

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Иван Илков Масларски

Катедра по анатомия, хистология, патологоанатомия и съдебна медицина,
Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

Относно: Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Докторска програма: „Анатомия, хистология и цитология“

Автор: Тихомир Руменов Рашев

Тема: „Промени в орексигенни и анорексигенни гени, регулиращи енергийната хомеостаза и тяхната роля в развитието на обезитет и метаболитен синдром“

Научен ръководител: доц. д-р Стефан Венелинов Трифонов, дм

1. Общо представяне на дисертационния труд и докторанта

Представеният дисертационен труд на Тихомир Руменов Рашев е разработен в Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ на Медицински университет – Плевен и е насочен към комплексен и актуален проблем, разположен на границата между анатомията, невроендокринологията, молекулярната биология и метаболитната медицина. В центъра на разработката стои генетичната вариабилност в системите на адипонектина и лептина и възможната ѝ връзка със затлъстяването, захарния диабет тип 2 и други компоненти на метаболитния синдром.

Изборът на тема е логичен за докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“, доколкото енергийната хомеостаза се реализира чрез сложна интеграция между периферни тъкани и централни регулаторни структури, включително хипоталамичните ядра и техните орексигенни и анорексигенни невронни популации. Трудът не е класическо морфологично изследване в тесния смисъл на думата, а разширява анатомичния подход към морфофункционалните и молекулярно-генетичните механизми на регулация. Именно тази връзка между структура, функция и молекулярна регулация придава на разработката интердисциплинарен характер.

Като цяло представената работа показва последователно участие на докторанта в събирането, обработката и интерпретацията на клинични, биохимични и генетични данни. Изследването е организирано около конкретен клиничен контингент и сравнява контролна и таргетна група, като върху тази основа се търсят генотип-фенотипни взаимоотношения. Подходът е подходящ за формулираната изследователска задача и позволява да се направят обосновани изводи в рамките на ограниченията на дизайна тип „случай-контрол“.

2. Кратки биографични и академични данни за дисертанта

Тихомир Руменов Рашев е молекулярен биолог по образование и има професионален път, който естествено го насочва към настоящата дисертационна проблематика. Завършил е бакалавърска степен по „Молекулярна биология“ и магистърска степен по молекулярна биология с квалификация в областта на физиологията на животните и човека. Притежава и специалност по „Анатомия, хистология и цитология“.

Професионалната му дейност е свързана с Медицински университет – Плевен. В периода преди постъпването си като асистент работи като молекулярен биолог в Университетската лаборатория за научни изследвания, а от 2018 г. е асистент в сектора по анатомия, хистология и цитология. Тази последователност е важна за оценката на дисертационния труд, тъй като обяснява добрата му ориентация както в молекулярно-генетичните техники, така и в морфофункционалната интерпретация на изследвания проблем.

В преподавателската си дейност участва в обучението по цитология, хистология и ембриология, както и по анатомия, хистология и цитология на човека. Представената биографична справка показва и участие в методични и академични дейности, включително работа със студенти в българо- и англоезично обучение. Това е подходящ професионален профил за кандидат в докторска програма по анатомия, хистология и цитология.

3. Техническа характеристика и структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е с общ обем 159 страници. Структуриран е в традиционните за докторска разработка раздели: въведение, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, заключение, изводи, приноси, бъдещи насоки и перспективи, приложения и литературен списък. Основната експериментална и аналитична част е развита до около 120-та страница, след което са включени подробни приложения и библиография.

Трудът съдържа значителен брой таблици, графики, схеми и фигури, използвани както за представяне на литературни концепции, така и за визуализация на собствените резултати. Особено полезни са графичните представяния на генотипните и алелните честоти, съотношенията на шансовете и връзките между генотипите и метаболитните показатели. В методичната част са включени и изображения на продукти от рестрикционни реакции, което прави лабораторния алгоритъм по-лесно проследим.

Структурата е логична и позволява последователно проследяване от общата физиологична и морфофункционална рамка на енергийната хомеостаза към конкретните генетични варианти и тяхната клинична интерпретация. На места изложението би могло да бъде по-стегнато и редакционно уеднаквено, но това е преди всичко въпрос на стил и не променя съдържателната стойност на извършеното изследване.

