

РЕЦЕНЗИЯ

ОТ ДОЦ. Д-Р ГАЛЯ ЦВЕТАНОВА СТАВРЕВА-МАРИНОВА, ДМ
катедра „Експериментална и клинична фармакология“, МУ - Плевен

на дисертационния труд
НА БОРИС ГЕОРГИЕВ КАДИНОВ
„РОЛЯ НА ВЪГЛЕРОДНИЯ ОКСИД В РЕГУЛИРАНЕ НА
СЪКРАТИТЕЛНАТА АКТИВНОСТ НА ВИСЦЕРАЛНИ МУСКУЛИ“

с научен ръководител чл.-кор. проф. д-р Радомир Радомиров, дмн

На основание Заповед № 143/13.03.2013 г. на Директора на Институт по Невробиология представям **рецензия относно:**

Дисертационния труд на **Борис Георгиев Кадинов**, гл. асистент в направление „Синаптична сигнализация и комуникации“, Институт по невробиология, БАН на тема: **„Роля на въглеродния оксид в регулиране на съкратителната активност на висцерални мускули“** за придобиване на образователна и научна степен **„Доктор“** в професионално направление 4.3 “Биологически науки“ научна специалност “Физиология на животните и човека”.

Процедурата е съобразена с чл. 4 ал. 2 от ЗРАС в Република България и Правилника на Институт по невробиология на БАН за приложението му. Дисертационният труд е насочен за защита на основание на решение на разширен колегиум на Института по невробиология, БАН от 13.03.2014.

Образование и професионално развитие. Гл. ас. Борис Кадинов е роден през 1973 г. в София. През 1991 г. завършва средното си образование в у-ще „Васил Левски“, София, а висшето – през 1998 г. в Биологически факултет, СУ, София. Започва работа в Институт по физиология на БАН през 1998 г като специалист, а от 2000 г. – като научен сътрудник в същия. От 2009 г. е избран за главен асистент в Институт по невробиология, БАН. Владее английски, френски и руски език. Води практически упражнения по физиология на студенти-медици в катедрата по физиология към Медицински университет – София (учебна натовареност 300 часа) и цикъл семинарни упражнения по «Физиология на

човека и физиология на физическите упражнения», «Анатомия и физиология» и «Функционална морфология на детето» на студенти във Факултет по начална и предучилищна педагогика на СУ «Св. Климент Охридски» (всеки по 15 учебни часа).

Общият брой на **научни трудове** на ас. Кадинов е 6, от които 3 в научни списания в чужбина. Има 8 участия в научни форуми в страната и чужбина.

Дисертационният труд е посветен на *in vitro* проучвания върху ефекта на въглеродния оксид върху моторната активност на изолирани гладкомускулни препарати от храносмилателна и съдова система.

Проблемът е актуален: натрупва се все повече информация за физиологичната и патогенетична роля на ендогенно произведените газови молекули, включително и за CO, която ще осветли доколко CO, подобно на NO може да бъде определен като газообразен невротрансмитер.

Екзогенният CO е отровен газ и нарушава абсорбционния капацитет на Hb за O₂. Но еукариотните организми използват ендогенен CO, произведен по време на разграждане хема от високо специализирани хем оксигеназни ензими като невротрансмитер и като физиологична сигнална молекула. През последните години са натрупани много данни за ролята на системата хем оксигеназа/CO. Наскоро е доказано, че ендогенният CO действа като цитозащитна и хомеостатична молекула с важна роля за сигнализиране във физиологични и патологични състояния. Ендогенно произведеният при катаболизма на хема CO има доказани биологични функции в поддържането на клетъчната хомеостаза и цитопротекция, модулира съкратителната активност на съдовата и несъдова висцерална гладка мускулатура, инхибира апоптозта на съдовата гладка мускулатура и може би CO има критична роля в протекцията на артериалните лезии, в клетъчния отговор при стрес, при различни модели на увреждане, включително исхемия/реперфузия, трансплантация, хеморагичен шок, и ендотоксемията. Неслучайно през 2005 г. Choi и Dolinay озаглавяват тяхна статия „Терапевтичният“ CO може би скоро ще бъде реалност ("Therapeutic" carbon monoxide may be a reality soon. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1318-

1319). Вече са налични предклинични доказателства, в различни животински модели (Foresti et al., 2008; Motterlini et al., 2010), че СО, доставен като газ или като парентерално- и орално активни форми, показва терапевтичен потенциал при възпаление, сепсис, увреждане на белия дроб, сърдечно-съдови заболявания, трансплантация и рак.

Обем и структура. Структурата на дисертационния труд и на автореферата са съобразени с възприетите у нас стандарти. Дисертацията е написан на 100 стандартни машинописни страници. Съдържа: Увод – 1 стр., Литературен обзор – 28 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 9 стр., Резултати и обсъждане – 37 стр., Заключение – 5 стр., Изводи и приноси – 2 стр. и Библиография, включваща 228 заглавия, от които 1 е на кирилица и 227 – на латиница. Дисертационният труд е онагледен с 9 схеми, 22 фигури и 1 таблица.

