

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Иван Пенчев Георгиев, секция „Физиология на животните”,  
катедра „Фармакология, физиология на животните и физиологична  
химия”, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски Университет,  
гр. Стара Загора

на дисертационен труд за придобиване на ОНС „Доктор” по научна  
специалност „Физиология на животните и човека” 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 от **Милена Станимирова Шкодрова** от катедра  
„Физиология на животните и човека”, Биологически Факултет, Софийски  
Университет „Св. Климент Охридски“, гр. София

Научен консултант: проф. д-р Игнат Борисов Минков

### **1. Актуалност на дисертационната тема**

Темата на дисертационния труд е много актуална, което се определя от факта, че през последните години нанотехнологиите, респ. наночастиците намират все по-голямо приложение в индустрията, електрониката, битата, биологията и медицината и др. Освен, това производните на аминокиселините са широко използвани в медицината, растениевъдството и растителната защита. Натрупаха се също така много експериментални данни относно ролята на азотния оксид в регулацията на редица физиологични процеси, както и в патогенезата на някои заболявания. Всичко това налага необходимостта от по-задълбочено познаване на евентуалните неблагоприятни ефекти, които наночастиците, азотния оксид и производните на аминокиселините оказват върху клетките и субклетъчните структури. В тази връзка особен интерес представляват процесите в митохондриите и най-вече тези, свързани с генерирането на АТФ.

### **1. Структурата на дисертационния труд**

Дисертацията е написана на 156 страници и е много добре структурирана, с адекватен баланс между отделните части. Съдържа всички необходими за такъв труд раздели: Увод – 2 стр.; Използвани съкращения – 1 стр.; Литературен обзор – 42 стр.; Цел и задачи – 1 страница; Материали и методи – 14 стр.; Резултати – 58 стр.; Обсъждане – 20 стр.; Изводи и Приноси – 3 стр.; Публикации, включени в дисертацията, участия в

конференции, научни проекти и установени цитирания – 3 стр. и Литература - 49 стр.

## **2. Увод, литературен обзор, цел и задачи**

В увода е анонсиран основния проблем на дисертационния труд, а именно влиянието на наночастиците, азотния оксид и аминометилфосфоновите киселини и техни производни върху функцията на митохондриите и в частност върху активността на АТФазния комплекс. В литературния обзор е извършен задълбочен и целенасочен анализ на наличната информация по проблематиката на дисертационния труд. Цитирани са голям брой източници, болшинството, от които са от последните 10 години, което е индикатор за много добрата осведоменост на дисертанта по отношение на съвременните достижения относно ролята на митохондриите в биоенергетиката на клетката, както и АТФазната активност в интактни, частично деструктурирани митохондрии и митохондриални препарати – субмитохондриални частици и разтворима митохондриална АТФаза. Разгледани в детайли са също така редица въпроси, свързани с възможни цитотоксични ефекти на сребърните наночастици, азотния оксид и аминифосфоновите киселини. Условно литературният обзор е разделен на две части. В първата част авторът е описал подробно основните процеси, които протичат в митохондриите като акцентът е поставен върху преноса на електрони в дихателните вериги, генерирането и поддържането на трансмембрания електрохимичен потенциал на протоните и синтеза на АТФ. Описана е също така АТФазната активност на митохондриите както и значението на различни митохондриални препарати, прилагани за изучаване на тази активност като специално внимание е обърнато на каталитичния компонент на АТФазния комплекс, т. нар. разтворима митохондриална АТФаза. Във втората част са анализирани и обобщени известните досега ефекти, които оказват сребърните наночастици, азотния оксид и аминифосфоновите киселини и техните производни. Представената в обзора информация показва уменията на дисертанта да анализира известните данни и да прави нужните обобщения.

Целта е правилно формулирана и напълно съответства на темата на дисертационния труд. Поставени са четири конкретни задачи, решаването на които гарантира постигането на набелязаната цел. Авторът е проявил голяма доза скромност, тъй като вземайки под внимание мащабността на получените в дисертацията експериментални данни, определено считам, че биха могли да бъдат добавени още няколко задачи.

### 3. Материали и методи

От раздела „Материали и методи” се вижда, че е извършена една значителна по обем експериментална работа свързана както с предварителната подготовка на някои от агентите (например сребърните наночастици), така и с работата по самото изследване на тези и другите агенти върху АТФазната активност в митохондриите. Много добро впечатление прави факта, че дисертантът е усвоил и приложил голям брой методики освен за определяне на АТФазната активност, но и на много други, необходими за реализиране на поставените задачи – разделяне на свободния азотен окис от донора му натриев нитропроеид, изолиране на митохондрии, субмитохондриални частици, изолиране на разтворима митохондриална АТФаза, определяне количеството на нитритите и др. Извършена е адекватна статистическа обработка на получените резултати в зависимост от това дали данните са нормално разпределени или не са използвани подходящи тестове за оценка ефекта на отделните агенти върху АТФазната активност. Извършена е подходяща статистическа обработка на експерименталните данни, вкл. и тестване за нормално разпределение, което е гаранция за достоверността на получените резултати.