4. Актуалност и значимост на научната проблематика

Затлъстяването и метаболитният синдром са сред най-значимите съвременни медицински проблеми поради високата им честота и връзката им със захарен диабет тип 2,

артериална хипертония, дислипидемия и сърдечно-съдова заболяемост. Съвременният поглед върху тези състояния надхвърля класическото разглеждане на мастната тъкан като пасивно енергийно депо и я определя като активен ендокринен орган, който чрез адипокини участва в системната регулация на метаболизма.

От анатомична и невробиологична гледна точка особено важно е взаимодействието между периферните сигнали и хипоталамуса. Аркуатното, паравентрикуларното, вентромедиалното и дорзомедиалното ядро, както и латералните хипоталамични области, формират функционално свързана мрежа, в която се интегрират сигнали за енергийните запаси, приема на храна и енергоразхода. Лептиновата сигнализация заема централно място в тази система, а адипонектинът е важен модулатор на периферната инсулинова чувствителност и метаболитната хомеостаза.

Изследването на единични нуклеотидни полиморфизми в гените ADIPOQ, LEPR и LEP е актуално, защото позволява да се оцени дали част от индивидуалната вариабилност в метаболитния фенотип може да бъде обяснена чрез генетични фактори. Подобни асоциации по правило са популационно зависими и невинаги се възпроизвеждат еднозначно в различни етнически групи. Поради това данните от популация от Северозападна България имат самостоятелна стойност и допълват наличната информация за генетичните детерминанти на кардиометаболитния риск.

5. Степен на познаване на научния проблем и литературен обзор

Литературният обзор е обемен и демонстрира добро познаване на основните звена в регулацията на енергийния баланс. Разгледани са структурата и функциите на бялата, кафявата и бежовата мастна тъкан, процесите на липогенеза и липолиза, ендокринната функция на адипозната тъкан, биологията на лептина, лептиновия рецептор и адипонектина. Значителна част е отделена на сигналните пътища, включително JAK/STAT, MAPK и свързаните с тях механизми на лептинова резистентност.

Особено релевантен към докторската програма е разделът за хипоталамуса и хипоталамичните ядра, регулиращи приема на храна и енергийната хомеостаза. Авторът разглежда орексигенните NPY/AgRP и анорексигенните POMC/CART невронни популации, както и ролята на основните хипоталамични центрове и връзките им с периферните хормонални сигнали. Така молекулярно-генетичната част на разработката е поставена в необходимия морфофункционален контекст.

Обзорът е по-скоро широк, отколкото критично селективен, но има ясна образователна стойност и създава достатъчна теоретична основа за собственото изследване. Силна страна е стремежът да се обединят данни от анатомията, невробиологията, молекулярната сигнализация и клиничната метаболитна патология.

6. Цел и задачи

Целите са формулирани ясно: да се оцени асоциацията между полиморфизмите ADIPOQ rs266729, LEPR Q223R и вариант в гена LEP с риска от затлъстяване, захарен диабет тип 2 и свързаните кардиометаболитни нарушения, както и да се анализира

разпределението на генотипните и алелните честоти чрез сравнение между таргетна и контролна група от популацията на Северозападна България.

Поставените задачи са логично производни на целите и включват сравнителен анализ на антропометрични, клинични и биохимични показатели; определяне на генотипните и алелните честоти; оценка на връзката на трите изследвани полиморфизма с метаболитен синдром, затлъстяване, T2DM и артериална хипертония; анализ на генотип-фенотипните взаимоотношения и на възможен алел-дозов ефект; както и оценка на относителния принос на генетичните и фенотипните характеристики за кардиометаболитния риск.

Тази постановка е достатъчно конкретна и проверяема. Тя позволява получените резултати да бъдат пряко съпоставени с предварително формулираните въпроси, което е важна характеристика на една дисертационна работа.

7. Материали и методи

Изследваният клиничен контингент включва 156 участници, набирани във Втора клиника по кардиология на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен и в специализирана кардиологична болница в Плевен. Контролната група включва 74 лица без затлъстяване и диабет тип 2, а таргетната група – 82 лица с метаболитни рискови характеристики. Посочени са критерии за включване и изключване, а проектът е одобрен от комисията по етика на научноизследователската дейност на МУ – Плевен. Участниците са информирани за целите и методите и са подписали информирано съгласие.

Методичният комплекс включва документален и клиничен подход, лабораторни биохимични изследвания и молекулярно-генетичен анализ. За генотипизирането са приложени PCR и PCR-RFLP подходи, с последваща визуализация и интерпретация на рестрикционните продукти. Изборът на методи е подходящ за целите на проекта и е в съответствие с характера на изследваните единични нуклеотидни полиморфизми.

