

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на проф. д-р Людмил Пенев Кирацов на тема „Биохимични основи на Алцхаймеровата болест“ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Биохимия“

Рецензент: проф. д-р Румяна Миронова – ИМБ „Акад. Румен Цанев“ - БАН

Алцхаймеровата болест (АБ) е диагностицирана за първи път преди повече от 100 години, но до момента е нелечима. Това се дължи на комплексните причините за болестта и на нейната честа проява в контекста на смесен тип патология заедно с други дегенеративни заболявания на главния мозък. В същото време статистически данни сочат, че АБ засяга над 50% от възрастното население над 80 години. Ето защо с демографските промени в полза на възрастното население през последните десетилетия болестта се превръща в сериозен социален и икономически проблем. Съгласно данни, цитирани в дисертацията, „...разходите за медицинско обслужване на Алцхаймеровите пациенти в световен мащаб се преценяват на над 1 трилион долара“ годишно. Тези данни подчертават актуалността и значимостта дисертационния труд на проф. Кирацов, посветен на биохимичните основи на Алцхаймеровата болест.

Дисертационният труд е написан на 270 стр. и съдържа въведение, цел на изследванията, литературен обзор (34 стр.), материали и методи (25 стр.), резултати и обсъждане (148 стр.), изводи, библиографска справка и приложения със справка за приносите и списъци на авторските публикации и научни съобщения по темата на дисертацията. Документалните материали включват 86 фигури и 9 таблици, а библиографската справка - 697 литературни източника. Тази структура говори за едно добре балансирано съдържание на дисертацията, в която доминират резултатите и тяхното обсъждане, базирано на впечатляващ брой цитирания. Въпреки големия обем, дисертацията се чете лесно, благодарение на изключително добрия езиков и научен стил.

Литературният обзор е подробен, задълбочен и изчерпателен. В него са разгледани съществуващите хипотези за етиологията на АБ, в т. ч. амилоидната и митохондриална каскадни хипотези и хипотезата за промени в кръвно-мозъчната бариера. Специално внимание е отделено на амилоидния β -пептид (А β) и неговия предшественик - амилоидния прекурсорен протеин (APP). Разгледани са процесинга на APP и функциите на неговите продукти с фокус върху физиологичната и невротоксична роля на А β . Дълги години битува представата, че сенилните плаки в мозъка на АБ пациенти, където А β се отлага в агрегирала форма, са причина за наблюдаваните когнитивни дефицити. В светлината на най-новите изследвания тази представа все повече се компрометира и насочва вниманието на учените към невротоксичността на разтворимия А β . Изследванията на проф. Кирацов целят „...да допринесат за изясняване на етиологията на Алцхаймеровата болест и да се създадат експериментални модели, които да подпомогнат за това“. В литературния обзор той подготвя читателя за една съществена част от своята експерименталната работа, посветна на използването на синаптозомите и невроналните мрежи като модел за изследване метаболизма на APP и токсичността на разтворимия А β .

В дисертацията е използван богат арсенал от **Материали и методи**, които са подробно описани и напълно адекватни на планираните изследвания. Те включват биохимични и молекулярно-биологични методи (определяне на белтък и ензимни активности, LDH- и MTT-тестове, SDS-PAGE, EMSA, *in situ* хибридизация, RT-qPCR), имунологични (ELISA, имуно-преципитация, -блотинг, -хистохимия, -флуоресценция), работа с клетки (в т. ч. с първични клетъчни култури) и експериментални животни, включваща процедури по изолиране на органи/тъкани и трансплантация на клетки. В транскриптомните изследвания е прилаган един от най-съвременните методи за секвениране на нуклеинови киселини (NGS). В биоинформатичния анализ на данните от секвенирането са използвани редица софтуерни продукти (Trimmomatic v0.38, CIRCEXplorer2 v2.3.6, GENCODE mm10 vM22 и др.), а за статистическа обработка на резултатите - подходящи методи (*t*-тест на Стьюдент, ANOVA с LSD post hoc тест на Фишер и др.), които убеждават читателя в достоверността на докладваните резултати.

