

РЕЦЕНЗИЯ

на Дисертационен труд на тема: „Роля на медиатори на периваскуларната мастна тъкан върху артериалната контракция”,

представена за присъждане на образователната и научната степен „Доктор”

в научна област 4. Природни науки, математика и информатика,

професионално направление 4.3 Биологически науки,

научна специалност „Физиология на животните и човека”

Автор: Радослава Емилова Грозданова

Научен ръководител: проф. д-р Христо Гагов

Рецензент: проф. д-р Светла Петрова

Катедра Биохимия, Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски”

Актуалност на дисертационната тема. Артериалният тонус и неговата регулация, механизмите на съкращение на васкуларните гладко-мускулни клетки (VSMC) и ролята на различни медиатори в клетъчната им сигнализация при физиологични и предизвикани патологични състояния, интригуват от години учените и медиците. Последните десетилетия са белязани от значителен брой здравословни проблеми свързани с паракринния контрол на васкуларната реактивност, изискващи въвеждането на нови подходи и изследвания на механизмите за възникването им, напр., произтичащите от метаболитния синдром и затлъстяването - диабет, сърдечна недостатъчност, хипертония, коронарна болест и др. Откритието на хормона лептин, про- и антивъзпалителните цитокини, растежни и релаксиращи фактори, синтезирани в клетките на мастната тъкан, недвусмислено доказаха ролята ѝ като ендокринен орган, откривайки напълно ново научно направление в изследванията на адипоцитите като предполагаем регулаторен фактор в патофизиологията на редица заболявания. Освен експресията на адипокини (действат паракринно, аутокринно или ендокринно), клетките на мастната тъкан секретират и голям брой нискомолекулни медиатори (NO, H₂S и H₂O₂), които повлияват метаболизма, възпалителните, про-ангиогенните процеси и съдовия тонус чрез регулация на съдовата пропускливост и антиадхезивност. Нарастващият брой изследвания върху нискомолекулните медиатори, синтезирани от адипоцитите, тяхната биохимична съдба и сигнализация насочват вниманието към функцията на периваскуларната

мастна тъкан (PVAT) като паракринен регулатор на артериалния тонус. В този смисъл, дисертационният труд е изключително актуален и се стреми да определи физиологичното въздействие на определени биохимични медиатори, продуцирани от периваскуларната тъкан върху силата на гладко-мускулното съкращение.

Структура и характеристика на дисертационния труд. Дисертационният труд на Радослава Грозданова е написан на 96 страници и е структуриран в следните раздели: Литературен обзор (33 стр.); Материали и методи (8 стр.), Резултати (33 стр.); Дискусия (10 стр.), обобщаваща най-важните акценти от резултатите; и литературна справка от 290 източника (повече от 80%, от които след 2000г.). Целите и задачите са формулирани на 1 стр., изводите, приносите, както и допълнителна информация за проектите, подкрепящи работата са представени на 4 стр. Дисертационният труд е илюстриран с 53 фигури и 1 таблица.

Поставената основна цел на дисертационния труд (*комплексна оценка на регулаторната роля на периваскуларната мастна тъкан върху силата на съкращение на скелетно-мускулни артерии при три различни състояния - нормално, хипергликемично и диабет (модел за хронично хипергликемично състояние)*) налага изпълнението на 5 конкретни задачи, които да определят ендотел-незвисимото паракринно влияние на различни медиатори (сероводород, водороден пероксид и екзогенно добавен инсулин) върху съдовата реактивност. Литературният обзор показва не само познанията на докторантката за васкуларната анатомична структура, ролята на адвентицията и физиологията на гладко-мускулното съкращение, но и отлично разбиране на биохимичните реакции, определящи метаболизма на определени съединения (медиатори) в адипоцитите и миоцитите, и механизмите, чрез които предизвикват определен физиологичен отговор. Радослава Грозданова поставя акцент на все още не добре проучената регулаторна роля на PVAT при физиологични и патологични състояния, които я е диференцират от бялата мастна тъкан. Достатъчно подробно са разгледани: биохимичните пътища за синтез и раграждане на различни новооткрити медиатори в периваскуларната мастна тъкан и ензимите, които катализират отделните реакции; специално внимание е отделено на биологичните свойства и известните механизми на повлияване на H_2S , H_2O_2 , както и потенциалната връзка между паракринното им въздействие и клетъчната сигнализация на миоцитите, което резултира в съкращение или релаксация; ролята на ROS (реактивни кислородни видове) при оксидативен стрес и връзката им с инсулиновата сигнална каскада, йонния транспорт и метаболизма на адипоцитите; ролята на инсулина като регулатор на обема на малките кръвоносни съдове в скелетните мускули и нарастващата необходимост от изследвания на инсулиновото въздействие върху PVAT.