Статистическата обработка е извършена с IBM SPSS Statistics 23.0 при праг на значимост $p < 0.05$. Използвани са дескриптивен и вариационен анализ, графични подходи, χ^2 и точен тест на Fisher за категорийни променливи, еднофакторен ANOVA, t-тест и логистична регресия. При генетичните асоциации са представени съотношения на шансовете и 95% доверителни интервали. Като цяло статистическият инструментариум е достатъчен за поставените задачи и позволява количествена оценка на наблюдаваните връзки.

Прави добро впечатление стремежът на автора да интегрира различни типове информация – клинична, биохимична и генетична. Именно тази комбинация придава практическа стойност на работата и намалява риска от едностранна интерпретация само на един показател.

8. Характеристика и оценка на получените резултати

Резултатите са организирани последователно според трите основни изследвани генетични системи – адипонектин, лептинов рецептор и лептин. Преди генетичния анализ са сравнени основните фенотипни и клинични характеристики на групите. Очаквано,

лицата със затлъстяване показват по-висок BMI, по-неблагоприятен метаболитен профил и по-висока честота на артериална хипертония и T2DM, което потвърждава адекватността на формираните групи.

Най-убедителните резултати са свързани с полиморфизма ADIPOQ rs266729. В изследваната популация се установява по-висока честота на G-алела при таргетната група и статистически значими асоциации с повишен риск от затлъстяване и T2DM. Представената генотип-зависима тенденция CC < CG < GG и връзката с плазмената глюкоза на гладно и HDL-холестерола подкрепят предположението, че този вариант може да има значение за глюкозната хомеостаза и част от липидния профил.

По отношение на LEPR Q223R резултатите са по-умерени и именно това прави интерпретацията по-надеждна. Не се установява убедителна асоциация със затлъстяването или липидния профил, но се наблюдава връзка с вариабилността на плазмената глюкоза на гладно. Авторът не преекспонира отрицателните резултати, а ги поставя в контекста на публикувани данни и възможните популационни различия.

При полиморфизма LEP -2548G>A се установяват по-ограничени и контекст-зависими отношения, като по-ясна асоциация се наблюдава по отношение на артериалната хипертония при лица със затлъстяване. Този резултат е интерпретиран като възможна проява на взаимодействие между генетичния вариант и метаболитния фенотип, а не като самостоятелен универсален рисков маркер.

Важна страна на резултатите е, че те не се свеждат до търсене на статистическа значимост на всяка цена. Част от изследваните връзки са негативни и са представени като такива. Това е коректен научен подход. При асоциативните генетични изследвания липсата на връзка в конкретна популация също носи информация, особено когато се сравнява с резултати от други популации.

9. Дискусия

Дискусията е развита отделно за ADIPOQ, LEPR и LEP и завършва с обобщаващ анализ на трите полиморфизма спрямо метаболитните характеристики. Авторът съпоставя собствените резултати с данни от международната литература и правилно отбелязва, че генетичните асоциации при затлъстяване и метаболитен синдром са комплексни и могат да бъдат зависими от популационната структура, средата, пола, възрастта и други фенотипни фактори.

Добро впечатление прави разграничаването между асоциация и причинност. В заключителната част е посочено, че дизайнът тип „случай-контрол“ не позволява причинно-следствени заключения и че размерът на извадката е относително ограничен. Отбелязана е и липсата на директни показатели за инсулинова резистентност. Самото посочване на тези ограничения свидетелства за реалистична оценка на доказателствената стойност на собствените данни.

Според мен най-съществената стойност на дискусията е в опита да се разглеждат трите генетични варианта не изолирано, а като елементи от по-широка регулаторна

система. Това е по-близко до съвременната представа за метаболитния синдром като резултат от кумулативно действие на множество молекулярни, невроендокринни и средови фактори.

10. Изводи

Изводите са свързани с представените резултати и не излизат съществено извън границите на проведеното изследване. Те обобщават различията между контролната и таргетната група, асоциацията на ADIPOQ rs266729 с предиспозицията към затлъстяване и T2DM, генотип-зависимите връзки с глюкозната хомеостаза и HDL-холестерола, липсата на убедителна асоциация на LEPR Q223R със затлъстяването и по-ограничените отношения на LEP -2548G>A с отделни кардиометаболитни показатели.

