



СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Иван Пенчев Георгиев, дн

катедра „Фармакология, физиология на животните и физиологична химия”,
секция „Физиология на животните”, ВМФ, Тракийски Университет, Стара
Загора

Относно: Дисертация представена от д-р Лилия Жечева Пашова-Стоянова на тема: „Модулация на ренин-ангиотензиновата система при експериментално предизвикани метаболитни промени” за придобиване на ОНС „Доктор”, Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление 7.1. Медицина; Научна специалност „Фармакология“ (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“.

Научен ръководител: Проф. д-р Анна Найденова Толева, дм и научен консултант: Доц. д-р Стефчо Радев Василев, дм

1. Актуалност на дисертационната тема

При замисъла и разработването на всяка научна работа, в т.ч. и дисертационен труд, е необходимо да има актуален и неразрешен проблем. Проблемът в настоящата дисертация е очевиден – все по-широкото разпространение на затлъстяването и метаболитния синдром (МС) в световен мащаб и свързаните с тях т.нар. социално значими заболявания - захарен диабет тип 2, сърдечно-съдови заболявания, неоплстични образувания и др. В този смисъл актуалността на проведените изследвания се основава на установената в последните години зависимост между нарушенията в системата ренин-ангиотензин-алдостерон (РААС) и компонентите на МС – дислипидемия, инсулинова резистентност, повишено артериално налягане и др. Авторът ясно е формулирал този проблем още във въведението като е акцентирал на необходимостта от по задъбочени проучвания върху различни експериментални модели с оглед изясняване на някои механизми на нарушенията и адекватни мерки с цел преодоляване на неблагоприятните последици от затлъстяването и МС и модулиране на РААС (промения в хранителния режим, прием на хранителни добавки и лекарствени препарати и др). Именно това е и основната цел на проведените изследвания в дисертационния труд като в случая е изследвана протективната роля на един сравнително слабо проучен в това отношение агент, а именно витамин Д.

2. Структурата на дисертационния труд

Дисертацията е написана на 176 страници и е много добре структурирана. Съдържа всички необходими раздели за такъв научен труд с адекватно съотношение между тях.

3. Литературен обзор, цел и задачи

В литературния обзор е направен задълбочен и критичен анализ на наличната информация по проблематиката на дисертационния труд. Цитирани са голям брой източници като болшинството от тях са от последните 10 години. Това е важен индикатор за актуалността на проблема, а от друга страна показва, че дисертантът е запознат със съвременните експериментални данни върху затлъстяването респ. МС като главен предразполагащ фактор за редица метаболитни отклонения и заболявания, както и с методите на изследването им с цел предотвратяване на неблагоприятните последици от нарушенията в липидния и въглехидратния метаболизъм.

Разгледани са подробно физиологичните ефекти на ангиотензин II и неговите рецептори (AT1 и AT2) като главни компоненти на ренин-ангиотензиновата система (РАС) и основни модулатори на гладкомускулните съкращения на вътрешните органи. Описани в детайли са критериите и компонентите на МС като комбинация от атерогенен липиден профил, инсулинова резистентност и повишено артериално налягане като резултат главно от т. нар. интра-абдоминално или висцерално затлъстяване. В тази връзка акцентът е поставен върху ролята и значението на дисфункцията на РАС в комплекса от фактори водещи до развитие на редица метаболитни нарушения и заболявания (инсулинова резистентност, захарен диабет 2, ендотелна дисфункция, диабетна нефропатия) както и евентуалната роля на витамин Д за модулиране на тези нарушения. Изтъкната е липсата на достатъчно информация за ролята на ангиотензин II в регулацията на мотолитета на стомашно-чревния тракт в норма и при захарен диабет. Описани са също така и различните видове експериментални модели с животни за индуциране на метаболитен синдром и захарен диабет (генетични, фармакологични, хирургични и диетични) със съответните положителни и негативни страни от тяхното използване. Много добро впечатление прави обобщението в края на литературния обзор, в което се акцентира върху ограничения брой изследвания на ефектите на ангиотензина II за развитието на метаболитните нарушения характеризиращи МС и за регулацията на съкратителната способност на висцералната гладка мускулатура на СЧТ в норма и при захарен диабет както и относно ролята на витамин Д. Всичко това мотивира целта и необходимостта от проведените в дисертационния труд изследвания.