Отделните раздели в обзора са написани компетентно, стегнато и демонстрират добро познаване на научните изследвания в тази сложна интердисциплинарна област до момента и способността на Радослава Грозданова да анализира и обобщава тази информация, да представи своето разбиране за научния проблем достатъчно информативно и убедително, да дефинира работната хипотеза, цел на работата и произтичащите от нея задачи.

В обособения раздел „*Материали и методи*”, докторантката е представила подробно описание на основния използван метод - изометрична жичкова миография - за регистриране на съкращения на препарати от кръвоносни съдове с диаметър на лумена от 60 μm до 3 мм.

Този раздел и експерименталните протоколи са описани точно, разбираемо и отразяват всички фактори, които биха могли да повлияят на измерването и от които зависи достоверността на експериментите. Използваният метод изисква много добра подготовка и прецизност при получаване на артериалните пръстени от *a.gracilis*, което показва висока степен на професионална квалификация придобита от Радослава Грозданова в хода на докторантурата, особено като се има предвид големия брой изследвани експериментални варианти: три състояния - физиологично (контроли), хипергликемия и индуциран диабет; присъствие и отсъствие на PVAT за всяко състояние; и влияние на различни медиатори във всяко едно от тях. С цел да се определят чистите ефекти на периваскуларната мастна тъкан и се избегне евентуалното повлияване от различните активни слоеве на артериалната стена, в експерименталния протокол от препаратите е отстраняван ендотела, което също е професионално предизвикателство.

Основните *Резултати* са представени в 4 раздела, които проследяват ролята на PVAT като паракринен регулатор и показват убедително, че и при трите изследвани състояния мастната тъкан оказва съществено влияние върху контракцията на артериални препарати от скелетно-мускулни резистентни артерии на плъх. Тъй като влиянието на периваскуларната мастна тъкан върху *a.gracilis* все още не е проучено, тези резултати са особено важни и са принос в установяването и правилното анализиране на ролята на PVAT, чието присъствие предизвиква: вазодилатиращ ефект в концентрационен интервал на серотонина (контрахиращ агент) - 10^{-8} - 10^{-6} М при физиологични и хипергликемични условия; и вазоконстрикторен ефект върху *a.gracilis* при високите стойности на серотонин (10^{-6} - 10^{-5} М) и STZ-индуциран диабет. Предположението, че ендогенно продуцираният (от клетките на PVAT) H_2S има вазодилатиращ ефект определя серия от експерименти за доказването му чрез прилагане на индиректен биохимичен подход - повлияване активността на основния ензим, катализиращ получаването на сероводород в адипоцитите - цистатионин γ -лиаза (CSE, EC. 4.4.1.1). Специфичният инхибитор на CSE - DL-пропаргил глицин е използван в експериментите за определяне на функционалното въздействие

на ензима в трите изследвани състояния. Резултатите от тези експерименти доказват, че инхибирането на ензимната активност елиминира вазодилатиращия ефект на H_2S (синтезиран от PVAT) върху предварително контрахирани де-ендотелизирани пръстени от *a. gracilis* от плъх и при трите състояния. Биохимичният подход позволява да се отдиференцира ензимната активност на CSE в PVAT от тази в гладко-мускулни клетки (препарати с отстранена PVAT) при всички състояния. Докторантката открива важни разлики в активността на CSE в PVAT при STZ-индуцираното диабетно състояние и липса на инхибиране от пропаргил глицин, които не водят до повлияване на артериалния тонус дори при високи концентрации на серотонин (10^{-6} - 10^{-5} M). Допуска се наличие и на друг PVAT медиатор с вазодилатиращо действие. В тази част бих препоръчала изследването да се насочи и към търсене на други изоформи на ензима, особено при диабетно състояние, които не се инхибират от пропаргил глицин или изискват по-висока инхибиторна концентрация. Не е без значение повишена концентрация на ROS при това състояние и влиянието им върху експресията на CSE, както и способността на H_2S да реагира с други свободни радикали, което води до промени в редокс метаболизма.

