

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност 4.3 - Биологични науки
(„Биофизика”- 01.06.08)

Автор: Теодора Василева Лупанова

Тема : *“Структурна организация и функционална активност на мембранните липиди в норма и в условия на оксидативен стрес”*

Рецензент : доц. Петър Антонов Антонов, д.б.н.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е посветен на ефекти на мембранно-клетъчно ниво, инициирани от оксидативен стрес. Тази тематика в един по-широк аспект е от голямо медицинско и социално значение, защото е свързана с етиопатогенезата на атеросклерозата, стареенето, болестта на Алцхаймер, неопластичните процеси, очна катаракта и др. Разкриването на молекулните механизми, лежащи в основата на тези процеси, е от жизнено важно значение и затова научните изследвания в тази област са актуални днес, а и занапред в необозримо бъдеще.

В настоящата дисертация част от експериментите са проведени върху плазмени мембрани от клетки култивирани като монослой (2D) и други, наподобяващи растеж на клетките в условия *in vitro*- среда от естествено синтезиран екстрацелуларен матрикс (3D). Изследван е ефекта на експериментално индуциран оксидативен стрес върху състава и структурната организация на плазмени мембрани, активността на някои липид-метаболизиращи ензими, влиянието на полиненаситените мастни киселини върху мембранната структурна организация в условията на оксидативен стрес, както и механизма на действие на природния антиоксидант кверцетин върху липидната пероксидация в чернодробни клетъчни мембрани. Гигантски моноламеларни липозами са използвани като модел за визуализиране на образуването на липидни домени в присъствие на липиди с различна степен на ненаситеност и пероксидация.

Дисертационната работа на Теодора Василева е изработена и апробирана в И-та по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН, секция “Липид-белтъчни взаимодействия в биологични мембрани”. Научен ръководител е проф. Албена Момчилова, дбн. Тук искам да отбележа, че у нас това е научната група, където продуктивно се работи по направлението „оксидативна

липодомика” и приоритетно се изследва ефекта на оксидативния стрес върху молекулните промени в биомембраните в биофизичен аспект, конкретно насочен към техните физико-химични свойства и структурна организация.

Дисертацията е написана на 135 стр. и съдържа 10 таблици, 46 фигури и цитирани 143 литературни източници. Тя е оформена по стандартен начин – увод, литературен обзор, цели и задачи, методична части, резултати, заключение и насоки на бъдещи експерименти (в автореферата тази част е озаглавена „обсъждане”) и изводи.

Уводът насочва към общобиологични проблеми свързани с оксидативния стрес. **Литературният обзор** от 38 стр. е много информативен и илюстрира добра осведоменост по дисертационната тема. В началото са маркирани класическите представи за структурата и функциите на биомембраните, полиморфизма на липидните структури и фазовите състояния. Представени са съвременни данни за физиологичното значение на сфингмиелина, неговото антиоксидантно действие и физико-химичните свойства на рафт-домените. Разгледани са отделните аспекти на оксидативния стрес : активни форми на кислорода, липидната пероксидация и клетъчните редокс- и антиоксидантни системи.

Целта на дисертацията по смисъл съответства на заглавието, а задачите са формулирани ясно и конкретно. Използваните експериментални техники и апаратура включват анализ на фосфолипидния и мастно-киселинния състав, липид метаболитизиращи ензими, апоптоза, липидна асиметрия и директна визуализация на фазово разделяне на липиди върху електроформирани гигантски униламеларни липозоми, екстрахиране на плазмени мембрани от клетъчни линии, подложени на оксидативен стрес и др.

Експерименталните резултати са представени в 4 раздела, а именно : изследвания с дву- и триизмерни култури ; влияние на оксидативния стрес върху моделни системи от трансформирани и нетрансформирани миши фибробласти ; изучаване на механизмите на взаимодействие на природни антиоксиданти с чернодробни плазмени мембрани от плъх и експерименти с моделни мембрани . Изследванията и представянето на резултатите са проведени в логична последователност, което може да се приеме като гаранция за достоверност на основните изводи и че са личния принос на

дисертантката. Добро впечатление правят кратки текстове , които свързват аргументирано последователното представяне на опитните резултати и е свидетелство за един добре обмислен и планиран изследователски проект.

По-долу ще аотирам оценката си по най-съществените резултати от дисертацията, които са с оригинален или потвърдителен приносен характер:

1. Резултат от ключово значение в настоящата дисертация следва от експерименти с 2D и 3D клетъчни култури, показващи съществени различия в техния липиден състав , като най-значителни са разликите в количеството на SM (50% повече в 3D клетките). При тези изследвания са доказани промени в свингомиелин-метаболизиращите ензими в съответствие с промени в количеството на SM в мембраните на клетките , култивирани като монослой или като матрикс. Установена е повишена активност на стрес-свързаните ензими сфингомиелиназа и цирамидаза в мембраните на 2D клетките. Тук могат да бъдат отнесени и данните с 3D фибробласти, които потвърждават изказаното и от други автори предположение , че SM има антиоксидантни свойства. Косвено доказателство затова е , че 3D клетките имат по-високо съдържание на полиненаситени мастни киселини (20:3 и 20:4) и въпреки това, при този тип клетки е намерена по-ниска степен на липидна пероксидация. Защитните свойства на SM срещу активните форми на кислорода е доказана и по алтернативен начин след третиране на NIH 3T3 фибробласти със свингомиелиназа.