Считам, че целта е правилно дефинирана и е в пълно съответствие с темата на дисертацията. Поставени са конкретни и достатъчно на брой задачи, които бих обособил в 2 групи: в първата група влизат индуцирането на метаболитни нарушения чрез богата на фруктоза диета и инжектиране на стрептозотцин при мъжки и женски плъхове и изследване на липидния профил, глюкозата, хормонални промени в т.ч. инсулин, ренин и ангиотензин II и контрактилитета на стомашно-чревния тракт; към втората група бих причислил проучването на протективното действие на различни дози витамин Д при плъховете с метаболитен синдром върху същите параметри и взаимоотношенията между РАС и витамин Д в условията на диетично-индуцирани метаболитни нарушения. Считам, че изпълнението на тези задачи гарантира постигането на поставената цел.

4. Материали и методи

От раздела „Материали и методи“ се вижда, че е извършена значителна по обем експериментална работа. Много добро впечатление прави факта, че дисертантът е усвоил и приложил голям брой методики, като акцентът е поставен на тези, свързани с основната цел на изследването, а именно индуциране на метаболитен синдром при плъхове чрез промени в диетата и прилагане на стрептозотцин, определяне на редица клинично-химични параметри и хормони в кръвта, както и регистрация и анализ на различни силови и времеви характеристики на гладкомускулните съкращения *in vitro* на препарати от различни сегменти на стомашно-чревния тракт. Считам, че в експериментите са включени достатъчен брой животни (49), което е важно от гледна точка на достоверността на получените резултати. Групите са правилно формирани с оглед на поставените цел и задачи. Специално искам да отбележа факта, че в първия експеримент са включени мъжки и женски плъхове, което дава възможност да се извърши сравнително изследване на ефектите на диетично индуцирания МС при двата пола и както се вижда от резултатите са установени съществени различия както в химичните и хормоналните показатели на кръвта, така и в мотолитета на СЧТ. Ще отбележа факта, че докторантът правилно е ключил и определянето на концентрацията на покочната киселина, която макар и все още не е включена официално в критериите за МС, но все повече се разглежда от редица автори като важен компонент на комплекса от фактори характеризиращи МС. Освен това, много добро впечатление прави, че при изследванията на липидния профил, авторът е изчислил и някои отношения и индекси на базата на отделните параметри (LDL/HDL; Total cholesterol/HDL; TG/HDL; Lipoprotein combined index – LCI; Atherogenic index – AI) тъй като напоследък все повече с налага становището, че те са много по-показателни и надеждни маркери за дислипидемия, респ. сърдечно съдов риск в сравнение с абсолютните им стойности в кръвта.

Извършена е адекватна статистическа обработка на получените експериментални данни с оглед на дизайна на двата експеримента, което е гаранция за достоверността на получените резултати.

5. Резултати и обсъждане

Разделът „Резултати” е много добре структуриран и илюстриран с общо 30 фигури и 20 таблици. Получени са голям брой собствени експериментални данни, с които се гарантира успешното изпълнение на поставените задачи и постигането на целта. В първия експеримент последователно в сравнителен аспект са дадени данните относно ефектите на високофруктозната диета и екзогенното прилагане на стрептозотоцин при мъжки и женски плъхове върху някои морфометрични параметри; липидния профил, вкл. и атерогенните индекси и отношения; глюкозата, креатинина и пикочната киселина; хормони – инсулин, ренин, ангиотензин II; инсулиновата резистентност определена чрез изчисляване на HOMA *ins. res.* показателя на базата на концентрацията на глюкозата и инсулина в кръвта на гладно; витамин Д, както и времевите и силовите характеристики на гладкомускулните съкращения на тъканни препарати от СЧТ. Подобен алгоритъм е използван и във втория експеримент, в който е тестван протективния ефект на 2 дози витамин Д (500UI/kg и 750UI/kg) при мъжки плъхове с индуциран с диета с високо фруктозно съдържание МС върху изброените по-горе параметри както и ефекта на ангиотензин II върху контрактилитета на сегменти от СЧТ на третираните с витамин Д групи.