За доказване на ролята на H_2O_2 като нискомолекулен медиатор с релаксиращо действие, продуциран от мастната тъкан, в моделната система е добавяна каталаза в определени концентрации, която катализирайки разграждането на пероксид блокира биологичното му въздействие. Каталазата елиминира релаксиращото въздействие на пероксида, синтезиран в PVAT при хипергликемични условия и измерените стойности на контракция са аналогични на проби без PVAT. Резултатите от STZ-индуцираното диабетно състояние са противоположни и доказват въвличане на различни биохимични механизми (релаксация в присъствие на каталаза при 10^{-6} M серотонин), съответни на промяната в скоростта на окислителните процеси (завишената концентрация на пероксид и ROS при диабетни състояния) и нарушаване на съдовата стена. Получените от докторантката резултати би трябвало да се коментират внимателно, имайки предвид използваната концентрация на каталаза; наличието на пероксидази в адипоцитите и миоцитите; активността на NADPH оксидазата в адипоцитите; съществуващите взаимодействия между големия брой различни ROS и RNS (реактивни азотни видове) и генерирането на пероксинитрит ($ONOO^-$) в клетките; взаимодействието на каталаза с пероксинитрит; пермеабилността на екзогенно поставения водороден пероксид през клетъчните мембрани в моделната система; и др. Първоначалните резултати поставят редица въпроси, чието изясняване е обект на бъдещите изследвания на Радослава Грозданова.

Чувствителността на миоцитите към инсулина при физиологично и хипергликемично състояние доказва модулиращата роля на PVAT - релаксиращото действие на инсулина в отсъствие на PVAT се променя до вазоконстрикция в присъствие на PVAT (при концентрации

на серотонин 10^{-7} - 10^{-6} M). Много интересен резултат е диференциацията в действието на инсулина при STZ-диабетни плъхове в присъствие на PVAT - релаксация само при ниски концентрации на серотонин и вазоконстрикция при високи. Установената по-висока степен на контракция в отсъствие на PVAT в целия концентрационен интервал на серотонина, което докторантката обяснява с нарушения в глюкозния транспорт (ниска експресия на GLUT4 транспортера), в същност доказва модулиращата роля на PVAT при диабетно състояние. Въздействието на инсулина винаги е много комплексно, зависи от много фактори и отключва сложна каскада от сигнални пътища в клетките, така че получените резултати също не биха могли да се коментират еднозначно, но те за първи път насочват вниманието към ендотел-независим регулаторен механизъм.

В *Дискусията*, Радослава Грозданова анализира, интерпретира и обобщава получените резултати, представени много кратко, сухо и еднотипно в раздела „*Резултати*“. Изводите отговарят напълно на направените изследвания, акцентите се поставят последователно, съобразно с поставените задачи и позволяват да се открият приносите на дисертационния труд концентрирани върху ендотел-независима роля на периваскуларната мастна тъкан. Приносите, свързани с установяване на биохимичните механизми за вазодилатация ефект на PVAT медиаторите - H_2S и H_2O_2 и на ендотел-независимата инсулинова регулация са много ценни, а изследването в това направление е перспективно и от изключителна важност.

Публикации, свързани с дисертационния труд. В дисертационния труд са включени резултати от 2 научни публикации в списания с IF (BBE_q и VJAS) и 1 статия в нереферирано списание. Част от резултатите са представени на 4 национални научни форуми с международно участие. Изследванията в дисертационния труд са предмет на 4 проекта, подкрепени финансово от Фонд научни изследвания към МОН и СУ“Св. Кл. Охридски“.

