

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор” с професионално направление 4.3 „Биологически науки”, научна специалност 01.06.08 „Биофизика“

Тема на дисертационния труд:
**„ВЛИЯНИЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ МОЛЕКУЛИ
ВЪРХУ МЕМБРАННАТА ОРГАНИЗАЦИЯ”**

Автор на дисертацията: Русина Лъчезарова Хазаросова

Научен ръководител: проф. д-р Галя Станева
Научен консултант: проф. д-р Албена Момчилова

Рецензент: доц. д-р Анелия Георгиева Добрикова
от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН,
член на научно жури във връзка със защита на дисертационен труд,
съгласно заповед № 476/16.05.2016 г. на директора на ИБФБМИ - БАН

Русина Лъчезарова Хазаросова е завършила Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски” със специалност магистър по „Клетъчна биология и патология” през 2003 г. От август 2013 г. тя е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка към секция „Липид-белтъчни взаимодействия” в Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН. В момента работи като асистент в същата секция. Тя е представила по процедурата всички необходими документи, в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН.

Актуалност и значимост на дисертационния труд:

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е насочен основно към изследване влиянието на някои значими биологично активни молекули върху структурната организация и физико-химичните свойства на биологичните мембрани и по-конкретно върху домените от вида “rafts”, които участват в редица клетъчни процеси като клетъчна сигнализация, клетъчна адхезия, мембранен транспорт и други. Тъй като до момента все още не е изяснено как биоактивните окислени фосфолипиди и ненаситените омега-3 мастни киселини модулират формирането на рафт-домени в клетъчните мембрани, изследванията в тази област са изключително важни и навременни за изясняване на

молекулните механизми, лежащи в основата на редица болести като Алцхаймер, атеросклероза, рак и други. Изучаването на специфичните молекулни механизми на действие на биологично активните молекули като антиоксиданти и пребиотици върху структурата и организацията на мембраните, в частност върху регулацията им на формиране на липидни рафтове, би било от голямо значение за разбиране на техния протективен и лечебен ефект, както и за разработване на нови фармакологични подходи при лечението и профилактиката на редица заболявания.

Описание на дисертационния труд:

Дисертационният труд е написан на 130 страници и е структуриран по стандартен начин в следните раздели: Увод - 3 страници; Литературен обзор, обхващащ 24 страници и 15 фигури; Цел и задачи – 4 страници; Материали и методи - 10 страници и 6 фигури; Резултати и дискусия - 48 страници с 37 фигури и 6 таблици; Заключение - 2 страници; Изводи – 5 на брой; Приноси – 5 на брой; Публикации във връзка с дисертационния труд - 3 броя; Забелязани цитирания; Участия в научни форуми и Литературна справка, обхващаща 193 литературни източника.

Литературният обзор представлява обстоен и компетентен научен преглед на съществуващите литературни данни до момента в областта на мембранологията и показва много добро познаване и разбиране на тематиките по дисертацията. Той се състои от 6 основни раздела, посветени на мембранната хетерогенност, липидните мембранни домени, биологичната роля на определени липиди, изграждащи плазмената мембрана, термотропното фазово поведение на мембранните липиди, биологично активните вещества - резвератрол и ксилоолигозахариди. Специално внимание е отделено и на моделните мембрани, които обикновено се използват за изследване на свойствата, структурата и процесите, протичащи в клетъчните мембрани, както и за изучаване на взаимодействието им с биологично активни вещества, лекарства и други. Информацията е добре систематизирана и подробна, онагледена е с подходящи модели и схеми (общо 15 фигури). Изчерпателното изложение на обзора показва много добрата теоретична подготовка, както и добро владение на терминологията. Докторантката анализира съществуващите литературни данни до момента и обосновава необходимостта на поставените задачи в дисертацията от гледна точка на това с какво те ще допринесат и с какво ще обогатят научното познание до момента. Този раздел е написан в тясна връзка с целта на дисертацията и показва актуалността и ролята на проведените експериментални изследвания за изясняване на механизмите на действие на биоактивните молекули върху структурата и организацията на плазмените мембрани.