Имам като забележка към представянето на резултатите, че на таблиците и на някои от графиките достоверността на разликите между групите не е означена, а е отбелязана само в текста. Не е грешка, но за по-голяма нагледност считам, че е по-добре да се даде и на таблиците и графиките.

Дискусията на дисертацията е написана много компетентно и задълбочено. Авторът е интерпретирал умело, с необходимата критичност, собствените си експериментални данни на фона на известното до момента в литературата относно връзката между дисфункцията на РАС, метаболитните нарушения и контрактилитета на СЧТ при експериментално индуцирано затлъстяване респ. МС, както и ролята на витамин Д като един сравнително слабо проучен фактор за преодоляване на тези нарушения. Ще отбележа също така, че много от резултатите са получени за пръв път в това изследване при използваната опитна постановка. Ето защо високо оценявам уменията на дисертанта в стремежа му да дава адекватни обяснения на научните факти, както и да формулира и изказва съответни хипотези. Това несъмнено допринася за по-пълното изясняване механизмите на дисрегулацията на РАС и значението ѝ за нарушенията в липидния и въглехидратния метаболизъм и съкратителната

способност на отделните части на СЧТ при МС. Особено важни са намерените съществени различия в липидния профил, както и в концентрацията на ренина, ангиотензин II и пикочната киселина между мъжките и женските плъхове. Намирам за правилно даденото от автора обяснение, че това е вероятно е свързано с ролята на естрогените, които вероятно оказват известен благоприятен ефект върху липидния метаболизъм и в същото време инхибират активността на РАС. Специално внимание заслужават също така данните, че екзогенното приложение на витамин Д има благоприятен ефект върху предизвиканите от високофруктозната диета метаболитни нарушения (липидния профил и съответните индекси, глюкозната хомеостаза, пикочната киселина), подобрява контрактилната способност на гладката мускулатура, особено добре изразена при стомаха и ректума и инхибира активността на РАС чрез понижаване на концентрацията на ренина. Важен оригинален характер имат получените от дисертанта данни за по-добре изразения ефект на дозата от 500 UI/kg върху посочените параметри, докато по-високата доза от 750 UI/kg дори има противоположен ефект и води до активиране на РАС в резултат от повишаване концентрацията на ренина. Особен интерес представляват също така данните от липидния профил на кръвта при третираните с фруктоза животни (по-добре изразени при мъжките плъхове), който показва някои особености в сравнение с типичния модел на дислипидемия при затлъстяване. Така например, установява се комбинация от ниски стойности на LDL-cholesterol и HDL-cholesterol на фона на значително повишение на триглицеридите и без промяна в концентрацията на общия холестерол. Намирам за правилна изказаната от дисертанта хипотеза, че това вероятно е в следствие на увредена чернодробна функция в следствие на високофруктозната диета. В тази връзка считам, че след евтаназията на животните с цел получаване на тъканни проби от различните сегменти от СЧТ би могло да бъдат взети проби и от черния дроб за хистологичен анализ за доказване на евентуални промени в чернодробния паренхим.

Важен приносен характер имат установените различия в ефекта на високофруктозна диета върху мотолитета на тънките и дебелия черва: при илеума се нарушават главно времевите характеристики на гладкомускулните контракции, докато при рекума се нарушават както времевите, така и силовите (амплитудата) характеристики. Имайки в предвид, че захарният диабет тип 2 е заболяване с ясно изразен хроничен характер докторантът правилно отбелязва, че нарушенията в мотолитета на дебелия черва се проявява на по-ранен етап в сравнение с тънките черва.

Направените 9 извода са коректни и непосредствено произтичат от получените от дисертанта резултати. Оценявам високо направените приноси (5 потвърдителни и 3 оригинални), които представят в синтезиран

вид научната и научно-приложната стойност на постигнатото в дисертационния труд.

Авторефератът точно отразява получените в дисертационния труд резултати, както и направените изводи и приноси.

Много важен критерий за стойността и значимостта на получените в дисертацията резултати са публикуваните 3 статии в специализирани научни издания както и големия брой участия (8) на научни форуми. Като много положителен факт отчитам и участието на докторанта в 3 научни проекти, които са свързани с темата и проблематиката на дисертационния труд.