Изследванията, представени в глава **Резултати и обсъждане**, могат да бъдат отнесени тематично към четири основни раздела – а) метаболизъм на APP, б) влияние на амилоидния β -пептид върху електричната активност на невронални клетки, в) изследване на транскриптома в синаптозомална фракция и г) сравняване на методите за определяне на белтък по Lowry и Bradford. Ще ги разгледам в тази последователност, която според мен отразява обема и значимостта на проведените изследвания, макар че в дисертацията те следват друг, по-скоро в хронологичен ред. Логично, най-голямо място е отделено на метаболизма на APP поради многото неизвестни, свързани с функционирането на този белтък и неговите процесирани форми в норма и АБ патология.

Метаболизъм на APP

В този раздел е изследвано влиянието на различни вещества и фактори върху секрецията на APP (глутамат (Glu), протеазни инхибитори, калциеви (Ca^{2+}) и оловни йони (Pb^{2+}), васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF), холинергичната невротрансмисия и стареенето). Впечатляващо е голямото разнообразие от използвани експериментални модели, включващи синаптозоми, първични клетъчни култури, експериментални животни (плъхове, мишки), в т. ч. трансгенни, различни органи от експерименталните животни (мозък, скелетен мускул, бъбрек, черен дроб), части на главния мозък (хемисфери, церебелум, преден и заден мозък) и мозъчни срезове. Целта на всички тези подходи е да се получи, колкото се може по-точна и задълбочена представа за метаболизма на APP в нативни условия *in vivo* и изследванията на проф. Кирацов имат съществени приноси в тази насока.

Едни от първите изследвания на проф. Кирацов (**№8**) запълват празнина, свързана с липсата на експерименти с мозъчни срезове за оценка на влиянието на невротрансмитера Glu върху секрецията на APP. Получените от него резултати потвърждават наблюденията на други изследователи с клетъчни култури, че активирането на глутаматните рецептори повлиява секрецията на APP. Установена е още базална секреция на APP, т. е. в отсъствие на невронално стимулиране. Това наблюдение е интересно в контекста на неизяснените до момента физиологични функции на APP в здравия мозък. Оригинални са наблюденията, че секретираният от мозъчните срезове APP не повлиява собствената си секреция и претърпява физиологичен Ca^{2+} -зависим процесинг

след секретирането си (**№9-11**). Тези наблюдения са направени съответно с Glu-стимулираната и базална секреция на APP и са прецизно извършени, за да се изключи неспецифичното разграждане на белтъка, както и неспецифичното изтичане на Ca^{2+} -зависими протеази от срезове. В свое скорошно изследване (**№29**) проф. Кирацов намира още, че Pb^{2+} инхибира секрецията на APP в кортекс-съдържащи мозъчни структури (хемисфери и церебелум) на мишки. Това наблюдение е важно, тъй като съгласно съществуващи данни APP регулира ефлукса на желязни йони и по този начин може да се стигне до увеличаване на вътреклетъчната им концентрация и до невротоксичност. Получените от проф. Кирацов данни подкрепят „металната хипотеза за АБ“, според която металната хомеостаза е критична за функцията на невроните и нейното нарушаване допринася за развитие на АБ.

Макар че мозъчните срезове са по-близки до условията *in vivo* в сравнение с клетъчните култури, в изследванията на проф. Кирацов за първи път е направен опит синаптозомите да се използват като моделна система за изследване секрецията на APP (**№12, №14, №22**). Тези опити са продиктувани от факта, че синапсите са специфично място, където действат невротрансмитерните рецептори и са мотивирани от допускането, че в синаптозомите рецепторите биха били по-достъпни за въздействие с различни агенти и APP ще се отделя директно в инкубационната среда, без да минава през матрикса. В тези опити отново е използван невротрансмитера Glu, но в сравнение с мозъчните срезове при стимулиране на синаптозомите е наблюдавана около два пъти по-висока секреция на APP. Още по-усилена секреция на APP от синаптозомите е наблюдавана при стимулирането им директно с форбол-меристат-ацетат (РМА), който медира действието на Glu, стимулирайки протеинкиназа С. Наблюдението има потвърдителен характер и е предположено, че се дължи на разлика в броя рецептори, свързани с Glu и РМА.

