

**Рецензия**  
**на дисертационен труд**  
**за получаване на научната и образователна степен „Доктор”**

**автор на дисертацията:** *Райна Иванова Георгиева*

**тема:** *Влияние на докозахексаеновата киселина и фосфолипаза A<sub>2</sub> върху процесите на мембранно преструктуриране*

**научен ръководител:** *доц. д-р Галя Станева*

**рецензент:** *доц. д-р Биляна Николова*

Райна Георгиева е родена през 1983г. През 2007г се дипломира като бакалавър от СУ „св. Кл. Охридски”, Биологически факултет, със специалност молекулярна биология, през 2009 успешно защитава магистърска степен с дипломна работа изработена в ИБФБМИ-БАН и през 2010г е зачислена за редовен докторант към секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани”. Представила е всички необходими документи за да бъде допусната до защита на дисертационния си труд.

В представената ми за рецензия работа е разгледано поведението на различни по състав везикули, имитиращи мембранната организация на нативни клетъчни мембрани с включени “rafts” домени. Постепенното усложняване на смесите от липиди за формиране на везикулите и третирането им с фосфолипаза A<sub>2</sub> са подробно разгледани. Основни методи намерили приложение при настоящето изследването са формиране на гигантски везикули, оптична микроскопия, фазов контраст, флуоресцентна микроскопия, атомносилова микроскопия, диференциална сканираща калориметрия, микроинжектиране.

Дисертацията е написана на 135 стандартни страници. Включва увод, цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, заключение, изводи, приноси и литература.

В литературния обзор много подробно са разгледани биологичните мембрани и изграждащите ги компоненти, като е описана структурата и функцията на всеки един от

тях, както и ролята която играе в организацията на мембраната. Особено внимание е обърнато на докозахексаеновата киселина, обект на представеното изследване, като е разгледано разпределението ѝ в тъканите на бозайници и биологичното ѝ значение в норма и патология. Липидните фази и домени, произхода на фазовото разпределение и т. нар. “rafts” участъци от мембраните също са подробно описани. Изяснена е ролята на ензима фофолипаза в регулирането на биологичните процеси, както и при определени нервнопатологии. В глава 7 на литературния обзор обстойно са представени видовете моделни системи, като се започне с най-простите – липидни монослоеове и се завърши с гигантските униламеларни везикули, който са най-близо до биологичните мембрани. Възможността да бъде контролиран липидния състав на мембраната и така да могат да бъдат подробно проучени възможните ефекти от третирането прави гигантските униламеларни везикули подходящ обект за настоящето изследване. Много добро впечатление прави богатата литературната справка, както и факта, че в литературния обзор са намерили място предходни изследвания на групата, в която докторантката е разработила своята дисертация.

Главата е илюстрирана с 14 фигури и три таблици, коректно цитирани.

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва влиянието на аминокиселината сфингозин и докозахексаеновата киселина върху формирането на домени от типа “rafts” и действието на фосфолипаза  $A_2$  върху хетерогенни моделни мембрани.

За постигането на така формулираната цел са поставени пет конкретни задачи.

Използваните в дисертационния труд методи са актуални и адекватни на поставените цел и задачи.

Резултатите и дискусията са представени в една глава, това улеснява четенето. Интерес в работата представлява факта, че се търси паралел между моделните системи, които са обект на изследването и нативните биологични мембрани. Експериментите са проведени при постепенно усложняване и надграждане на моделните системи, което би могло да се приеме, че ги доближава до естествените мембрани. Чрез промени в съотношенията на компонентите, формиращи везикулите и домени са симулирани клетъчни мембрани.

От резултатите представени на фиг. 19 и 20 се вижда, че при постепенно усложняване на моделната система, добавяйки SM към трикомпонентната смес PC/SPH/CHOL и при понижаване на температурата се формират домени, които посредством сливане увеличават размерите си. Установено е, че сфингозинът стимулира формирането на “raft” домени.

В следващата група експерименти е проследена температурата на фазово разделяне на при везикули, формирани от трикомпонентна смес в различни съотношения. Установено е, че при смеси съдържащи POPC/SM/CHOL 50/25/25 везикулите са хомогенни до около 23°C, след което се появяват малки тъмни домени в светлата фаза, а при понижаване на температурата до около 4°C настъпва фазова перколация. Докато везикули формирани с PDPC/SM/CHOL 50/25/25, температурата на фазово разделяне е по-висока. Като резултат от направените експерименти е заключено, че наличието на докозахексаенова киселина в смесите повишава температурата на фазовото разделяне от типа  $L_o/L_d$  и води до формиране на  $L_o$  домени при физиологична температура.