Целта на настоящата дисертация е формулирана ясно и конкретно, а именно: да се изследва влиянието на отделни мембранни липиди върху формирането и стабилността на “rafts” домените в моделни мембрани и да се установи ефекта на значими биологично активни съединения върху мембранната организация. За постигането на тази цел са формулирани много подробно **5 основни задачи**. По мое мнение, поставените задачи в дисертацията са прекалено подробно разписани, което считам, че не е необходимо, тъй като литературният обзор достатъчно добре обосновава тяхната важност. В автореферата задачите са представени по-кратко, ясно и конкретно. За тяхното изпълнение са използвани **съвременни биофизични методи**, които включват: флуоресцентна и фазово-контрастна микроскопия, диференциална сканираща калориметрия и Лаурдан флуоресцентна спектроскопия. Използвани са също така различни методи за формиране на униламеларни и мултиламеларни везикули, както и методи за изолиране на плазмени мембрани и липиден анализ. Овладяването на тези изброени методи ще е от изключителна полза за бъдещите изследвания на докторантката.

В раздела **Резултати и дискусия** са представени общо 37 фигури и 6 таблици. В този раздел е описана и анализирана извършената значителна по обем експериментална работа във връзка с поставените задачи. Получените резултати са изложени и анализирани ясно и логично. Най-интересните нови резултати, получени в дисертационната работа, могат да се представят накратко по следния начин:

Във връзка с **първата задача**: изследване ефекта на аминокислотни фосфолипидите фосфатидилетаноламин (PE) и фосфатидилсерин (PS) върху формирането на домени от вида “rafts”, са изследвани и анализирани промените в температурата на фазово разделяне на аминокислотни фосфолипид-съдържащи дву- и трикомпонентни липидни смеси чрез флуоресцентна микроскопия. Получените резултати показват, че PE и PS увеличават температурата на смесваемост на двете фази Lo/Ld и увеличават фракцията на Lo домени (имитиращи клетъчните “rafts”) като ефектът е по-голям при PE. Предполага се, че полиненаситеният PE влияе върху формирането на Lo домени чрез изместване на свободния сфингомиелин и/или холестерол от течна-неподредената (Ld) към подредената фаза (Lo). Установен е също и ефекта на холестерола върху фазовото разделяне в аминокислотни фосфолипид-съдържащи смеси. Тези резултати целят изясняване ролята на аминокислотни фосфолипидите при формиране на рафт-домени във вътрешния монослой на плазмените мембрани.

Втората част от този раздел се фокусира върху изследване влиянието на докозахексаеновата мастна киселина (DHA), която е от

фамилията на омега-3 мастните киселини, върху формирането на рафт-домени в моделни мембрани. Получените резултати, посредством флуоресцентна микроскопия, показват промените в температурите на фазово разделяне и формирането на рафт-домени като функция от степента на ненаситеност на мастната киселина и като функция на полярната глава (PC и PE) в ДНА-съдържащи глицерофосфолипиди. Установено е, че ДНА при *sn*-2 позиция на глицерофосфолипидите PDPC и PDPE повишава температурата на формиране на рафт-домени като PE подсилва в по-голяма степен формирането на тези домени в сравнение с PC. Показано е също, че PDPE при високи концентрации стимулира в по-голяма степен процеса на пъпкуване на Lo домени, индуциран от високото линейно напрежение. Тези научни изследвания допринасят за изясняване механизмите на действие на полезните омега-3 мастни киселини върху човешкия организъм.

Третата част от този раздел изследва влиянието на окисления фосфолипид POVPC върху мембранната организация посредством флуоресцентна микроскопия и диференциална сканираща калориметрия на гигантски униламеларни везикули. Получените резултати показват, че POVPC променя латералната организация на мембранните липиди като повлиява размера и структурата на мембранните домени. Установено е, че окисленият липид повлиява в по-голяма степен формирането на рафтове в смеси, съдържащи мононенаситени PC (POPC), отколкото в смеси, съдържащи полиненаситените видове (PDPC). От друга страна, PDPC-съдържащата среда, за разлика от POPC, спомага за протичането на процеса пъпкуване, което е много важно за физиологичните функции на плазмените мембрани. Чрез калориметрични измервания е показано, че POVPC има флуидизиращ ефект върху високо-подредения сфингомиелинов (SM) бислой като температурата и енталпията на фазовия му преход постепенно намаляват с увеличаване концентрацията на окисления липид. Освен това е установено, че POVPC оказва различен ефект върху термограмите на мононенаситените (eggSM/Chol/POPC/POVPC) и полиненаситените (eggSM/Chol/PDPC/POVPC) смеси, което се дължи на неговото различно действие в тях: намалява смесваемостта на холестерола за POPC-съдържащите смеси и я увеличава в PDPC-смесите. Тези изследвания целят изясняване механизмите на действие на биологично активните окислени фосфолипиди върху клетъчните мембрани в условия на оксидативен стрес в човешкия организъм.

