

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертация „Пептидите КАРТ и обестатин като регулатори на сърдечните съкращения при *Rana sp.*”, представена от Илияна Василева Саздова, катедра Физиология на животните и човека, СУ „Св. Кл.Охридски”, за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

Рецензент: доц. Полина Стоянова Петкова-Кирова

Биографични данни

Илияна Саздова е родена през 1980 в гр. Плевен. През 2003 се дипломира като бакалавър в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски”, специалност Молекулярна биология, а през 2005 и като магистър, специалност Физиология на животните и човека, с отличен успех. През 2005-2009 работи като асистент, 2009-2011 като старши асистент, а от 2011-като главен асистент в Катедра Физиология на животните и човека, Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”. През 2009 година е зачислена на свободна докторантура към същата катедра. Илияна Саздова е специализирала изобарна миография при проф. Рудолф Шуберт, Институт по Физиология, Медицински факултет, Университет на гр. Рощок, Германия, участвала е в 7 проекта, финансирани от Софийски университет и по програми на НАТО, като част от резултатите по проектите са представени от нея в 4 конференции.

Актуалност на проблема и формиране на целите и задачите

Целта на настоящия дисертационен труд е да се установят ефектите на пептидите КАРТ и обестатин върху сърдечната дейност на жаба *Rana sp.* и механизмите, по които тези ефекти се осъществяват.

КАРТ-пептидът, изолиран през 1981 от хипоталамус на овца, е особено интересен с ролята си на ендогенен психостимулант с ефекти подобни на тези на кокаина и амфетамин, както и с многообразието от други ефекти като участие в стресовите реакции чрез оста хипоталамус-хипофиза-надбъбречни жлези, участие в регулацията на секрецията на инсулин, на болковата сетивност, влияние върху храносмилателната система и апетита и др. Въпреки доказаната физиологична важност на КАРТ пептида, неговият рецептор предстои да бъде открит, а за клетъчните сигнални пътища, по които КАРТ осъществява своите ефекти, е известно малко. Установено е, че КАРТ активира Gi/o-белтък в някои клетъчни линии, което силно подкрепя тезата, че съществува

специфичен G-протеин-свързан рецептор за КАРТ. От друга страна КАРТ може да потенцира инсулиновата секреция с участието на цАМФ и протеинкиназа А, което предполага съществуването на един или повече рецептори за КАРТ, куплирани с различни G-белтъци.

На фона на оскъдните и разнопосочни литературни данни поставените задачи

-да се определи влиянието на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба, и след третиране с инхибитори на вътреклетъчни сигнални вериги

-да се проследи влиянието на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба в присъствие на адренорецепторни блокери.

-да се определи ефектът на КАРТ върху сърдечната дейност на жаба след разрушаване на ЦНС, след екстирпация на хипофизата и след функционално елиминиране на интерреналните жлези.

са много точно формулирани. Изследването с така поставените цел и задачи, е актуално и във връзка с възможно използване на КАРТ-пептида и КАРТ-подобни синтетични вещества при лечението на хранителни разстройства и третиране на кокаиново пристрастяване, като в основата на последното е фактът, че едновременното прилагане на КАРТ и кокаин, блокира ефектите на кокаина. Допълнително, с оглед на известната кардиотоксичност на кокаина, изследването на ефектите на КАРТ върху сърдечна дейност, е особено навременно, още повече, че такива изследвания в литературата са малобройни. Изследването е добре аргументирано в дисертацията, като е посочено влиянието на КАРТ върху кръвния поток в мозъка и повишаването под негово действие на нивата на катехоламините, които както е известно (при жаба основно адреналин) имат отношение към регулацията на сърдечната дейност. От друга страна, КАРТ е установен като екскреторен белтък в хипоталамус, хипофиза и надбъбречни жлези, което допълнително насочва вниманието към предполагаемо участие на КАРТ в регулацията на сърдечно-съдовата система при стрес.

Обестатинът е открит при анализ на биоинформационни данни за препрогелина от Zhang и сътр. през 2005 и подробни проучвания на пептида се осъществяват едва през последните 6-7 години. Данните за обестатина са още по-оскъдни, в много случаи противоречиви, като рецепторът за този пептид все още не е еднозначно доказан и сигналните пътища активирани от обестатина остават неизяснени. Интересът към обестатина е не по-малък от този към КАРТ пептида, като се допуска участие на обестатина в етиологията и

патофизиологията на затлъстяването и диабета. Отново дисертантката поставя ясни и конкретни задачи, чието изпълнение би попълнило липсващата информация.

