

Вх. № 919 АСН / 28.08.2023

До Председателя на научното жури
(определено със Заповед №605/10.08.2023г.
на Директора на Института по биофизика и
биомедицинско инженерство, БАН

РЕЦЕНЗИЯ

относно дисертационен труд за придобиване на образователната и научна
степен “Доктор” по професионално направление 4.3 „Биологически науки“,

Докторска програма “Биофизика”,

Научен консултант: проф. д-р Галя Станева,

Автор на дисертационния труд: Весела Василева Йорданова,

докторант на самостоятелна подготовка,

Тема на дисертационния труд: „МЕМБРАННА РЕОРГАНИЗАЦИЯ ПРИ
ОКСИДАТИВЕН СТРЕС: ЕФЕКТ НА ОКИСЛЕНИТЕ ЛИПИДИ”,

Секция „Липид-белтъчни взаимодействия“,

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Рецензент: проф. дбн Яна Христова Цонева,

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН

Весела Йорданова е завършила Софийски университет „Св. Климент Охридски“, София, Биологически факултет, магистърска степен по специалността Биотехнологии. Зачислена е като докторант на самостоятелна подготовка на 1.08.2020г. По процедурата Йорданова е представила всички необходими документи в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ за откриване на процедура по защитата.

Описание на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд е написан на 151 страници и 64 фигури, и е структуриран по стандартния начин, състоящ се от разделите: Използвани съкращения, Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Заключение, Изводи, Приноси, Публикации по дисертацията, Участия в конференции, Декларация за оригиналността на резултатите, Литературна справка, включваща 417 литературни източника.

Актуалност на тематиката:

Напоследък ненаситените ω -3 мастни киселини (PUFAs) са актуални от научна гледна точка, тъй като са изключително важни не само за храненето, но и за здравето, облекчавайки редица възпалителни заболявания, а също така и автоимунни процеси като атеросклероза, невродегенеративни заболявания, включително болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон и множествена склероза, ревматоиден артрит, диабет и лупус. Полиненаситените мастни киселини са широко застъпени предимно в плазматичната мембрана и отговарят главно за флуидитета на мембраните и реорганизацията на динамичните структури от типа „рафт“, открити и популяризирани едва към 2006 година. PUFAs, са силно податливи на окисление от реактивните кислородни форми в клетките и авторите се насочват към изследване на ефекта на два от най-физиологично активните окислени липиди POVPC (1-палмитоил-2-(5'-оксо-валероил)-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин) и PGPC (1-палмитоил-2-глутарил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин) върху структурната организация на липидния бислой на биомиметични системи (липозоми), които моделират фазовите състояния на мембраната. Използваните липозоми са основно от фосфатидилхолинови (PC) молекули с различна степен на ненаситеност на мастната киселина в *sn*-2 позиция. Използвани са: 1) мононенаситения липид POPC (1-палмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин), съдържащ олеинова киселина и 2) полиненаситения PDPC (1-палмитоил-2-докозахексаеноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин), който съдържа докозахексаенова киселина (DHA - 22:6 ω -3), която е мишена на оксидативен стрес, но проявява също така редица плейотропни свойства.

Особено внимание е отделено и при изследване на секреторните фосфолипази (sPLA₂), които водят до получаване на свободни мастни киселини и лизолипиди при *sn*-2 позиция на глицерофосфолипидите. Продуктите от действието на секреторните фосфолипази върху фосфолипиди с повече ненаситени мастни киселини са свързани с оксидативния стрес, а също така и някои възпалителни процеси.

В заключение по-пълното познаване на въздействието на окислените фосфолипиди върху мембранната структура, а и свързаните с нея процеси на молекулно ниво

биха могли да дадат някои диагностични и терапевтични подходи при много широко разпространени заболявания като невродегенеративните и атеросклерозата.

Литературен обзор:

Литературният обзор е подходящо систематизиран, балансиран и представлява добър научен преглед на съвременните литературни данни, свързани с тематиката на докторантурата. Представеният обзор е онагледен с 16 фигури, цитирани са актуални и съвременни литературни източници. На пръв поглед, литературният обзор изглежда твърде обширен, но всъщност без разглеждането на някои новости относно последните изследвания в областта на биологичните мембрани би било трудно да се мотивира едно актуално научно изследване чрез използването на моделни биомиметични мембрани. Всичко това показва, че докторантката има добра теоретична подготовка. В заключение, литературният обзор е написан във връзка с целите на проведените изследвания.

