

СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р Радой И. Иванов

Относно: Дисертационния труд на гл. ас. Милена Станимирова Шкодрова, докторант на самостоятелна форма на обучение към катедрата по Физиология на животните и човека, Биологически факултет, Софийския университет „Св. Кл. Охридски” на тема: „**АТФазният комплекс на митохондриите като модел за изследване на биологично активни съединения. Влияние на сребърни наночастици, азотен оксид и [(диметилфосфинилметил) аминок](фенил)-метилфосфонова кисе-лина**”, представена за придобиване на образователна и научна степен „*доктор*” по професионално направление 4.3. Биологически науки (Физиология на животните и човека)

Представеният дисертационен труд е задълбочено мониторингово изследване на влиянието на три важни за теорията и практиката биологично активни вещества – сребърни наночастици, азотен оксид и [(диметилфосфинилметил) аминок](фенил)-метилфосфонова киселина (DMPPA) върху един от най-съществените процеси от клетъчната биоенергетика – регулация на функциите на АТФ-синтазния и хидролазен комплекс в митохондриите при аеробните организми.

Актуалността на проблематиката, на изследователския проект, на получените резултати, техния анализ и изводи се изразява в следното:

- от обекта на изследването – митохондриите като основен източник на метаболитна енергия (в случая чернодробни митохондрии като модел с възможност за изследване на митохондрии от най-различни тъкани) в няколко форми: нативни, субмитохондриални частици, деструктирани митохондрии, разтворима митохондриална АТФаза. Това дава възможност за проследяване на топографията на проникване на изследваните вещества (субстанции, съединение, фактори), от цитоплазмената мембрана до външната и вътрешна митохондриална мембрани. Изследванията са проведени при две основни равнища на АТФазната активност – минимална (нативни митохондрии) и максимална (разобщени митохондрии);
- от използваните биологично активни вещества, всяко от което със своята уникалност. Такива са *сребърните наночастици*, стабилизирани със скорбяла и рафиноза и които в последните години са „хитови” продукти в медицината, молекулярната биология и други области на науката и практиката (тук е осъществена продуктивна колаборация между докторанта и научна група от Факултета по химия и фармация, които са специалисти по приготвяне и идентификация на различни нанопрепарати); *азотният оксид* като газообразен невромедиатор, регулатор и модулатор на различни биологични процеси, радикал, лекарствен препарат и др. В този смисъл е използван натриев нитропрусид (SNP) като източник на NO и като агент за бърз контрол и стабилитет на кръвното налягане. Този продукт при фармакометаболизма съдържа и други продукти, които могат да прикрият ефектите на NO. Това е взето в предвид с прилагането на оригинална система за разделяне на NO от SNP. Тук е интересно проследяването на влиянието на NO върху активността на митохондриалната АТФаза от естествени (ендогенни) източници, какъвто е например L-аргинин и SNP; аминокиселините (АФК; DMPPA) като синтетични структурни аналози на естествените аминокиселини намират широко приложение в практиката селското стопанство, медицината и др. Механизмите на действие при някои

процеси са все още неизяснени. Разработката в дисертационния труд е принос в това отношение;

- прилагане на оригинална апаратура за дифузионно разделяне на азотния оксид от неговия донор;
- получените оригинални данни в различните части на дисертационния труд, някои от които с безспорен приносен характер. Добрият преподавател трябва да бъде добър и успешен изследовател

Придобиването на образователната и научна степен „доктор” предполага, че дисертационният труд съдържа убедителни доказателства в тези два аспекта на висша университетска квалификация. Това без никакво съмнение е подчертано основно в литературния обзор и цитираните литературни източници (около 340 заглавия). В работата ясно е очертан профила на докторанта – физиология на животните и човека с акцент към клетъчната биоенергетика. Още от конкурса за асистент в Биологическия факултет М. Шкодрова беше насочена от проф. д-р И. Минков към биоенергетиката. Проф. Минков е основател и всепризнат авторитет в това направление в СУ „Св. Кл. Охридски”. Поради това М. Шкодрова водеше практикумите и упражненията по клетъчна биоенергетика не само за магистрите към катедрата, но и за други магистърски програми. Това е паралелна, а в бъдещето, може би основна дейност на кандидата. Друг критерий, като основание за положително становище, е съавторството на М. Шкодрова в ръководството за „лабораторни упражнения по физиология на животните и човека” (2012 г.), както и „Протоколна тетрадка” за тези упражнения (2013 г.), „Тест по физиология” (2000 г.). Самият литературен обзор в дисертацията е много добър теоретичен източник за студенти и специалисти в биоенергетиката. Там са представени както класически теоретични основи, така и съвременни знания за достиженията в тази област. Това означава, че дисертационният труд може с успех да бъде ползван от всички, които се интересуват и работят в сферата на клетъчната биоенергетика. Таква опорни точки тук са: аеробен метаболизъм, структура и функция на митохондриите; митохондриални процеси и механизми; АТФ-синтазен и хидролазен комплекс – механизми на функциониране и регулация; Азотен оксид, азотоксид синтетаза и митохондрии; сребърни наночастици, цитотоксичност, влияние върху някои биоенергетични процеси и роля на аминокиселините върху биологията и биоенергетиката на клетките. Друг аргумент в това направление е текстуалният материал за методологията и методите на изследването, което също е много добро ръководство за експериментална дейност.

