

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология-Биологични мембрани)

Автор на дисертационния труд: Славяна Пламенова Иванова, редовен докторант (отчислен, с право на защита), в Катедра “Биохимия”, Биологически факултет на Софийски университет “Климент Охридски”

Тема на дисертационния труд: “Взаимодействие на фармацевтични агенти с филми от слъзни липиди и протеини”

Научен ръководител: доц. д-р Георги Георгиев

Рецензент: доцент д-р Христо Иванов Христов, ИФХ-БАН, член на научното жури

Дисертационният труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ на докторант Славяна Пламенова Иванова на тема: “Взаимодействие на фармацевтични агенти с филми от слъзни липиди и протеини” представлява мащабно, експериментално и теоретично, научно изследване на взаимодействията на фармацевтични агенти с филми от слъзни липиди и белтъци на въздушно/водна фазова граница. Нарушенията в състава, структурата и функцията на липид/белтъчния слой покриващ фазовата граница сълза/въздух, са главна причина за развитието на широко разпространеното съвременно заболяване на външната очна повърхност – синдромът на сухото око. Това заболяване засяга около 10% от населението и освен, че причинява сериозен дискомфорт на болелите, има и значителен негативен социален ефект. Слъзната дисфункция е хронично нарушение, което може да се контролира успешно, но понастоящем не може да бъде излекувано напълно. В тази връзка представения за рецензия дисертационен труд е в актуална научна област с голямо значение за практиката. Получените резултати могат да допринесат за разработването на нови подходящи средства за лечение или за облекчаване състоянието на болелите от синдромът на сухото око.

Кратки биографични данни

Докторант Иванова е завършила Биологическия факултет на СУ “Св. Климент Охридски” с бакалавърска степен по “Молекулярна биология” през 2010 г. През 2012 г. е защитила дипломна работа на тема ”Филми от човешки мейбомиеви липиди на въздушно/водна фазова граница: квази-равновесни и динамични повърхностни

свойства и взаимодействие с изкуствени слъзи и фармацевтични ingrediente” за получаването на магистърска степен по “Биохимия”. През 2013 г. е зачислена на редовна докторантура професионално направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология - Биологични мембрани) към катедра “Биохимия” с научен ръководител доц. д-р Георги Георгиев. Съавтор е на 6 статии публикувани в престижни международни списания с висок импакт фактор (ИФ). До момента трудовете са цитирани 19 пъти от чужди автори. Има 5 участия в международни конференции и симпозиуми с един устен доклад и 4 постера. Предвид сравнително кратката научна кариера на докторант Иванова, посочените наукометрични данни са впечатляващи.

Дисертационният труд е в обем от 167 страници и съдържа 4 глави, заключение, приноси, 61 фигури и 10 таблици. Цитирани са 251 литературни източника. Дисертацията се основава на 3 статии, като една е публикувана в “International journal of molecular sciences” с ИФ 2.86 и две в “Soft matter”, с ИФ над 4. Резултатите по дисертацията са представени на 5 международни научни форума, като на един от тях е получила награда за най-добър постер.

Кратък анализ на отделните глави на дисертацията.

Литературният обзор обхваща 28 страници, цитирани са 180 източника и дава една отлична представа за развитието на научната област, предмет на дисертацията. Обзорът се състои от 3 подточки. В *първата точка*, озаглавена “Слъзен филм” е обяснена ролята му за нормалното функциониране на окото, анализиран е състава на слъзния филм, описани са липидните и бегъчни компоненти на слоя, както структурата и свойствата му. Основна част от слъзния филм е мейбомиевия секрет (> 90%) продуциран от жлези разположени по вътрешната част на клепачите. Биохимичното му характеризирание е показало, че представлява сложна многокомпонентна смес от 80-90% липиди (полярни и неполярни) и 10-20% белтъци. Подробно са разгледани основните липидни класове и предполагаемата им роля за свойствата на слъзния филм. Подобен анализ е направен и за белтъчните компоненти, като са отбелязани съвременните схващания за ролята на отделните компоненти за функцията на слъзния филм. Но, както е отбелязано в дисертацията, въпреки многобройните изследвания до момента, относителната роля на липидната и белтъчната компонента в повърхностните свойства на мейбомиевия секрет все още остава неизяснена. Посредством интерферометрични измервания *in vivo* е установено, че слъзния филм представлява сложна мултислойна

