

Становище

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “доктор”, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност Биофизика, шифър 01.06.08

Автор на дисертационния труд: Русина Лъчезарова Хазаросова, секция „Липид-белтъчни взаимодействия“ на Института по биофизика и биомедицинско инженерство

Тема на дисертационния труд: Влияние на биологично активни молекули върху мембранната организация

Автор на становището: Албена Георгиева Йорданова, доцент по биохимия в Медицински факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“

В представения ми за становище дисертационен труд на Русина Лъчезарова Хазаросова е изследван ефектът на някои структурни мембрани липиди (*аминофосфолипидите фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин, съдържащите полиненаситената ω -3 докозахексаенова мастна киселина (DHA) фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин, както и окисления фосфолипид палмитоил-оксовалероил фосфатидилхолин, POVPC*) върху формирането и стабилността на важните при процесите на клетъчната сигнализация, транспорт, адхезия и др. микродомени от вида “rafts” в моделни мембрани системи. В допълнение е изследвано и въздействието на биологично активните съединения *резвератрол* и *ксилоолигозахариди* върху структурата и мембранната организация съответно на моделни мембрани и на изолирани чернодробни плазмени мембрани. За осъществяване на поставените амбициозни цели са използвани съвременните методи за формиране и визуализация на гигантски униламеларни, мутиламеларни и големи униламеларни везикули, диференциална сканираща калориметрия, флуоресцентна микроскопия, Лаурдан флуоресцентна спектроскопия и др.

Дисертационният труд е старателно оформен, добре структуриран и дава отлична представа за поставените задачи и изпълнението на извършените от докторантката изследвания. Дисертацията съдържа 130 страници, 58 фигури и 6 таблици. Цитирани са 193 литературни източника, предимно от чуждестранни автори и публикувани през последните години.

Прави впечатление много доброто познаване на изследванията на цитираните автори и точното им и компетентно интерпретиране. Литературния обзор към дисертационния труд ясно и последователно въвежда читателя към характера и изследователската цел, която Русина Хазаросова си е поставила: изследване на влиянието на отделни липиди, изграждащи

биологичните мембрани върху формирането и стабилността на домени от вида “rafts” в моделни мембрани и установяване ефекта на значими биологично активни съединения върху мембранната организация. За постигането на тази цел ясно са формулирани пет основни задачи за реализация, които се явяват солидна основа за представянето и интерпретирането на конкретните резултати в изследванията на дисертантката.

Литературният обзор е логично структуриран и в продължение на 21 страници са разгледани свойствата и биологична роля на липидите, изграждащи плазмената мембрана, като вниманието основно е насочено към главните компоненти на “rafts” микродомени - сфингомиелин и холестерол. Взаимодействията с тези микродомени са обект на изследванията в представената дисертация, като за целта са използвани структурни аминокиселини, ДНА-съдържащи глицерофосфолипиди и окисленият POVPC. Изборът на тези липиди е обоснован, поради все още неизяснените им ефекти върху формирането, стабилността и функциите на рафтовите микродомени в биологичните мембрани, както и въздействието на оксидативния стрес върху мембранната организация. От друга страна дисертационният труд е обогатен и с изучаване на взаимодействието на биологично активните антиоксиданти резвератрол и ксилоолигозахариди с мембранни липиди. Популярният с положителното въздействие върху сърдечно-съдовата система резвератрол показва и противовъзпалително, химиопрофилактично, противодиабетно и противосъстаряващо действие и е от значение да се вникне в молекулярния механизъм на взаимодействието му с различни мембранни липиди и влиянието му върху подредеността и организацията на моделните мембранни системи. В допълнение е изследвано и въздействието на пребиотиците ксилоолигозахариди (XOS) върху мембранната организация на липиди, екстрахирани от чернодробни плазмени мембрани на мишки, хранени с XOS.

На 8 страници са изложени използваните съвременни методи, описани са подробно постановките на опитите и приложените при експерименталната работа методики за провеждане на изследванията. Използвани са както класически биофизични методики за изолиране и пречистване на мембранни липиди, запазили стойността си до днес, така и съвременни високоинформативни техники (електроформиране на гигантски униламеларни везикули, диференциална сканираща калориметрия, флуоресцентна спектроскопия), позволяващи да се достигне до визуализацията на взаимодействията в моделните мембрани.

