks can be divided as essential and typographs

##### ***Essential ones are:***

► the contributions in doctoral thesis are not define very well. When we use statistic, the character of the conclusions is only probable, as it gave probability of one speculation. Because everyone statistical method has owner mathematical models, then the obtained results are correct in the limits of the used real model;

► with the regression analysis we can evaluated how a variable depends from another one and what is the dissipation of the dependent variable near a line determine its dependence. For the evaluation confidential intervals exist which determine precision of the prediction. Also, the dispersion analysis sensibility depends from: the groups number, its size (numbers), the level of significance and the value of distinctions. These problems are not explained in the doctoral thesis.

##### ***Typographic ones are:***

- in the doctoral thesis some spelling and stylistic mistakes can be found. I recommend of the author to eliminate it in the final form for library;
- Figure 10 in the doctoral thesis is not clear;

- the numbers of the figures and tables in the doctoral thesis and autoreferat are different and this is a problem for the reader. In the end of the autoreferat list of references must be added.

## 7. Conclusion

I don't know Andreyan Georgiev Georgiev and haven't some personal impressions for its scientific career. But the reviewed doctoral thesis gave me a conviction that Andreyan Georgiev has the necessary qualities and careful knowledge in this specialty. I think that his contributions in the field of higher education 7. "Public health services and sport", professional direction 7.1. "Medicine", by scientific speciality "Pharmacology" are sufficient to obtain the PhD degree. ***Because of that I give my positive estimation of the reviewed doctoral thesis and I recommend of the scientific jury to confer on Andreyan Georgiev Georgiev the educational and scientific degree "doctor".***

29.04.2026  
Sofia

Reviewer:.....  
/Prof. DSc Svetoslav G Nikolov/