

## СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Радой Иванов Иванов

**Относно:** дисертационния труд на *Елица Тодорова Денчева*, редовен докторант към катедрата Зоология и Антропология, Биологически факултет към СУ „Св. Кл.Охридски”, на тема: *„Роля на азотния оксид като регулатор и модулатор на ацетилхолинестеразата и бутирилхолинестеразата в ЦНС при различни животни”*, представен за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” по професионално направление 4. 3. Биологически науки (Зоология – ЗБЖ).

**Административни документи и основна дейност.** Съгласно административните данни (административна папка) всички изисквания за допускане на докторанта към пред защита и официална защита са изпълнени. Докторантът е зачислен като редовен аспирант на 01.01.2014 г. (РО 20-946/ 01.01.2014 г.) и отчислена с право на защита на 01. 07.2017 г. (РД 20-946/01.07.2017г.). През този период Е. Денчева и извършвала следните дейности: участие в изработване на учебен план; търсене и анализ на научната литература по темата на дисертацията; овладяване на методите за изследване по темата, анализ на получените експериментални данни, подготовка и участие в национални и международни научни форуми, преподавателска дейност, написване на раздели на дисертационния труд, подготовка на научни статии за печат, окончателно оформяне на дисертационния труд, подготовка за официална защита.

Докторантът е завършил висшето си образование като бакалавър по биология през 2009 г., а като магистър през 2012 г. в катедрата Физиология на растенията (Биологическия факултет).

**Преподавателската дейност.** Преподавателската дейност на докторанта през този период е пълен цикъл практикум по Физиология и биохимия на насекомите с студенти от магистърската програма по Ентомология към катедрата Зоология и антропология (30 ч.); част от семинарите по Физиологична психология към Философския факултет (18 ч.) на тематика Невромедиаторни системи – физиологични и психологични аспекти; Част от семинарните упражнения (20 ч.) от курса Въведение в неврофизиологията към Биологическия факултет – тематика Холинергична система и синаптични процеси; изготвяне и обсъждане със студентите на няколко презентации с резултатите от изследванията от докторантския проект.

**Положени изпити.** Съгласно докторантския учебен план Е. Денчева е положила следните изпити: Зоология на безгръбначните животни (оценка отл. 5,50); западен език (английски) – добър 4,00; методи на изследването – отл. 6,00; етология, биология и физиология на поведението – отл. 6,00; методологични аспекти на научната дейност и преподаването – отл. 6,00; биостатистика – добър 4,00.

**Допускане към защита.** Ежегодно първичното научно звено (катедра Зоология и антропология) респективно Факултетния съвет към БФ е приемал положително Атестацията за работата на докторанта.

На заседание на разширен катедрен съвет на катедрата Зоология и антропология след проведената апробация и направените обсъждания на Дисертационния труд и Автореферата беше решено допускане към официална защита (28 души – за, 1 – против и 1 – въздържал се. На това заседание бяха дадени ценни

препоръки, бележки и критики, както и указания за още по-доброто представяне на официалната защитата. Колегиалната критика и съпричастие е една от ценностните характеристики на човека и най-вече на интелigentните хора. Затова ние благодарим (ние – защото аз съм научен ръководител на докторанта и нося съответната отговорност) на всички. Направените препоръки и бележки са взети в предвид окончателната редакция на дисертацията и автореферата. Въпреки направените корекции в работата има правописни и стилови грешки, разменени индекси в някои фигури, дублиране на автори, др.

**Структура на дисертационния труд.** Дисертационният труд съдържа 166 стр., онагледен е с 51 фигури, от които в раздел Резултати и обсъждане – 42 фигури и 8 таблици. Цитирани са 154 литературни източника от които 150 на латиница и 4 на кирилица.

Дисертацията съдържа всички компоненти за такъв труд: увод; abstract; съкращения; литературен обзор (29 стр.); цел и задачи на изследването; материали и методи с 6 подраздела (8 стр.); резултати и обсъждане (108 стр.); изводи; приноси; участие в международни и национални научни форуми; списък на отпечатани или приети за печат научни статии; благодарности; библиография (8 стр.).

**Основна цел.** Основна цел на дисертационния труд са комплексни изследвания на влиянието и ролята на NO от два източника – L-Аргинин и Na-Нитропрусид върху активността на ХЕ в различни тъкани и видове животни (безгръбначни и гръбначни). Основно направление в експерименталните проучвания е разкриване на някои механизми от ефективността на тези реагенти. Проучено е влиянието на L-NMMA – широкоспектърен инхибитор на активността на NOS и синтетаза на NO. Специално внимание е отделено на Na-Нитропрусид (Na-НП), съдържащ нитроферицианидни компоненти и при по-високи концентрации е токсичен. В работата се акцентира също върху сравнителния анализ на влиянието на антихолинестеразни агенти и ролята на използваните реагенти като регулатори на активността на ХЕ при някои безгръбначни и гръбначни животни.

**Изследователските задачи.** В по-обобщен вид изследователските задачи се свеждат до следното: *Ензимен скрининг* (сканиране) на холинестеразите в различни тъкани и видове животни и допълнение към методологията за използване на холинестеразите като биомониторингови маркери за състоянието на организмите в нормална и екотоксикологична среда (пестициди, инсектициди, наркотични агенти, ендогенни и екзогенни токсични продукти и др.); влияние на L-Аргинин и NO като регулатор и реактиватор на активността на холинестеразите, като протектор и антидот при интоксикация на холинестеразите от антихолинестеразни и други агенти; изследване на ролята на NO и системата NOS (азот оксид синтетаза) с прилагане на инхибитори на NOS (NG-Methyl-L-Arginine acetate (L-NMMA)); влияние на Na-НП върху активността на холинестеразите във фракции от различни видове животни. Ефекти на L-NMMA; влияние на някои цианидни производни, близки по молекулна организация с Na-НП – К-ферицианид, К-фероцианид и KCN върху активността на холинестеразите; роля на L-Аргинин и NO като реактиватори на активността на холинестеразите, инхибирани от цианид-съдържащи съединения..

**Литературният обзор** съдържа основните тези на докторантския проект (6 основни раздела и 4 под раздела), например: Холинергична система; Холинестерази; Ендогенни и екзогенни донори на NO; Антихолинестерази, видове, механизми на действие; Азотен оксид – биологична роля и механизми на действие; Азотен оксид синтетаза (синтаза); Биологична роля на бутирилхолинестеразата (БХЕ); др.

Почти всички факти в обзора са обезпечени с литературни източници, с изключение на общоизвестните, посочени в съответни учебници. Обзорът е полезен за всички, които се интересуват от холинергичната система при животните и човека, от невротоксикологията, поведението, адаптацията, популационен контрол, резистентност, превенция и т.н.

Още два аспекта – независимо от обекта на изследването, крайният бенефициент е човекът – неговото физиологично и психично здраве, защита от вредни въздействия, нови технологии за терапия, нови фармацевтични препарати и др. и второ – интегрален, комплексен и интердисциплинарен подход. Това означава, че при решаване на даден научен проблем например в областта на зоологията или изкуствения интелект, нужният положителен резултат изисква участие на изследователи с различен профил – молекулярни биолози, таксономи, физиолози, генетици, медицински физици и химици, които владеят най-новите технически постижения в изследването, паразитолози, микробиолози или дизайнери на биологични модели и т.н. Някои от тези аспекти фигурират и в настоящата дисертация. Може би поради това в литературата се срещат статии от 4-5 стр. с 5, 10 или повече съавтора. В литературния списък на дисертацията могат да се намерят подобни примери.

**Материал и методи.** Данните в раздел „Материал и методи” са представени в 6 подраздела на равнище възможност за възпроизвеждане.

**Резултати и обсъждане.** Този раздел е основен и най-важен за дисертацията. (около 70% от ръкописа). Той е богато онагледен (42 фигури и 8 таблици).

Тази част е хронологичен отчет на експерименталната работа, анализ и описание на получените данни съгласно основните експериментални задачи. Състои се от 7 раздела и 21 под раздела.

Акцентите в изследването падат върху влиянието на L-Аргинин, NO, Na-НП, L-NMMA (инхибитор на NOS), К-ферицианид, К- ферицианид и KCN върху активността на холинестеразите и роля на L-Аргинин и NO като реактиватори на активността на холинестеразите, инхибирани от карбаматни пестициди и цианид-съдържащи съединения.

Тук са посочени само основните резултати и приноси. Надявам се докторантът на Публичната защита да представи много по-подробно основните данни и тяхната биологична роля и значимост. Тези резултати са представени синтетично и много по-лесно за четене и анализ в автореферата.

В дисертацията има достатъчно аргументирано данни, които характеризират холинестеразите като биомониторингови критерии за състоянието на организмите в нормална и екотоксична среда.