Направени са изследвания на трикомпонентните смеси и посредством диференциална сканираща калориметрия (ДСК). Бих искала да попитам защо използваните три компонентни смеси за целите на това измерване са в различни пропорции, от тези за предходните и дали за целите на ДСК са приготвяни везикули в съответните съотношения или са използвани смеси от SM/CHOL/POPC(PDPC)?

Във втората група експерименти представени в раздел резултати е изследвано, посредством флуоресцентна микроскопия и диференциална сканираща калориметрия, влиянието на антиоксиданта n-пропил галат, прибавен в различни концентрации, върху латералното фазово разделяне на липидите в липидните смеси. Прибавянето на антиоксидант към съответните смеси се налага поради факта, че полиненаситените мастни киселини са по-податливи на окисление от мононенаситените, което от своя страна би могло да доведе до формиране на домени по време на изследването. Установено е, концентрационно зависимо понижение на температурата на фазовия преход, като ефекта е по-ясно изразен при PDPC/SM/CHOL везикулите. За по-детайлното изследване на влиянието на n-пропил галат, не само като протектор, но и като допълнителен елемент в мембраната, който би могъл да повлияе върху фазовото

поведение на липидите са проведени измервания с ДСК. Изследвано е концентрационното влияние на антиоксиданта върху сфингомиелин, смес от сфингомиелин и холестерол, както и върху трикомпонентна смес SM/CHOL/POPC(PDPC). Резултатите са представени в таблица.

В третата група експерименти представени в раздел резултати са показани изследвания свързани с активността на фосфолипаза  $A_2$  върху субстратни везикули, везикули съставени от двукомпонентни смеси PC/SM, както и върху трикомпонентните SM/CHOL/POPC(PDPC). Установена е зависимост на устойчивостта спрямо фосфолипаза  $A_2$  на везикулите, формирани от един от типовете PC както следва PDPC, POPC, eggPC. При двукомпонентните везикули с добавен SM се наблюдава подобна на субстратните везикули устойчивост към действието на ензима. При добавянето и на трети компонент към смесите PC/SM, а именно PDPC, и последващо третиране с фосфолипаза  $A_2$  се наблюдава моментално отделяне на  $L_o$  домена или т.нар. пъпкуване. Докато при везикулите формирани от SM/CHOL/POPC и инжектирани с фосфолипаза  $A_2$  настъпва постепенно разграждане на  $L_d$  фазата.

В четвъртата група експерименти е изследвана елестичността на монослойни и бислойни системи, съдържащи докозохексаенова или олеинова киселина. За целта е използвана атомносилова микроскопия. Установено е че по-високото линейно напрежение при PDPC/SM/CHOL се дължи на най-вероятно на разлика в подредеността.

Поставените цел и задачи в дисертационния труд са изпълнени успешно.

Приносите имат характер на получаване на нови за науката факти.

В цитираната литература са включени 210 източника, повечето от тях публикувани след 2003г.

### **Заклучение**

Дисертацията на Райна Георгиева е написана на правилен и чист български език, балансирана е и оформена е много добре. Дисертантката е изпълнила голям обем работа. Съдържанието на автореферата и дисертацията съответстват.

Към дисертационния труд са приложени четири научни публикации, в три от които докторантката е първи автор. Три от статиите са в списания с импакт фактор, което обаче не отбелязано, а би било добре т.к. например J colloid interface sci. е с висок импакт – 3.172. Приложен е и списък със забелязаните цитати.

От приложените документи става ясно, че докторантката е изпълнила всички изисквания на ЗРАС (успешно положени изпити, предварително разглеждане на дисертационния труд на разширен научен семинар, публикации с импакт фактор във връзка с дисертационния труд).

Всичко казано до тук, както и личните ми впечатления от докторантката ми дава основание убедено да препоръчам на научното жури да присъди на Райна Иванова Георгиева образователната и научна степен „доктор”.

София

05.03.2014г.

Рецензент

доц. д-р Биляна Николова