Особено важно е, че авторът прави диференцирани, а не генерализирани заключения. Данните подкрепят по-тясна връзка на част от изследваните варианти с нарушенията в глюкозната хомеостаза, отколкото с липидния профил или степента на затлъстяване като самостоятелен фенотип. Това е умерена и научно коректна интерпретация.

11. Научни и научно-приложни приноси

Приносите са формулирани в две групи – с оригинален и с приложен характер. Към оригиналните може да се отнесе получаването на данни за генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми в конкретна севернобългарска популация и установяването на статистически значима асоциация между ADIPOQ rs266729 и повишен риск от затлъстяване и T2DM, както и с показатели на глюкозната хомеостаза и HDL-холестерола.

Съществен принос е и разграничаването на различния профил на трите генетични варианта. За LEPR Q223R не се доказва връзка със затлъстяването и липидния профил, но се очертава възможно отношение към глюкозната хомеостаза. За LEP -2548G>A се получават контекст-зависими асоциации, особено по отношение на артериалната хипертония при затлъстели индивиди. Тези резултати са полезни именно защото показват, че отделните полиморфизми не могат да бъдат разглеждани като универсални маркери извън конкретния фенотипен и популационен контекст.

Приложната стойност е по-скоро перспективна, отколкото непосредствено клинична. Данните могат да бъдат използвани като референтни при следващи генетични и епидемиологични проучвания и създават предпоставки за включване на подобни варианти в бъдещи мултигенни модели за оценка на кардиометаболитния риск. Правилно е да се подчертае, че подобна употреба изисква независимо потвърждение в по-големи извадки.

12. Публикационна активност, свързана с научното направление

Представеният списък включва три публикации в български и международни издания, реферирани и индексирани в Web of Science. Сред тях особено пряка методична връзка с дисертационния труд има публикацията, посветена на de novo дизайн на PCR-RFLP анализ за детекция на полиморфизъм в гена на лептиновия рецептор в хипоталамични ядра. Тази

работа показва самостоятелен интерес и практически опит на докторанта в молекулярно-генетичната методика, използвана и в дисертацията.

Останалите публикации показват участие в колективни научни разработки в областта на молекулярната медицина, генетичните полиморфизми и невробиологията. Публикационната активност е съответна на ранния етап от академичното развитие на кандидата и подкрепя впечатлението за последователно изграждане на изследователски профил.

13. Оценка на научната самостоятелност и професионалното развитие

От представените материали се вижда, че докторантът притежава компетентност в молекулярно-биологичните техники и може да ги прилага в рамките на морфофункционален и клиничен проблем. Това е особено важно за съвременната анатомия и хистология, където все по-често се изисква работа на границата между класическата морфология, молекулярната генетика и количествения анализ.

Професионалният му път в катедрата и преподавателската дейност допълват научната подготовка. Кандидатът има профил, който може да бъде полезен за развитието на катедра по анатомия, хистология и цитология – както в обучението, така и при въвеждането на молекулярни методи в научните разработки. За академичната общност е важно млади преподаватели с такава комбинирана подготовка да бъдат насърчавани да развиват трайна научна и преподавателска кариера.

14. Обща оценка

Дисертационният труд на Тихомир Руменов Рашев не цели да реши изчерпателно изключително сложния въпрос за генетиката на затлъстяването и метаболитния синдром. Неговата стойност е по-конкретна и реалистична: в една дефинирана популация са изследвани три функционално значими генетични варианта, съпоставени с клинични и биохимични показатели, а получените асоциации са интерпретирани в контекста на съвременните представи за адипокиновата и хипоталамичната регулация на енергийната хомеостаза.

Работата има ограничения, характерни за този тип проучвания – умерен размер на извадката, дизайн „случай-контрол“, отсъствие на част от по-задълбочените метаболитни показатели и необходимост от бъдеща независима валидация. Важно е обаче, че тези ограничения са осъзнати и отчетени от автора. В рамките на поставените цели са получени достатъчно собствени резултати, които позволяват формулиране на изводи и приноси.

Като рецензент оценявам положително интердисциплинарния характер на разработката, връзката ѝ с анатомията и невроендокринната регулация, приложението на молекулярно-генетични методи и опита за интегриран анализ на генетични и фенотипни данни. Представеният труд показва научно израстване и способност на докторанта да планира, извършва и интерпретира изследване в областта на медицинската биология и морфофункционалните науки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на цялостната оценка на представения дисертационен труд, получените научни резултати, формулираните изводи и приноси, както и представената публикационна активност, считам, че разработката притежава необходимите характеристики на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“.