Литературният обзор е обособен в 4 основни раздела: Въглероден оксид – характеристика, външни и ендогенни източници и токсичност; Влияние на оксидативния стрес върху гладката мускулатура; Общи сведения за организацията на стомашно-чревната и съдовата мускулатура и Регулация на съкратителната активност на стомашно-чревната и съдовата гладка мускулатура. Той отразява съвременните схващания за поддържане на редоксбаланса в организма, за оксидативния стрес и влиянието му върху висцералната гладка мускулатура, за ефекта на ензима хем оксигеназа и продукцията на СО при оксидативен стрес. Подробно е разгледана структурата на стомашно-чревната мускулатура, инервацията ѝ и съкратителната ѝ активност. Фокусирано е върху ролята на СО като модулатор на съкратителната активност на гладките мускули. Обзорът завършва със заключението, че участието и влиянието на въглеродния оксид върху модулирането на НАНХ-невротрансмисия, както и взаимодействието му с други невротрансмитери все още не са достатъчно добре проучени. От използваните 288 научни източници, 91 са от последните 10 години. Правят впечатление и най-ранните публикации от 1920 г., 1949 г., 1952 г. Обзорът е написан с вещина и представя проблема на високо ниво. Онагледен е с 7 схеми, на които коректно са посочени използваните източници.

Целта на дисертационния труд – „Изследване ефекта на въглероден оксид (CO) върху моторната активност на изолирани висцерални мускулни препарати” е логично изведена от данните на литературния обзор. За постигането ѝ са поставени 5 основни задачи, които са ясно и точно формулирани.

Представени са използваните **методични подходи** за реализиране на поставените цел и задачи: индуциране на оксидативен стрес *in vivo* и *in vitro*; регистриране на спонтанната и електрически-индуцирана съкратителна активност на гладкомускулни препарати от фундус на стомах на морско свинче, коронарна артерия и a. basilaris на морско свинче и a. ophthalmica на плъх и морфологични изследвания. Акцентирам върху прецизно групирани препарати от артериалните съдове: 1) нативни (с интактни ендотел и неврони); 2) с отстранен ендотел; 3) с нативен ендотел и тетродотоксин-третиран и 4) деендотелизирани и тетродотоксин-третиран препарати. Изборът на използваните фармакологично активни вещества е много сполучлив, както и използваните експериментални протоколи. Проведени са имунохистохимичен метод за доказване на Неме oxugenase и хистохимичен метод за – NADPH-диафораза.

Статистическата обработка на данните, построяването на графиките и цялостното оформяне на фигурите е извършена с помощта на оптимално подбрани статистически методи и софтуерни програми.

Резултатите от проучването са представени ясно. Те са много добре онагледени с високо информативни предимно цветни фигури (2 микроснимки и 20 графики). Резултатите от проучването са представени точно в 3 раздела, като всеки от тях завършва със стегнато и конкретно обсъждане.

В първия раздел: Участие на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при гладкомускулни препарати от фундус на стомах са представени морфологични резултати и влиянието на ендогенния въглероден оксид върху съкратителната активност на циркуларни гладкомускулни препарати от фундус на морско свинче. Дадени са имунохистохимично и

хистохимично доказателства за наличието съответно на хем оксигеназа и NADPHd във фундуса от стомах на морско свинче.

Приветствам представянето първо на морфологичните резултати и след това изследване и представяне на съкратителната активност на гладкомускулните препарати в различни условия на експериментите. Изречението „Наблюденията за експресия на NO-2 в невронните елементи инервиращи гладката мускулна тъкан на стомаха дават доказателство за функционална индукция на NO-1 в нервните терминали и поставят начало на дебата за роля на CO в регулиране на съкратителната активност на висцералните гладки мускули” обобщава морфологичната находка и основанието за провеждане на *in vitro* изследвания върху моторната активност на изолирани гладкомускулни препарати.

Особено ценни са резултати от имунохистохимичните изследвания, показващи за първи път присъствие на NO-2 в гладкомускулни клетки и невронални клетъчни тела във фундус на стомах при експериментален модел от морско свинче.

