

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ,
ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ
Вх. № 122
18.05 2021 г.
СОФИЯ

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Димитър Кадийски, доктор на медицинските науки,

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) към БАН, София,

на дисертационен труд за присъждане на академична научна степен „доктор на науките“ (01.06.10 „Биохимия“, Професионално направление 4.3. „Биологични науки“).

Автор: проф. Людмил Пенюв Кирацов, доктор

Тема на дисертационния труд:

БИОХИМИЧНИ ОСНОВИ НА АЛЦХАЙМЕРОВАТА БОЛЕСТ

1. Общо представяне на автора, процедурата и материалите.

Представеният ми комплект материали на хартиен и електронен носител от проф. Людмил Кирацов, включва: 1. Заявление за допускане до защита 2. Професионална автобиография по европейски образец 3. Копие от документ за придобита образователна и научна степен „доктор“ 4. Дисертационен труд 5. Проект за автореферат 6. Списък на публикациите, свързани с темата на дисертацията 7. Копие на публикациите, включени в дисертацията 8. Списък на научните мероприятия, на които са представени резултати от дисертацията 9. Списък на цитатите на публикациите, включени в дисертацията 10. Справка за научните приноси 11. Справка за изпълнение на минималните изисквания на ИЕМПАМ за придобиване на научната степен „доктор на науките“.

Налице са всички изискуеми документи за провеждане на защита на дисертационен труд за придобиване на научната степен „доктор на науките“.

Справката за изпълнение на минималните национални изисквания показва, че наукометричните показатели на автора, извън включения обем при досегашната му регистрация в НАЦИД, са напълно достатъчни според изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците за откриване на процедура за защита на дисертационен труд за присъждане на академичната степен „доктор на науките“.

Проф. Людмил Кирацов завършва висшето си образование през 1981 г. по специалността Биохимия в Лайпцигския Университет, Германия, а през 1982 г. защитава дипломна работа в областта на невробиохимията в Институт за изследване на мозъка Паул Флексиг, Лайпциг. От 1984 г. до 1988 г. той е докторант по невробиохимия и

защитава докторска дисертация в Института за изследване на мозъка Паул Флексиг, Лайпциг.

След този период проф. Кирацов реализира последователно академичното си и кариерно израстване от биолог, през научен сътрудник, до доцент и професор в областта на невробиологията и биохимията съответно. В периода 1994-1998 г. проф. Кирацов е пост-докторант в Институт за изследване на мозъка Паул Флексиг в Германия. У нас научноизследователската дейност на проф. Людмил Кирацов намира своето място в Централната лаборатория по регенерация, Института по клетъчна биология и морфология, Института по експериментална морфология и антропология и Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) към БАН. Към момента проф. Кирацов продължава научната си дейност като опитен изследовател в Секцията по експериментална морфология на ИЕМПАМ в областта на невробиологията, биохимията и невроморфологията, отново в колаборация с невробиолози от Германия.

Като цяло научноизследователските търсения на автора са концентрирани в организиране и провеждане на изследвания, насочени към разкриване на интимни биохимични механизми, свързани пряко или индиректно с етиологията и патогенезата на Алцхаймеровата болест, както и в разработване и промотиране на съвременни научноизследователски методични разработки в полза за биомедицината.

Проф. Кирацов е титуляр на грантове, стипендии и многобройни колаборации с участия в международни проекти, основно с видни невробиолози в големи научноизследователски центрове в Германия.

Дисертационният труд на проф. Кирацов е изложен на 279 страници и е онагледен с 86 фигури и 9 таблици, включващи схеми, графики и микрофотографии. Цитирани са 697 литературни източника.

2. Актуалност на темата на дисертационния труд.

Удължаването на продължителността на живота на човека през последните столетия и съответно нарастването в количествено отношение на сенилните популации в развитата част на света е нов процес в историята на човешкия вид. Противно на очакванията, този процес засилва някои негативни здравословни последици за отделния индивид на базата на нарастване на широк спектър специфични за напредналата възраст патологични изменения, които няма как да не се проявяват в този случай. Изследванията

в представения ми за рецензиране дисертационен труд са насочени към Алцхаймеровата болест, която е актуален социален, включително икономически проблем и разпространението ѝ нараства, като резултат на казаното по-горе. Изясняването на патогенезата на Алцхаймеровата болест и една евентуална превенция на възникването ѝ е обещаваща стратегия за постигане на по-добро здраве в напредналата старческа възраст за част от обществото. За съжаление неясната етиология и неуточнените особености на необратимите хронични невродегенеративни увреждания на мозъка при болестта на Алцхаймер в значителна степен провалят усилията за превенцията ѝ, както и за създаване на потенциални терапевтични подходи. Всичко това подчертава изключителната актуалност към днешна дата на съдържанието на представения труд.