Тихомир Руменов Рашев демонстрира подготовка в областта на молекулярната биология, генетичния анализ и морфофункционалната интерпретация на енергийната хомеостаза. Професионалното му развитие като преподавател в анатомична катедра и придобитият научноизследователски опит са добра основа за по-нататъшното му академично израстване.

Поради изложеното давам ПОЛОЖИТЕЛНА ОЦЕНКА на дисертационния труд и предлагам на уважаемото Научно жури да присъди на Тихомир Руменов Рашев образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1. Медицина, докторска програма „Анатомия, хистология и цитология“.

Изготвил рецензията:

проф. Иван Илков Масларски

Катедра по анатомия, хистология, патологоанатомия и съдебна медицина

Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

На основание чл.59 от ЗЗЛД

Дата: 19.09.2026 г.

Подпис:

гр. София

REVIEW

by Prof. Ivan Ilkov Maslarski

Department of Anatomy, Histology, Pathology and Forensic Medicine,
Faculty of Medicine, Sofia University “St. Kliment Ohridski”

Regarding: Dissertation submitted for the award of the educational and scientific degree “Doctor” (PhD)

Field of higher education: 7. Health Care and Sports

Professional field: 7.1. Medicine

Doctoral programme: “Anatomy, Histology and Cytology”

Author: Tihomir Rumenov Rashev

Title: “Changes in orexigenic and anorexigenic genes regulating energy homeostasis and their role in the development of obesity and metabolic syndrome”

Scientific supervisor: Assoc. Prof. Stefan Venelinov Trifonov, MD, PhD

1. General presentation of the dissertation and the doctoral candidate

The dissertation presented by Tihomir Rumenov Rashev was developed at the Department of Anatomy, Histology, Cytology and Biology at Medical University – Pleven and addresses a complex and topical problem at the interface of anatomy, neuroendocrinology, molecular biology and metabolic medicine. The work focuses on genetic variability in the adiponectin and leptin systems and its possible association with obesity, type 2 diabetes mellitus and other components of the metabolic syndrome.

The choice of topic is appropriate for the doctoral programme “Anatomy, Histology and Cytology”, since energy homeostasis is maintained through complex integration between peripheral tissues and central regulatory structures, including the hypothalamic nuclei and their orexigenic and anorexigenic neuronal populations. The dissertation is not a classical morphological study in the narrow sense of the term; rather, it broadens the anatomical approach toward the morphofunctional and molecular-genetic mechanisms of regulation. It is precisely this link between structure, function and molecular regulation that gives the work its interdisciplinary character.

Overall, the work demonstrates consistent involvement of the doctoral candidate in the collection, processing and interpretation of clinical, biochemical and genetic data. The study is organised around a defined clinical cohort and compares a control group with a target group, using this framework to investigate genotype–phenotype relationships. The approach is appropriate for the formulated research question and allows well-grounded conclusions to be drawn within the limitations of a case–control design.

2. Brief biographical and academic information about the doctoral candidate

Tihomir Rumenov Rashev is a molecular biologist by training and has followed a professional path that naturally led him to the subject of the present dissertation. He holds a Bachelor's degree in Molecular Biology and a Master's degree in Molecular Biology with qualification in animal and human physiology. He also holds a specialty in "Anatomy, Histology and Cytology".

His professional activity is associated with Medical University – Pleven. Before taking up an academic assistant position, he worked as a molecular biologist at the University Research Laboratory, and since 2018 he has been an assistant in the Anatomy, Histology and Cytology sector. This progression is relevant to the assessment of the dissertation, as it explains his sound orientation both in molecular-genetic techniques and in the morphofunctional interpretation of the problem under investigation.

In his teaching activity, he participates in courses in cytology, histology and embryology, as well as in human anatomy, histology and cytology. The submitted biographical information also indicates participation in methodological and academic activities, including work with students in both Bulgarian- and English-language programmes. This constitutes an appropriate professional profile for a candidate in the doctoral programme in anatomy, histology and cytology.

3. Technical characteristics and structure of the dissertation

The dissertation comprises a total of 159 pages. It is structured in the sections traditionally expected of a doctoral dissertation: introduction, literature review, aims and objectives, materials and methods, results, discussion, conclusion, conclusions, contributions, future directions and perspectives, appendices and references. The principal experimental and analytical part extends to approximately page 120, followed by detailed appendices and the bibliography.