6. Заключение

Считам, че поставената цел и задачи са успешно изпълнени. По структура, съдържание и обем дисертацията отговаря напълно на нормативно приетите изискванията за придобиване на ОНС „Доктор” вкл. и на Правилника за развитие на академичния състав в Тракийския университет. Направени са редица приноси с важно научно-приложно значение относно неблагоприятните ефекти на високофруктозната диета върху липидния профил, глюкозната хомеостаза, активността на РАС и контрактилитета на СЧТ при плъхове от двата пола, както и протективната роля на екзогенно добавения витамин Д. Ето защо, оценявам високо положително получените резултати в дисертационния труд на тема **„Модуляция на ренин-ангиотензиновата система при експериментално предизвикани метаболитни промени”** и ще гласувам „за” присъждане на ОНС „Доктор” на Лилия Жечева Пашова-Стоянова редовен докторант към катедра „Физиология, патофизиология и фармакология” на Медицински факултет към Тракийски университет, Стара Загора по научна специалност „Фармакология” (вкл. фармакокинетика и химиотерапия), Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление 7.1. Медицина

06.08.2019 г.
Стара Загора

Подпис:
(проф. д-р Иван Пенчев Георгиев дн)



STATEMENT

By Prof. Dr. Ivan Penchev Georgiev, DSc

Department of Pharmacology, Animal Physiology and Physiological Chemistry, Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora

Regarding: Dissertation presented by Dr. Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova on the topic: **"Modulation of the renin-angiotensin system in experimentally induced metabolic changes"** for the acquisition of the Doctor of Medical Sciences, Higher Education Area 7. Health and Sport; Professional area 7.1. Medicine; Pharmacology (including pharmacokinetics and chemotherapy).

Scientific Supervisor: Prof. Dr. Anna Naydenova Tolekova, MD and Scientific Advisor: Assoc. Prof. Dr. Stefcho Radev Vasilev, MD

1. Relevance of the dissertation topic

In the design and development of any scientific work, incl. dissertation work, it is necessary to have a topical and unresolved problem. The problem in this dissertation is obvious - the increasing worldwide prevalence of obesity and metabolic syndrome (MetS) and related so-called socially significant diseases - type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, neoplasms and more. In this sense, the relevance of the conducted research is based on the established in recent years relationship between disorders in the system of renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) and the components of MetS - dyslipidemia, insulin resistance, high blood pressure, etc. The author has clearly formulated this problem in the introduction by emphasizing the need for in-depth studies on different experimental models in order to clarify some mechanisms of disorders and adequate measures to overcome the adverse effects of obesity and MetS and modulate RAAS (changes in diet, intake of dietary supplements and medications, etc.). This is precisely the main purpose of the research in the dissertation, in which case the protective role of a relatively poorly studied agent, namely vitamin D, was investigated.

2. Structure of the thesis

The dissertation is written on 156 pages and is very well structured. It contains all the necessary sections for such scientific work with an adequate ratio between them.

3. Literary review, purpose and objectives

In the literature review a thorough and critical analysis of the available information on the problems of the dissertation is made. A large number of sources have been cited, most of them from the last 10 years. This is an important indicator of the urgency of the problem and, on the other hand, indicates that the dissertation is familiar with current experimental data on obesity and resp. MetS as a major predisposing factor for a number of metabolic abnormalities and diseases, as well as their research methods, to prevent the adverse effects of disorders of lipid and carbohydrate metabolism.

The physiological effects of angiotensin II and its receptors (AT1 and AT2) as major components of the renin-angiotensin system (RAS) and major modulators of smooth muscle contraction of the internal organs are discussed in detail. The criteria and components of MetS, such as a combination of atherogenic lipid profile, insulin resistance, and hypertension resulting mainly from so-called intra-abdominal or visceral obesity, are described in detail. In this regard, the emphasis is placed on the role and importance of RAS dysfunction in the

complex of factors leading to the development of a number of metabolic disorders and diseases (insulin resistance, diabetes mellitus type 2, endothelial dysfunction, diabetic nephropathy) and the possible role of vitamin D for modulation of these violations. The lack of sufficient information on the role of angiotensin II in regulating the motility of the gastrointestinal tract in normal and diabetes mellitus was highlighted. The various types of animal experimental models for inducing metabolic syndrome and diabetes mellitus (genetic, pharmacological, surgical and dietary) with the respective positive and negative aspects of their use are also described. A very good impression is made at the end of the literature review, which focuses on the limited number of studies on the effects of angiotensin II on the development of metabolic disorders characterizing MetS and on the regulation of the visceral smooth muscle of the thyroid gland in both normal and diabetes mellitus and about the role of vitamin D. All of this motivates the purpose and the need for the research done in the dissertation.