Четвъртата част изследва взаимодействието на антиоксиданта резвератрол (при концентрации от 50 до 500 μ M) с моделни мембрани чрез Лаурдан флуоресцентна спектроскопия. За изследванията са използвани различни едно-, дву- и трикомпонентни липидни смеси.

Експерименталните данни ясно показват, че взаимодействието на това биологично активното съединение с мембрания бислой зависи от степента на ненаситеност на мастната киселина в PC молекулата, от съдържанието на SM и холестерол, както и от концентрацията на този полифенол. Установено е, че резвератролът е в състояние да флуидизира полиненаситения липиден бислой (PDPC-съдържащите везикули) като ефектът е най-силно изразен при 50 μM , докато при концентрация 500 μM той проявява втвърдяващ ефект. При POPC смесите, този полифенол има само втвърдяващ ефект. Показано е също, че резвератролът отменя фазовия преход на сфингомиелина към по-ниски температури и флуидизира рафтовете. Установената способност на резвератрола да модулира мембранната организация и да флуидизира липидните рафтове от своя страна може да повлияе на мембрания транспорт и сигнализацията в клетките. Представена е схема, която онагледява предполагаемото разположение на полифенолната молекула в мембранната равнина: хоризонтално или вертикално, в зависимост от природата на липидния матрикс или от концентрацията на резвератрола.

Петата част от този раздел изследва действието на ксилоолигозахаридите върху плъщи чернодробни плазмени мембрани. За изследванията са реконструирани липидни мембрани, съставени от плазмено-мембрания чернодробен липиден екстракт на плъхове, хранени с и без ксилоолигозахариди. Установено е, че приемът на пребиотици като ксилоолигозахариди променя състава, структурата и физико-химичните свойства на липидните мембрани основно поради повишаване нивата на сфингомиелина и понижаване нивата на холестерола. Визуализирано е фазовото разделяне на липидите, определена е формата, размерите и динамиката на рафт-домениите. Показано е също, че приемът на ксилоолигозахариди предизвиква леко понижаване на флуидитета на липидния екстракт от чернодробни плазмените мембрани в сравнение с контролните. Тези експерименти ясно показват корелация между хранене, липиден състав, структура и организация на мембраните.

Резултатите са обобщени в **5 извода**, които са формулирани ясно и напълно съответстват на получените експериментални резултати и на задачите, поставени в дисертационния труд.

Приемам **основните приноси** на дисертационната работа, които ясно показват оригинарността и значението на проведените изследвания, а именно:

1. Установено е за първи път, че аминоксфолипидите стимулират формирането на домени от вида „rafts”. Ролята им да увеличат фракцията на Lo домениите може да се разглежда като „трик” в природата за компенсиране ниското съдържание на SM във вътрешния слой на

плазмената мембрана и да се запази способността на липидите да формират такива домени.

2. Установена е корелация между степента на ненаситеност на мастните киселини в молекулата на фосфатидилхолина и размера на Lo домоените. За първи път е установен ефектът на полярната глава при полиненаситените глицерофосфолипиди (PDPC и PDPE) за формирането на рафт-домени. PE увеличават фракцията на рафтовете при физиологична температура. DHA-съдържащите глицерофосфолипиди стимулират процесите на пъпкуване на мембраните домени. Тези научни изследвания допринасят за изясняването на механизмите на действие на полезните омега-3 мастни киселини върху човешкия организъм.

3. За първи път е установено, че окисленият липид POVPC в зависимост от природата на липидния матрикс (поли- или мононенаситен) повлиява в различна степен размера и динамиката на рафтовете. Тези научни изследвания разкриват механизмите на действие на окислените липиди в условия на оксидативен стрес в човешкия организъм.

4. Установено е за първи път, че биоактивното съединение резвератрол повлиява диференцирано подредеността на липидите в зависимост от степента на ненаситеност на мастната киселина в молекулата на фосфатидилхолина, присъствието на сфингомиелин и холестерол. Това научно изследване допринася за установяване способността на резвератрола да модулира мембранната организация, което може да повлияе на функциите на определени сигнални белтъци, независимо дали те се намират в подредените домени или в неподредения липиден матрикс. Изследваните ефекти на този полифенол на ниво мембрани могат да послужат като база за изясняване механизма на действие, който е от значение за разбирането на фармакологичното действие на това биоактивно съединение.

5. За първи път е показано, че приемът на пребиотици като ксилоолигозахаридите въздейства на състава, структурата и организацията на мембранныя бислой на плъщи чернодробни плазмени мембрани. Тези научни факти допринасят за изясняване на специфичните молекулни механизми, лежащи в основата на благоприятните ефекти на пребиотиците върху организма на гостоприемника и за развитието на комплексни терапевтични подходи за подобряване здравето на човека.

