

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационния труд на г-жа **Теодора Василева Лупанова** „Структурна организация и функционална активност на мембранните липиди в норма и в условия на оксидативен стрес“

от акад. **Евгени Головински** –

Институт по молекулярна биология

„Акад. Румен Цанев“ при БАН

Представеният дисертационен труд на г-жа Лупанова е представен за придобиване на научната и образователна степен „Доктор“ по научната специалност 4.3 – Биологически науки (стар шифър „Биофизика“ – 01.06.08). **Трудът е структуриран** по възприетия у нас начин и обхваща 135 страници, които включват Увод (стр. 8-9); Литературен обзор (стр. 10-49); Цел и задачи (стр. 49); Материали и методи (стр. 49-60); Резултати и дискусия (стр. 60-118); Изводи (стр. 120); Публикации и Участие в научни форуми и Декларация за оригиналност (стр. 120-124) и Цитирана литература (стр. 124-135).

Трудът на г-жа Лупанова е в една твърде **важна и актуална област** на съвременната наука – изучаването на ролята и механизмите на оксидативния стрес в организмите и неговата роля за възникването и протичането на редица жизнени процеси и заболявания, такива например като стареенето, атеросклерозата, хипертонията, болестта на Алцхаймер и други. Важна насока на изследванията в областта на оксидативния стрес са проучванията върху биохимичните последици от въздействието на токсичните видове (реактивните форми) на кислорода, така наречените ROS, върху различни клетъчни структури и макромолекули.

Особено внимание напоследък се обръща върху влиянието на оксидативния стрес върху клетъчните мембрани. Сама за себе си областта на проучвания на структурата и функцията на клетъчните мембрани е една от водещите в съвременната биофизика, биохимия и молекулярна биология. Така че своеобразното съчетаване на двете модерни изследователски насоки – оксидативен стрес и клетъчни мембрани – намирам за сполучлива находка за научно дирене с отнапред очаквани интересни и важни резултати. В тази насока изследвания се провеждат в много страни, включително и в България. У нас например заслужено признание са получили изследванията, които провежда проф. Албена Момчилова. Под нейно ръководство успешно е протекла и приключила работата върху дисертационния труд на Теодора Лупанова.

Вътрешната защита на дисертацията на г-жа Лупанова се проведе на 19 септември т.г. и аз бях включен за еднократно участие в състава на съответната секция на института. Бях се запознал предварително с проекта на дисертационния труд, което ми даде възможност да направя някои препоръки на Т.Л. Виждам, че някои от препоръките ми бяха взети под внимание.

Информираността на дисертантката за онези конкретни сведения, които са необходими за провеждането на предвидените от нея изследвания проличава от **Литературния обзор**, който предшества дефинирането на целите и задачите на труда. В тази част на дисертацията Т.Л. е включила накратко данните относно структурата и функциите на клетъчните мембрани, характеристиката на явлението „оксидативен стрес“ и неговото значение. Тук са дадени и сведения за моделите, които се използват при провеждането на биологичните експерименти. Обзорът е написан стегнато, пригледно и ясно, но мисля, че би спечелил, ако дисертантката му беше дала, както обикновено е възприето, заглавие, което да определи неговото съдържание. Обзорната част на дисертацията показва, че Т.Л. познава достатъчно добре литературата, отнасяща се до структурата и функциите на клетъчните мембрани и до механизмите на оксидативния стрес.

След обзорната част Т.Л. формулира накратко **Целите и задачите** на дисертацията (стр. 49). Като цел на своя труд тя вижда „... изследването на влиянието на оксидативния стрес върху структурата и функциите на мембранните липиди, като се използват различни моделни системи – нативни и моделни мембрани“. За постигането на тази цел Т.Л. формулира ясно 4 задачи, включващи установяването на ролята на оксидативния стрес върху образуването на липидни пероксиди; изучаването на ролята на оксидативния стрес върху количеството на липидните пероксиди при определени условия; установяването на антиоксидантната функция на сфингомиелина, както и изследването на ролята на степента на ненаситеност на мастните киселини и окислените фосфолипиди върху латералната организация на моделните липидни бислоеве. Преценявам плануването като обем и съдържание на подобни експериментални резултати за подходящо за една добра дисертационна работа в разглежданата област.