2. Резултат с приносна стойност е получен при инкубирането на фибробласти с полиненаситени МК и екзогенен оксидативен стрес с H_2O_2 . Данните са показали, че концентрацията на липидни пероксиди е по-висока при трансформираните фибробласти с линолова МК с 2 двойни връзки в сравнение с трансформираните с ейкозапентаенова к-на (EPA) с 5 двойни връзки. Този експериментален резултат е неочакван и е дискутиран в дисертацията по компетентен и приемлив начин. Изказва се предположението , че определени омега-3 МК , като използваната при тези експерименти EPA, могат да се разглеждат като протектори на мембраните от оксидативни увреждания, което се постига благодарение на тяхната специфична конформация и структурно стабилизиране на мембраните.

3. Оригинални резултати са получени след модулиране съдържанието на холестерол чрез третиране на чернодробни плазмени мембрани от плъх със специфичен реагент Ciclodextrin . Определяно е съдържанието на активни форми на кислорода след третиране с H_2O_2 и природния оксидант с фенолна структура – кверцетин. Установено е , че понижено количество на холестерола води до завишени нива на активни кислородни форми , нарушение на асиметрично разпределение на мембранните аминокислотни липиди и намаляване ефективността на споменатият антиоксидант. Изказано е предположение , че намаляването на количеството холестерол в рафт-домени, прави клетъчната антиоксидантна защита по-слабо ефективна.

4. Определен интерес представляват резултатите , при които се установява как се променя латералната организация и физико-химичните свойства на бислоя под действие на окисления липид палметоил-оксовалероил фосфатидилхолин върху формирането на домени от типа „rafts”. Чрез флуоресцентно-микроскопски метод визуално е установено, че липидни смеси съдържащи декозахексаенова киселина предизвикват формиране на по-обширни рафт-домени, пъпкуване и отделяне на дъщерни везикули при физиологична температура. Изказано е предположение за връзка на наблюдаваните ефекти с някои функционално значими клетъчни процеси.

Накрая искам да отбележа, че работата по рецензията беше приятна и ми донесе удовлетворение. Защото лесно се пише рецензия на дисертация, написана на ясен и разбираем език . В цялата конструкция и дискуссионните текстове в нея има логическа връзка между отделните части. Освен това, резултатите са публикувани в пет статии , всичките с ИФ, като в 3 от тях Лупанова е първи автор. Документирано е участието и в 6 научни форума и е забелязан един цитат.

Нямам критични забележки по същество. За пълнота на рецензията, ще посоча някои пропуски от техническо естество и други, които бих желал да се възприемат като забележки с препоръчителен характер: напр., след прочитането на обзорната част се чувства липсата на обобщаващ коментар, от който логично да следват целите и задачите на дисертационния труд ; не звучи убедително твърдението, че големите разлики в липидния състав на двата типа

клетки са дължи на това , че 2D клетките се култивират върху „твърда и „некомфортна „ за тях основа” (стр. 32 от авт.). Тази уникална експериментална находка се нуждае от по-прицизен анализ и вероятно, от допълнително проучване ; при процесите на пъпкуване на мембранни домени неправилно се обясняват ефекти чрез „ линейно напрежение”, защото това понятие е стриктно дефинирано в електротехниката ; отбелязвам и това , че формулираните 6 извода далеч не корелират реално с наличните резултати. Биха могли да се добавят още десетина извода, които , апропо , са направени на съответните места в дисертацията, но не са изнесени накрая в „Изводи”; към фиг. 3 ,11-13 са визирани цветни колонии, сини и червени, а всъщност фигурите са черно - бели ; фигурите 17-19 в автореферата, илюстриращи етапите на фазовото разделяне при различни липидни смеси, не са с нужното качество и информативност ; авторефератът започва с „благодарности”, вместо тази рубрика да бъде в края , където е по-естественото и място.

Всички тези бележки, обаче, на фона на казаното по-горе, са с пренебрежимо значение спрямо общата ми положителна оценка на дисертацията на Теодора Лупанова.

Авторефератът адекватно отразява съдържанието на дисертацията.

З а к л ю ч е н и е : Представената за защита дисертационна работа е резултат от едно добре планирано и задълбочено изследване, проведено компетентно с използването на адекватни експериментални подходи. Докторантката Теодора Лупанова се е справила успешно с поставените задачи, за което са допринесли нейните сериозни познания в областта на биофизичната и биохимична мембранология. Дисертационния труд съдържа резултати с приносен характер и отговаря на изискванията за развитие и израстване на учените от Института по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН. Всичко това ми дава основание да препоръчам на уважаемите членове на журито по провеждането на тази процедура да присъди на Теодора Василева Лупанова образователната и научна степен „**доктор**”.

08.11.2012 г.

Рецензент :