При изследване на влиянието на ендогенния CO върху съкратителната активност на циркуларни гладкомускулни *препарати от фундус на морско свинче* е оценен ефектът на haemin (субстрат на хемоксигеназата и донор на CO) върху спонтанния тонус в присъствието на ТТХ, прибавен за блокиране освобождаването на невротрансмитерите от интрамуралните неврони; на haemin и SnPPIX (калаен протопорфирин – конкурентен антагонист на индуцируемата NO-1) върху PGF₂ α предизвикания тонус и електрически евокирани моторни отговори. Неврогенно-зависимите отговори на фундуса на стомаха на морско свинче са отчитани в присъствие на атропин, който блокира ацетилхолин-зависима съкратителна компонента. За неутализиране на свободни радикали в някои от експериментите е прилаган след Vitamin E. Взаимодействие между CO и NO в електрически-индуцираните моторни отговори на препарати от фундус от стомах на морско свинче са изследвани като haemin е прилаган на фона на атропин и L-NNA (блокатор на NOS). Препаратите са изолирани от контролни животни и такива с индуциран с CoCl₂ оксидативен стрес. Резултатите показват,

че ендогенният СО има незначителен ефект, проявяващ се като намаление на амплитудата на електрически-индуцираната релаксация на гладката мускулатура, изолирана от третираните животни.

Във втори раздел е проучено участието на ендогенния въглероден оксид в реализиране на съкратителния отговор при съдови гладкомускулни препарати. Ниски концентрации на hemin предизвикват невронално-зависима контракция, докато по-високи концентрации причиняват невронална и ендотелно-независима релаксация на съдови препарати от *коронарна артерия на морско свинче*. Съкратителното, концентрация-зависимо действие на hemin върху преконтрахиранни сегмент-препарати ефективно се премахва при претретиране с калаен протопорфирин. Върху съдови препарати от *a. basilaris* на морско свинче hemin, приложен на фона на vit. Е предизвиква съкратителен отговор както при интактни препарати, така и при тези с отстранен ендотел и предизвиква понижаване на тонуса при приложение на по-високи концентрации. Hemin предизвиква релаксаторен отговор на съдови препарати от *a. ophthalmica* на плъх. Прилагането на екзогенен СО предизвиква намаляване на съдовия тонус в сравнение с тонусът при контролните, нетретиран с екзогенен СО съдови сегменти. Конститутивната NO-2 се експресира в съдовата стена на *a. ophthalmica*, индикация за което е намаляването на съдовия тонус при въздействие с hemin. Трябва да се отбележи изключително прецизната работа при изолиране и изследване на артериалните съдове, особено на *a. ophthalmica*, която гл. ас. Борис Кадинов владее на изключително високо ниво.

В трети раздел са проучени промените в съкратителната активност на сегменти от кръвоносни съдове под влияние на свободни кислородни форми. Оксидативният стрес, причинен от H₂O₂ въведен в работния разтвор предизвиква покачване на тонуса в сравнение с този при контролните съдови сегменти. Екзогенният СО предизвиква понижаване на съдовия тонус на препарати, инкубирани с H₂O₂ с до 10% в сравнение с тонуса при контролните съдови сегменти, аерирани единствено с нормална газова смес. Резултатите потвърждават участието на системата хем оксигеназа/СО в регулацията на съдовия тонус.

Графиките, онагледяващи резултатите са много информативни, с прецизни механографски записи, с много добро качество и подпомагат значително възприемането на изложението.

Заклучението съдържа много умел анализ на получените резултати на фона на съвременните данни за ролята на СО в редица физиологични и патологични процеси.

Изводите отразяват най-същественото от получените резултати и показват, че ас. Кадинов е овладял методите на анализ, синтез и обобщение, изключително необходими при научните изследвания.

Основните приноси на дисертацията са:

- За пръв път е изследвана връзката и е установено взаимодействието между ензимните системи NOS/NO и HO/CO във фундус от стомах на морско свинче.
- Оригинални данни са получени при изследване въздействието *in vitro* на свободни кислородни форми при малки кръвоносни съдове. Показано е нарушаване на баланса във функциите на ензимните системи NOS/NO и HO/CO.
- За първи път е разработена и въведена методика за изолиране на *a. ophthalmica* и изследването ѝ *in vitro*.

Приемам за значими всички приноси с оригинален характер, посочени от дисертанта.

Дисертационният труд е написан ясно и стегнато, на добър литературен български език. Всички препоръки, направени на предварителното обсъждане (предзащита) са изпълнени.

Докторантът е отразил проучванията си в 4 реални публикации - 2 в български и 2 в чужденстранни списания. Статиите са цитирани 22 пъти, IF е 0.152.

Заклучение

Дисертационният труд на ас. Борис Г. Кадинов „Роля на въглеродния оксид в регулиране на съкратителната активност на висцерални мускули“ е прецизно проведено експериментално проучване върху актуален проблем с адекватни методи. Целта и задачите са точно поставени. Получените резултати

са убедителни и имат приносен характер. Онагледяването е много добро. Резултатите от проучването са публикувани в достатъчен брой публикации.

Дисертационният труд покрива показателите за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ съгласно ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение на Институт по невробиология на БАН.

Като имам предвид гореизложеното, давам положителна оценка на дисертационния труд на гл. ас. Борис Георгиев Кадинов за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17 и му желая пълен успех.

Плевен, 25.05.2014 г.

Доц. д-р Галя Ставрева, дм:

