

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд

“Пептидите КАРТ и обестатин като регулатори на сърдечните съкращения при *Rana* sp.”

на Илияна Василева Саздова

от проф. Огнян Атанасов Димитров, дб

Представеният дисертационен труд съдържа 128 стандартни страници печатен текст, илюстриран с 40 фигури, който е разделен стандартно на: увод - 1 стр., литературен обзор – 33 стр., цел и задачи – 2 стр., материали и методи – 8 стр., експериментални резултати – 38 стр., обсъждане – 18 стр., изводи и научни приноси – 2 стр., цитирана литература – 18 стр. с 267 източника (2 - на кирилица и 265 – на латиница), главно от последните 10 години. Този труд е посветен на проучване механизма на действие и функционалната роля на два сигнални пептида, в чиято характеристика има още много бели петна. Независимо, че техни рецептори все още не се установени, някои автори ги дефинират като хормони, което прави изследването им изключително интересно и актуално.

Литературният обзор на дисертацията е съставен от 3 части – в първата са разгледани анатомията и физиологията на жабешкото сърце, както и регулацията на сърцевата дейност, а втората и третата са посветени на характеристиката и физиологичните ефекти на двата изследвани пептида. И в трите части описанието е стегнато и целенасочено, почиващо на задълбочени научни познания. В първата част морфологичните и функционалните особености на жабешкото сърце и регулацията на дейността му са не само описани, но и съпоставени с характеристиката на сърцето при бозайниците и човека. Сравнението е направено дори на субклетъчно равнище, като е обърнато внимание на особеностите на съкратителните елементи на сърцевата мускулна клетка и механизма на нейното възбуждане и съкращение. Това позволява впоследствие адекватно да се оценят ефектите на двата пептида върху сърцевата дейност.

Във втората и третата част на обзора са отразени изчерпателно литературните данни за химичната природа, локализацията и широкия спектър физиологични ефекти на

КАРТ-пептида и обестатина съответно, като не са пропуснати и редица спорни въпроси, противоречия и предположения. Добро впечатление прави желанието на дисертанта да изкаже в някои случаи и обосновано собствено мнение.

Като цяло обзорът е пълен, написан с разбиране, насочен към дисертационната тема и лишен от излишна информация. Той характеризира автора като ерудиран изследовател, познаващ в детайли фронта на науката по разработваната тема. Бих предложил само многобройните цитирани работи във втората и третата част на обзора да бъдат групирани и подредени по функционални системи, върху които са установени ефекти на двата пептида. Това би направило разказа за тях още по-приятен.

Преследваната **цел на работа** и поставените конкретни експериментални задачи са ясно и точно формулирани. Целта е съобразена с постигнатото в конкретната научна област. Работата цели проучването на физиологични ефекти на пептидите КАРТ и обестатин върху сърцевата дейност на жаба. Тази цел е постижима с набелязаните задачи, с които е възможно установяването не само на конкретни ефекти на пептидите, но и разкриване на механизма им. Поради възникването на непредвидими затруднения в хода на изследването на действието на обестатина дисертантът правомерно е разширил спектъра на експерименталните задачи с още 4, което несъмнено повишава качеството на дисертационния труд.

Експерименталната работа по темата е изпълнена с подходящи **методи на изследване**, избрани в съответствие с поставените задачи. Обектът на изследване – сърце на жаба широко се използва в проучвания на действието на различни вещества върху сърцевата мускулатура. В работата той е включен в два експериментални модела – *in vivo* за изследване на КАРТ-пептида и *in vitro* (изолирано сърце) за изследване на обестатина. И в двата случая в опитната постановка се използват тензодатчик, аналогово-цифров преобразувател и компютър. За целта на работата специално разработени са и 3 програмни продукта. Експерименталните подходи са описани подробно и коректно. Извършена е прецизна вариационно-статистическа обработка на данните, което изключва съмнения за обективността на заключенията и прави изводите убедителни.

Експерименталните резултати са представени графично много нагледно, с подробно текстово описание. Всяка фигура илюстрира конкретно изследване, като включва средните стойности за всяка точка на кривите и стандартната грешка. Коректно са отбелязани точките с висока статистическа достоверност на разликите опит - контрола,

от които са отчетени експерименталните ефекти. Всяка фигура е съпроводена с подробен обяснителен текст (вкл. броя на повторенията).

Обсъждането е представено в две независими части, съответно за двата пептида. При планирането на дисертационната тема дисертантът се е насочил към изследване на физиологични ефекти на КАРТ-пептида върху може би най-слабо проучената в това отношение функционална система. Върху сърцевата дейност е установен добре проявен положителен инотропен ефект, чийто механизъм е проследен и доказан в детайли. Много находчиво с използването на подходящи блокери и антагонисти, стъпка по стъпка е изградена убедителна схема на този механизъм, включваща оста хипоталамус-хипофиза-интерренални жлези и нейни хормони: кортиколиберин, адренкортикотропен хормон и кортикостероиди (глюкокортикоиди). Последните активират α -адренорецепторите на сърцевите мускулни клетки, с което КАРТ стимулира сърцевата дейност. Схемата е детайлизирана с доказателства за участие в нея на сигнална верига в хипофизата, включваща активиране на кортиколиберина на хипофизни рецептори с последващо участие на G_s -белтък, аденилатциклаза и цАМФ-зависима протеинкиназа А. Това предполага и свързване на КАРТ с вероятен негов мембранен рецептор в клетки на хипофизата, а също и на хипоталамуса. На базата на експериментални доказателства се допуска и присъствие на КАРТ - рецептори в клетки на хипофизата и хипоталамуса, куплирани и с други G-белтъци.

