

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Николай Еленков Лазаров, д.м.н.
за дисертационния труд на проф. Людмил Пенюв Кирацов, доктор
“БИОХИМИЧНИ ОСНОВИ НА АЛЦХАЙМЕРОВАТА БОЛЕСТ”
за присъждане на научната степен
“ДОКТОР НА НАУКИТЕ”

Дисертационният труд на проф. Людмил Кирацов е написан на 270 стандартни страници и е разпределен по раздели по следния начин: *Списък на използваните съкращения* – 2 стр., *Съдържание* – 5 стр., *Въведение* – 1 стр., *Цел на изследванията* – 1 стр., *Литературен обзор* – 34 стр., *Материал и методи* – 27 стр., *Резултати и обсъждане* – 149 стр., *Изводи* – 3 стр., *Библиография*, включваща 697 заглавия, всичките на латиница – 45 стр. Трудът е онагледен с 9 таблици и 86 фигури, в това число черно-бели и цветни микрофотографии, графики и диаграми. При това част от представените фигури представляват табла с няколко монтирани микроснимки, така че действителният брой на представената фотодокументация е по-голям. В отделно *Приложение* на 3 страници е дадена *Справка за научните приноси* на изследването и са изброени *публикациите и научните съобщения* на автора по дисертационния труд, и *техните наукометрични показатели* – 7 стр.

Темата на дисертационния труд е много удачно подбрана. Тя е посветена на един изключително актуален проблем на невродегенеративните заболявания: изясняване на етиологията и биохимичните механизми на възникване на болестта на Алцхаймер, и изграждане на ефективна терапевтична стратегия за нейното лечение. Добре известно е, че това прогресивно заболяване на мозъка е най-честата причина за сенилна деменция и представлява важен медицински проблем с голямо социално-демографско и икономическо значение. Актуалността и значимостта на проблема е очевидна и от забележителния експоненциален ръст на подобни изследвания и нови хипотези за генезата на болестта, публикувани в научната периодика през последните години. Независимо от факта, че заболяването е познато от повече от столетие и на него от края на XX век се отделя все по-голямо внимание от страна на невролози и невропатолози, все още сме далеч от пълното разбиране на причините, предизвикващи болестта и разкриване на детайлните етиопатогенетични механизми на възникване, развитие и поддържане на

болестната симптоматика в структурен, функционален и неврохимичен аспект. В този смисъл настоящето изследване представлява сполучлив опит за комплексно разглеждане на проблема във всичките му аспекти, с акцент върху проучване на биохимичните основи на заболяването, изясняване на причините за неговото възникване и търсене върху подходящи експериментални модели за други (генетични и биохимични) подходи за неговото лечение.

Уводът е кратък, стегнато написан и в синтезиран вид въвежда читателя в предмета на дисертационния труд.

Литературният обзор, след кратка и увлекателна историческа препратка, дава обширна информация за известното в познанията ни относно морфологичната и биохимична характеристика на Алцхаймеровата болест, връзката на установената патологична находка в мозъка и тежестта на клиничната картина, ролята на генетичната предиспозиция, възпалителния отговор, активираната микроглиална реакция и оксидативния стрес за произтичащите дегенеративни мозъчни промени. Със систематична точност, ясно и последователно, са описани многобройните експериментални модели, приложими при изследване на заболяването. По подходящ начин и достатъчно изчерпателно е предадена и информацията за смесената патология, съпровождаща Алцхаймеровата болест. От всички цитирани в библиографията литературни източници, 204 (>29%) статии са от последното десетилетие, включително 12 публикации от 2020 год, което е още едно доказателство за актуалността на разработвания проблем, пълнотата на библиографската справка и, не на последно място, за добрата литературна осведоменост на дисертанта по него. Отлично впечатление прави факта, че в края на прегледа на литературата в кратък заключителен параграф и резюмиран вид е изведено състоянието на разглеждания проблем и са очертани отворените и все още нерешени въпроси. Това е позволило на Кирацов да си постави точно целта на собствените изследвания.

По мое мнение тук, а не преди обзора, е мястото в дисертационния труд на формулираната **цел на изследването**, която логично следва от направения анализ на известното в литературата по темата на проучването. Независимо от променящите се във времето задачи, добре би било обаче, те да се формулират конкретно като се обвържат с приложените методи за тяхното реализиране. Това впрочем е направено в следващия раздел.

