

РЕЦЕНЗИЯ

върху: Дисертационния 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 БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ МОЛЕКУЛИ ВЪРХУ МЕМБРАННАТА ОРГАНИЗАЦИЯ“**, разработен от **Русина Лъчезарова Хазаросова**, докторант на самостоятелна подготовка в секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани“ на Института по биофизика и биомедицинско инженерство при БАН

Рецензент:

доц. д-р Виктория Виткова Виткова,
Институт по физика на твърдото тяло,
Българска академия на науките

Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на дисертанта

Авторът на представения за рецензиране дисертационен труд, Русина Лъчезарова Хазаросова, е получила своята бакалавърска степен по специалността „Биология“ в Нов български университет, София през 2000 година. Дисертантката е защитила през 2003 година магистърска степен по „Клетъчна биология и патология“ в Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“. След завършването на магистратурата си Р. Хазаросова работи като специалист-биолог, а впоследствие и като асистент в секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани“ към ИБФБМИ – БАН, където успешно участва в научноизследователската дейност и усвоява съвременни експериментални методи за изследване на биофизикохимичните свойства на моделни липидни и биологични мембрани.

Актуалност на разработвания в дисертацията проблем

Дисертационният труд е посветен на изследването на ролята на биологично-активни молекули върху мембранната организация, което представлява особено актуален проблем, както във фундаментален за мембранната биофизика аспект, така и в научно-приложно отношение. Мотивацията на включените в дисертацията изследвания, както и изборът на биологично значимите съединения, които са обект на тези изследвания, се основават на концепцията на липидните рафтове и тяхното значение за клетъчните процеси в норма и патология. В рамките на дисертацията са формулирани и осъществени експерименти за изясняване на ролята на биоактивни молекули върху латералната структура и термотропното поведение на липидния бислой. Голяма част от изследванията са насочени към мембрани, съдържащи полиненаситена докозахексаенова мастна киселина, чиято терапевтична стойност е доказана при превенцията и лечението на редица невродегенеративни заболявания със социално значение (болест на Алцхаймер, деменция и др.). В светлината на доказаното значение на окислените фосфолипиди при имунния отговор и възпалителните процеси в организма, в дисертацията са проведени изследвания на измененията в структурната организация на липидни мембрани в присъствие на окислен фосфатидилхолин. Изследвано е и как присъствието на вещества с протективни свойства при оксидативен стрес, каквито са фитоалексинът резвератрол и

кисилоолигозахаридите, повлияват мембранните липиди и тяхната структурна организация. В дисертационния труд са използвани моделни мембранны системи, които позволяват поставянето и възпроизводимото реализиране на експериментални задачи при строго контролирани условия на експеримента (състав, температура и др.), както и интерпретацията на получените резултати с помощта на подходящи теоретични модели.

Общ преглед на дисертационния труд

Дисертацията е оформена според установените стандарти и съдържа заглавна страница, съдържание, списък на използваните съкращения, увод, литературен обзор, формулировка на целите и задачите, описание на материалите и методите, използвани в изследването, представяне на получените в дисертацията резултати и тяхната дискусия, заключение, изводи и обобщение на приносите на дисертанта. В дисертационния труд е включен списък с участията в научни конференции, както и списък на научните публикации на кандидата, свързани с дисертацията, забелязаните цитати и цитираната литература. Дисертационният труд се състои от 130 страници, съдържащи текст, 58 фигури и 6 таблици. Цитирани са 193 литературни източника, 55% от които са публикувани след 2000 година. Библиографията представя фундаментални и нови постижения в изследваната област.