The dissertation contains a substantial number of tables, graphs, diagrams and figures used both to present concepts from the literature and to visualise the author's own results. Particularly useful are the graphical presentations of genotype and allele frequencies, odds ratios and relationships between genotypes and metabolic parameters. The methodological section also includes images of restriction-reaction products, making the laboratory workflow easier to follow.

The structure is logical and allows the reader to follow a consistent progression from the general physiological and morphofunctional framework of energy homeostasis to the specific genetic variants and their clinical interpretation. In places, the presentation could be more concise and editorially more uniform; however, this is primarily a matter of style and does not alter the substantive value of the research performed.

4. Relevance and significance of the scientific topic

Obesity and metabolic syndrome are among the most important contemporary medical problems because of their high prevalence and their association with type 2 diabetes mellitus, arterial hypertension, dyslipidaemia and cardiovascular morbidity. The modern view of these conditions extends beyond the classical concept of adipose tissue as a passive energy store and

recognises it as an active endocrine organ that, through adipokines, participates in the systemic regulation of metabolism.

From an anatomical and neurobiological perspective, the interaction between peripheral signals and the hypothalamus is of particular importance. The arcuate, paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei, together with the lateral hypothalamic areas, form a functionally connected network in which signals related to energy stores, food intake and energy expenditure are integrated. Leptin signalling occupies a central position in this system, while adiponectin is an important modulator of peripheral insulin sensitivity and metabolic homeostasis.

The study of single-nucleotide polymorphisms in the ADIPOQ, LEPR and LEP genes is relevant because it enables assessment of whether part of the individual variability in metabolic phenotype can be explained by genetic factors. Such associations are generally population-dependent and are not always reproduced consistently across different ethnic groups. Therefore, data obtained from a population in Northwestern Bulgaria have independent value and add to the available information on genetic determinants of cardiometabolic risk.

5. Knowledge of the scientific problem and literature review

The literature review is extensive and demonstrates good knowledge of the principal components involved in the regulation of energy balance. It discusses the structure and functions of white, brown and beige adipose tissue, the processes of lipogenesis and lipolysis, the endocrine function of adipose tissue, and the biology of leptin, the leptin receptor and adiponectin. Considerable attention is devoted to signalling pathways, including JAK/STAT and MAPK, as well as the related mechanisms of leptin resistance.

Particularly relevant to the doctoral programme is the section dealing with the hypothalamus and the hypothalamic nuclei regulating food intake and energy homeostasis. The author discusses the orexigenic NPY/AgRP and anorexigenic POMC/CART neuronal populations, together with the role of the principal hypothalamic centres and their connections with peripheral hormonal signals. In this way, the molecular-genetic component of the dissertation is placed within the necessary morphofunctional context.

The review is broad rather than critically selective, but it has clear educational value and provides a sufficient theoretical basis for the author's own research. A strong aspect is the attempt to integrate data from anatomy, neurobiology, molecular signalling and clinical metabolic pathology.

6. Aim and objectives

The aims are clearly formulated: to assess the association between the ADIPOQ rs266729 and LEPR Q223R polymorphisms and a variant in the LEP gene with the risk of obesity, type 2 diabetes mellitus and related cardiometabolic disorders, and to analyse the distribution of genotype and allele frequencies by comparing a target group and a control group from the population of Northwestern Bulgaria.

The objectives follow logically from these aims and include a comparative analysis of anthropometric, clinical and biochemical parameters; determination of genotype and allele frequencies; assessment of the relationship of the three investigated polymorphisms with metabolic syndrome, obesity, T2DM and arterial hypertension; analysis of genotype–phenotype relationships and a possible allele-dose effect; and evaluation of the relative contribution of genetic polymorphisms and phenotypic characteristics to cardiometabolic risk.

This framework is sufficiently specific and testable. It allows the obtained results to be directly compared with the questions formulated in advance, which is an important characteristic of a doctoral dissertation.

7. Materials and methods

The clinical cohort includes 156 participants recruited from the Second Clinic of Cardiology at “Dr. Georgi Stranski” University Hospital – Pleven and from a specialised cardiology hospital in Pleven. The control group comprises 74 individuals without obesity or type 2 diabetes, while the target group comprises 82 individuals with metabolic risk characteristics. Inclusion and exclusion criteria are specified, and the project was approved by the Research Ethics Committee of Medical University – Pleven. Participants were informed about the aims and methods of the study and signed informed consent forms.