Разделът **Материал и методи** е подробен и много добре написан. За изпълнение на различните задачи е изследван материал от различни експериментални животни, основно гризачи (мишки и плъхове), но точният брой на използваните животни ми е трудно да определя. За по-добра прегледност, многобройният експериментален материал би могъл да бъде представен в таблична форма, разпределен по вид, възраст и пол. По презумпция приемам, че броят на опитните животни е достатъчен за получаването на статистически достоверни резултати, както и че в хода на изследванията са спазени необходимите етични изисквания при работа с експериментални животни. За решаването на поставените задачи са прилагани голям брой и различни биохимични методи за разделяне на протеини (полиакриламидна гел електрофореза), тест за изместване на електрофоретичната мобилност (EMSA), съвременни високоинформативни методи като клетъчно култивиране на кортикални мозъчни срезове, хибридохистохимия, ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) и имунохистохимия за доказване на амилоидния прекурсорен протеин (APP) и васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF), молекулярно биологични техники като полимеразна верижна реакция (PCR), имуоблот анализ с флуоресцентна детекция на фибриларен β -амилоиден пептид върху интактен и патологичен мозъчен материал, биоинформационен анализ на метаболитните пътища, статистически анализ на получените експериментални данни. За някои от използваните методи са разработени авторски модификации на известни техники. Детайлно са описани експерименталните модели и прилаганите методи. Използваните технически прийоми са изложени стъпка по стъпка с акуратност и последователност, позволяваща тяхната повтораемост от други изследователи.

Разделът **Резултати** е обединен с последващата **Дискусия** и е изложен на цели 149 страници, което е над половината от текста на дисертацията. Заслужава изрично да се подчертае факта, че всички авторски находки са солидно подкрепени от съответен илюстративен материал с детайлно описание. Той е разделен на 10 глави, повечето от които допълнително подразделени на подглави. В тях последователно и подробно са описани ефектите на факторите, повлияващи секрецията и метаболизма на APP, онтогенетичните промени в неговата експресия, влиянието на амилоидния β -пептид върху електричната активност на култивираните кортикални неврони и резултатите от сравнителния анализ на синаптозомалния транскриптом в младия и стареещ миши мозък. В хода на проучването е

установено, че L-глутамат чрез въздействие върху метаботропния глутаматен рецептор повлиява метаболизма на APP в главномозъчната кора, но неговото участие в патологичното му процесране и отлагане в сенилните плаки предстои да бъде изяснено. С имуноблот техника е изследвано влиянието на протеазните инхибитори върху секрецията на APP и е показано, че те увеличават sAPP с около 14%, което е верифицирано с тест за наличие на Ca^{2+} . В допълнение чрез метода на суперфузия е доказано, че sAPP не повлиява секрецията на APP. От друга страна, в култивирани мозъчни срезове от трансгенни мишки е установено, че VEGF повлиява процесирането на APP в астроцитите, намалява нивото на амилоидния β -пептид и потиска $\text{A}\beta$ -фибрилогенезата. Следвайки причинно-следствената логика, че отлагането на β -амилоидни фибрили предизвиква имунна реакция в мозъка, която задейства вътреклетъчната сигнална каскада, водеща до невронална загуба и дисфункция, дисертантът е изследвал влиянието на инфламаторни цитокини като интерлевкин- 1β (IL- 1β) върху нивото на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1 в холинергичните неврони на кората и е установил че повишената експресия на IL- 1β потиска медирания от мускариновите ацетилхолинови рецептори сигнален път чрез инхибиране на тези транскрипционни фактори. Получените данни дават основание на Кирацов да предложи възможна таргетна терапия на болестта на Алцаймер чрез фармакологично регулиране на тяхната функция. По-нататък, върху експериментални модели на холинергична дегенерация в базални ядра на предния мозък у плъхове той е проследил имунохистохимичната локализация на невроналния растежен фактор (NGF), на неговия ниско-афинитетен рецептор и нивата на холинергичните маркери холинацетилтрансфераза (ChAT) и M1 мускаринов рецептор в трансплантирани в мозъка фибробласти, продуциращи NGF. При тези експерименти е доказано, че частичната холинергична имунолезия води до намаляване на ChAT в кортекса с около 60%, а присаждането на NGF-произвеждащи фибробласти след дегенерацията възстановява нормалната активност на ChAT в базалните ядра на предния мозък. Ефектът на частичната холинергична денервация върху метаболизма на APP в мозъка на трансгенни мишки се изразява в повишената му експресия на PHK и протеинно ниво, което е установено посредством *in situ* хибридизация, имуноблот тестове и имунохистохимично оцветяване. Авторът предполага, че повишените нива на амилоид в този случай се дължи на промяна в процесирането на APP или на влошено отстраняване на $\text{A}\beta$. Нещо повече, при

