

РЕЦЕНЗИЯ

върху: Дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „ДОКТОР”, професионално направление „Биологически науки”, шифър 4.3, специалност 01.06.08 Биофизика на тема: „**Влияние на докозахексаеновата киселина и фосфолипаза A₂ върху процесите на мембранно преструктуриране**”, разработен от **Райна Иванова Георгиева**, редовен докторант в Института по биофизика и биомедицинско инженерство при БАН, секция „*Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани*”

Рецензент:

доц. д-р Виктория Виткова Виткова,
Институт по физика на твърдото тяло, БАН

Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на дисертанта

Авторът на представения за рецензиране дисертационен труд, Райна Иванова Георгиева, притежава магистърска степен по „Медицинска и фармакологична биофизикохимия”, защитена през 2009 година във Факултета по химия и фармация на Софийския университет „Св. Климент Охридски”. Балавърската степен на дисертанта е придобита през 2007 година по специалността „Молекулярна биология” към Биологическия факултет на същия университет. За научните интереси на Райна Георгиева в областта на мембранната биофизика свидетелства още направеният от нея избор на тема на магистърска дипломна работа, изготвена в Института по биофизика и биомедицинско инженерство към Българската академия на науките (ИБФБМИ – БАН). От края на 2009 година дисертантът работи като специалист в секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани” към ИБФБМИ – БАН, където приоритетно се изследват структурната организация и функционалната активност на биологичните мембрани в норма и патология.

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Темата на разглеждания дисертационен труд е съсредоточена върху особено актуален биомедицински проблем, какъвто е изследването на ролята на липидните молекули и техните метаболити в отключването и развитието на патологични клетъчни процеси. В светлината на субстратната теория за влиянието на мембранните свойства върху ензимната активност в клетката, в рамките на дисертацията са проведени задълбочени изследвания за изясняване на ролята на състава и латералната структура на липидния бислой върху активността на фосфолипаза A₂. Изследванията са насочени към мембрани, съдържащи докозахексаеновата киселина, чиято терапевтична стойност е доказана при лечението на невродегенеративни заболявания с голямо социално значение като болест на Алцхаймер, деменция и др. В дисертационния труд се използват моделни мембранни системи, наложили се в съвременната биофизика като подходящ модел на биологичните мембрани, които позволяват поставянето и възпроизводимото реализиране на експериментални задачи при строго контролирани условия (състав, температура и др.), както и интерпретацията на получените резултати с помощта на адекватни теоретични постановки.

Преглед на дисертационния труд

Дисертацията е формена според установените стандарти и съдържа заглавна страница, съдържание, списък на използваните съкращения, увод, литературен обзор, формулировка на целите и задачите на дисертацията, описание на материалите и

методите, използвани в изследването, представяне на получените резултати и тяхната дискусия, заключение и бъдещи насоки в научното изследване, както и изводи и обобщение на приносите на дисертанта. В дисертационния труд е включен списък с участията на кандидата в научни конференции, както и списък на научните публикации по дисертацията, забелязаните цитати и цитираната литература. Дисертационният труд се състои от 135 страници, съдържащи текст, 37 фигури и 7 таблици. Цитирани са 210 литературни източници, 58% от които са публикувани след 2000 година. Библиографията отразява както фундаменталните така и най-новите постижения в изследваната област.

Актуалността на разработвания проблем се подчертава в направения аналитичен и изчерпателен литературен обзор (в обем от 41 страници), който обхваща 173 заглавия на монографии и оригинални статии, отразяващи основните постижения в мембранната биофизика и изследването на хетерогенни моделни и клетъчни мембрани. Освен добро познаване на предхождащите изследвания по темата, проведени в секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани” към ИБФБМИ-БАН, дисертантът демонстрира и отлична запознатост със световната библиография в областта. Критичният преглед и творческата оценка на литературния материал е позволило точно и ясно формулиране на **целта на дисертацията**, която се състои в ***Изследване на влиянието на сфингозина и докозахексаеновата мастна киселина при sn-2 позиция в молекулата на фосфатидилхолин върху формирането на домени от типа „rafts” и действието на фосфолипаза A₂ върху хетерогенни L_o/L_d моделни мембрани.***

Обект на изследване в дисертационния труд са многокомпонентни липидни мембрани, проявяващи латерална хетерогенност (съвместно съществуване на различни структурни фази), като особено внимание е отделено на мембрани, съдържащи рафт-домени. В клетъчните мембрани този вид микродомени са обогатени на холестерол, сфинголипиди, различни протеинови молекули и участват в редица мембранносвързани процеси (мембранен транспорт, клетъчна сигнализация и др.). В моделните мембрани формирането на микродомени от течна подредена (L_o) фаза в течния неопореден (L_d) бислой имитира клетъчните рафт-домени и позволява тяхното систематично изучаване.

