

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Христо Стефанов Гагов
Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

Относно дисертационния труд на ас. Милена Станимирова Шкодрова на тема:
„АТФазният комплекс на митохондриите като модел за изследване на биологично
активни съединения. Влияние на сребърни наночастици, азотен оксид и
[(диметилфосфинилметил)амино](фенил)-метилфосфонова киселина”, представен за
присъждане на образователна и научна степен „доктор” в професионално направление
4.3. Биологически науки (Физиология на животните и човека)

Ас. Милена Шкодрова завършва висше образование през 1991 г. в Биологически факултет (БФ) на СУ „Св. Климент Охридски“ като *Магистър биохимик, микробиолог със специализация Физиология на животните и човека*. В периода 1993-2001 г. работи като клиничен лаборант в Национална кардиологична болница, София. От август 2001 г. е асистент, от 2006 до 2011 г. е старши асистент, а от 2011 до 2015 г. – главен асистент в катедрата по Физиология на животните и човека, БФ на СУ „Св. Климент Охридски“, където се занимава с преподавателска и научно-изследователска дейност.

Дисертационният труд на ас. Милена Шкодрова е разработен с помощта на научния консултант проф. дбн Игнат Минков. Дисертацията е базирана на 4 научни статии, от които 1 на български език в *Годишника на ШУ „Еп. Константин Преславски“* и 3 на английски език и с импакт фактор (ИФ). На 3 от тях ас. Милена Шкодрова е първи автор и в една – втори. Основната публикация по дисертацията е в *Journal of Nanoparticle Research*, което списание има ИФ = 2.184 за 2014 г. Участията на докторанта в конференции с материали по темата на дисертационния труд са 3. Забелязани са 2 цитирания на статията с наночастици – 1 в книга на английски език и 1 в списание *Nanotechnology*, ИФ = 3.921 за 2014 г.

Дисертационният труд се състои от 156 страници, като съдържа всички необходими раздели. Той е фокусиран върху проучване влиянието на сребърни наночастици, азотен оксид (NO) и [(диметилфосфинилметил)амино](фенил)-метилфосфонова киселина (DMPPA) върху активността на АТФазния комплекс на цели митохондрии и митохондриални частици. Регулаторното влияние на NO, както и това на аминокиселини и сребърните наночастици върху биоенергетичните процеси

в митохондриите е много актуална проблематика, чието задълбочено проучване е от съществено значение за науката, терапията във ветеринарната и хуманната медицина, и токсикологията.

Литературният обзор е много задълбочен и едновременно с това пределно понятно написан. Той се простира на 42 страници и съдържа 13 фигури, схеми и химични формули. В него подробно са разгледани митохондриите като основен генератор на АТФ (над 90%) при еукариотни клетки, структурата и основните компоненти на двете митохондриални мембрани, разликите между тях, някои тъканни специфики, рибозомите, ДНК, гранулите и множество междинни метаболити на митохондриалния матрикс и др. Дихателната верига на вътрешната митохондриална мембрана, съдържаща четири електронни преносителя (3 от тях и за H^+) – комплекс I (НАДН-дехидрогеназен комплекс или НАДН-КоQ оксидо-редуктаза), комплекс II (сукцинатдехидрогеназен комплекс или сукцинат-КоQ оксидо-редуктаза), комплекс III (цитохром *bc₁*-комплекс или КоQ-цитохром *c* оксидо-редуктаза) и комплекс IV (цитохром *c* оксидаза), както и техните функции са разгледани по начин, който е достоен за учебник. Същото се отнася и за процеса на трансформация на енергията, включващ три последователни етапа: окисление в дихателната верига, генериране на трансмембранен електрохимичен градиент за H^+ и неговото използване от АТФазния комплекс за синтез на АТФ чрез ротационен механизъм. Освен това са разгледани особеностите, преимуществата и спецификите на регулацията на АТФазната активност на митохондрии, субмитохондриални частици и разтворима митохондриална АТФаза за целите на фармакологични изследвания. Следват описания на сребърните наночастици, на техните приложения и биологично действие, включително известните им до момента ефекти върху митохондрии. Акцентирано е върху токсичността на наночастиците, свързана с промените в клетъчната морфология, метаболитната активност и оксидативния стрес, предизвикани от освобождаването на сребърни йони, директното увреждане на клетъчните мембрани или генерирането на свободни радикали. Отбелязано е, че не са открити достатъчно експериментални данни за директно въздействие на сребърни наночастици върху митохондриалния АТФазен комплекс, което мотивира целта на дисертационния труд и необходимостта от провеждане на настоящите изследвания. Данните за NO и NO синтазите (ендотелна, невронална, индуцируема и митохондриална изоформи) са разгледани стегнато и балансирано предвид огромния брой изследвания на този ендогенно продуциран газ и механизмите на неговата вътреклетъчна сигнализация в еукариотни клетки. Дискутирани са възможните механизми на действие на NO - върху

електронния транспорт в дихателната верига на митохондриите, чрез директно повлияване върху цитохром оксидазата и други дихателни комплекси или косвено, поради взаимодействието му със супероксидния анион и получаването на пероксинитрит. Отсъстват данни за директен ефект на NO върху митохондриалната АТФаза. Характеристиката на аминокислотите е сравнително подробна, което е и необходимо, поради факта, че те са по-малко познати на изследователите извън кръга на тесните специалисти – биолози, химици и фармаколози, които изследват техните свойства. Добре е отразен фактът на значителното българско участие в разработката на такива съединения, както и множеството им приложения и ефекти. Описани са структурните характеристики на изследваната аминокислота (DMPPA), предполагащи биологични ефекти, включително и върху митохондрии.