Авторефератът отговаря напълно на изискванията, вярно отразява съдържанието на дисертационния труд и в съкратен вид представя получените резултати и изведените приноси на дисертационния труд.

Препоръки. Представената тематика и избраните модели на физиологични състояния отразяват в най-голяма степен функцията на PVAT и актуалните тенденции и изследователски търсения в тази област. Това, което ме заинтригува като биохимик са изследванията свързани с: установяване на метаболитната роля на синтезираните в адипоцитите нискомолекулни медиатори - H_2S и H_2O_2 ; сигналните пътища, които отключват при взаимодействия с други биомолекули в клетките от различните слоеве на съдовите стени, водещи до промяна на тяхната структура и реактивност. В тази връзка имам следните въпроси към Радослава Грозданова:

1. В експериментите за определяне на влиянието на водородния пероксид върху артериалната контракция (в де-ендотелизирани препарати без PVAT), Вие установявате различни ефекти на екзогенно добавен H_2O_2 - при физиологично състояние и H_2O_2 концентрация от $1\div 33 \mu M$ се наблюдава вазоконстрикция, а при концентрация на H_2O_2 от $100\div 330 \mu M$ - вазорелаксация, докато при същите експериментални условия и препарати на *a.gracilis* от STZ-диабетни плъхове, ефектът на високи концентрации H_2O_2 е вазоконстрикция. Можете ли да съпоставите тези резултати с получените при използването на каталаза за доказване на ендогенно синтезираня в PVAT, H_2O_2 ?

2. Използвали ли сте други концентрации на каталаза (освен посочената от 1000 U/ml) в изследванията с водородния пероксид като медиатор при трите експериментални състояния и направен ли е предварително *in vitro* тест за влияние на концентрацията на ензима каталаза върху скоростта на реакцията на разграждане на H_2O_2 , тъй като ендогенната му концентрация е различна при физиологични и патологични състояния?

В дисертационния труд се са допуснати и някои пропуски, които биха могли да се избегнат, като: печатни грешки и такива във форматирането; съдържанието на дисертационния труд е представено непълно, особено в частта „*Резултати*“ и би трябвало да отразява точно всяко тематично разделение; липса на означения под някои фигури (стр. 73, фиг. 41); липсата на задължителното дефиниране на класификационния номер на разглежданите ензими по приетата ензимна номенклатура (поставен след името на ензима); неясноти в израза и др., които не оказват влияние на общото отлично впечатление от извършената експериментална работа и представянето ѝ.

Заклучение. Смятам, че дисертационният труд на Радослава Грозданова е перспективно и значително научно изследване, със стойностни приноси, които потвърждават регулаторната и ендотел-независима роля на периваскуларната тъкан при физиологични и патологични състояния и чрез което докторантката хвърля светлина върху медиаторната роля на сероводород, водородния пероксид и хормона инсулин.

Той представя Радослава Грозданова като отлично подготвен в теоретично и практическо отношение млад учен в областта на физиологията и смятам, че получените резултати определят няколко насоки за продължаване и задълбочаване на изследванията с интер-дисциплинарните подходи и методи. Дисертационният труд на Радослава Грозданова и научните публикации по темата отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав, Правилника за неговото приложение и препоръките на Биологическия факултет при СУ.

Приложеният подход в използваната моделна система (предизвикана васкуларна реактивност на препарати от *a.gracilis* при физиологични и патологични състояния, в

присъствие и отсъствие на PVAT) за функционално повлияване от различни паракринни медиатори, продуцирани от PVAT; получените резултати, анализирани на основата на метаболизма и клетъчната сигнализация на адипоцитите и миоцитите; и приносите на представения дисертационен труд, отразени в публикуваните статии, ми дават основание да заявя пред членовете на Научното жури моето положително мнение и убедено да препоръчам присъждането на образователната и научната степен „Доктор” по направление 4.3. „Биологически науки” (Физиология на животните и човека) на Радослава Грозданова.

4 Септември, 2014г.

Автор:

проф. д-р Светла Петрова