този модел са установени и други важни патоморфологични белези на болестта като хипокампадна атрофия и загуба на синапси. Кирацов използва също изолирани синаптозомални фракции като моделна система за изследване секрецията на APP. Онтогенетичните промени в експресията на APP са проследени в хомогенат, растежни конуси и синаптозоми от развиващ се плъши мозък и се характеризират с ниската му концентрация в ембрионалния мозък и повишени постнатално нива. По време на развитието са проследени и промените в експресията и локализирането на APP транскрипти в ембрионален и развиващ се мозък и някои други органи и скелетни мускули и е установено че APP695 е основната експресирана изоформа. От тези изследвания е направено важното заключение, че индуцираното от разтворимия A β намаляване на електрическата активност на невроните е ключов елемент в патологията на болестта и то не се дължи на оксидативен стрес, а по-скоро на агонистичното му въздействие върху инхибиторните невротрансмитери. Този ефект на амилоидните пептиди е сходен с ефекта на други невроактивни вещества като диазепам. В тази връзка се допуска, че A β мономерите нарушават невроналните вериги и синаптичната комуникация между кортикалните неврони, което води до дегенерация на синапсите и невронална смърт. Сравнителният анализ на секвенирания синаптозомален транскриптом в мозъка на млади и възрастни мишки е позволило да се картират засегнатите гени, кодиращите участъци (екзони) и не кодиращи последователности (интрони), които експресират уникални кръгови РНК. От това се съди за въздействието върху дисрегулацията на протеин-кодиращите гени, водещо до процесите, свързани с Алцхаймеровата болест.

Обсъждането на авторските находки е направено с вещина и показва завидното умение на дисертанта да интерпретира собствените резултати, съпоставяйки ги с известните факти в релевантната литература, и интегрирайки ги да направи ценни изводи за клиничната практика. Особено важна в практически аспект намирам дискусията за възможното приложение на получените резултати в изграждане на ефективна терапевтична стратегия за лечение на Алцхаймеровата болест. Според мен дисертационният труд би придобил по-завършен вид с един заключителен раздел (или поне параграф), в който в резюмиран вид да се обобщят заключителните бележки на автора относно установените в това изследване научни факти и се набележат насоките за бъдещи изследвания по проблема.

Разделът **Изводи** съдържа основните изводи от проучването. Те са написани стегнато и точно отразяват заключенията на автора от находките в настоящия дисертационен труд. Като цяло приемам тяхната формулировка и научна стойност. Единствено извод 6 по моя преценка съдържа както изводи, така и авторски принос, а изводи 9 и 10, макар и конкретни, са твърде обстоятелствени. За по-доброто изпъкване на научните постижения на дисертанта, голяма част от които имат определено оригинален характер, те би следвало да бъдат изведени не в приложението, а непосредствено след изводите, така както е направено в автореферата на дисертационния труд.

Основните **приноси** на дисертационния труд биха могли да се резюмират както следва:

1. Изяснена е ролята на амилоидния β -пептид върху електричната активност на нервните клетки и връзката между секретирания амилоиден прекурсорен протеин и секрецията на APP.
2. Доказана е модулаторната роля на васкуларния ендотелен растежен фактор в амилоидогенезата.
3. Постулирано е участието и е изяснен механизма на действие на провъзпалителни цитокини като интерлевкин-1 β в етиологията на Алцхаймеровата болест.
4. Създадени са експериментални модели за изследване ефекта на холинергичната инервация върху процесираването на амилоидния прекурсорен протеин.
5. Направена е сравнителна характеристика на експресията на амилоидния прекурсорен протеин в мозъка и периферни органи в хода на онтогенезата.
6. Предложен е оригинален модел за изследване на процесираването на амилоидния прекурсорен протеин в синаптозомалната фракция, чрез който е изследван транскриптома в млади и възрастни мишки и са установени некодиращи и кръгови РНК във възрастни синаптозоми.