Синаптозомите са експериментален модел и в други изследвания на проф. Кирацов, където фокусът е изместен върху онтогенетичните промени в експресията на APP. Изследването на APP в синаптозомални фракции е логично, тъй като APP се синтезира в невроните и по аксоните се пренася до синапсите. Белтъкът е доказан хистохимично и в растежни конуси. Поради тези причини проф. Кирацов подлага на експериментална проверка хипотезата, че формирането на синапсите и тяхната активност са свързани с повишена секреция на APP. Изследвани са промените на APP в хомогенат, конуси и синаптозоми от мозък на плъх по време на онтогенезата. Тези изследвания, проследяващи APP експресията на ниво белтък, потвърждават направената хипотеза като ясно показват, че той е необходим както за формирането на невроните и синапсите, така и за поддържане на синаптичните функции (**№13**). Разнообразните функции на APP карат автора да предположи, че в тях най-вероятно са въввлечени различни APP изоформи. Това предположение е проверено и потвърдено чрез изследване на матрична РНК (мРНК) за трите APP изоформи в ембрион и мозък на плъх (**№15**). Установено е, че най-късата APP изоформа (APP695) играе роля в диференцирането на нервните клетки, както в централната, така и в периферна нервна система, докато двете по-дълги изоформи (APP751 и APP770) се експресират предимно в периферните органи и тъкани и много по-слабо в мозъка. Това заключение за диференциална експресия на APP връща проф. Кирацов към изследване на APP на ниво белтък в различни органи на плъх (мозък, скелетни мускули, бъбрек и черен дроб) в хода на онтогенезата (**№27, №28**). Важен е

установеният факт, че концентрацията на APP в мозъка в пъти по-висока от тази в периферните органи. В тази връзка имам следния **ВЪПРОС: Тъй като в научната литература има данни за експресия на APP изоформи във васкуларния ендотел, ми е любопитно дали в атеросклеротичните плаки на кръвоносните съдове се откриват β -амилоидни отлагания?**

Многобройни изследвания, в т. ч. и тези на проф. Кирацов показват, че процесинга на APP се намира под невротрансмитерен контрол. Липсват обаче данни дали секрецията на APP се влияе от активирането на мускариновите рецептори *in vivo*. Научен принос в тази насока са изследванията на проф. Кирацов, проведени с плъхове, в които е предизвикана частична холинергична дегенерация в базални ядра на предния мозък (**№30**). Моделът е създаден чрез предизвикване на частична холинергична имунолезия, следвана от трансплантацията на фибробласти, секретирани невронални растежен фактор (NGF) за възстановяване на холинергичната функция. Предприети са множеството експерименти за валидиране на модела - доказване секрецията на NGF, определяне нивата на холинергични маркери и техни кинетични константи. Едва след това изследователите си позволяват да преминат към изследване метаболизма на APP в моделните животни. Получените резултати ясно показват, че холинергичната хипофункция в кората на главния мозък води до увеличаване на мембранно-свързания APP и намаляване на неговата секреция. Това е съществен научен принос, тъй като за първи път *in vivo* резултати показват, че APP процесингът в кортикалните неврони, получаващи холинергична инервация отвън, се намира под холинергичен контрол. Приносът е съществен, тъй като е добре известно, че в АБ пациенти холинергичната система в базалните ядра на предния мозък претърпява тежка дегенерация. В тази насока особено удачно е създаването на същия модел, но с трансгенни Tg2576 мишки, които са с амилоидна патология, тъй като съдържат човешки ген за APP с двойна мутация, описана за фамилна форма на АБ. Потвърдено е, че в тези моделни животни амилоидната патология се засилва и се проявяват важни патологични белези на болестта – загуба на синапси, невродегенерация и атрофия на хипокампуса. Резултатите имат и друго важно значение – те указват на целесъобразността от използването на холиномиметици за терапия на АБ. Изследването с трнсгенния модел е публикувано в престижното списание *Neurobiology of Disease* с IF₂₀₁₂ 5.624 (**№4**).