Получените резултати са представени, онагледени и анализирани на 43 страници, като подробно и задълбочено са разгледани различните ефекти на взаимодействие на изследваните биоактивни молекули по отношение на: въздействието им върху формирането на “rafts” домени, фазовото термотропно поведение на структурните липиди, ефектите на холестерола върху

смесваемостта на мембранните липиди, влиянието на степента на ненаситеност на мастно-киселите вериги и структурата на полярната глава върху мембранната организация и мн. др.

Заключенията и изводите от анализа на получените резултати, са обобщени поотделно в по 5 основни направления. Приносите, скромно обобщени в пет точки, определено са от изключително значение за изясняване на динамичните процеси в плазмената мембрана при директно взаимодействие с биологично активни вещества, разкривайки молекулните механизми на протичащите в мембраните сложни процеси.

Впечатляващите резултати от разработката на дисертационния труд са публикувани в 3 научни статии. В една от тях дисертантката е първи автор, а две – трети автор, което е доказателство за личния принос, както при проведените изследвания, така и при техния анализ. Общият импакт-фактор от трите публикации е впечатляващ – 7,859. Забелязани са 4 цитата. Резултатите са представени на 12 научни форуми у нас и в чужбина, като 4 от тях са доклади, а 8 са постерни презентации.

Представеният автореферат от Русина Хазаросова отговаря на съдържанието на дисертационния труд и може да дава достатъчно добра информация за извършената експериментална работа и получените резултати от изследванията.

Имам следните въпроси и забележки към дисертантката, относно представения дисертационния труд:

1. В последните години се утвърди представата за динамичното групиране на мембранни сфинголипиди и холестерол, при което се образуват микродомени със закотвени към тях белтъци, важни за сигналната трансдукция. Има ли категорични доказателства за наличието на подобни микродомени от вида “rafts” във вътрешната (цитоплазмена) част на клетъчната мембрана?
2. При сравняване на ефектите от мембранните взаимодействия на глицерофосфолипидите е установено значението на полярната глава при формирането и размера на рафтовите домени. Каква е ролята на геометрията и формата на фосфолипидните молекули при формиране на везикули, пори или мембранни нагъвания?
3. Защо на някои фигури в дисертацията (напр. IV-1, IV-5, IV-10, IV-14) показаните барчета, които онагледяват мащаба на флуоресцентните микрофотографии, са с различни размери, докато везикулите са със сходни размери?
4. Защо на фиг. IV-22 (стр. 74) не е посочен целият изследван температурен интервал (12 - 60°C)?

5. Как са определени ширините на Лоренциановия пик при изследване на зависимостта на общата поляризация като функция на температурата при нетретирани и третирани с резвератрол сфингомиелинови везикули (данните са представени в таблица 5)?
6. Имам някои дребни забележки по отношение на неточното използване на някои термини – напр. „ ... много патогени и техните токсини преференциално използват рафтовете като място за навлизане в клетката мишена т.е. те **“измамват”** тези микродомени и ги използват за свои цели“ на стр. 30. Какво имате предвид? Или „мастно-киселинната верига в молекулата на POVPC е активната молекула“ (стр. 69), както и определението за *биоактивни съединения* – всъщност те могат да оказват не само положителни въздействия върху метаболитните процеси, стр. 97.

Независимо от забележките ми дисертационния труд е посветен на много важен от научна гледна точка проблем, който изследва на молекулно ниво динамичните явления на взаимодействие в клетъчната мембрана и конкретно с “rafts” микродомените с различни биологично активни съединения. От извършената научно-изследователска работа проличава, че Русина Хазаросова е напълно подготвен специалист при провеждане на съвременни биофизични изследвания, притежаваща необходимите експериментални умения и способност да обсъжда резултатите и да ги съпоставя с литературните източници. С представените публикации и участия в научни форуми тя напълно отговаря на изискванията в Правилника за реда и условията за придобиване на научни степени в Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН, както и на Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав на Република България.

Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на дисертантката Русина Лъчезарова Хазаросова заслужено да бъде дадена образователната и научна степен “доктор”.

София

30.06.2016 год.

Автор на становището:

(доц. д-р Албена Йорданова)