Разделът **„Материали и методи“** обхваща 10 страници и съдържа конкретното описание на всички средства и подходи, които дисертантката е използвала в хода на експерименталната си работа. Читателят се убеждава, че тя е овладяла и сполучливо използвала голям набор от класически и съвременни методи, необходими за пълноценното провеждане на нейните изследвания. Спектърът на овладяни и сполучливо използвани експериментални методи е значителен. Ще отбележа например култивирането на клетъчни култури при различни условия, изолирането на различни клетъчни съставки и вещества (плазмени мембрани, липиди и др.), прилагането на методи на аналитичната биохимия (определянето на липидни пероксиди, газово-хроматографско определяне на мастни киселини), определяне активността на някои ензими и т.н. Изложението на този раздел би спечелило, ако Т.Л. беше възприела традиционно използвания в такива случаи начин за изреждане и описание на апаратите и уредите в самото начало на раздела. Беше необходимо да се посочат и източниците, степените на чистота и други характеристики на всички използвани реактиви.

Логично е, че разделът **„Резултати и дискусия“** е най-голям, като той оправдано обхваща 60 страници от целия труд. Тук обстойно и убедително се представят резултатите от проведените експерименти и се прави обсъждане както за всеки конкретен случай, така и в обобщен план (напр. стр. 116-117). И в този текст проличава отличната професионална подготовка на дисертантката в сложната и многообразна материя.

Изложението на резултатите, представени в този раздел, както и в раздела **„Изводи“** (стр.120-121) очертава приносите, които постига дисертантката в своя труд.

Ще се опитам да очертая по-съществените според мен **приноси** в дисертацията на Т.Л., които според мен ще има тепърва да се цитират в специалната литература.

Установен е *протективният ефект на сфингомиелина* спрямо оксидативните увреждания на мембранните фосфолипиди. Резултатите са получени при различни условия – фибробласти, култивирани като монослой и такива, култивирани в екстрацелуларен матрикс. Показано е, че ензимите, участващи в метаболизма на сфингомиелина се активират в различна степен в условия на оксидативен стрес при клетки, култивирани в монослой и такива, които са отглеждани в триизмерна среда. Култивираните като монослой клетки, чиито плазмени мембрани съдържат по-високи равнища сфингомиелин и в които са повишени активностите на стрес-свързани ензими (напр. неутрална сфингомиелиназа и церамидаза) се оказват по-чувствителни към оксидативен стрес в сравнение с клетките, отглеждани в триизмерни условия.

Доказано е, че при вграждане на различно ненаситени мастни киселини в мембраните нивото на акомулираните в клетките лиридни пероксиди не е пропорционално на броя на двойните връзки на ацилните вериги. При включване на полиненаситени мастни киселини от типа омега-3 (напр. ейкозапентаеновата киселина, ЕПК) в контролни и онкоген-трансформирани фибробласти, количеството на липидни пероксиди е по-ниско в сравнение с клетки, в които е включена линолова киселина, въпреки по-високата степен

на ненаситеност и на включване на ЕПК. Доказано е, че омега-3 мастните киселини не се локализируют в рафт-микродомените, докато ненаситени мастни киселини с по-малък брой двойни връзки (като напр. линолова киселина), взаимодействат в по-значителна степен с домените в точно подредено състояние. Това обуславя по-голяма вероятност оксидативните увреждания на линоловата киселина да предизвикат по-голям деструктивен ефект върху структурно-функционалния интегритет на мембранните рафт-домени, които са известни като клетъчните „сигнални платформи“ и са отговорни за процесите на трансмембранен пренос на сигнали от екстрацелуларната среда.