структура съставена от двоен (дуплексен) филм на фазовата граница сълза/въздух, покрит с дебела (18-150 nm) „маслена шапка“ състояща се основно от неполярни липиди, контактуващи с въздуха. Във *втора точка* озаглавена “Синдром на сухото око” са разгледани двата основни класа сухо око “*Сухо око вследствие на дефицит на водни сълзи*” и “*Изпарително сухо око*”. Впечатлен съм от идеята на докторант Иванова да представи графично на фигура 7 основните причини за развитие на синдрома на сухо око, както и дадената на фигура 8 обобщена схема на механизмите на развитие на му, с което много улеснява читателя. *Точка трета* е посветена на съвременните достижения в терапията на синдрома на сухото око. Описани са както конвенционалните средства за терапия (например изкуствените сълзи), така и медицинската терапия с различни лекарствени средства която, както е отбелязано в дисертацията, поради сложната патофизиология на синдрома изисква също толкова комплексна терапия,

Считам че, докторантът е направил задълбочен литературен обзор на съответната специфичната научна област, анализирал е получените от други автори резултати, ясно е разграничил решените от нерешените научни проблеми свързани с темата на дисертацията. За мен няма никакво съмнение, че е отлично запознат със съвременното състояние на научните проблеми свързани с дисертационния му труд.

В главата “Цели и задачи” е дефинирана основната цел на дисертацията а именно: Да се изучат взаимодействията на различни по химична природа фармацевтични агенти с филми от мейбомиев секрет и да се оцени способността на подобрени фармацевтични агенти, частично или напълно, да възстановяват повърхностните свойства на филмите, а така също и да се установи кои свойства на мейбомиевите филми се променят между норма и патология. За постигането на поставената цел са формулирани шест задачи включващи изследване на повърхностните и реологични свойства на филмите, определяне морфологията на филмите посредством микроскоп под ъгъла на Брюстер и др.

В глава 3 са представени материалите и методите, използвани за провеждане на изследванията предмет на дисертацията. Детайлно са описани процедурите за събиране на човешки мейбомиев секрет от очите на здрави индивиди и пациенти, диагностицирани с дисфункция на мейбомиевите жлези, както и последващата обработка и съхранение на пробите. Повърхностните и реологични експерименти са

проведени посредством компютърно контролирана тензиометрична везна на Лангмюир. За измерване на изотермите повърхностно налягане/площ ($\pi(A)$ -изотермите) е използван модифициран метод на Wilhelmy (чрез платинена игла) с точност на измерванията $\pm 0.01 \text{ mN/m}$). Детайлно е описана методологията на експеримента, като са посочени всички необходими стъпки, от подготвяне на пробите, до получаването на крайните резултати. Латералната морфологията на филмите е изследвана с Брюстеровата микроскопия. Тази техника позволява изследването на тънки монослойни филми на фазовата граница въздух/разтвор. Разгледана е, и обяснена, принципната схема на метода и начина за работа. Подробно са разгледани математичните методи използвани за обработка на експерименталните данни: модела на *Maxwell* за анализ на кривите на релаксацията на повърхностното налягане на филма и *Фурие трансформация* за описание кинетиката на релаксация, като са дефинирани две константи отразяващи приноса на бързото и бавното релаксационно време в общото време за релаксация. Критичната концентрация на агрегиране на свободни молекули на консерванта додецилдиметилбензиламониев хлорид (C12-BAC) е определена в Катедра „Офталмология“ към Медицински университет на Киото, Япония. Събирането на проби от човешки сълзи и определяне съдържанието на Сквален (алифатен, разклонен, силно ненаситен липид) в тях е проведено в Катедра „Офталмология и зрителни науки към Луисвил Университет, Луисвил, САЩ посредством NMR (ядрено магнитен резонанс). Скваленът е потенциален компонент към фармацевтичните състави, защото проявява антиоксидантна, детоксикираща, и хидратираща функция. Последните две изследвания са ярък пример, че успешното международно сътрудничество е помогнало на докторанта да осъществи поставените задачи на дисертационният труд.

От казаното до тук е видно, че овладяването на разнообразни експериментални методи, обработката, анализа и интерпретацията на получените данни не е лека задача, с която докторант Иванова се е справила отлично. Както теоретичната подготовка, така и експерименталните ѝ умения са на високо научно ниво.

В четвърта глава “Резултати и дискусия” са описани и дискутирани резултатите от проведените многобройни изследвания с различни експериментални техники. Обособени са пет основни групи изследвания посочени по-долу. Няма да дискутирам

подробно получените резултати и ще отбележа само (по мое мнение) основните научни постижения за всяка точка.

1) *Структура и свойства на филми от човешки мейбомиев секрет въздушно/водна фазова граница*

Предложен е нов модел за структурата и функцията на слъзния филм, комбиниращ резултатите от настоящия дисертационен труд с тези на други независими изследователски групи. Според него главната функция на липид/белтъчния слой е да стабилизира фазовата граница слъза/въздух чрез покачване на еластичността на филма, а не толкова да предотвратява изпарението на водата от слъзния филм, както се е считало според предишните схващания. Настоящият модел е приет от научната общност като водещ за разбирането функционалността на слъзния филм

2) *Взаимодействие на хидрофилни полимери с човешки мейбомиев секрет въздушно/водна фазова граница*

Установено е, че хидрофилни не повърхностно активни полианионни полимери, като полизахариди, хиалуронова киселина и др. взаимодействат с мейбомиеви филми в района на полярните глави, без да проникват в дълбочина във филмите. При взаимодействието на полимерите с мейбомиевите слоеве се наблюдава подобро разтичане на мейбиума на въздушно/водната фазова граница и повишаване на еластичния компонент във вискоеластичните свойства на слоевете.