Актуалността на тематиката е аргументирана убедително не само в направения литературен обзор (в обем от около 20 страници), но и на редица други места в текста на дисертацията, което води до някои повторения. Литературният обзор обхваща 140 заглавия на монографии и оригинални статии, отразяващи основните постижения в мембранната биофизика и изследването на хетерогенни моделни и клетъчни мембрани. В изложението си дисертантът демонстрира 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 отделни липиди, изграждащи биологичните мембрани върху формирането и стабилността на домени от вида "rafts" в моделни мембрани и установяване на ефекта на значими биологично активни съединения върху мембранната организация посредством методите флуоресцентна микроскопия, диференциална сканираща калориметрия и Лаурдан флуоресцентна спектроскопия.***

Обект на изследване в дисертационния труд са многокомпонентни липидни мембрани със съвместно съществуване на различни структурни фази (латерална хетерогенност), като акцентът е поставен върху мембрани, съдържащи рафт-домени. В клетъчните мембрани този вид микродомени участват в редица мембранносвързани процеси (мембранен транспорт, клетъчна сигнализация и др.). В литературата съществуват доказателства за ролята на липидните микродомени в патологията на сърдечно-съдовите заболявания, атеросклерозата, диабета 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 определената в дисертацията цел кандидатът си поставя за изпълнение пет групи задачи:

1. Изясняване на способността на всеки от изследваните аминокфосфолипиди, фосфатидилетаноламин (PE) и фосфатидилсерин (PS) поотделно и в комбинация, за формирането на липидни домени от вида "rafts".

Към тази задача са формулирани три подзадачи:

- Определяне на температурата на смесваемост на PE и PS във фосфатидилхолинова (PC) среда;
 - Изследване на ефекта на холестерола (Chol) върху смесваемостта на аминокфосфолипидите в серия от трикомпонентни смеси PC/aminophospholipids/Chol;
 - Определяне на афинитета на аминокфосфолипидите да формират L_o домени в микронната скала.
2. Изследване на ефекта на докозахексаеновата киселина върху формирането на домени от вида "rafts" чрез включване на PDPC (палмитоил-докозахексаеноил-фосфатидилхолин) и PDPE (палмитоил-докозахексаеноил-фосфатидилетаноламин) в трикомпонентни смеси PC/Sphingomyelin(SM)/Chol.
 - Изследване ефекта на степента на ненаситеност на мастните киселини в молекулата на фосфатидилхолина (PC) върху формирането на домени от вида "rafts" в трикомпонентни смеси PDPC/SM/Chol и PDPE/SM/Chol;
 - Изследване ефекта на полярната глава на ДНА- съдържащи глицерофосфолипиди върху формирането на домени от вида "rafts" в трикомпонентни смеси PDPE/SM/Chol и PDPC/SM/Chol.
 3. Изследване на влиянието на окисления фосфолипид POVPC (палмитоил-оксвалероил-фосфатидилхолин) върху мембранната латерална организация.
 - Изследване на ефекта на POVPC върху формирането на домени от вида "rafts" като функция от степента на ненаситеност на мастната киселина (POPC- и PDPC-съдържащи мембрани);
 - Изследване на термотропното поведение на POVPC върху фазовия преход на SM и върху главния фазов преход, използвайки диференциална сканираща калориметрия.
 4. Изследване на степента на подреденост на липидите при различни концентрации резвератрол, като се разглежда последователно ефектът на полифенола върху:
 - Липидни слоеве в L_d фаза, съставени от глицерофосфолипидите POPC и PDPC. Ефект на степента на подреждане на резвератрола като функция на степента на ненаситеност на мембраната.
 - Липидни слоеве, претърпяващи главен фазов преход, съставени от SM.
 - Липидни слоеве в L_o фазово състояние, съставени от SM/Chol и PC/Chol.
 - Липидни слоеве, претърпяващи фазов преход от вида L_o/L_d , съставени от PC/SM/Chol.
 5. Изследване на ефекта на ксилоолигозахариди (XOS) върху структурата и организацията на липидите, екстрахирани от чернодробни плазмени мембрани на плъхове, подложени на диета, богата на XOS.

- Определяне на степента на подреденост на реконструирани липидни мембрани, чиито липиди са екстрахирани от черен дроб на плъхове при контролни и при тези, хранени с XOS.
- Визуализиране на липидните домени в тези мембрани посредством флуоресцентна микроскопия.

В раздела „Цел и задачи“ прави впечатление повторението на представената в увода и литературния обзор мотивация за избора и биологичното значение на изследваните мембранни състави. Задачите, планирани за постигане на поставената в дисертацията цел, биха могли да се формулират по-сбито и конкретно. По този начин читателят би бил улеснен при съставяне на визията си относно концепцията на дисертационния труд.