Интересен резултат е установяването, че оксидативният стрес *променя в различна степен асиметричната локализация* на плазмено-мембранните фосфолипиди при контролни и *ras*-трансформирани фибробласти. Намереното различие би могло да се използва при търсенето на терапевтични подходи на базата на различната реакция на плазмената мембрана на здрави и злокачествено трансформирани клетки по отношение на оксидативния стрес.

Намирам за особено интересни резултатите от изучаването на *механизма на действие на кверцетина*, който е един природен антиоксидант. В дисертацията е показано, че акумулирането на активни форми на кислорода и на липидни пероксиди в богати на холестерол мембрани е по-ниско в сравнение с мембрани с понижено съдържание на холестерол в присъствие на кверцетин. Изказани са и предположенията относно характера на взаимодействие на антиоксиданта с мембранните липиди. Получените резултати сочат, че при индуцирано понижаване на една основна липидна съставка на мембранните рафт-домени, каквато е холестеролът, се стига до понижаване на неспецифичния транспорт на липидни молекули между двата мембранни монослоя, при което става частично нарушаване на нативната асиметрия на мембранните липиди.

Интерес представляват и *моделните изследвания върху гигантски униламеларни везикули*, в които е вграден окисления палмитоил-оксо-валероил-фосфохолин. В

резултат на това е установено, че в среда, богата на омега-3 полиненаситени мастни киселини окисленият липид индуцира пъпкуване и везикулизация на мембраните при температури, близки до физиологичните. Изказано е аргументирано предположение, че в присъствие на полиненаситени омега-3 мастни киселини окислени липидни молекули от типа на палмитоил-оксо-валероил-фосфохолина могат да участват в процеси, които в условия „*ин vivo*“ биха могли да имат физиологично значение при сортирането и преноса на протеини в ендоплазматичния ретикулум.

Последната част на дисертацията обхваща списък на използваната от Т.Л. **литература**. Той обхваща 143 източници, като преобладаващата част от тях е от последните няколко години. Това показва, че дисертантката, от една страна, следи грижливо ставащото в областта, на която се е посветила, а от друга потвърждава, че темата на дисертацията е действително актуална и важна. Тук не бих избегнал препоръката към Т.Л. да не цитира „Уикипедия“ при посочването на данни за конкретни химични съединения, а да се облекне на сведения от международно утвърдени и традиционно използвани източници (ср. напр. цитати 114 и 115).

В добре оформения и стегнато написан **автореферат** на дисертацията на Т.Л. са изтъкнати ясно собствените научни приноси.

Моята цялостна преценка за дисертационния труд на Теодора Лупанова е категорично положителна. В труда има интересни приноси моменти, някои от които съм се постарал да открия. Използван е богат набор от утвърдени адекватни експериментални методи на изследване. Получените резултати са представени добре и съответно компетентно обсъдени. Ползван е голям обем от предимно съвременна специална литература.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 5 *журнални статии, три от които в реномирани международни списания с импакт-фактор*. В три от статиите дисертантката е първи автор. Резултатите от изследванията по

дисертацията са представяни на 6 международни научни срещи, една от които – в Швеция. Вече има и цитирания на трудовете по дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният за придобиването на научната и образователна степен „доктор“ труд „Структурна организация и функционална активност на мембранните липиди в норма и в условия на оксидативен стрес“ отговаря напълно на възприетите за присъждането на тази степен изисквания. Неговият автор, г-жа Теодора Лупанова според мен е вече изградена като млад учен, овладял най-важните експериментални методи на изследване в разработваната от нея област, познава необходимата специална литература и умее да интерпретира адекватно получените от нея резултати. Ето защо без колебание предлагам на почитаемите членове на Научното жури да гласуват за присъждането на образователната и научна степен **„доктор“** на г-жа **Теодора Василева Лупанова**.

София, ноември 2012 г.

(Акад. Евг. Головински)