

СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № Заповед № I-37/01.04.2019 г. на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН

за получаване на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология)

Автор на дисертационния труд: **Стефан Андреас Енгибаров**

Тема на дисертационния труд: **„ПОЛУЧАВАНЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА НОВА НЕУРАМИНИДАЗА ОТ *AEROMONAS CAVIAE* 40/02“**

Изготвил становището: **проф. Мария Ангелова, д.б.н.**

Макар и известен отдавна като фактор на патогенността и ключов партньор в метаболизма на сиаловите киселини, в последните години ензимът неураминидаза/сиалидаза преживява истински изследователски бум. Това фактически е цяло семейство гликозил-трансферази, демонстриращи голямо биохимично разнообразие. Проучванията относно наличието им в про- и еукариотни организми, тяхната филогенетична еволюция, както и биологичната им роля в инфекциозния процес, във формирането на бактериални биофилми и в модулирането на имунната защита на гостоприемника са иновативните аспекти в тази област. Едновременно с това, приложението на неураминидазите все повече привлича вниманието на учените и бизнеса от химическата и фармацевтичната индустрия. И в двете посоки има неизследвани ниши: сериозен интерес представлява разпространението на ензима, условията за неговата синтеза и физико-химичната му характеристика, търсят се нови продуценти и нови ефективни препарати за приложение. Някои от тези въпроси са в основата на предложения дисертационен труд, което подчертава неговата **актуалност и значимост**. Освен това, дисертацията на Стефан Енгибаров е част от концепцията на проф. Абрашев за съществената роля на ензима неураминидаза в метаболизма на бактериите. Разработката е логично продължение на дейността в неговата школа, единствената в Източна Европа, която работи системно върху този проблем. След смяната на научния ръководител (по обективни причини), основната насоченост бе запазена, а именно - проучване разпространението на ензима неураминидаза в представители на род *Aeromonas* както и възможностите за избор на нов ефективен продуцент на ензима. Тя произтича от липсата на данни за бактерии от този род.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 96 компютърни страници, които включват 74 страници текст и

21 страници литература. Материалът е онагледен с 12 таблици и 23 фигури, по-голямата част от които са комплексни. Много професионално са представени и снимките на микроорганизмите и на електрофорезите. Текстът е балансиран както по обем, така и по съдържание.

Литературният обзор представя информация за съвременното състояние на проблема и обхваща всички направления на разработката. В него са отразени 227 литературни източника (3 на кирилица и 224 на латиница), като над 30% от тях са от последните 10 години. Отделено е внимание на постигнатото в различните направления, определящи съвременното ниво на изследвания. В обзора са отразени както исторически данни, така и последните новости, очертана е актуалността на подобен род изследвания, посочена е възможността за използването на ензима в различни области на науката и практиката.

Целта на изследванията е изведена от нерешените въпроси, от стремежа на докторанта и неговия научен ръководител да кажат нещо ново за бактериалните неураминидази. Формулирани са 9 конкретни задачи, които обхващат всички задължителни стъпки за реализирането на тази цел. По мое мнение, те могат да бъдат обединени и представени като 7 на брой.

Разделът „Материали и методи“ отговаря на мултидисциплинарния характер на разработката, използвани са рутинни и съвременни микробиологични, биохимични и молекулярно-генетични методи. Всички те са адекватни на изследванията и създават предпоставка за коректни резултати. Освен това, методите са представени разбираемо, без излишни подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени.