Доказаното в по-горните изследвания участие на мускариновите ацетилхолинови рецептори в метаболизма на APP аргументира предприетото изследване върху ролята на интерлевкин-1 β (IL-1 β) в сигналната каскада на този тип рецептори (**№31**). В литературата има данни, че А β отлаганията активират невроимунологична каскада, в която IL-1 β води до Glu-опосредствана дегенерация на холинергичните клетки, а от друга страна стимулира амилоидогенното разграждане на APP. На тази база в своите изследвания проф. Кирацов изхожда от хипотезата, че IL-1 β в заболялия мозък може да наруши холинергичната невротрансмисия, повлиявайки мускариновите рецептори. За проверка на тази хипотеза холинергично диференцирана невробластомна клетъчна линия е третирана с IL-1 β и холинергичния агонист карбахол като ефектът върху сигналната каскада на мускариновите рецептори е изследван чрез измерване хидролизата на фосфионзитид, активността на ацетилхолинестеразата и ДНК-свързващата способност на

транскрипционни фактори NF κ B и AP-1. Основното заключение от тези опити е, че хроничното третиране с IL-1 β потиска сигналния път на мускариновите рецептори, най-вероятно посредством NF κ B и AP-1. Това подкрепя хипотезата, че IL-1 β е фактор в холинергичните дефицити при АБ и разкрива NF κ B и AP-1 като потенциални мишени за терапия на АБ.

Пионерни и оригинални са изследванията на проф. Кирацов (№1), които търсят отговор на въпроса дали VEGF повлиява метаболизма на APP. Като модел в тези изследвания са използвани трансгенните Tg2576 мишки (виж по-горе). Моделът е подходящ, тъй като в мозъка на възрастните мишки се наблюдават характерните за АБ амилоидни отлагания. В срезове от мозъка на тези мишки проф. Кирацов наблюдава повишена VEGF-имунореактивност на васкуларните ендотелни клетки, като повишените нива на VEGF са потвърдени количествено с ELISA. Тези резултати са в съгласие с литературни данни за повишени нива на VEGF в мозъка на АБ пациенти. Интересна е наблюдаваната взаимовръзка между А β пептидите и VEGF. От една страна, чрез корелационен анализ е изключена възможността експресията на VEGF да се влияе от А β , а от друга е намерено, че третирането на срезовете с VEGF инхибира образуването на разтворим А β (А β 1-40 и А β 1-42), докато от фибриларните форми на двата пептида се повлиява (повишава) само А β 1-42, чието относително съдържание в АБ пациенти е известно, че нараства. Всички тези данни подсказват възможно участие на VEGF в β -амилоидогенезата при АБ и разкриват врати за нови изследвания.

Влияние на амилоидния β -пептид върху електричната активност на невронални клетки

Интересът към APP, на който проф. Кирацов е отделил голяма част от своите изследвания, се дължи на факта, че процесингът на белтъка е потенциален източник на А β пептид, който **агрегира** и образува ядрото на сенилните плаки. В литературата обаче се натрупват все повече данни за невротоксичността на **разтворимия А β** и се оформя представата, че основен патологичен белег на АБ са не сенилните плаки, а загубата на синаптични контакти. Агрегацията и отлагането на А β се разглежда по-скоро като защитен механизъм срещу невротоксичността на разтворимите му форми. Поради това проф. Кирацов насочва изследванията си към ефекта на **разтворимия А β** върху електричната активност на неврони, свързани в мрежа посредством синаптични контакти. За тази специфична цел за първи път са използвани „невронални мрежи, култивирани върху микроелектроди“ с произход от фронтален кортекс и гръбначен мозък на мишки, които са третирани с разтворима форма на биологично активния А β (А β ₂₅₋₃₅) пептид. Намерено е, че той намалява бързо, концентрационно зависимо и обратимо електричната активност на невроналните мрежи, получени от гръбначния мозък, докато кортикалната култура е засегната по-слабо (№16, №17). Допуснато е, че наблюдаваните разлики се дължат на преобладаването на различни трансмитерни системи в двете невронални мрежи. Тези първи резултати водят до заключението, че предизвиканото от разтворимия А β ₂₅₋₃₅ намаляване на електричната активност на невроните, а с това и нарушаване на комуникацията между нервните клетки, е ключов елемент в патологията на АБ. В тази връзка имам следния **ВЪПРОС: Има ли данни за концентрацията на разтворим А β в мозъка на здрави индивиди и АБ пациенти?** Въпросът ми е продиктуван от факта, че

наблюдават инхибиращ ефект на Аβ в концентрации от 25 nM до 77 nM и над 1 μM. Дали концентрациите на Аβ в мозъка на АБ пациенти попадат в тези граници?