Цел и задачи:

Целите и задачите са ясно формулирани, свързани с изследване на влиянието на биологично окислени липиди върху латерална организация на униламеларни везикули и активността на фосфолипаза A₂ (sPLA₂) в същите биомиметични системи, съставени от липиди с различна степен на ненаситеност при *sn*-2 позиция на мастните киселини. За целта задачите са оформени в 7 конкретни задачи като първата е с 2 подзадачи. Като цяло задачите отговарят на целите: Създаване на различни видове биомиметични системи, съдържащи окислени липиди в зависимост от ламеларността и моделиращи различни фазови състояния и фазови преходи; проследяване на степента на ненаситеност на мастните киселини, включени при *sn*-2 позиция в молекулата на GPLs, POPC и PDPC, върху домените от типа "rafts" при физиологична температура чрез гасене на DPH флуоресценцията чрез TEMPO молекулата; Лаурдан флуоресцентна спектроскопия за определяне на диференциалния ефект на окислените липиди; Флуоресцентна спектроскопия за определяне на влиянието на степента на ненаситеност на мастните киселини, включени в *sn*-2 позиция при смес от три вида липиди върху ензимната активност на sPLA₂ при физиологична температура; Определяне чрез флуоресцентна спектроскопия на активността на sPLA₂ като функция на степента на ненаситеност

при *sn*-2 позиция на фосфатидилхолина при двукомпонентни, трикомпонентни и четирикомпонентни смеси, а също така анализ на скоростта на ензимната реакция в системи, които имитират течно-неподредено (L_d) фазово състояние и L_o/L_d съвместно съществуване на различни комбинации от липиди.

Материали и методи:

Използвани са високо-качествени липиди, закупени от Avanti Polar Lipids. Представени са и структурните им формули. Използвани са подходящи флуоресцентни маркери и сонди като 1,6-дифенил-1,3,5-хексатриен (DPH), (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил) оксил (TEMPO) и 6-додеканоил-N,N-диметил-2-нафтиламин (Лаурдан), а също така фосфолипаза A_2 и подходящи буфери. Като пропуск бих посочила, че не е посочена единицата, в която се определя молекулното тегло. Методите са подробно описани и биха могли да бъдат като ръководство за млади кадри като дипломанти или докторанти. Включени са и 3 фигури, които показват механизма на действие.

Получени резултати и дискусия:

При изследване на влиянието на окислените липиди POVPC и PGPC и степента на ненаситеност на мастната киселина при *sn*-2 позиция в молекулата на PC върху формирането и размера на “рафт” домените чрез DPH-TEMPO флуоресцентна спектроскопия е доказано, че фосфатидилхолиновите липозоми – модел на L_d фаза, се характеризират с най-ниски стойности на Q (отношението на флуоресцентните интензитети с TEMPO и без TEMPO), а с най-висока се характеризира сместа SM/Chol (50:50) (модел на L_o фаза). Останалите смеси, бинарни и трикомпонентни, които са модел на L_o/L_d ко-съществуване се разполагат между тези стойности (Фиг. IV.1). При добавяне на POVPC се увеличава повече образуването на L_o фазата в сравнение с използването на PGPC (Фиг. IV.2). Добавянето на POVPC и PGPC води до образуване на по-големи домени от типа „рафт” (Фиг. IV.3).

Зависимостта на общата поляризация (GP) на Лаурдановата флуоресценция от температурата, изчислена на базата на получените емисионни спектри в чисти фосфатидилхолинови липозоми показва намаляване на GP стойностите на тази сонда с увеличаване на температурата. GP силно зависи от наличието на окислени

липиди и холестерол, а също и от комбинацията на липидите при формирането на липозоми (моно, две или трикомпонентни) (Фиг. IV.4-10).

Активността на фосфолипаза A_2 (пчелна sPLA₂) е изследвана също чрез флуоресцентна спектроскопия като везикулите са съставени от фосфолипиди с различна степен на ненаситеност на мастните киселини в молекулата на POPC и PDPC. Във везикулите е включен флуорогенен субстрат на тази фосфолипаза, наречен PED6 (фосфатидилетаноламинова молекула, белязана с флуоресцентно багрило BODIPY към *sn*-2 ацилната верига). Ензимната активност е по-висока при мононенаситените мембрани в сравнение с полиненаситените, което е в съответствие с резултатите, получени и от други автори (Фиг. IV-11). Дисертантката установява, че при наличие на окислени липиди в състава на липозомите ензимната активност на фосфолипаза A_2 силно зависи от протокола на хидратация на липидите (Фиг. IV.12.1-2 и Фиг. IV.12.3) и при двата типа матрикси. Наличието на холестерол в различни концентрации повлиява скоростта на ензимната реакция, която е по-висока при мононенаситените мембрани в сравнение с полиненаситените (Фиг. IV 13.1-3).