### 5. Резултати и обсъждане

Приложеният от дисертанта алгоритъм в раздела „Резултати”, базиращ се на проучване ефекта на сребърните наночастици, Na-нитропроеид, NO и [(диметилфосфинилметил)амино](фенил)-метилфосфоновата киселина (DMPPA) върху АТФазната активност в интактни митохондрии и различни митохондриални препарати (деструктурирани митохондрии, субмитохондриални частици и разтворимата митохондриална АТФаза дава възможност за по-пълно изследване на механизмите на евентуалните нарушения и по-точната им локализация – протонната помпа ( $F_0$ ) или в каталитичния компонент на АТФазния комплекс.

Дискусията на дисертационния труд е написана много компетентно. Получените собствени експериментални данни са много умело интерпретирани на фона на известното до момента относно влиянието на сребърните наночастици, азотния окисид и производните на аминокиселините върху функцията на митохондриите. Тъй като много от резултатите са получени за пръв път в това изследване, високо оценявам уменията и стремежа на дисертанта да дава адекватни обяснения на установените научни фактите, както и да формулира съответни хипотези. Това допринася за по-пълното изясняване на механизмите, чрез които изследваните агенти повлияват процесите в митохондриите и в частност активността на АТФазния комплекс.

Приемам даденото от дисертанта обяснение, че установените различия в ефектите на сребърните наночастици върху АТФазната

активност могат да се дължат на различия в покритието (по-силно изразен ефект на частиците с покритие от скорбяла в сравнение с рафиноза) и размера им. Особен интерес представлява установеното от автора инхибиращо влияние на цистеина върху ефекта на сребърните наночастици върху АТФазната активност и изказаната хипотеза, че това вероятно се дължи на образуването на по-големи агрегати в резултат от взаимодействието му със сребърните наночастици. Доказано е също, че в резултат от хемисорбция на цистеина върху повърхността на сребърните наночастици с покритие от рафиноза се образуват комплекси с по-голям размер (респективно по-ниска колоидна стабилност и по-ниска реактивност) от тези покрити със скорбяла, което до голяма степен е причина за установеното по-силно инхибиране на АТФазната активност от сребърните частици покритие със скорбяла в интактните митохондрии, разпрегнати със замръзване и размръзване митохондрии и субмитохондриални частици. Проведените експерименти с разпрегнати (динитрофенол) или частично деструктурирани митохондрии (чрез замразяване и размразяване) показват, че сребърните наночастици са в състояние да преминат през вътрешната мембрана и да въздействат върху АТФ комплекса, което би могло да се осъществи косвено, върху мембрания сектор ( $F_0$ ) или пряко върху каталитичната субединица на комплекса.

При изследване на ефектите на NO върху АТФазната активност са приложени два подхода: при първия в реакционната среда е въведен натриев нитропрурид като донор на NO, а при втория подход се изследва директно влиянието на NO. В тази връзка специално искам да отбележа факта, че докторантът е разработил оригинален способ за разделяне на NO от неговия донор натриев нитропрурид. Оценявам това като съществен принос в дисертационния труд тъй като по този начин се дава възможност за определяне ефекта само на NO и елиминиране този на донора или други странични продукти. По този начин авторът установява, че азотният оксид понижава активността на АТФазата в деструктурирани чрез замразяване и размразяване митохондрии и субмитохондриални частици и на разтворимата митохондриална АТФаза. Тези резултати са важни от гледна точка на обстоятелството, че допринасят за изясняване на механизмите, чрез които NO повлиява функцията на митохондриите. Доказва се, че освен известното действие върху преноса на електрони в дихателната верига, NO може да окаже инхибиращо действие и върху активността на мембрания сектор (протонния канал -  $F_0$ ) и каталитичния компонент на АТФазата ( $F_1$ ). В друга серия опити се доказва, че ефектът на NO върху митохондриалната АТФаза зависи от нейното конформационно състояние тъй като добавянето на АДФ води до засилване на инхибиращия ефект на азотния оксид върху АТФазната активност при деструктурирани митохондрии и субмитохондриални частици.

В друга серия опити са получени оригинални експериментални данни с важно научно-приложно значение относно ефекта на една новосинтезирана и все още недостатъчно проучена за евентуални ефекти върху клетъчните и субклетъчните структури киселина – [(диметилфосфинилметил)амино](фенил)-метилфосфонова киселина. Интересът към подобен род органофосфорни съединения се поражда от факта, че те намират широко приложение в селското стопанство и в частност в растениевъдството и растителната защита както и в медицината. Доказва се, че тази киселина няма разпрягащо действие върху митохондриите тъй като не повлиява АТФазната активност на интактни митохондрии както и на динитрофенил стимулираната АТФазна активност. В същото време обаче тя оказва инхибиращ ефект върху АТФазната активност на деструктурирани митохондрии и субмитохондриални частици и при двата приложения от докторанта подхода – при едновременно взаимодействие на субстрата (АТФ) и ефектора (DMPPA) с ензима (АТФазата) и при предварително взаимодействие на ефектора с ензима. Тези данни свидетелстват за възможно въздействие на тази киселина върху някои белтъци на АТФ комплекса, респективно върху протонния канал и/или каталитичната субединица.