Избраните методи за изследване са на високо съвременно ниво, съответстват на целта на дисертационния труд и позволяват успешното разрешаване на поставените задачи. В процеса на тяхното изпълнение е използван богат набор от актуални и добре развити експериментални методи, каквито са флуоресцентната микроскопия на еднослойни „гигантски“ (с диаметри в микрометричния диапазон) липидни везикули (GUVs – giant unilamellar vesicles); диференциална сканираща калориметрия; Лаурдан флуоресцентна спектроскопия. Обектите на изследването са получавани чрез най-подходящия за изпълнение на конкретната експериментална задача метод: електроформиране на GUVs, формиране на „големи“ (с диаметри ~0,1 мкм) еднослойни везикули (LUVs – large unilamellar vesicles) или получаване на многослойни везикули (MLVs – multilamellar vesicles). В главата „Материали и методи“ педагогично са въведени и представени използваните от дисертанта методи. Прави впечатление, че за разлика от подробното описание на повечето от тях (напр. фазовоконтрастната и флуоресцентната микроскопия), в текста не присъства въведение в други методи, използвани за получаване на докладваните в дисертацията резултати. Например не се намира кратко представяне на газовата хроматография, която е използвана за определяне на холестеролното съдържание в липидния екстракт от чернодробни плазмени мембрани на плъхове, или на електронния парамагнитен резонанс, използван в изследванията на ефекта на POVPC върху латералната организация на четирикомпонентните POPC- и PDPC-съдържащи мембрани. Полезно би било да се представи накратко и методът на S. Veatch и колектив (цитиран като [161] в списъка на литературата), използван в изследванията за определяне на температурата за формиране на домени в гел-фаза.

В дисертацията е доказвано индуциране под действие на окисления фосфолипид POVPC на процес на пъпкуване на L_α-домени, наблюдавани в хетерогенни PDPC-съдържащи мембранни състави. По този начин се подкрепя формулираната от дисертанта хипотеза, че окисленият липид е активната молекула, контролираща ръбното напрежение между двете съвместно съществуващи в мембраната фази. Доказателствата, представени в дисертацията за ролята на окислените липидни видове в мембранното везикулиране, са от значение за изясняване на молекулните механизми на физиологичните функции на плазмената мембрана при сортирането и преноса на протеини в *in-vivo* условия, а също така и при транспортните процеси в клетката, свързани с трансцитоза.

Като особено интересни определям резултатите за силния ефект на аминокислотите върху формирането на рафт-домени и заключението, че

фосфатидилетаноламинът показва по-голяма способност да формира такива домени в сравнение с фосфатидилсерина. Дисертантът предполага индиректен механизъм на участието на фосфатидилетаноламина във формирането на домените посредством намаляване на смесваемостта на сфингомиелина и/или холестерола в L_d -фазата. Резултатът е създаването на по-голяма фракция на L_o -домени и включването на по-голямо количество сфингомиелин при формирането на "rafts". Актуалността на изследването се подчертава от липсата на данни за молекулните механизми, включени в липидната реорганизация в мембраната за компенсиране на ниското съдържание на сфингомиелин в цитоплазмения монослой на клетъчната плазмена мембрана и запазване на способността на липидите да формират домени в подредена L_o - фаза.

Въз основа на изложението на 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 и табличните представяния на получените данни са достатъчно нагледни и подробни. Горепосоченото ми позволява да оценя материала като достоверен и оригинален. 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 пет извода и са формулирани пет основни приноса. Приносите на дисертанта могат да бъдат обобщени като фундаментални. За първи път са получени доказателства относно способността на аминокислотни фосфолипидите фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин да стимулират формирането на рафт-домени. Като особено важни приемам изводите за ролята на биоактивната молекула резвератрол върху структурната организация на многокомпонентни липидни мембрани и зависимостта на тази роля от липидното обкръжение при физиологични температури и концентрации на изследвания фитохалкоген. Оригинален принос на кандидата е и осигуряването на експериментални доказателства за промените в структурата и организацията на мембрани, реконституирани от липидния екстракт от чернодробни плазмени мембрани на плъхове, при прием на ксилоолигозахариди в резултат на увеличаване на съдържанието на сфингомиелин и намаление на съдържанието на холестерол.