Бележки и препоръки:

По дисертационния труд бих направила някои забележки и препоръки към докторантката:

- Има някои дребни грешки, които съм показала лично на докторантката.

- На места в текста при цитиране на литературата има неточности или технически пропуски като например: „Karnovsky през 1982 година”, вместо „Karnovsky *et al.* ...”; на стр. 77 е посочен цитат [167] вместо [176] или в текста е написано Mannock *et al.* (стр. 71, 72) без да се посочва годината или номера от литературната справка. Цитат [190] от литературната справка е непълен - не е дадено заглавието на статията и страниците.

- На представените фигури в дисертацията, които не са авторски, а са взети от литературата, трябва да се посочи литературният източник в надписа под самата фигура (например на фигури IV-32 и IV-37). Считам, че не е необходимо да се дава отделен списък в края на дисертацията.

- В надписите под фигури IV-21,22,23,24 е посочено, че скоростта на сканиране е 0.1°C/min, което най-вероятно е грешка и трябва да бъде 1°C/min, както е описано в глава III.2.4. за използвания DSC метод.

- Би било добре да се даде статистическата достоверност на представените резултати във всички таблици, за да може да се оцени дали промените в стойностите на изследваните параметри показват статистически-значими разлики, както това е направено в Таблица 6.

- В Извод 4 се споменава за физиологична концентрация на резвератрола, но никъде в дисертацията не е посочена нейната стойност и не е коментирана в дискусията. Бих искала да попитам какви са били мотивите за използването на тези концентрации на резвератрола (50 - 500 μ M)?

- Като препоръка считам, че би било интересно в бъдеще да се изследва ефектът на резвератрола, освен при физиологично, и при кисело рН, тъй като е установено, че неговото действие върху ракови клетки се увеличава при по-ниско рН (Shamim *et al.* (2012) *J. Cell Physiol.* 227(4):1493-1500). Така може да се оцени и неговия ефект при патология предвид по-ниското рН в тумори в сравнение с нормална тъкан.

Направените забележки в никакъв случай не засягат приносите на дисертацията, а по-скоро имат за цел отстраняване и избягване на посочените неточности в бъдеще.

Собствените ми впечатления от докторантката Русина Хазаросова са, че тя е навлязла теоретично много добре в изследваните проблеми, притежава необходимата компетентност и експериментална подготовка. Считам, че тя може отговорно и самостоятелно да провежда научни експерименти, както и правилно да интерпретира получените резултати.

Авторефератът отразява правилно основните резултати на дисертационния труд като по обем и съдържание отговаря на изискванията.

Във връзка с дисертацията са публикувани **3 научни статии** като и трите публикации са в реферирани международни списания с импакт фактор: 1 в ***Food Biophysics*** (IF 1.605), 1 в ***J. Fluorescence*** (IF 1.601), 1 в ***Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*** (IF 3.687), което гарантира наличието на нови и оригинални резултати в дисертационния труд. В една от публикациите докторантката е първи и кореспондиращ автор, което също показва значимостта на нейното участие. Две от публикациите ѝ вече са цитирани, като тази в ***Biochim. Biophys. Acta*** е цитирана 3 пъти, а тази в ***Food Biophysics*** - 1 път. Материалите от дисертацията са представени общо на 12 научни форума – 5 международни и 7 национални, като 4 от тях са доклади. Тези наукометрични данни напълно изпълняват изискванията на ИБФБМИ - БАН за присъждане на образователната и научна степен „доктор”.

Заклучение:

Дисертационният труд е актуален. Проведени са голям брой изследвания с подходящи и съвременни биофизични методи като са получени нови и оригинални резултати. Тези резултати са публикувани в авторитетни списания и вече са намерили отражение в световната научна литература.

Считам, че дисертационният труд на Русина Хазаросова до голяма степен е лично дело на докторантката и показва нейната много добра практическа подготовка и теоретични познания в областта на съвременната мембранология. Дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за приложението му в ИБФБМИ-БАН.

Всичко това ми дава основание да дам своята **положителна оценка** и убедено да препоръчам на членовете на Научното жури да присъдят на кандидатката **Русина Л. Хазаросова** образователната и научна степен „доктор” по научната специалност „Биофизика”, професионално направление 4.3. „Биологически науки”.

05.07.2016 г.
гр. София

Рецензент:
/Доц. д-р Анелия Добрикова/