3. Литературна осведоменост на автора.

В литературния обзор е включена пълна историческа справка за заболяването и е дефинирана известната от гледна точка на медицината и морфологията структура на дегенеративните процеси в централна нервна система (ЦНС) при болестта на Алцхаймер. В обзора е наблегнато на значението на амилоидния прекурсорен протеин, ролята на секреторния прекурсорен протеин, както и на амилоидния β -пептид в организма. Тяхната физиологична и невротоксична роля е представена в условията на функционирането на централната нервна система. От невробиологична, а и вкл. от морфологична гледна точка, проф. Кирацов обобщава процесите на церебро-васкуларни отлагания на амилоидния β пептид, ролята на микроглията и загубата на синапси при протичане на Алцхаймеровата болест. Съпоставяйки различни публикации авторът прави корелация на измененията на определени биохимични показатели с клиничните данни при етапите на Алцхаймеровата болест. Отделно внимание е обърнато в литературния обзор на съществуването на генетични причини за Алцхаймеровата болест, както и на ролята на възпалителните процеси и оксидативния стрес. Направен е преглед на опитите за експериментално моделиране на Алцхаймеровата болест с цел създаване на успешни терапевтични подходи.

Чрез преглед на съществуващи в литературата теории и хипотези, проф. Людмил Кирацов разглежда причините за биохимичното преструктуриране в мозъка, довеждащо до невродегенеративни изменения, създаването на плаките, състава им и възникващите деформации в мозъчната морфология, водещи в последствие до смъртта на индивида.

В обзорната част на труда отделен раздел е посветен на трансформацията на сложен комплекс от биохимично активни компоненти на ЦНС, довеждащи до класическия

невродегенеративен изглед на структурата на мозъка. Структурата на ядрото на сенилните плаки, като основен патогномоничен феномен за болестта на Алцхаймер основно представлява концентрация от агрегирал амилоиден β -пептид ($A\beta$). За този пептид е установено, че е важният заподозрян за деструкцията и увреждането на невроните, наблюдавано при болестта на Алцхаймер, като по-късно се налага и разбирането, че амилоидният β -пептид ($A\beta$) е част от голям прекурсорен протеин – амилоидния прекурсорен протеин (APP). Това разбиране в съвременната невробиология е открило огромно поле за изследвания на биохимичните основи на болестта на Алцхаймер, на базата на което разбиране са и многобройните научноизследователски подходи на проф. Кирацов, отразени в научния труд.

4. Конструкция и обхват на дисертационния труд. Научни подходи, представяне на резултатите.

Целта на дисертационния труд е съвсем конкретна - **установяване на базисни биохимични подходи за научен скрининг на етиологията и патогенезата на болестта на Алцхаймер**. Ясното формулиране на целта на основание на обширния преглед на проблема в обзорната част е залог за създаване на един завършен труд с фундаментален и същевременно научно-приложен характер, съществен и за съответния клон на медицината.

За изпълнението на тази цел проф. Кирацов е включил в дисертационния труд резултатите от голям обем модерни и класически биохимични, хистологични, имунохистохимични, биотехнологични, морфологични, статистически и множество други **нови модерни методи**, какъвто например е *in situ* хибридизацията. Като базова техника за голяма част от експериментите е прилагано клетъчното култивиране, включително на невронални популации. Резултатите са изложени стегнато и нагледно.

Логиката на последователност на подреждане на резултатите в дисертационния труд следва стриктно заявления в заглавието тренд на научно търсене и в композиционно отношение проф. Кирацов е постигнал гладко и разбираемо подреждане на материала. Погледнато обратно - заглавието на научния труд е точна производна на съдържанието.