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 за придобиване на образователната и научна степен „доктор“, както и на вътрешните правилници за приложението на горепосочения закон в Българската академия на науките.

Публикации по дисертацията

Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в 3 (три) научни статии, отпечатани в специализирани научни издания с импакт-фактор и издавани от престижните научни издателства Elsevier и Springer. Една от научните статии с

материали от дисертацията е публикувана във високоцитируемото (импакт-фактор > 3) издание на Elsevier, Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes. Резултатите, включени в дисертационната работа, са докладвани на дванадесет национални и международни научни конференции. В четири от научните конференции е взето участие с устен доклад. В една от публикациите и в девет от научните съобщения на научни форуми дисертантът е първи автор. Забелязани са четири независими цитирания в чуждестранни научни издания. Така изброените наукометрични данни превишават изискванията за присъждане на научната и образователна степен „доктор“, залягнали в правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБФБМИ – БАН.

Автореферат

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

Критични бележки, препоръки и въпроси

Освен отбелязаните по-горе забележки и препоръки относно оформянето на текста на изложението, други особени критични бележки по дисертацията нямам. Забелязват се някои технически и стилистични неточности и пропуски в текста на дисертацията, като например липса на информация за метода, използван за получаването на данните, показани в Таблица 6 (стр. 90, въпреки че методът за анализ на липидния състав е споменат в т. 2.6 от „Материали и методи“); използване на термина „озвучаване“ (стр. 33; 45; 46) вместо прилагане на ултразвук; понятието „обща поляризация“ би било добре да се въведе още в началото на представянето на метода (стр. 47); фосфатният буфер, използван с липидните екстракти, не е включен в списъка с материалите и др.

Тези забележки не променят положителното ми впечатление от дисертационния труд на Русина Хазаросова.

Въпроси:

Въпросите ми се поставят с уточняваща цел. Отговорите на кандидата ще допринесат за изясняване на някои аспекти в интерпретацията на оригиналния материал, представен в дисертационния труд.

1/ Във връзка с установеното в дисертацията влияние на аминофосфолипиди върху образуването на рафт-домени, как може да бъде коментиран евентуалният електростатичен принос при фосфатидилсерин-съдържащите мембрани върху структурната организация на мембраната? Как дисертантът ще коментира влиянието на йонната сила на средата върху наблюдаваните процеси?

2/ Провеждани ли са контролни измервания върху формирането на рафт-домени и структурните изменения в мембрани с липидни състави от един (синтетичен) вид фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилетаноламин или фосфатидилсерин? Какви са очакванията за влиянието на мастнокиселинния състав на липидния матрикс

върху заключението за увеличаването на температурата на смесваемост на съвместно съществуващите L_o и L_d фази (първият извод)?

3/ В допълнение към анализа на резултатите в дисертацията как могат да бъдат коментирани резултатите от контролните изследвания чрез Лаурдан спектроскопия на POPC и PDPC везикули, а именно, по-ниската, измерена при температура над 35°C степен на хидратация на PDPC-мембраните в сравнение с POPC такива при положение, че и двата липида се намират в течна фаза в целия температурен интервал? Може ли да се търси физиологично значение на температурата, над която се измерва по-висока степен на подреденост на PDPC-бислоевите в сравнение с мембраните, съставени от липид с една мононенаситена верига?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като заключение на гореизложеното и взимайки предвид оригиналността на научните приноси, давам своята **положителна оценка** за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и приноси на дисертанта. Рецензираният дисертационен труд съдържа научни резултати, които представляват оригинален принос в мембранната биофизика и показва, че кандидатът притежава задълбочени знания по научната специалност „Биофизика“, както и способности за самостоятелни научни изследвания. Изложеното дотук ми дава основание да препоръчам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен **„доктор“** на **Русина Лъчезарова Хазаросова** по научната специалност **01.06.08 „Биофизика“**, професионално направление **„Биологически науки“**, шифър **4.3**.

04.07.2016 г.
Гр. София

Изготвила:

/доц. Виктория В. Виткова/