В литературата има съобщения, че АБ патологията е свързана с окислителен стрес, предизвикан от Аβ. В експерименти, проведени с невронални мрежи от гръбначен мозък, оксиданти (FeSO_4 , H_2O_2) и антиоксиданти (витамин Е, пропилгалат) е отхвърлена възможността ефектът на Аβ да се дължи на окислителен стрес (**№19, №20**) – заключение, което има потвърдителен характер. По-логично изглежда допускането, че Аβ действа посредством рецептори в синапсите. За проверка на това допускане невроналните мрежи са третирани с бикикулин и стрихнин, които са антагонисти съответно на инхибиторните невротрансмитери γ-аминомаслена киселина А и глицин (**№18**). В резултат е направено заключението, че Аβ действа най-вероятно като агонист на рецепторите за тези инхибиторни невротрансмитери. Това заключение е потвърдено в следващи изследвания, които демонстрират сходно действие на психотропното лекарство диазепам (**№24**).

В други изследвания проф. Кирацов сравнява ефекта на фрагмента Аβ₂₅₋₃₅ върху електричната активност на невронални клетки с този на ендогенните форми на амилоидния пептид Аβ₁₋₄₀ и Аβ₁₋₄₂. В тези изследвания е установено, че инхибиторният ефект на Аβ₂₅₋₃₅ е най-силен, следван от този на Аβ₁₋₄₂ и Аβ₁₋₄₀. Наблюдението е интересно с това, че подреждането на Аβ пептидите отразява тяхното участие в образуването на амилоидни плаки. Допуснато е, че различният по сила ефект на пептидите се дължи на разлики в механизма им на действие или на тяхната структура, което изисква допълнителни изследвания (**№21, №23**). В проведените дотук опити с невроналните мрежи са използвани разтворими форми на различните Аβ пептиди. Тъй като в литературата данните за токсичността на разтворимия и агрегирал Аβ са противоречиви, е предприето изследване, в което са сравнени ефектите на мономерен (разтворим) и агрегирал Аβ₁₋₄₂ (**№26**). Този пептид е избран поради преобладаването му в амилоидните плаки. След процедура за олигомеризация на пептида, неговата агрегация е потвърдена електрофоретично и са предприети целевите изследвания. Направен е категоричният извод, че Аβ₁₋₄₂ потиска електричната активност на невроналните мрежи в мономерна форма, но не и в агрегирало състояние. Този извод подкрепя оригиналната хипотеза на авторите на изследването, която е алтернативна на „каскадната хипотеза“ за патогенезата на АБ и гласи, че разтворимите Аβ мономерни нарушават синаптичната функция, което води до загуба на комуникация между неврони.

Изследване на транскриптома в синаптозомална фракция

В рецензираните от мен дотук публикации на проф. Кирацов е отделено специално внимание на синапсите във връзка с изказаната по-горе хипотеза за тяхното въвличане в патогенезата на АБ. За по-детайлна характеристика на протичащите в синапсите процеси е предприето широкомащабно изследване на транскриптома в изолирани синаптозоми от мишки чрез прилагане на един от най-съвременните молекулярнобиологични методи - секвениране от ново поколение (NGS). Интересът основателно е насочен не към протеома, а към транскриптома, който много по-всеобхватно отразява протичащите процеси, поради регулаторната роля на некодиралите РНКи. Изследванията са аргументирани от факта, че липсват данни за промените в синаптозомалния транскриптом

по време на непатологичното стареене. Предприети са две групи изследвания на транскриптома в синаптозомални фракции от кортекса на млади (2.5 месечни) и стари (23 месечни) мишки.