I believe that the purpose is properly defined and is in full accordance with the topic of the thesis. Specific and sufficient number of tasks have been set out, which I would group into 2 groups: the first group includes the induction of metabolic disorders through a fructose-rich diet and the injection of streptozotocin in male and female rats and examination of the lipid profile, glucose, hormonal changes incl. insulin, renin and angiotensin II-induced contractility of the gastrointestinal tract; to the second group I would classify the study of the protective effect of different doses of vitamin D in rats with metabolic syndrome on the same parameters and the relationships between RAS and vitamin D under conditions of diet-induced metabolic disorders. I believe that the fulfillment of these tasks guarantees the attainment of the objective pursued.

4. Materials and methods

The Materials and Methods section shows that a considerable amount of experimental work has been carried out. It makes a very good impression that a large number of methodologies are mastered and applied, focusing on those related to the main purpose of the study, namely inducing metabolic syndrome in rats through changes in diet and administration of streptozotocin, determining a number of clinical and chemical parameters and hormones in the blood, as well as the registration and analysis of various strength and temporal characteristics of smooth muscle contractions in vitro of preparations from different segments of the gastrointestinal tract. I believe that a sufficient number of animals (49) were included in the experiments, which is important in terms of the reliability of the results obtained. The groups are properly formed in view of the set goals and objectives. I would particularly like to point out the fact that the first experiment included male and female rats, which made it possible to perform a comparative study of the effects of diet-induced MetS in both sexes and, as it can be seen from the results, significant differences were found in both chemical and hormonal parameters of the blood and the motility of the GIT. I will point out the fact that the PhD student has correctly identified the determination of uric acid concentration, which, although not yet formally included in the MetS criteria, is increasingly considered by many authors as an important component of the complex factors characterizing MetS. Moreover, it makes a very good impression that in the studies of the lipid profile, the author also calculated some relationships and indexes based on individual parameters (LDL / HDL; Total cholesterol / HDL; TG / HDL; Lipoprotein combined index - LCI; Atherogenic index (AI), as it has been increasingly suggested that they are much more indicative and reliable markers of dyslipidemia, respectively cardiovascular risk compared to their absolute values in the blood.

Adequate statistical processing of the obtained experimental data was performed in view of the design of the two experiments, which is a guarantee of the reliability of the obtained results.

5. Results and discussion

The Results section is very well structured and illustrated with a total of 30 figures and 20 tables. A large number of own experimental data have been obtained to guarantee the successful completion of the tasks set and the achievement of the objective. In the first experiment, data on the effects of the high-fructose diet and the administration of streptozotocin in male and female rats on some morphometric parameters were presented sequentially in comparative terms; lipid profile, incl. atherogenic indexes; glucose, creatinine and uric acid; hormones - insulin, renin, angiotensin II; insulin resistance determined by calculating HOMA ins. res., an indicator based on fasting blood glucose and insulin levels; vitamin D, as well as the temporal and power characteristics of smooth muscle contractions of tissue preparations from GIT. A similar algorithm was used in the second experiment, which tested the protective effect of 2 different doses of vitamin D (500UI / kg and 750UI / kg) in male rats with a high-fructose-diet induced MetS on the above parameters as well as the effect of angiotensin II on the contractility of segments of GIT of vitamin D treated groups.

I have a note in the presentation of the results that on the tables and on some of the charts the significance of the differences between the groups is not indicated, but only noted in the text. Not a mistake, but for the sake of clarity, I think it's better to give tables and graphs as well.