Прави впечатление изключителната прецизност и коректност на авторката при провеждане на изследването върху обестатина, като са поставени и допълнителни задачи свързани с определяне на собствените ефекти на органичния разтворител на някои от използваните фармакологични агенти, диметил сулфоксид (ДМСО), както и на ефектите на обестатина разтворен в 0,1% ДМСО; изследвани са допълнително и сигналните пътища, чрез които обестатинът разтворен в 0,1% ДМСО осъществява ефекта си, като често са използвани няколко концентрации на блокерите, осигуряващи различна специфичност към блокираните ефектори, което е изключително трудоемко, но прави изследването особено ценно със своята точност и пълнота.

Преглед на дисертационния труд

Дисертацията е 129 страници, структурирана в Използвани съкращения-1стр., Увод - 1стр, Литературен обзор- 33 стр., Цел и Задачи- 2стр., Материали и методи-8стр, Експериментални резултати-38стр., Обсъждане-18стр., Изводи-1стр., Научни приноси-1стр., Декларация за оригиналност на резултатите-1стр., Списък на публикациите, участия в конференции и цитирания-2стр., Литература-18стр., съдържа 40 фигури и 3 таблици. Цитираната литература включва 267 заглавия, от които едно на български и едно-на руски език, като 119 от литературните източници (около 45%) са от последните 10 години, а един-от последната година. Дисертацията е написана грамотно, на литературен български език, като са избягвани чуждици и съкращения, което я прави лека и приятна за четене и допълва доброто впечатление от задълбочените познания на авторката.

Литературният обзор, чийто обем е около $\frac{1}{4}$ от общия обем на дисертацията, е построен много добре. Много удачно в него е отделено място на особеностите на жабешкото сърце-анатомия и физиология напр. еднокамерност на сърцето, наличие на венозен синус, от който кръвта се влива в дясното предсърдие и др., както и на особеностите в регулацията на сърдечната дейност на жабешко сърце, като механизмите на вегетативна регулация на сърдечната дейност от симпатиковата и парасимпатикова нервна система са обобщени в авторска схема; дадена е и общата характеристика и са разгледани подробно и физиологичните ефекти на кокаин-амфетамин регулируемия

транскрипт пептид и на обестатина. Литературният обзор е актуален, в пряка връзка с темата на дисертацията и представлява добра основа за излагане на собствените резултати и на дискусията. Написан е с вещина като показва не само уменията на авторката за анализ на литературните данни, но и широкообхватните и знания.

Анатомичните и физиологични особености на жабешкото сърце го правят удобен обект за фармакологични експерименти в *in vitro* условия. Освен това множеството получени и потвърдени данни на препарат „изолирано сърце“ го определят и като надежден модел за изследвания. Сравнително богатата литературна справка за електро-механичното куплиране и регулацията на сърдечната дейност при жаби позволява коректна интерпретация на получените данни, което прави *Rana sp.* една много добра моделна система за изследване на сигналните пътища на КАРТ пептида и обестатина и изясняване на характеристиките на техните рецептори, които са все още неизвестни. Методите *in vivo* (с разрушаване на ЦНС, екстирпация на хипофизата и функционално елиминиране на интерреналните жлези, където се налага) и *in vitro* регистрация на сърдечните съкращения на жаба, са подбрани правилно, съответни на поставените задачи и са предпоставка за получаването на носещите богата информация резултати.

Експерименталната работа е достатъчна по обем, брой опити и опитни животни като резултатите са представени много добре, с 29 графики и една таблица и са обработени с напълно подходящи статистически методи. Кратките обобщения за участието на различните междинни ефектори, блокирани от съответни фармакологични агенти в сигналните каскади на КАРТ и обестатин, почти след всяка графика, намирам за много добра идея, която показва системния подход на дисертантката при анализа на поставените научни проблеми. Обсъждането, което е в две глави- поотделно за КАРТ пептида и обестатина, показва много добра способност за анализ, оценка и обобщение, но и творчески подход, видни и в трите авторски схеми за механизма на действие на КАРТ, механизма на действие на обестатина в симпатикови неврони и механизма на действие на обестатина върху сърдечните мускулни клетки.