За постигането на поставената в дисертацията цел са определени 5 (пет) основни задачи, както следва:

1. Да бъде изследван ефектът на аминокиселинол холестерол сфингозин върху формирането на домени от вида „rafts”.
2. Посредством флуоресцентна микроскопия да бъде визуализирано L_o/L_d фазовото разделяне и да се определи температурата на смесваемост на двете течни фази в трикомпонентни липидни смеси фосфатидилхолин (PC) /сфингомиелин(SM) /холестерол(CHOL) в зависимост от:
 - степента на ненаситеност при sn-2 на фосфатидилхолин (PC) - сравнителен анализ между олеиновата и докозахексаеновата киселина;
 - температурата;
 - присъствието на антиоксиданта n-пропил галат (nPG).
3. Изследване ефекта на антиоксиданта nPG върху липидни смеси, съдържащи докозахексаенова или олеинова мастна киселина, чрез диференциална сканираща калориметрия.
4. Определяне активността и действието на PLA₂ върху везикули съставени от:
 - палмитоил-олеоил фосфатидилхолин (POPC);
 - палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолин (PDPC);
 - бинарни смеси (POPC/SM и PDPC/SM, POPC/CHOL и PDPC/CHOL);
 - трикомпонентни смеси (POPC/SM/CHOL и PDPC/SM/CHOL).

5. Определяне еластичните свойства на монослойни и бислойни моделни мембранни системи, съдържащи олеинова или докозахексаенова киселина, в присъствие и отсъствие на лизофосфатидилхолин.

Прави впечатление, че формулировката на първата задача е по-обща в сравнение с останалите четири, при които са посочени качествените състави на изследваните мембранни системи. По-нататък в изложението (в началото на четвърта глава „Резултати и дискусия“) се посочва върху какви мембрани е изследван ефектът на аминокиселината сфингозин (SPH). Изследвано е фазовото поведение на бинарни фосфатидилхолинови (PC)/SPH смеси, на трикомпонентни PC/SPH/CHOL, както и на четирикомпонентни PC/SPH/SM/CHOL мембранни системи. Мотивацията на това изследване се състои в установеното в литературата значение на сфингозина при регулацията на редица клетъчни процеси като клетъчна диференциация, апоптоза и др., а безспорната му актуалност се подчертава от липсата на данни за ролята на тази биоактивна молекула при липидната реорганизация в мембраната.

Избраните методи за изследване са на най-високо съвременно ниво и напълно съответстват на целта на дисертационния труд, като позволяват успешното разрешаване на поставените задачи. В процеса на тяхното изпълнение е използван богат набор от актуални и добре развити експериментални методи, както следва: флуоресцентна микроскопия на еднослойни липидни везикули с диаметри в микрометричния диапазон (GUV – giant unilamellar vesicles); определяне на ензимна активност; микроинжектиране на биологично активни субстанции; тънкослойна и газова хроматография; диференциална сканираща калориметрия; атомно-силова микроскопия (AFM); получаване и изследване на еластичните свойства на Ленгмюрови филми; измерване на модула на еластичност на огъване на липидни мембрани чрез анализ на термичните флуктуации на формата на квазисферични GUV; електронен парамагнитен резонанс. Липидните системи, обект на изследването, са получавани чрез най-подходящите за целта на конкретния експеримент методи: електроформиране на GUV; формиране на Ленгмюрови и Ленгмюр-Блоджетови филми; получаване на многослойни везикули (MLV – multilamellar vesicles) и др. В текста не присъства подробно описание на измерванията с електронен парамагнитен резонанс. Проведените с този метод изследвания на трикомпонентните POPC(PDPC)/SM/CHOL смеси доказват по-голяма разлика в параметрите на подреденост на L_o и L_d фазите при PDPC-съдържащите смеси в сравнение със стойността на тази разлика при POPC-съдържащите мембрани. Така получените експериментални резултати се използват в подкрепа на предложения в дисертационния труд механизъм за индуцирания под действие на ензима PLA_2 процес на пъпкуване на L_o -домени, съществуващи в трикомпонентните PDPC/SM/CHOL мембрани.

Въз основа на докладваното в дисертационния труд имам основание да заключа, че оригиналният материал, включен в дисертацията, е получен напълно коректно. Фигурите, представящи микроскопските образи на наблюдаваните хетерогенни мембрани с различен състав и при различни условия, убедително илюстрират докладваните резултати и подкрепят направените изводи и заключения. Графичните представяния на получените данни са достатъчно нагледни, което ми позволява да оценя материала като достоверен. Спазени са методичните изисквания при извършването на всички етапи от експерименталните изследвания, чието успешно изпълнение свидетелства за мултидисциплинарните познания и умения на кандидата.