Поради непознаването на КАРТ-рецептора и неговата органна локализация, дисертантът с право не отхвърля възможността КАРТ-пептидът да се свързва специфично с мембранна молекула и на клетки на интерреналните жлези.

В работата е установена интересна находка – ефектът на КАРТ се елиминира при продължително гладуване на жабите, а след приемане на храна се възстановява. Това подсказва участие на пептида в приспособяването на функциите на сърдечно-съдовата система на пойкилотермните организми към енергийната обмяна и открива нов хоризонт за изследване на пептида.

Приложената схема на фиг. 15 илюстрира текста, свързан с механизма на действие на КАРТ-пептида, но според мен е конструирана не по най-добрия начин.

Изследването на влиянието на обестатина върху дейността на изолирано сърце е разкрило аналогичен на КАРТ ефект – пептидът повишава силата на съкращенията. Този

инотропен ефект отчетливо е дозозависим, за което имат значение експерименталните условия *in vitro*. И тук с помощта на удачно избран набор от блокери и инхибитори е проследен механизъмът на сигналния път, включен от пептида, като са установени важни негови звена.

Обестатиновият рецептор също не е установен, но с основание се приема, че е локализиран в мембраната на симпатикови нервни окончания и куплиран с G_s -белтък. Свързването на пептида с рецептора включва веригата от компоненти: аденилатциклаза – цАМФ - протеинкиназа А - извънклетъчна сигналрегулируема киназа 1 и 2 тип митогенактивируема протеинкиназа. Последната повишава синтезата, но също и екзоцитозата на адреналин чрез активиране, съответно на тирозинхидроксилазата и синапсина в нервното окончание. Така под влияние на обестатина в окончанията на симпатиковите неврони на сърцето се отделя адреналин. В работата е показано, че той се свързва с β -адренорецептори на сърцевите мускулни клетки, което води до установения физиологичен ефект на обестатина. Съществено постижение на дисертанта е разкриването на детайли в действието на адреналина върху тези клетки. Установено е, че се повлияват три мембранни ефектора – калциевите канали L-тип, калиевите канали KCNQ1 и Na^+ , Ca^{2+} -евият обменен механизъм, което прави ефекта на медиатора комплексен.

Голямо достойнство на работата е успешното преодоляване на установеното неспецифично действие на липофилния разтворител диметилсулфоксид (ДМСО), което се е проявило в неочаквани значителни ефекти върху сърцевата дейност. С упоритостта и усърдието на дисертанта тези разочарования са били преодоляни много сполучливо и страничните ефекти на ДМСО са били елиминирани.

Поради изобилието на експериментални данни по изследването на действието на обестатина, тази част на обсъждането закономерно е доста обширна. Но с внимание е разгледан всеки резултат, потърсено е сравнение или подкрепа в разсъжденията от литературните източници и е постигнато коректно научно заключение. Бил отбелязъл, че на места текстът е тежък и би могъл по-добре да се редактира.

Изводите от работата напълно отразяват установените физиологични ефекти на пептидите КАРТ и обестатин, както и проследените звена на сигналните пътища, по които се осъществява тяхното положително инотропно действие върху съкращенията на сърцето на жаба. Изводите са обосновани от получените експериментални данни и са прецизно

формулирани. Бил отбелязал само, че в 8-ия извод би трябвало да се спомене посочените йонни канали за какви клетки се отнасят.

Приемам напълно отбелязаните от автора научни приноси. Действително работата съдържа оригинални научни постижения, които сполучливо очертават за първи път механизма на действие на двата пептида върху сърцевата дейност. Безспорно, работата като цяло разкрива, от една страна, как двата пептида участват в регулацията на сърцевата дейност, а от друга страна, значително обогатява общата картина на тяхното физиологично действие.

Заключение. Темата на представения дисертационен труд е актуална. Изследвано е регулаторното действие на пептидите КАРТ и обестатин върху сърцевата дейност, което е почти непроучена област в широкия спектър на физиологичните им ефекти. В голямата си част получените резултати и техният задълбочен анализ и коментар са нови за науката и съществено обогатяват знанията за контрола на сърцевата дейност.

Повечето експериментални данни са публикувани в три научни статии-две в международни научни списания с импакт фактор (3.014 и 0.915): *Exp. Physiol* и *Cent. Eur. Journal of Biology*, а една в Доклади на БАН (под печат). Материали от дисертацията са представени на два авторитетни научни форума. Забелязани са две цитирания в международни научни списания.

Авторефератът на дисертацията напълно съответства на основния труд.

На основание изложеното предлагам убедено на членовете на уважаемото жури по конкурса да дадат своя положителен вот за присъждане на Илияна Василева Саздова образователната и научна степен “**доктор**”.

Декларирам, че нямам общи публикации с дисертанта.

10 август 2013 г.

Подпис:

/проф. О. А. Димитров/