Въз основа на извършената експериментална работа и получените резултати, докторантката прави 8 извода, които са свързани с резултатите и логично произтичат от тях.

Приносителите на дисертацията, които трябва да бъдат отбелязани и на които трябва да се даде висока оценка са

1) За първи път е установено, *in vivo*, че КАРТ повишава силата на сърдечните съкращения като е определен механизъмът на този ефект, включващ много вероятно последователното отделяне на кортикотропин-освобождаващ хормон от хипоталамуса, секреция на АКТХ от хипофизата и на кортизол от интерреналните жлези като кортизолът стимулира активирането на сърдечните α_1 -адренергични рецептори.

2) Продължително гладуване премахва положителния инотропен ефект на КАРТ, което предполага участието на ендогенния КАРТ във физиологичната адаптация на сърдечно-съдовата система към енергийната обмяна при студенокръвни животни.

3) В детайли е определен и описан сигналният път, по който обестатинът активира сърдечните съкращения- пептидът стимулира както освобождаване на адреналин, така и неговия синтез *de novo* в симпатикови нервни окончания, като тези процеси се дължат на МЕК-зависимо активиране на ERK1/2 тип МАП-киназа, която действа чрез синапсин и тирозин хидроксилаза. Индуцираната от обестатина адренергична медиация води до ефекти, обусловени предимно от β -адренергичните рецептори на сърцевите мускулни клетки, които ефекти са комплексни и включват повлияване на L-тип калциеви канали, KCNQ1-канални и Na^+ - Ca^{2+} обменен механизъм, които от своя страна взаимно модулират проводимостта си.

4) При реализиране на дисертационния труд са разработени три специализирани програмни продукта – TENZSU, TENZOGRAPH и Hearts_M5, прецизирани са и процедурни стъпки при *in vivo* експериментите като интервал и брой на убожданията във венозния синус, начин на въвеждане в анестезия без повлияване на сърдечната дейност и без модификации на записа, и функционално елиминиране на интерренални жлези на жаба чрез лигиране на ренални артерии.

Приносният характер на резултатите намира потвърждение в публикуването им в три статии в списания с импакт фактор 3,014, 0.915 и 0.211, в докладването им на две конференции и във вече наличните цитирания в реномирани списания като *British Journal of Pharmacology* и *Molecular and Cellular Endocrinology*.

Нямам забележки към дисертационния труд, които биха променили цялостното отлично впечатление, по-скоро препоръки и уточняващи въпроси.

1) В литературния обзор на дисертацията са дадени някои подробности, нямащи съществено отношение към темата на дисертацията напр. прекалено подробно са описани гените за КАРТ и обестатин (стр.20 и стр.31), прекалено подробно са дадени и някои ефекти при инжектиране на КАРТ в *area tegmentalis ventralis* стр.26 „При някои от животните в експерименталната група на горепосоченото изследване са наблюдавани гърчове. При тях е установено, че канюлата е попаднала извън *area tegmentalis ventralis* (Jaworski et.al. 2003). Вероятно КАРТ предизвиква гърчове като потиска ГАМК-ергичните неврони или чрез активиране на възбудна невромедиация (Kimmel et.al. 2000).„ ; би било добре и да се обърне повече внимание на ефектите на КАРТ пептида и обестатина върху сърце и сърдечно-съдова система, ако в литературата са описани такива.

2) Би било добре да се отбележи изрично в дисертацията, че при разрушаване на главния и гръбначен мозък, хипофизата се запазва, тъй като, макар ефектът на КАРТ да не се опосредства от нервната сигнализация към сърцето, той се опосредства от хипофизата, която е част от главния мозък.

3) Макар в литературния обзор да е споменато , че КАРТ се експресира и в хипоталамус, а в дискусията да е коментирано, че КАРТ активира оста хипоталамус–хипофиза-интерренални жлези (стр.89), според експерименталните резултати , по-вероятно е КАРТ да активира директно хипофизата (а не хипоталамус-хипофиза), иначе ефектът на КАРТ би изчезнал при отстраняване на главния мозък (съответно хипоталамуса), а този ефект остава.

Как авторката обяснява, че макар ефектът на КАРТ -пептида да е зависим от CRF рецептор тип 2 , съответно от CRF, който се произвежда от хипоталамуса, разрушаването на главния мозък (съответно хипоталамуса) не повлиява ефекта на КАРТ?

4) Защо блокирането на синтеза на кортизол с метирапон (стр.60) има отношение към ефекта на КАРТ, след като се очаква катехоламините (съответно адреналинът) да опосредстват ефекта на КАРТ чрез α 1-адренергичните рецептори, а не кортикостероидите (съответно кортизолът)? Каква е връзката между кортизола и

цитозолния глюкокортикоиден рецептор от една страна и $\alpha 1$ -адренергичните рецептори от друга, отбелязана в схемата на фиг. 38, стр.93?

5) Според Фиг.3, стр. 16 в литературния обзор активацията на $\alpha 1$ -адренергичните рецептори задейства сигналната верига фосфолипаза С- ДАГ(ПКС)+ИТФ чрез Gq белтък, докато активацията на β рецепторите задейства сигналната верига аденилат циклаза-цАМФ-ПКА ($\beta 1$ рецептор) и Gi ($\beta\gamma$)-Src+ ФИЗК, както и ФДЕ4, който ензим намалява цАМФ ($\beta 2$ рецептор). След като се установява, че КАРТ осъществява ефекта си чрез активация на $\alpha 1$ -адренергичните рецептори (фиг.10Б), но не и чрез β рецепторите, защо не е изследвано участието на сигналната каскада фосфолипаза С- ДАГ(ПКС)+ИТФ в ефекта на КАРТ?

6) За да отговаря по-пълно коментара под представените фигури на съответните фигури и за по-голяма яснота, във фигурите 24, 25, 26 е било добре да се представят и да се търси статистически достоверна разлика със съответните контроли напр. във фиг. 24, коментирана „Пропранололът напълно премахваше отрицателния инотропен ефект на обестатина в присъствие на 0,1% ДМСО за всички използвани концентрации на пептида” би било добре да се представи в графиката и ефектът на обестатин в 0,1% ДМСО, както и контролните съкращения в Рингеров разтвор, като контроли. При такова представяне на резултатите в графиката, участието на β -адренергичните рецептори в ефекта на Обестатин +0.1% ДМСО би могло да се илюстрира с липсата на статистически достоверна разлика между контролните изследвания и Обе+0.1% ДМСО+ пропранолол (тоест премахване на отрицателния инотропен ефект Обе+0.1% ДМСО в присъствие на пропранолол) или наличие на статистически значима разлика между ефектите на Обе+0.1% ДМСО и Обе+0.1% ДМСО+ пропранолол.

7) Забелязани са някои типографски грешки като напр.

- „Обестатинът в концентрация 100 pmol/l не показваше статистически значим силата на сърдечните съкращения спрямо контролната амплитуда...”, което най-вероятно е Обестатинът в концентрация 100 pmol/l не показваше статистически значим ефект върху силата на сърдечните съкращения спрямо контролната амплитуда (стр. 67)

- Последващото въвеждане на обестатин в присъствието на ПТ и 0,1% ДМСО не предизвикваше положителен инотропен ефект (фиг. 26), което най-вероятно е Последващото въвеждане на обестатин в присъствието на ПТ и 0,1% ДМСО не предизвикваше отрицателен инотропен ефект (фиг. 26).
- В присъствие на Рингрево разтвор вместо Рингеров разтвор (стр.54 и 55, надпис на фиг.10 и 11)
- Натриево-калциев обменник вместо обменник (стр.104, надпис на схемата)

В заключение, представеното научно изследване е осъществено задълбочено, с подходяща методика и фармакологични агенти, а получените резултати, представени и онагледени много добре, са интересни и оригинални, с висока научна стойност и добре коментирани, дисертантката показва отлично познаване на литературата по проблема, както и отлични експериментални умения, извършвайки сложни операции върху жаба (екстирпация на хипофиза, функционално отстраняване на интерренални жлези, поставяне на няколко лигатури и др.) във връзка с поставените задачи, демонстрира висока ерудиция и научна зрялост, един напълно изграден млад и перспективен учен с възможности за бъдещи самостоятелни научни разработки, поради което най-убедено препоръчвам на уважаемото жури да присъди на Илияна Василева Саздова научната и образователна степен „доктор”.

11.07. 2013

София

Подпис:

/доц. д-р П.Петкова-Кирова/