Установено е, че L-Аргинин (1-50 mM) в различна степен активира активността на холинестеразите (АХЕ и БХЕ) в мозъчни зони на бозайници и на АХЕ във фракции от два вида безгръбначни животни. Такова активиране на ензимната

активност липсва във фракции от *V. germanica* и високо пречистена лиофилизирана АХЕ от електрически орган на някои електрически риби. Предполага се, че в тези продукти има дефицит на NOS и NO. В този смисъл друг перспективен факт е много силното активиране на активността на БХЕ в мозъчна тъкан, достигащо в някои случаи многократно. Това означава, че БХЕ е „защитна стена” пред ЦНС от токсични продукти. Научно съобщение на тази тема беше представено на Международния биомедицински конгрес- София, 2016.

Следващ съществен факт е използването на L-Аргинин като протектор на ХЕ от специфични токсични продукти и реактиватор на инхибираната ХЕ от антихолинестеразни агенти (например карбаматни обратими инхибитори). Тази ефективност на L-Аргинин и/или NO в научно приложен аспект е значим в смисъл за възможност за използване на подобни реагенти като противоотрови (антидоти) не само срещу антихолинестеразни пестициди и инсектициди, но също срещу предозиране с наркотични вещества, някои лекарствени средства, естествени или синтетични холинови естери и др.

Такъв е например невротоксичният препарат „Новичок” (Novichok), за който се предполага, че е използван като нервна отрова. Това е органофосфатно съединение, което необратимо инхибира АХЕ и може да доведе до смърт. По токсична ефективност тази „молекула” е почти осемкратно по силна от невропаралитичния газ VX, синтезиран в Англия през 40-те години на миналия век (подобен на табун, зарин и др., синтезирани по това време в Германия). Нашето изследване би могло в случая да помогне на страдащите чрез бързо и мощно повишаване на активността на АХЕ и БХЕ и нормализиране на синаптичната активност в ЦНС и бързо разграждане на този токсичен препарат.

Ролята на NO е проследена чрез прилагане на широкоспектърен инхибитор, на NOS (L-NMMA), при което частично или напълно се блокира отделяне на азотен оксид. В тези случаи реактивиране на холинестеразите от L-Аргинин е значително ограничено. Това означава още, че механизъм в контрола на активността на холинестеразите е азотния оксид. Тази тема е обсъдена сравнително обстойно в дисертацията, респективно в автореферата.

Na-нитропрусид като молекулна организация е нитроферицианид (динатриум пентацианонитрозил ферат дихидрат), екзогенен източник на NO и ефективно лекарствено средство при някои сърдечно-съдови разстройства и заболявания. Друг интересен момент тук е ролята на този препарат върху ваготоничните ефекти в организма. Това означава например, че хипотоничният ефект на Na-НП се дължи не на NO, а на инхибиране на ХЕ (респективно на АХЕ) от ферицианидните радикали, при което повишеното съдържание на АХ води до закономерен хипотензивен ефект и забавяне на сърдечната дейност. Този препарат (Na-НП) съдържа и двата молекулни компонента – NO и ферицианиди.

Ефектите на Na-НП са двуфазни: сравнително слабо активиране при ниски концентрации на препарата (0,005-0,01 mM) (най-вероятно, дължащо се на NO) и прогресивно концентрационно зависимо инхибиране на ХЕ, паралелно с повишаване на концентрацията примерно до 1,0 mM (най-вероятно, дължащо се на ферицианидните

радикали). Друг факт е, че първият компонент (стимулиране на активността на АХЕ) при фракциите от *V. germanica* и *A. mellifera* не се установява (Табл. 5 в дисертацията).

Важен факт от изследването е, че L-Аргинин, респективно на NO, реактивира значимо потиснатата активност на АХЕ например във фракции от *V. germanica* (фиг. 32 в дисертацията). Това реактивиране е концентрационно зависимо – почти 2 пъти по-ефективно при конц. 50 mM L-Аргинин, спрямо това при конц. 30 mM.

С цел обяснение на някои от механизмите на влияние на ферицианидни съединения върху активността на АХЕ в дисертацията експериментално изследвано някои молекулни аналози на Na-НП – К-ферицианид, К-фероцианид и KCN върху активността на някои АХЕ например във фракции от *V. germanica*. К-ферицианид (0,01-1,0 mM) (фиг. 36 в дисертацията) дозозависимо инхибират ензимната активност (около 50%) в горе посочения обект. Установено е още, че L-Аргинин (50 mM) напълно реактивира (около 1,5 пъти възстановяване) АХЕ.