Приносите на гл. ас. М. Шкодрова в научната област и това, което е непосредствено свързано с процедурата е структурирането на дисертационния труд, получените експериментални данни, направените изводи и приносите за науката в областта. Дисертацията е формирана на основата на основни данни от няколко публикации (четири на брой), от представените резултати на научни форуми (три на брой), от участието и в научен проект и др. Предполагам, че материалите от изследванията крият в себе си още публикации и перспективи за разгъната изследователска дейност. Много добро впечатление в работата прави методологичният подход – формулиране на задачите, работни хипотези, как да се реализира изследването (методология), точно описание на резултатите, статистическа достоверност на различията, много професионално обсъждане на получените данни, аргументирани изводи и списък на приносите.

По-конкретно основните резултати се свеждат до следното:

- Сребърните наночастици, стабилизирани със скорбяла или с рафиноза, преминават през външната и вътрешната мембрана на митохондриите и стимулират (в различна степен в зависимост от приложената концентрация) АТФазната активност на нативни митохондрии (разпрягаща ефективност). Сравнени са също така ефектите на тези наночастици при изкуствено разобщи нативни митохондрии с динитрофенол (ДФ), като ефектите са също стимулиращи спрямо основното равнище на АТФазната активност (нативни митохондрии), но повлияват в различна степен ДНФ-стимулираната АТФаза и тези влияния са в зависимост от стабилизиращото покритие. С цел изясняване на механизмите на тези ефекти са проведени още няколко серии изследвания при субмитохондриални частици, в присъствието на L-цистеин, което е важно при анализа на поведението на тези частици с различно покритие и ролята на SH-групи. За нуждите на обсъждането в дисертацията са приложени и други подходи за установяване на колоидната стабилност на наночастиците. Много добро впечатление прави умението на автора за теоретичен анализ и обсъждане на експерименталните данни. Това е валидно както за този раздел, така и за останалите.

- Втората част на експерименталния дял на дисертацията е посветен на влиянието на NO върху активността на митохондриалната АТФаза. Ролята на NO в молекулните механизми на биоенергетиката все още поражда много въпроси. Докторантът със своята работа и данни, както и ролята на другите сътрудници в научната група, имат своят съществен принос в това направление. Както беше вече посочено в част от изследванията е използвана специална система за разделяне между донора на NO от отделения от него NO. Това е много разумен подход, особено когато се работи с такъв донор, какъвто е натриев нитропрурид (NP). В този смисъл докторантът е приложил още един методичен подход – «активен» и «инактивиран» NP, т.е. използване на NP с потенциални и изчерпени възможности за отделяне на NO. Данните от изследването са противоречиви при различните модели на състояние на митохондриалната АТФаза. Достоверните различия са подложени на анализ в „Обсъждането”. Интересно е общото заключение, че NO не повлиява АТФазната активност на нативни митохондрии, докато в деструктирани митохондрии, митохондриални частици и разтворима АТФаза този агент инхибира АТФазната активност. Обсъдени са и някои механизми на тези ефекти.

- Третата част на дисертационния труд е посветена на влиянието на МФК (DMPPA). Този синтетичен продукт намира широко приложение в селското стопанство, медицината и др., но твърде малко се знае за молекулните механизми на влияние върху различни биологични процеси и в частност върху клетъчната биоенергетика. Тази киселина е синтезирана само преди около 7 години. Данните от изследването показват, че МФК не преминава през вътрешната митохондриална мембрана. Установено е инхибиране на ензимната активност при условие, че тази киселина има директен обсег с ензима.

Изводите, 10 на брой, са резултат от коректен анализ на експерименталните и литературните данни. Те отразяват най-съществените страни на експерименталните резултати на влиянието на 3 групи агенти върху една от най-съществените звена на клетъчната биоенергетика – АТФазната система на митохондриите.

Приемам и оценявам положително направените изводи, както и списъка на приносите, предложени от автора на дисертацията.

Дисертационният труд, както и реферата, са много добре технически оформени в съответствие с нормативните изисквания и отразяват напълно изпълнението на проекта.

„Външната оценка” на резултатите в дисертационния труд са демонстрира и от самите публикации, три от които са с импакт фактор. В три от статиите М. Шкодрова е водещ автор. Досега са установени и няколко цитирания. Такава оценка е дадена в рецензиите и становищата на научното жури.

Заклучение

На основание на представената документация по конкурса е видно, че всички изисквания според Закона за висшето образование и Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски” за образователните, научни степени и длъжности.

Дисертацията беше апробирана с максимален брой положителни гласове.

Основната идея в дисертационния труд е по-нататъшното разкриване на молекулните механизми на ендогенен и екзогенен контрол на клетъчната биоенергетика. Получени са важни и оригинални данни за влиянието на сребърни наночастици, азотен оксид и алфа диметил аминокиселина върху различни експериментални модели на АТФазната система в чернодробни митохондрии. Експерименталните данни са подложени на обстоен анализ, който завършва с аргументирани изводи и посочване на основните приноси. Очертани са и перспективите за бъдещата изследователска дейност.

Докторантът, гл. ас. М. Шкодрова се характеризира с много добра подготовка като преподавател в Биологическия Факултет на СУ „Св. Кл. Охридски” в областта Физиология на животните и човека и Клетъчна биоенергетика, което се демонстрира още с литературните, методични и експериментални данни от изследванията, описани в Дисертацията, както и като съавтор на няколко учебно-методични ръководства.

Дисертационният труд и авторефератът са много добре технически оформени и представляват научна ценност по същество.

На основание на комплексния анализ на дисертацията, научната значимост на получените експериментални резултати, подготовката и успехите на кандидата като преподавател в Университета, давам положително становище за избора на гл. ас. Милена С. Шкодрова за присъждане на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Физиология на животните и човека) и напълно убедено призовавам членовете на научното жури да гласуват за това.

София,
27. 07. 2015 г.

Подпис:
/Доц. д-р Р. Иванов/