Цел и задачи. Целта на дисертацията е формулирана кратко и ясно, а поставените за нейното достигане 4 задачи за определяне на ефектите на наночастици, NO и DMPPA върху митохондрии, субмитохондриални частици и непречистена разтворима АТФаза са логични и адекватни.

В *Методи на изследване* подробно са описани начинът на синтезиране на сребърни наночастици, стабилизирани със скорбяла или рафиноза, методите за получаване на пречистени и концентрирани дисперсии от тях и тяхното характеризиране. Освен това разделът съдържа подробно описание на изолирането на интактни митохондрии от черен дроб на плъх, на получаването на субмитохондриални частици и непречистена разтворима митохондриална АТФаза, както и на начините за определяне на АТФазната активност и др. Специално място е отделено на оригинална експериментална клетка, конструирана да раздели NO от неговия донор с цел елиминирането на странични ефекти върху изследваните биологични обекти. Количеството на отделения NO е определяно с полярограф, а на нитритите – спектрофотометрично.

Разделът *Резултати* съдържа множество оригинални данни. За установяване каква част от общата АТФазна активност на изследваните препарати се дължи на FoF₁ АТФазния комплекс са проведени опити със специфичния инхибитор на мембранно-свързаната митохондриална АТФаза – олигомицин. Така в целия труд е сравнявана олигомицин-чувствителната АТФазна активност в контролни условия и в присъствие на сребърни наночастици, NO и DMPPA. Резултатите показват, че стабилизирани сребърни наночастици взаимодействат с вътрешната митохондриална мембрана и повлияват АТФазната активност на интактни митохондрии. Тези частици инхибират

АТФазната активност на деструктурирани митохондрии и на субмитохондриални частици. Установява се разлика в ефектите на изследваните наночастици стабилизирани с рафиноза или скорбяла. NO инхибира активността на митохондриалната АТФаза, ефект който се засилва в присъствие на АДФ. Изследваната аминокиселина DMPPA не повлиява АТФазната активност на интактни митохондрии, но има инхибиращ ефект върху нея при деструктурирани митохондрии и субмитохондриални частици. Получените резултати са онагледени с 34 фигури и 2 таблици. Използвана е адекватна статистическа обработка.

Разделът *Обсъждане* на дисертацията съдържа стегната и компетентна дискусия на разгледаните в дисертационния труд научни теми. По конкретно – голямо внимание е отделено на възможните механизми, които са причина за наблюдаваните ефекти на NO, DMPPA и сребърни наночастици. Отлично впечатление прави адекватното планиране на опитите с използване на три активни структури – нативни митохондрии, субмитохондриални мембранни фрагменти и разтворима митохондриална АТФаза (F_1). Този подход позволява да се разграничат възможни ефекти върху дихателната верига, от разпрягащия ефект върху вътрешната митохондриална мембрана, както и тези две влияния от директното въздействие върху АТФазния ензим. Освен това съединението DMPPA изобщо не е изследвано за биологични ефекти върху клетъчни и субклетъчни структури на животни и човек.

Представеният труд съдържа 10 извода и 5 оригинални приноса. *Изводите* добре обобщават получените данни. Приемам тези изводи като достатъчно подкрепени и логично произтичащи от получените от докторанта експериментални данни. *Приносите* са формулирани кратко и ясно. В тях се съдържа нова информация за механизмите на ефектите на сребърни наночастици, стабилизирани с рафиноза или скорбяла, на NO и на изследваната аминокиселина – DMPPA върху АТФазната активност на митохондрии от черен дроб на плъх или на фрагменти от тях.

Авторефератът се състои от 44 страници, 21 фигури и 2 таблици, които подробно отразяват основните акценти на докторантския труд, представя и обсъжда много добре получените резултати, както и съдържа изводите, приносите, публикациите, проекта и участията в научни форуми по темата на дисертацията, а също и забележаните цитирания.

Към текста на дисертацията имам някои забележки:

а) абзацът започващ в края на стр. 65 е изцяло методичен и мястото му е в раздела *Материали и Методи*, а не в *Резултати*;

б) не е нужно под всяка фигура да се пише какъв метод за статистическа обработка е използван. Тази информация може да се представи обобщено в края на раздел *Методи*;

в) съкращението SPR не е изведено в началото на този труд, където са представени използваните съкращения;

г) на стр. 66, последния ред трябва да се поясни кои са причините „използваната реакционна среда (*da*) не е подходяща за появата на активността им.“ Като тук става дума за АТФази, различни от олигомицин-чувствителната митохондриална АТФаза.

Познавам ас. Милена Шкодрова от повече от десет години, когато постъпих на работа в катедра Физиология на животните и човека към Биологическия факултет на СУ. Свидетел съм на нейното усърдие и постоянство в експерименталната работа, обработката на данните, изготвянето на публикации и написването на дисертационния труд. Смятам, че тя успешно е изпълнила и завършила огромна по обем експериментална работа, като е прилагала адекватни на поставената цел методики. Високо оценявам способността ѝ да пише по научни въпроси точно, аргументирано и достатъчно изчерпателно, което е характерно за всички раздели на дисертацията и най-вече за *Литературния обзор* и *Обсъждането*. Това позволява на читателя бързо и с лекота да навлезе и следва разглежданите теми. Очаквам в бъдеще работата с митохондрии, субмитохондриални частици и разтворима АТФаза да продължи като модел за проучване ефектите на други важни молекули и наночастици върху трансформацията на енергията и синтеза на АТФ.

В заключение, предложеният труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение за ОНС „Доктор. Затова убедено препоръчвам на членовете на научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен „доктор” на ас. Милена Станимирова Шкодрова в професионално направление 4.3. Биологически науки (Физиология на животните и човека).

Подпис:

София, 01.08.2015 г.

(проф. д-р Христо Гагов)