The methodological complex includes documentary and clinical approaches, laboratory biochemical testing and molecular-genetic analysis. PCR and PCR-RFLP approaches were applied for genotyping, followed by visualisation and interpretation of the restriction products. The choice of methods is appropriate for the aims of the project and corresponds to the nature of the investigated single-nucleotide polymorphisms.

Statistical processing was performed using IBM SPSS Statistics 23.0 with a significance threshold of $p < 0.05$. Descriptive and variation analyses, graphical approaches, the χ^2 test and Fisher’s exact test for categorical variables, one-way ANOVA, the t-test and logistic regression were used. Odds ratios and 95% confidence intervals are presented for the genetic associations. Overall, the statistical tools are sufficient for the stated objectives and allow quantitative assessment of the observed relationships.

The author’s effort to integrate different types of information—clinical, biochemical and genetic—makes a favourable impression. It is precisely this combination that adds practical value to the work and reduces the risk of a one-sided interpretation based on a single indicator.

8. Characterisation and assessment of the obtained results

The results are organised consistently according to the three principal genetic systems studied—adiponectin, leptin receptor and leptin. Before the genetic analysis, the main phenotypic and clinical characteristics of the groups are compared. As expected, individuals with obesity show a higher BMI, a less favourable metabolic profile and a higher prevalence of arterial hypertension and T2DM, confirming the adequacy of the groups formed.

The most convincing results are related to the ADIPOQ rs266729 polymorphism. In the studied population, a higher frequency of the G allele is observed in the target group, together

with statistically significant associations with an increased risk of obesity and T2DM. The genotype-dependent trend $CC < CG < GG$ and the association with fasting plasma glucose and HDL cholesterol support the assumption that this variant may be relevant to glucose homeostasis and certain aspects of the lipid profile.

With regard to LEPR Q223R, the results are more moderate, and this in itself makes their interpretation more reliable. No convincing association with obesity or the lipid profile is established, although an association with variability in fasting plasma glucose is observed. The author does not overstate the negative findings, but places them in the context of published data and possible population differences.

For the LEP -2548G>A polymorphism, the associations are more limited and context-dependent, with a clearer relationship observed with arterial hypertension in individuals with obesity. This result is interpreted as a possible manifestation of interaction between the genetic variant and the metabolic phenotype rather than as an independent universal risk marker.

An important aspect of the results is that they are not reduced to a search for statistical significance at any cost. Some of the investigated relationships are negative and are presented as such. This is a scientifically correct approach. In genetic association studies, the absence of an association in a particular population is also informative, especially when compared with results from other populations.

9. Discussion

The discussion is developed separately for ADIPOQ, LEPR and LEP and concludes with an integrated analysis of the three polymorphisms in relation to metabolic characteristics. The author compares his own results with data from the international literature and correctly notes that genetic associations in obesity and metabolic syndrome are complex and may depend on population structure, environmental factors, sex, age and other phenotypic characteristics.

A favourable impression is made by the distinction between association and causality. In the concluding part, it is stated that the case-control design does not allow causal conclusions and that the sample size is relatively limited. The lack of direct measures of insulin resistance is also acknowledged. The very fact that these limitations are explicitly stated demonstrates a realistic assessment of the evidential strength of the author's own data.

In my view, the most important value of the discussion lies in the attempt to consider the three genetic variants not in isolation but as elements of a broader regulatory system. This is closer to the contemporary concept of metabolic syndrome as the result of the cumulative action of multiple molecular, neuroendocrine and environmental factors.

10. Conclusions

The conclusions are related to the results presented and do not substantially extend beyond the boundaries of the study performed. They summarise the differences between the control and target groups, the association of ADIPOQ rs266729 with predisposition to obesity and T2DM, genotype-dependent relationships with glucose homeostasis and HDL cholesterol, the lack of a

convincing association of LEPR Q223R with obesity, and the more limited relationships of LEP -2548G>A with individual cardiometabolic parameters.

It is particularly important that the author reaches differentiated rather than generalised conclusions. The data support a closer relationship of some of the investigated variants with disturbances of glucose homeostasis than with the lipid profile or the degree of obesity as an isolated phenotype. This is a balanced and scientifically sound interpretation.

11. Scientific and applied scientific contributions

The contributions are formulated in two groups—original and applied. The original contributions include the generation of data on genotype and allele frequencies of the investigated polymorphisms in a specific Northern Bulgarian population and the establishment of a statistically significant association between ADIPOQ rs266729 and an increased risk of obesity and T2DM, as well as with markers of glucose homeostasis and HDL cholesterol.