Значим научен принос в първата група изследвания (**№2**) е откриването на 6 642 диференциално експресиращи се гени (DEGs) в млади и стари мишки, неанотирани до момента в референтния миши геном, от които почти всички (99.9%) са за некодиращи РНКи. Интересна е находката, че от тези неописани 6 642 транскрипта, само 17 се експресират и в двете групи животни. Най-много (4 670) са гените, които се експресират само във възрастния мозък, поради което могат да се разглеждат като потенциални молекулни маркери на стареенето. Като такива биха могли да се разглеждат 389 дълги интервениращи некодиращи РНКи, за които авторите на изследването намират ортолози в човешкия геном. Чрез анализ на генната онтология на анотираните в мишия геном белтък-кодиращи DEGs (233 на брой) е установено, че гените с понижена експресия в стареещите синаптозоми се отнасят основно до клетъчната миграция, а тези с повишена експресия са свързани с невротрансмисията, имунния отговор и регулиране на генната експресия. Един такъв ген (*Clp1*) привлича вниманието на изследователите, поради над сто пъти завишената му експресия в стареещите синаптозоми. Повишената експресия на *Clp1* гена е доказана с няколко независими метода на ниво РНК (RT-qPCR) и белтък (имуноблотинг, имунохистохимично оцветяване). Относно локализацията на белтъка CLP1 е намерена частична такава в синаптозомите и изместване към невроналните израстъци на хипокампални неврони в мозъка на стареещи мишки. Белтъкът CLP1 представлява мултифункционална киназа, участваща в сплайсинга на различни видове РНКи в т. ч. на тРНК, чиито сплайсинг е нарушен при невродегенеративни заболявания. Тези изследвания, проведени с безпрецедентна резолюция, представляват съществен научен принос. Те показват за първи път зависимости от възрастта промени в експресията на белтък-и РНК-кодиращи гени в синаптозомите. Изследванията са публикувани в престижното списание *Neurobiology of Aging* (IF₂₀₁₇ 4.7).

Във втората група транскриптомни изследвания акцентът е върху кръговия транскриптом в синаптозоми от млади и стари мишки. Известно е, че мозъкът е обогатен както на дълги некодиращи РНКи, така и на кръгови РНКи (circРНК), последните от които будят интерес с потенциалната си възможност за трансляция. Има данни, че circРНК се експресират преференциално от гени, кодиращи синаптични протеини и че някои circРНК се откриват в синапсите. Въпреки това до момента няма публикувани данни за промени в кръговия транскриптом по време на стареенето. Изследванията на проф. Кирацов запълват тази празнина, като представят данни от биоинформатичен анализ на circРНК и експериментално валидирани circРНК в синаптозоми, изолирани от кортекса на млади и възрастни мишки (**№1**). Както в предишното изследване е наблюдавано, че общият брой circРНК е по-голям в синаптозоми от стари (3 778) в сравнение с млади (2 836) мишки, но в този случай делът на circРНК, експресирани в двете възрастови групи е по-голям (1 506/6 614). Друга съществена разлика е, че само 4 от общите гени за circРНК са диференциално експресирани в млади и стари мишки. Всичките 4 гена (*Dgkd*, *Hdac4*, *Ptpn4* и *Robo2*) кодират белтък и са по-слабо експресирани в старите мишки. Експресията на 4-те гена и на ген, експресиран само във възрастни мишки (*Igf1*), е експериментално валидирана чрез RT-qPCR. Анализът на генната онтология показва, че както в младите, така и в старите

синаптозоми се експресират предимно *circRNA* гени, свързани с неврогенезата, невроналната протекция и организация на синапсите, което е очаквано. За значението на изследванията върху кръговия транскриптом говори фактът, че те са публикувани от издателство Elsevier в списанието *Neuroscience* (IF₂₀₂₀ 3.244).