## **6. Изводи и приноси**

Направените 10 извода са конкретни и непосредствено свързани с получените резултати. Високо оценявам направените приноси, които представят в синтезиран вид научната и научно-приложната стойност на постигнатото в дисертационния труд.

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

## **7. Участие на докторанта при разработването на дисертационния труд**

Не познавам Милена Шкодрова, но съм изключително впечатлен от огромната и в същото време прецизно извършена експериментална работа и от компетентния и професионален начин на представяне и интерпретиране на резултатите в дисертационния труд. Обстоятелството, че тя е водещ автор на 3 от представените 4 научни публикации и на резюметата от участието в научните форум ми дава основание да се убедя, че дисертационният труд е лично дело на докторанта. Важен индикатор за качеството на проведените изследвания и научната стойност на дисертацията е факта, че 3 от публикациите са в списания с импакт фактор, Освен това, едната статия е в специализирано научно издание в чужбина (ИФ=2,28), която макар излязла през 2014 година вече има 2 цитирания – 1 в монография в чужбина и 1 в списания с висок импакт фактор (Nanotechnology – IF=3,67 за 2014 г.). Както вече казах по-горе тематиката на дисертационния труд и свързаните с него

публикации е много актуална, убеден съм, че в скоро време предстоят още много цитирания в специализирани международни издания. Докторантът участва в авторския колектив на научен проект, чиято тематика е пряко свързана с дисертационния труд.

Ще отбележа, че бях включен като член на Разширения катедрен съвет с писмен отзив и се убеждавам, че в окончателния вариант на дисертацията авторът се е съобразил с много от направените препоръки.

## **8. Забележки и въпроси**

Към дисертационния труд имам и някои забележки. Считам, че първата част на литературния обзор би могла да бъде редуцирана, като се избегне описателния елемент и се наблегне на онези факти, които имат пряко отношение към целта и задачите на дисертационния труд. Препоръчително е в края на обзора да се направи кратко резюме на най-важните факти от литературата относно ефектите на изследваните агенти върху процесите в митохондриите като се акцентира най-вече на нерешените проблеми и/или на липсата на достатъчно експериментални данни. Това ще мотивира още по-добре целта на дисертационния труд и необходимостта от провеждане на заложените изследвания. Считам, че би било добре, ако съобразно вижданията си, авторът бе обособил приносите в две категории – оригинални и потвърдителни и във всяка от тях да бъдат посочени тези с научно-теоретичен и научно-приложен характер.

Както е видно направените от мен бележки са от техническо естество и по никакъв начин не намаляват високата научна и научно-приложна стойност на постигнато в дисертационния труд и не могат да повлияят на окончателното ми становище.

Към докторанта имам следните въпроси, които касят главно научно-приложния характер на получените в дисертацията резултати:

1. Базирайки на собствените си резултати и информацията която има, какво е бъдещето на изследваните наночастиците в медицината и биологията?
2. Известно е широкото приложение на производните на аминокиселините като пестициди, респ. хербициди. В този смисъл възможно ли е тези производни, в т.ч. и [(диметилфосфинилметил)амино](фенил)-метилфосфоновата киселина или на продуктите, до които те се разграждат в почвата, да попаднат в посевите, зеленчуците и плодовете, отглеждани върху третираны площи? С други думи: Възможно ли е "обратно движение" на тези съединения от почвата към корените и оттам към посевите, зеленчуците и плодовете?

В заключение, считам, че поставената цел и задачи са успешно изпълнени. По структура и съдържание дисертационният труд отговаря напълно, а в много отношения превишава изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение, вкл. и този на СУ „Свети Климент Охридски“, за ОНС „Доктор“. Направени са редица оригинални приноси с важно научно-теоретично и научно-приложно значение относно ефектите на сребърните наночастици, азотния оксид и [(диметилфосфинилметил)амино](фенил)-метилфосфоновата киселина върху функцията на митохондриите в хепатоцитите. Акцентът е поставен на изясняване механизмите, чрез които тези агенти осъществяват въздействието си върху активността на АТФазния комплекс. Ето защо, давам много висока положителна оценка на проведените изследвания и получените резултати. **Напълно убедено ще гласувам „За“ присъждането на ОНС „Доктор“ на докторанта Милена Станимирова Шкодрова от катедра „Физиология на животните и човека“, БФ на СУ „Св. Климент Охридски“ по научна специалност „Физиология на животните и човека“ като призовам за същото и останалите членове на Научното жури (назначено със Заповед 38-441 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ от 07.07.2015 г.).**

30.07.2015 г.

Подпис:

Стара Загора

(проф. д-р Иван Пенчев Георгиев)