Документацията като цяло е с много добро качество и нагледно илюстрира авторските находки. Добавянето на указателни знаци и символи към микрофотографиите значително би улеснило незапознатия читател в ориентацията и оценката на авторските находки. От друга страна, статистическите данни, представени в прегледни таблици и диаграми, дават богата и точна нагледна информация за установените количествени показатели.

Дисертацията е написана на разбираем език и ясен научен стил със съответната специфична терминология. Проектът за **автореферат** на дисертационния труд е изготвен съгласно изискванията. Той отразява адекватно и в достатъчен обем състоянието на изучавания проблем, поставената цел на изследването, използваните методи за нейното реализиране, получените резултати, тяхното аналитично описание и интерпретиране на собствените данни, както и направените авторски изводи и приноси.

Няма съмнение, че настоящият дисертационен труд е **лично дело** на проф. Кирацов. Това се доказва недвусмислено и от представения списък на научните публикации по темата на дисертацията, като в мнозинството от тях (25 = 80%) той е водещ автор. Резултатите от експериментите са отразени в **31 научни статии**, 8 от които в авторитетни международни журналы като *Neurobiology of Disease*, *Neurobiology of Aging*, *Neurochemistry International*, *International Journal of Developmental Neuroscience*, *Neuroscience*, *European Journal of Neuroscience*, *Brain Research*. Отделно е представен списък с 45 научни съобщения в наши и международни научни прояви, а 2 от тях са публикувани в престижни научни списания като *Alzheimer's and Dementia* и *Journal of Neurochemistry*. **Общият импакт фактор** на списанията с публикуваните научни трудове, включени в дисертацията (по данни на кандидата) е **30,23**. Научните постижения на дисертанта в настоящия труд са намерили достойно отражение в специализираната литература. Научните трудове са цитирани общо 425 пъти в научни списания, дисертации, научни книги и патенти, вкл. 257 цитирания, отбелязани в Scopus.

В **заключение** констатирам, че дисертационният труд на проф. Людмил Кирацов е фактологично издържан и внася съществен принос за фундаменталната невронаука, в частност за разбиране на механизмите на възникване на невродегенеративните заболявания, и има значим теоретично-приложен принос за съвременната им фармакотерапия. То е добре замислено проучване, което е прецизно методично обосновано, проведено е акуратно с разнообразни и съвременни похвати и е сполучливо осъществено. Трудът е подходящо изложен, богато и перфектно илюстриран, ясно и добросъвестно дискутиран. Резултатите от него имат определено практическо значение за намиране на подходяща таргетна терапия на болестта на Алцхаймер. Значимостта на научните приноси на дисертацията са видни от приложената по-долу сравнителна таблица с наукометричните

показатели на представените от дисертанта материали, които покриват задължителните национални изисквания и почти двукратно надхвърлят минималните количествени критерии на ИЕМПАМ-БАН за присъждане на научната степен «доктор на науките»:

Група показатели	Показател	Задължителни количествени критерии за присъждане на научната степен „доктор на науките“ (минимален брой точки)	Наукометрични показатели на проф. Людмил Кирацов (верифициран брой точки)
А	1. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"	50	50
Б	2. Дисертационен труд за присъждане на научната степен "доктор на науките"	100	100
Г	3. Научни публикации, които не са използвани за регистрация в НАЦИД и имат Q-фактор	100	130
Д	4. Цитирания посочени в Scopus, които не са използвани за регистрация в НАЦИД	Минимален брой = 100 т.	Общ брой = 372 т.
Общ брой		350	652

Всичко посочено по-горе ми дава вътрешната увереност да дам положителна оценка на разработения дисертационен труд и в качеството ми на член на Научното жури по процедурата да подкрепя с положителен вот присъждането на научната степен “доктор на науките” в професионално направление 4.3. Биологически науки, по научна специалност „Биохимия“ (шифър 01.06.10) на проф. д-р Людмил Пенюв Кирацов.

Рецензент:

(проф. д-р Николай Лазаров, д.м.н.)

София, 14.05.2021 г.