Експериментално е установено, че друг аналог на Na-НП – К-фероцианид не повлиява активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera*. Разликите между двете съединения, посочени по-горе е само във валентността на желязния атом.

Следващ факт са данните за влиянието на KCN върху активността на холинестеразите.

Отразените данни най-общо в последната част на това становище са допълнителни и са извън работния план, но са интересни и необходими за направените анализи. Това означава още, че решаването на важни въпроси в тази сфера изисква нови проекти. Важното е, че е поставена солидна база. Някои от трудностите в тази дейност идват от общата насоченост на изследванията – липсата на аргументирани данни по повдигнатите проблеми в световната научна литература. От тук следва изводът за оригиналност в подходите и приносите на експериментални данни.

В заключение на Становището ще направя кратък анализ на изводите, приносната значимост, участието в международни и национални научни форуми и др.

Докторантът по време срока на обучение има участие в **5 международни и национални научни мероприятия** – конгрес, международен научен семинар, Климентови дни (в дисертацията и автореферата е приложен подробен списък). На тези форуми са представени и защитени 6 научни съобщения.

Тематично научните съобщения са оформени в **научни статии**, от които 2 са отпечатани, две са приети за печат (в документацията са представени съответните документи). Предадена за рецензия е още една статия в списание с импакт фактор (BJAS). Ако процедурата е успешна ще бъде представена съответната служебна бележка. Библиографска справка за тези статии е налична в дисертацията и в автореферата. Ксерокопия на всички статии – отпечатани или в ръкописна форма са приложени в служебната папка.

**Библиографският списък** е всецяло посветен на дисертационната тема. Около 80 позиции от този списък са от последните 10-15 години.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данните от административните документи, ходът на изпълнение на докторантски проект, участието на докторанта в 5 международни и национални научни форума, 2 отпечатани научни статии и 2 приети за печат, получени 6 сертификата, участието в преподавателската дейност за студенти от Биологическия факултет и Философския факултет (над 60 ч.). напрегнатата и широкоспектърна изследователска дейност по темата на докторантски проект, написване на по-голямата част от дисертацията и автореферата, извеждане на обобщените изводи от изследванията и списък на приносите, личностите трудови характеристики на Е. Т. Денчева – изразен интерес към проблематиката, желание и стремеж към овладяване на нови изследователски методи, търсене на решения в световната информационна система, точност и прецизност в провеждане на изследователските задачи и др., ми дават основание да оценя положително работата на Е. Денчева в изпълнение на докторанския проект и дисертацията като цяло.

Основание за положителна оценка ми дават най-вече качеството и значимостта на експерименталните данни в дисертацията.

Приемам изводите (12 на брой) в дисертацията. Те отразяват основните резултати от изследователската работа, условно представени в няколко основни групи – ефективност на L-Аргинин и/или NO като регулатори, стимулатори, реактиватори на холинестеразите в различни тъкани и видове животни и като противоотрови при натравяне с някои специфични токсични продукти; установяване на специфичната ефективност на NO в тези явления чрез регулиране активността на NOS; влияние на Na-НП и ролята на ферицианидите върху активността на ХЕ; използване на ХЕ като биомониторингови маркери за състоянието на организма и реакцията в токсична и Еко токсична среда. Изводите биха могли да бъдат частично съкратени, редактирани, редуцирани или увеличени. Това в крайна сметка е в правата на докторанта и неговия ръководител.

Списъкът на приносите наброява 8 позиции. В съдържателно отношение приносите могат да се разделят в две групи; експериментални данни, които нямат аналог в световната научна литература и във втората група – данни и подходи, които имат принос към известни закономерности. Към първата група спадат данните за влияние на L-Аргинин, Na-НП, L-NMMA, К-фери- и К-фероцианиди върху активността на ХЕ в различни тъкани и при различни видове животни. Към втората група спадат данните за използване на ХЕ като биомониторингови маркери и апробацията на няколко конкретни критерия. Приемам съдържателната част в списъка на приносите.

Е. Денчева е участник в изследователски проект към ФНИ на Софийския университет „Св. Климент Охридски”, Договор №182/13. 04. 2016 г.

На основание на декларираната положителна оценка на дисертационния труд, препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят образователната и научна степен „доктор” на Елица Тодорова Денчева по професионално направление 4. 3. Биологически науки (Зоология - ЗБЖ).

Подпис:

София  
26. 03. 2018 г.

/Доц. д-р Р. Иванов/