The dissertation discussion is written very competently and thoroughly. The author has skillfully interpreted, with the necessary criticality, his own experimental data against the background of what is known in the literature to date regarding the relationship between RAS dysfunction, metabolic disorders, and contractility of GIT in experimentally induced obesity, respectively MetS, as well as the role of vitamin D as a relatively poorly studied factor in overcoming these disorders. I will also note that many of the results were obtained for the first time in this study in the experimental setting used. Therefore, I highly appreciate the ability of the PhD student in her quest to provide adequate explanations of the scientific facts, as well as to formulate and state appropriate hypotheses. This undoubtedly contributes to a more complete elucidation of the mechanisms of RAS dysregulation and its importance for disorders of lipid and carbohydrate metabolism and the contractile capacity of individual parts of GIT in MetS. Particularly important are the significant differences found in the lipid profile as well as in the concentration of renin, angiotensin II and uric acid between male and female rats. I find the explanation given by the author correct that this is probably related to the role of estrogens, which probably exert some beneficial effect on lipid metabolism and at the same time inhibit RAS activity. Particularly noteworthy is the data that exogenous administration of vitamin D has a beneficial effect on metabolic disorders (lipid profile and related indexes, glucose homeostasis, uric acid) induced by the high-fructose diet, improves smooth muscle contractility, improves contractility of smooth muscle, especially well expressed in the stomach and rectum and inhibits RAS activity by reducing renin concentration. Important original character of the thesis is the data obtained from the dissertation about the better expressed effect of the dose of 500 UI / kg on the indicated parameters, while the higher dose of 750 UI / kg even has the opposite effect and leads to the activation of RAS as a result of the increased concentration of renin. Of particular interest are the data on the lipid profile of blood in fructose-treated animals (better expressed in male rats), which shows some peculiarities compared to the typical model of dyslipidemia in obesity. For example, a combination of low LDL-cholesterol and HDL-cholesterol levels was found against a background of significant triglyceride elevation and no change in total cholesterol concentration. I find the hypothesis suggested by the PhD student that this is probably due to impaired liver function as a result of the high-fructose diet. In this regard, I believe that after the euthanasia of the animals in order to obtain tissue samples from the various segments of

the GIT, the liver may also be sampled for histological analysis to demonstrate possible changes in the liver parenchyma.

The differences in the effect of the high-fructose diet on the motility of the small and large intestines have an important contributory character: in the ileum, the temporal characteristics of smooth muscle contractions are disturbed, while both the temporal and power (amplitude) characteristics are disturbed in the rectum. Bearing in mind that type 2 diabetes mellitus is a disease with a clearly chronic nature, the PhD student correctly notes that impaired motility of the large intestine is manifested at an earlier stage than the small intestine.

The 9 conclusions made are correct and are directly derived from the results obtained by the dissertation. I appreciate highly the contributions made (5 confirmatory and 3 original), which present, in a synthesized way, the scientific and applied scientific value of the achievements in the dissertation.

The abstract accurately reflects the results obtained in the dissertation, as well as the conclusions and contributions made.

A very important criterion for the value and importance of the results obtained in the dissertation are the published 3 articles in specialized scientific journals as well as the large number of participation (8) in scientific forums. As a very positive fact, I also consider the participation of the PhD student in 3 scientific projects, which are related to the topic and problems of the dissertation.

6. Conclusion

I believe that the goal and tasks set have been successfully completed. In structure, content and volume, the dissertation fully complies with the normatively accepted requirements for the acquisition of the Doctor of Medical Sciences incl. and the Rules for the Development of Academic Staff at the Trakia University. A number of important scientific and relevant contributions have been made regarding the adverse effects of the high-fructose diet on lipid profile, glucose homeostasis, RAS activity and contractility of rats in both sexes, as well as the protective role of exogenously added vitamin D. Therefore, I appreciate highly the positive results obtained in the dissertation on the topic "**Modulation of the renin-angiotensin system in experimentally induced metabolic changes**" and will vote "for" the adjudication of the Doctor's degree to Lilia Zhecheva Pashova-Stoyanova, regular PhD student at the Department of "Physiology, pathophysiology and pharmacology" of the Faculty of Medicine at Trakia University, Stara Zagora in the scientific specialty "Pharmacology" (incl. pharmacokinetics and chemotherapy), Higher education field 7. Health and sports; Professional area 7.1. Medicine.

06.08.2019
Stara Zagora

Signature:
(Prof. Dr. Ivan Penchev Georgiev, DSc)