Сравняване на методите за определяне на белтък по Lowry и Bradford

Разглеждам тези изследвания в края на моята рецензия, тъй като те са методични. Това, разбира се, не омаловажава тяхното значение като се има предвид, че белтък е определян в голяма част от целевите изследвания. Основните изводи, направени в тази точка от дисертацията са, че методът на Bradford измерва занижени белтъчни концентрации в сравнение с метода на Lowry и че една и съща белтъчна проба след замразяване на -20°C показва понижена концентрация с Bradford метода (**№5-7**). Проявих специален интерес към тази част от резултатите в дисертацията, тъй като те потвърждават по-късно наше наблюдение, свързано с измерване концентрацията на пречистен белтък (човешки интерферон-γ) спектрофотометрично и по метода на Bradford (Mironova *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(51):51068). Ние също измерихме по-ниска (4 пъти) концентрация с метода на Bradford и показахме, че това се дължи на неензимно гликозилиране (гликиране) на белтъка по време на неговата *in vivo* синтеза. Изтъквам този факт, тъй като гликирането е процес, чиято роля в процесите на стареене е добре известна. В този контекст намирам за много точно и далновидно изказаното от проф. Кирацов предположение, че причината за измерената по-ниска концентрация на белтъците след замразяването им е тяхното „стареене“.

Обсъждането на резултатите не е отделено в самостоятелна глава, но във всяка точка, докладваща резултатите, последните са много задълбочено дискутирани в контекста на съществуващите литературни данни и дообогатяват разбирането на читателя за интимните механизми на процесите, въввлечени в развитието на АБ патологията. Приемам всички **11 изводи, 10 оригинални научни и 2 научно-приложни приноси**, формулирани от проф. Кирацов, тъй като те вярно и точно отразяват резултатите от неговите изследвания. Нямам забележки към **афтореферата**, който представлява съкратена версия на обемния дисертационен труд и отразява неговото есенциално съдържание.

Наукометрични показатели и съответствие с минималните изисквания

Проф. Кирацов е публикувал общо **31 журнални статии** по темата на дисертацията с **общ импакт-фактор 30.23**. В повече от половината статии (18/31) той е първи автор, което подчертава водещата му роля в провежданите изследвания. В световноизвестната база данни за научна информация Scopus научните трудове на проф. Кирацов, включени в дисертацията, са **цитирани 257 пъти** като общият брой цитирания (в т. ч. в дисертации, книги и патенти) е значително по-голям – 425. Резултатите от проведените изследвания са представени на общо 45 научни форума у нас и в чужбина. В таблицата по-долу е представено съответствието на активите на проф. Кирацов с минималните национални изисквания (съгласно ППЗРАСРБ изм./доп. ДВ. бр.15/19.02. 2019) и тези на ИЕМПАМ-БАН

за придобиване на научната степен „Доктор на науките“, от която се вижда, че неговите активи надхвърлят близо два пъти изискуемия минимум.

Показател	Минимум точки	Изпълнени
А – Дисертация за ОНС „Доктор“	50	50
Б – Дисертация за НС „Доктор на науките“	100	100
Г – Научни публикации	100	130
Д – Цитирания в Scopus	100	372
Общ брой точки	350	652

Забележки

Имам следните несъществени забележки:

1. Термините „линеарна“ (стр. 18), „центрофугация“ (стр. 51) и „черти“ (стр. 82) по-добре звучат на български като „линейна“, „центрофугиране“ и „ивици“ (става въпрос за различните електрофоретични фракции).
2. Означенията на някои фигури (напр. вмъкнатите графики във Фиг. 33) са нечетими, вероятно поради директната им репродукция от публикуваните статии.
3. На стр. 144, предпоследен ред, „сериен срезове (16 μM)“ вероятно трябва да бъде „сериен срезове (16 μm)“.
4. На Фиг. 5 мерната единица на абсцисата би трябвало да бъде μM вместо mM .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проф. Кирацов ни представя едно задълбочено изследване върху причините за социално значимо и към момента нелечимо невродегенеративно заболяване (Алцхаймеровата болест). С предложените нови модели, хипотези и тяхната проверка това изследване допринася съществено за разбиране на биохимичните основи на заболяването и на неговата патогенеза на молекулно ниво. Резултатите от тези изследвания са публикувани в престижни списания и са намерили адекватен отзвук сред международната научна общност. Наукометричните показатели на проф. Кирацов напълно отговарят и надхвърлят минималните национални изисквания и тези на ИЕМПАМ-БАН за придобиване на научната степен „Доктор на науките“. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на членовете на Научното жури да гласуват **ЗА** присъждане на Научната степен „Доктор на науките“ на проф. д-р Людмил Пенев Кирацов.

25/05/2021 г.

Рецензент:



/проф. Р. Миронова/