В началото е представен ключов резултат от проведено сравнение на чувствителността на основни методи за определяне на белтък. Тези ключови в науката методи са използвани многократно за остойностяване на резултатите от специфичните биохимични подходи при изследванията на автора. Констатацията, че методът на

Bradford дава по-ниски резултати за съдържанието на белтък във фракции, съдържащи биологични мембрани в сравнение с метода на *Lowry* е взета предвид при преценката на всички по-нататъшни резултати, включени в дисертацията. Неочакваният факт, установен от проф. Кирацов и колектив, за съществуването на флукутация в данните за белтъчно съдържание в зависимост от продължителността на съхранение на пробите при -20°C се явява важен за крайните резултати, а това е взето предвид от автора при отчитането на редица експерименти. Извеждането на първи план в дисертацията на този резултат представлява реална предварителна заявка за точност на биохимичната достоверност на всичко, което авторът ни представя по-нататък. За значението на установяването на този научен факт говори неговата оценка сред международната научна общност - цитиран е повече от 50 пъти в *Scopus* и 90 в *Google Scholar*.

Важна част от труда представлява представянето на резултати за различни **трансмисерни системи и сигнални молекули**, като тук авторът въвежда разнообразни експериментални модели. Например, за доказване на участието на васкуларният ендотелен растежен фактор (*VEGF*) в метаболизма на амилоидния прекурсорен протеин (*APP*) се експериментира върху първични астроцитни култури от трансгенни *Tg2576* мишки и култивирани мозъчни срезове от същите животни. Като резултат се демонстрира, че *VEGF* модулира амилоидогенезата.

При модела с нативни мозъчни срезове - в условия много по-близки до тези *in vivo* в мозъка в сравнение с клетъчното култивиране, са проведени оригинални изследвания за ролята на невротрансмисера глутамат при процесирването на амилоидния прекурсорен протеин. Резултатите на автора показват, че глутаматът повлиява концентрационно-зависимо секретирването на амилоидния прекурсорен протеин. Доказването при тези изследвания, че стимулирането на различни видове глутаматни рецептори има различен ефект върху процеса е от голямо значение за установяване на интимните механизми на патогенезата на болестта на Алцхаймер. В тази експериментална постановка е установено също, че секретираният амилоиден прекурсорен протеин няма обратна връзка със секрецията и претърпява допълнително калциево-зависимо разграждане.

Ролята на интерлевкин-1 β е изследвана с помощта на холинергично диференцирана клетъчна линия (*SH-SY5Y*) и е показано, че той допринася за холинергичните дефицити, най-вероятно чрез инхибиране на транскрипционни фактори. В друга експериментална постановка е моделирана **имунолезия** на холинергични неврони в базалните ядра на предния мозък. При лезията, проведена при мишки за първи

път е показано *in vivo*, че метаболизмът на амилоидния прекурсорен протеин (APP) в кортекса е под аферентна инервация. Много убедителна е демонстрацията за преодоляването на предизвиканата холинергична хипоактивност чрез присаждане на произвеждащи нервни растежни фактор клетки. При прилагане на имунолезия при трансгенни *Tg2576* мишки се постига оптимално моделиране *in vivo* на развита амилоидна патология.

За изследване на метаболизма на амилоидния прекурсорен протеин е промотиран и утвърден модел за изследване на изолирана синаптозомална фракция, чрез който се получават по-ясни отговори на стимулирането с различни агенти.

Като цяло в дисертацията доминират резултатите от детайлно и мащабно изследване на **промените на експресията на амилоидния прекурсорен протеин по време на онтогенезата** от ембрионален стадий до възрастни плъхове, както на ниво белтък, така и на ниво РНК. Промените на ниво белтък са проследени в хомогенат и за първи път в растежни конуси и синаптозоми. За изследванията на ниво РНК по време на същите стадии на развитие е използвана *in situ* хибридизация на срезове от ембриони и мозъци. Направено е сравнение на съдържанието на амилоидния прекурсорен протеин в мозък и периферни органи по време на развитието. Показана е основната роля на амилоидния прекурсорен протеин *APP695* в мозъка и са направени изводи за неговото значение при развитието.

С изключително оригинална и точна технология – **култивиране на неврони върху мрежа от микроелектроди** – за първи път е демонстриран директно ефектът на амилоидния бета пептид (A β) върху електричната активност на невроните. Амилоидният бета пептид (A β) повлиява бързо, концентрационно-зависимо и обратимо електричната активност. Доказано е, че ефектът не се дължи на оксидативен стрес, а най-вероятно на стимулиране на инхибиторни рецептори. Намерени са различия в ефекта на различните форми на амилоидния бета пептид A β (A β 25-35; A β 1-40; A β 1-42). Също така е доказано, че инхибицията се причинява от мономерни форми на амилоидния бета пептид (A β), а не от големи агрегати.