Another significant contribution is the distinction between the different profiles of the three genetic variants. LEPR Q223R is not shown to be associated with obesity or the lipid profile, although a possible relationship with glucose homeostasis emerges. LEP -2548G>A demonstrates context-dependent associations, particularly with arterial hypertension in individuals with obesity. These results are useful precisely because they show that individual polymorphisms cannot be regarded as universal markers outside a specific phenotypic and population context.

The applied value is prospective rather than immediately clinical. The data may be used as reference information in subsequent genetic and epidemiological studies and create a basis for including similar variants in future multigene models for cardiometabolic risk assessment. It is appropriate to emphasise that such use requires independent confirmation in larger samples.

12. Publication activity related to the scientific field

The submitted list includes three publications in Bulgarian and international journals that are referenced and indexed in Web of Science. Among them, the publication devoted to the de novo design of a PCR-RFLP assay for detection of a polymorphism in the leptin receptor gene in hypothalamic nuclei has a particularly direct methodological relationship to the dissertation. This work demonstrates the doctoral candidate's independent interest and practical experience with the molecular-genetic methodology also applied in the dissertation.

The remaining publications demonstrate participation in collaborative scientific work in the fields of molecular medicine, genetic polymorphisms and neurobiology. The publication activity is appropriate for the candidate's early stage of academic development and supports the impression of a steadily developing research profile.

13. Assessment of scientific independence and professional development

The submitted materials show that the doctoral candidate is competent in molecular-biological techniques and is able to apply them within a morphofunctional and clinical problem. This is particularly important for contemporary anatomy and histology, where work at the

interface between classical morphology, molecular genetics and quantitative analysis is increasingly required.

His professional development within the department and his teaching activity complement his scientific training. The candidate has a profile that can be useful for the development of a department of anatomy, histology and cytology—both in teaching and in the introduction of molecular methods into scientific research. For the academic community, it is important that young lecturers with such combined training are encouraged to develop a sustainable scientific and teaching career.

14. Overall assessment

The dissertation of Tihomir Rumenov Rashev does not aim to provide an exhaustive solution to the highly complex question of the genetics of obesity and metabolic syndrome. Its value is more specific and realistic: three functionally relevant genetic variants are investigated in a defined population and compared with clinical and biochemical parameters, while the observed associations are interpreted in the context of current concepts of adipokine and hypothalamic regulation of energy homeostasis.

The work has limitations characteristic of this type of study—a moderate sample size, a case-control design, the absence of some more advanced metabolic parameters, and the need for future independent validation. It is important, however, that these limitations are recognised and acknowledged by the author. Within the stated aims, sufficient original results have been obtained to allow conclusions and contributions to be formulated.

As a reviewer, I positively assess the interdisciplinary nature of the work, its relationship to anatomy and neuroendocrine regulation, the application of molecular-genetic methods and the attempt to integrate genetic and phenotypic data. The dissertation demonstrates scientific development and the doctoral candidate's ability to plan, conduct and interpret research in the fields of medical biology and morphofunctional sciences.

CONCLUSION

Based on the overall assessment of the submitted dissertation, the scientific results obtained, the conclusions and contributions formulated, as well as the publication activity presented, I consider that the work possesses the necessary characteristics of a dissertation for the award of the educational and scientific degree “Doctor” (PhD) in the doctoral programme “Anatomy, Histology and Cytology”.

Tihomir Rumenov Rashev demonstrates training in molecular biology, genetic analysis and the morphofunctional interpretation of energy homeostasis. His professional development as a lecturer in an anatomy department and the research experience he has acquired provide a sound basis for his further academic development.

For the reasons stated above, I give a **POSITIVE ASSESSMENT** of the dissertation and propose that the esteemed Scientific Jury award Tihomir Rumenov Rashev the educational and scientific degree “Doctor” (PhD) in the field of higher education 7. Health Care and Sports, professional field 7.1. Medicine, doctoral programme “Anatomy, Histology and Cytology”.

Prepared by:

Prof. Ivan Ilkov Maslarski

Department of Anatomy, Histology, Pathology and Forensic Medicine

Faculty of Medicine, Sofia University “St. Kliment Ohridski”

На основание чл.59 от ЗЗЛД

Date: 19 September 2026

Signature:

Sofia