В раздел „Резултати и обсъждане“ в логична последователност е отразен значителен експериментален материал относно разпространението на ензима в 40 щамове от род *Aeromonas* и неговата характеристика в избран продуцент. Искан да отбележа много детайлната работа по идентифицирането на този продуцент, където Енгибаров използва всички възможни подходи, за да определи достоверно неговата видова принадлежност като *A. caviae*. Следващите експерименти установяват физиологичните и биохимични свойства на щамове, доказват общото с характеристиките на вида и някои отличителни особености. Ензимният потенциал също е в съответствие с високата вирулентност на представители от род *Aeromonas*. Най-подробно е проучена способността на щам *A. caviae* A40/02 като продуцент на неураминидаза; оптимизирани са условията за максимална биосинтеза; установена е ролята на индукцията и връзката с фазата на развитие на микроорганизма. Дисертационният труд предлага оригинална

схема за изолиране на ензима, при която се постига 480 пъти пречистване при добив 24%, което е унисон с резултатите за други бактериални неураминидази. Интерес представлява работата на докторанта по охарактеризиране на ензима, който е първият публикуван за вида *A. caviae*. Доказана е зависимостта на ензимната активност от основните физико-химични фактори, както и неговата субстратна специфичност.

Искам специално да обърна внимание на дискусията, в която се открива стила на Енгибаров – да обяснява защо провежда изследването, какво очаква от него и какъв е изводът. Този начин на обсъждане предоставя възможност на читателя да възприеме идеята и резултатите на дисертационна тема.

Според мен, **изводите** са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Приемам и формулировката на **приносите**.

Към докторант Енгибаров имам следните **въпроси**:

1. В кои други организми, освен вируси и бактерии, е установено наличие на ензима неураминидаза?

2. Установени ли са съществени разлики в структурата и свойствата на неураминидаза, синтезирана от про- и еукариотни организми?

Извършените в разработката изследвания дават възможност да се открият сериозни **теоретични и приложни приноси**, както оригинални, така и потвърдителни. По същество, те се отнасят до следното:

1. Получени са нови доказателства за разпространението на ензима неураминидаза в бактерии от род *Aeromonas*.

2. За първи път е установено наличието на ензима неураминидаза в представител на вида *Aeromonas caviae*.

3. Намерен е добър продуцент на ензима, който е идентифициран с биохимични и молекулярно-биологични методи.

4. Разработена е схема за получаване на пречистен препарат и са установени неговите физико-химични свойства. За първи път е охарактеризиран ензим с неураминидазна активност от бактерия от род *Aeromonas*.

5. За първи път са получени данни за метаболизма на сиаловите киселини при представител на род *Aeromonas*.

Резултатите от дисертацията са включени в 4 научни статии. Две от статиите са публикувани в реномирани списания с ИФ (*Annals of Microbiology* и *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*) и 2 – в специализирани научни журналы (*Problems of*

Infectious and Parasitic Diseases и Ecological Engineering and Environment Protection. Общият ИФ е 1.502. Една от статиите вече е цитирана два пъти. Енгибаров е представил 4 научни доклада и 1 постер на научни форуми. В 8 от научните трудове (3 статии и 5 участия) той е на първо място. Всичко това ми дава основание да считам, че резултатите от дисертацията са станали достояние на международната научна общност и докторантката има основен дял в тази разработка.

В заключение искам да подчертая, че материалът, който представя Стефан Енгибаров е дисертабилен, темата е актуална и предлага ново съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. В процеса на обучение докторантът е усвоил широк набор от модерни методи, а така също умението да интерпретира получените резултати, да търси и критично да оценява подобни изследвания в литературата и да формулира обяснения. Според мен, получените резултати са достоверни и са база за следващи научни и приложни разработки. Всичко това е резултат на много доброто познаване на проблема, задълбочената научна разработка и компетентната научна среда, в която е реализирана.

Моите **лични впечатления** от Енгибаров го определят като добре подготвен и квалифициран микробиолог и биохимик, като прецизен експериментатор с изявен стремеж към новостите в областта на неураминидазите. Искам да подчертая неговото умение да работи в екип с различни специалисти, което е допринесло за мултидисциплинарния характер на дисертационния труд.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, **убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури, сформирани със заповед № I-37/01.04.2019 г. на Директора на Института по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН да присъдят на Стефан Андреас Енгибаров образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология).**

10. 05. 2019 г
София

Рецензент:.....
/проф. М. Ангелова, дбн/