Резултатите от оригинално сравнително изследване на **синаптозомалния транскриптом** във фракции, получени от млади и възрастни мишки са разгледани от гледна точка на тяхното значение за биохимизма на болестта на Алцхаймер. Така във синаптозомите на възрастни животни е установено натрупване на голям брой вериги от дълги интервениращи некодиращи РНК, както и на кръгови РНК.

Анализът, засягащ **влиянието на олово** върху секрецията на амилоидния прекурсорен протеин APP, е дал възможност на автора за извеждане на оригинална хипотеза за механизма на токсичността на оловото върху невроналните клетки.

И накрая, тук е мястото да се отбележи, че дискутирането на многобройните научни данни в представения дисертационен труд върви паралелно с излагането на резултатите, което улеснява значително разглеждането му.

5. Изводи, приноси, публикации и въздействие сред научната общност

Дванадесет стриктно оформени извода, свързани с резултатите изложени в отделните глави на дисертацията обобщават съществени невробиологични, биохимични и методологични констатации, резултат от научноизследователската работа на проф. Кирацов за немалък период.

Справката за приносите на дисертационния труд показва 10 оригинални научни постижения и други два отделно, определени от автора като научно-приложни приноси, но представляващи важни оригинални методологични резултати, оценени високо в научната общност.

Цялостната научноизследователска дейност на автора, свързана с темата на дисертационния труд е отразена в 45 научни съобщения в различни форуми и е обект на представяне и дискусия в 31 научни труда на проф. Кирацов, публикувани в значими издания от рода на *Brain Res.*, *Eur. J. Neurosci.*, *Int. J. Dev. Neurosci.*, *Neuroscience*, *Neurobiol.*, *Aging*, и др. Общият импакт фактор на публикациите по дисертацията е 30,23.

Намерените от проф. Кирацов цитирания в чужбина (в публикации, дисертации, книги и патенти) на свързани с дисертацията му трудове са 425 на брой. Цитирания на публикациите по дисертацията отчетени в Scopus са 257.

6. Критични бележки и препоръки.

Непълноти по отношение на структурата, фактологията и резултатите не съм забелязал. Обемът, структурата и съдържанието на един дисертационен труд за академичната степен „доктор на науките“ във всички случаи са в значителна степен функция на преценката и решението на самия автор, така че не ги коментирам. Забелязаните от мен в дисертационния вариант за предзащита няколко терминологични несъответствия, дължащи се на неустановен все още на български превод на нозологични единици, имена и термини от чужди езици, бяха коригирани след лична беседа с автора.

Трябва да се има предвид обаче, че този проблем с терминологичните несъответствия в специализираната научна литература възниква често.

7. Представеният автореферат (в обем от 95 страници) отразява пълно резултатите и е изключително добре илюстриран с графики, схеми, цветни и чернобели микрофотографии. Той дава точна картина на съдържанието на дисертацията. Обемът и оформянето му отговарят на приетите изисквания според правилниците и ЗРАСЗРБ.

8. Заключение.

Представената дисертация съдържа нови съвременни данни, уточняващи фините биохимични механизми на невродегенеративните процеси при мозъчна патология. Авторът е вложил своите задълбочени теоретични познания и професионални умения в областта на невробиологията при научноизследователската си работа по време на академичното си и кариерно израстване. Получени са резултати, които са спомогнали за съставяне на качествен научен труд, обобщаващ базисни биохимични особености на етиологията и патогенезата на болестта на Алцхаймер. Научните и научно-приложни резултати синтезирани в изводите от дисертацията представляват оригинален принос в науката. Трудът е разработен компетентно, а за качеството на работата допринася и максималното използване на възможностите за научноизследователска дейност във водещи европейски университети и институти.

Във връзка с изложеното по-горе, убедено давам своята положителна оценка на представения ми труд и **предлагам на уважаемото научно жури да гласува положително по отношение на качествата на представената дисертация.**

На автора - проф. Людмил Кирацов – предлагам да бъде присъдена научна степен “доктор на науките” по специалност “Биохимия” - 01.06.10, професионално направление 4.3. - „Биологични науки“, тъй като натрупаният от автора научноизследователски материал в областта на невробиологията и биохимията, обобщен като дисертационен труд напълно отговаря за присъждане на такъв тип академична степен.

Изготвил рецензията:



Проф. д-р Димитър С. Кадийски, дмн

Гр. София

14.05. 2021 г.