При изследване на степента на ненаситеност на мастните киселини в молекулата на глицерофосфолипидите POPC и PDPC върху активността на sPLA₂ в PC/SM/Chol смеси, използвани в различни моларни съотношения (L_o/L_d модел на съществуване) е доказано, че при полиненаситените мембрани, най-ниска ензимна активност е при еквимоларно липидно съотношение в сместа PDPC/SM/Chol 1:1:1, т.е. с най-високо съдържание на SM и Chol (Фиг. IV-14.1-3).

Ефектът на окислените липиди (OxPCs) върху активността на sPLA₂ в мононенаситени и полиненаситени PC/SM/Chol мембрани при липидно съотношение 1:1:0.5 показва, че OxPCs проявяват силен инхибиращ ефект върху ензимната активност и при двата типа липидни матрикси, който за POVPC е 100%, а за PGPC – близо 90% (Фиг. IV-15). Наклоните на кинетичните криви показват, че най-ниска скорост на хидролизната реакция, катализирана от sPLA₂, е установена при четирикомпонентните смеси PC/SM/Chol/OxPC 1:1:0.5:0.3 (Фиг. IV-15.3B). При OxPC-съдържащите мембрани, скоростта на ензимната реакция намалява с над 85% в сравнение с трикомпонентните контролни смеси. В заключение

дисертантката прави анализ на кинетиката на хидролизата на фосфатидилхолиновите мембрани в L_0/L_d фазово състояние под действие на sPLA₂, че е изключително сложна, свързана с латералното разделяне на фазите, мембранната хетерогенност и кривина, като резултат от натрупването на едноверижни PCs (лизопродукти) и свободни мастни киселини, които могат да останат в бислоя, осигурявайки различен характер на мембранната структура.

Приемам направените от докторантката **9 извода и 3 приноса**, които са представени доста компактно и отговарят на получените резултати.

Посочените приноси се отнасят към **област получаване и доказване на нови за науката факти**. Посочените изводи биха могли да помогнат за изясняване на структурната организация и физико-химичните свойства на биологичните мембрани, както и предоставят механизми на патологии, свързани с оксидативния стрес и стареенето, дискутирани в дисертацията.

Авторефератът съответства на дисертацията.

Научни публикации в дисертацията:

1. **Yordanova V. et al**, International Journal of Molecular Sciences, 24, 11166, 2023, **Q1, IF 5.6**
2. **Yordanova V. et al**, Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 74, 78-87, 2021, **Q2, IF 0.343**
3. **Yordanova V. et al**, Oxidation Communications, 43, 4, 678-687, 2020, **Q3, SJR 0.224**

На всички публикации Весела Йорданова е първи автор. Познавам докторантката и работа ѝ през годините и приемам, че по-голямата част от резултатите са нейн личен принос.

Участие в конференции:

Участието на докторантката с устни или постерни доклади на наши и международни мероприятия е 8. На всички докторантката е първи автор.

Критични забележки и въпроси към докторантката нямам, но бих припоръчала в бъдеще визуализиране на везикулите.

Заклучение:

Дисертационният труд е актуален. Извършена е значителна по обем и качество научно-изследователска работа с подходящи и съвременни биофизични методи. Получените нови и оригинални резултати са публикувани в 3 списания (1 - Q1, 1 - Q2 и 1 – Q3). Дисертационният труд е обемно и коректно проведено научно изследване, в голяма степен лично дело на докторанта, което заслужава безспорно положителна оценка. Дисертационният труд по актуалност на изследванията, количеството и качеството на проведените експерименти, броя на публикациите и значимостта на изводите и приносите, напълно отговаря на Закона за развитие на академичния състав в Република България и 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 гласуват положително за присъждането на Весела Василева Йорданова образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3. „Биологически науки”, докторска програма „Биофизика”.

28. 08. 2023 г.

София

Подпис:

Проф. дбн Яна Цонева