Приноси на дисертационния труд

В заключение на дисертационния труд са направени девет извода и са формулирани три основни приноса. Приносите на дисертанта могат да бъдат обобщени

като фундаментални. За първи път са получени доказателства относно способността на сфингозина да сегрегира и да формира листовидни гел домени във фосфатидилхолинови мембрани, както и относно увеличаването на площта на рафт-домени в присъствието на сфингозин и сфингомиелин. Приемам като оригинален и физически издържан предположения на базата на представените резултати и наличните литературни данни възможен механизъм за пъпкуване на рафт-домени в PDPC-съдържащи мембрани с отчитане на трите основни фактора – линейното напрежение на L_o -домени, активността на PLA_2 и еластичните свойства на мембраната в L_d -фаза. Като особено важно определям заключението за установеното влияние на полиненаситения фосфатидилхолин PDPC в неподредената течна фаза върху формирането на по-големи рафт-домени чрез намаляване на смесваемостта на сфингомиелина и холестерола в L_d -фазата и формиране на по-големи L_o -домени в сравнение с по-слабо ненаситените фосфатидилхолинови видове.

Приносите в определяща степен са дело на кандидата. Дисертационният труд е подготвен на високо научно ниво и отговаря на чл.27, ал.(1) и ал.(2) от Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) за придобиване на образователната и научна степен „доктор”, както и на вътрешните правилници за приложението на гореупоменатия закон в Българската академия на науките.

Публикации по дисертацията

Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в 4 (четири) научни статии, три от които са отпечатани в специализирани научни издания с импакт-фактор, а една – в електронно международно научно издание. Една от научните статии въз основа на материалите от дисертацията е публикувана във високоцитируемо (импакт-фактор > 3) издание на Elsevier, Journal of Colloid and Interface Science. Резултатите, включени в дисертационната работа, са докладвани на шест научни конференции. Два от научните форуми са международни и са се състояли извън страната, като за своето участие в тях Р. Георгиева е спечелила стипендия от Федерацията на европейските биохимични общества (FEBS). В две от научните конференции е взето участие с устен доклад. В три от публикациите и във всички научни съобщения на научни форуми дисертантът е първи автор. Забелязани са две независими цитирания в чуждестранни научни издания, едно от които е в реномираното специализирано списание Journal of Lipid Research (импакт-фактор > 5). Така изброените наукометрични данни превишават изискванията за присъждане на научната и образователна степен „доктор”, залегнали в правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБФБМИ – БАН.

Автореферат

Авторефератът достоверно отразява съдържанието на дисертационния труд и представя основните резултати, заключенията и приносите на дисертанта. Изготвен е съгласно установените изисквания.

Критични бележки, препоръки и въпроси

Особени критични бележки по дисертацията нямам. Забелязват се някои технически и стилистични неточности в текста на дисертацията, като например: използването на израза „термичен анализ на мембранните флуктуации”, „колебания” и „контура на радиуса” (стр. 69) вместо „анализ на термичните флуктуации на мембраната”, „флуктуации” и „радиуса на контура” съответно; „умерено хидратиране”

(стр. 46) вместо „спонтанно образуване” на GUV; „предпочитателно” (стр. 71) вместо напр. „предимно” и др.

Тези забележки не са съществени и не променят отличното ми впечатление от дисертационния труд на Райна Георгиева.

Въпроси:

Формулираните както следва въпроси се поставят с уточняваща цел. Отговорите от страна на кандидата ще допринесат за яснотата на изложението и интерпретацията на оригиналния материал, включен в дисертационния труд.

1/ Термодинамичните параметри на фазовите преходи на мембрани, съставени от сфингомиелин, холестерол и фосфатидилхолин, са определени чрез диференциална сканираща калориметрия за трикомпонентни смеси с преобладаващо количество на сфингомиелина в сравнение с другите два липида, докато при изследванията с флуоресцентна микроскопия основната компонента на мембраната е фосфатидилхолиновият липид. Очаква ли се тази разлика да окаже влияние върху термотропното поведение на изследваните мембрани?

2/ Относно установения ефект на n-пропил галата върху разпределението по размери на везикули има ли промяна в протокола на електроформиране при добавяне на антиоксиданта? В резултат на какъв брой електроформирания е изчислена всяка от хистограмите, показани на Фиг. 25?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение на гореизложеното и отчитайки оригиналността на научните приноси, тяхното представяне и международна видимост давам своята висока **положителна оценка** за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и приноси на дисертанта. Рецензираният дисертационен труд съдържа научни резултати, които представляват оригинален принос в науката и показва, че кандидатът притежава задълбочени теоретични знания по научната специалност „Биофизика”, както и способности за самостоятелни научни изследвания. Изложеното дотук ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор” на **Райна Иванова Георгиева по научната специалност 01.06.08 „Биофизика”, професионално направление „Биологически науки”, шифър 4.3.**

24.02.2014 г.
Гр. София

Изготвила:

/доц. Виктория В. Виткова/