3) *Взаимодействията на хиалуронова киселина и бензалкониев хлорид с филми от човешки мейбомиев секрет.*

Предложен е нов физикохимичен механизъм за полезното действие на хиалуронова киселина (НА). Полимерът понижава концентрацията на свободния додецилдиметилбензиламониев хлорид (C12-BAC), като агрегира с него в обемната фаза, образувайки големи сърфактант/полимерни комплекси, които не могат да проникнат в мейбомиевите филми при физиологична плътност на молекулната опаковка. Катионните сърфактанти като додецилдиметилбензиламониевия хлорид са единствените ефикасни сърфактанти за много активни фармацевтични ingrediente, но също така са и силно инвазивни за очната повърхност. Предложено е към лекарствения разтвор, предпазен с катионен консервант, да се добави полимер потискащ вредните странични ефекти на консервантните молекули и същевременно да позволява останалите фармацевтични ingrediente да оказват желаното въздействие върху очите

4) *Повърхностните свойства на Сквален/мейбомиеви филми и потвърждение на присъствието на Сквалена в човешките слъзи посредством ЯМР*

Установено е, че при ниски физиологични концентрации Сквадена има ограничено въздействие върху структурата и свойствата на мейбомиевите филми и почти не влияе върху повърхностните свойства на сълзите. Главните му биологични и фармакологични функции се изразяват в антиоксидантно, детоксикиращо, хидратиращо и противовъзпалително действие.

5) *Динамичните повърхностни свойства на мейбомиеви филми от здрави и болни индивиди.*

Проведения сравнителният анализ на свойствата на мейбомиеви филми от здрави доброволци (nMGS) и от пациенти, диагностицирани със синдрома на сухо око (dMGS) е показал, че при последните филмите имат нарушена структура и вискоеластичност в сравнение с тези на здравите хора.

Резултатите в настоящия дисертационен труд разкриват нуждата от преосмисляне на ролята на слъзния филм. Много е вероятно да се окаже, че основната функция на слъзните липиди е да поддържат еластичен слой, способен да противостои на разтягането на въздушно/водната фазова граница. В такъв случай, измененията във вискоеластичните свойства на мейбомиевите липиди биха били от ключово значение за стабилността на слъзния филм. На базата на получените резултати е предложена нова хипотеза за ролята на компонентите на мейбиума за структурата и функцията на слъзния филм и в съчетание с демонстрираната способност на полианионни неповърхностно активни полимери частично да възстановяват свойствата на слъзните филми от “сухо око”, което може да помогне да се разкрият възможности за дизайн на нови фармацевтични състави с офталмологично приложение.

Заслужава да се отбележи също, че подхода използван за Фурие анализа на кинетиката на релаксациите е довел до разработка на метод включен в комерсиален софтуер за Фурие трансформация на релаксационни кинетични криви на повърхностното налягане, който понастоящем се предлага от фирмата Kibron Inc., Finland.

Достоверността на получените експериментални данни не буди никакво съмнение. Във всички случаи е направен подробен анализ на получените експериментални резултати, сравнени са със съответните теоретични зависимости (където е било възможно), оценени са грешките, коментирани са и резултати, получени от други автори. Не на

последно място е и факта, че статиите послужили за основа на дисертацията са публикувани в престижни международни списания с висок ИФ, след рецензии на компетентни в тази научна област учени.

Резултатите и теоретичните разглеждания в дисертацията са представени по много добре организиран и ясен начин, и за мен няма никакво съмнение, че научните приноси са в голяма степен лично дело на докторант Иванова. Разбира се, трябва да се отбележи и заслугата на научния ѝ ръководител доц. Георгиев, който я е въвел в тази изпълнена с предизвикателства научна област и я насочвал и помагал при изпълнението на поставените задачи.

Авторефератът отразява коректно основните положения и научните приноси на дисертационния труд,

Основните научни приноси (три на брой) са дефинирани много добре и отразяват точно научните и научно приложните резултати получени в рамката на поставените цели в дисертацията.

Нямам забележки по дисертационния труд. Не забелязах грешки или пропуски, които заслужава да бъдат коментирани.

Заклучение

В заключение, искам да отбележа, че съм впечатлен от дисертационния труд на докторант Славяна Пламенова Иванова. Считаю, че той надхвърля значително изискванията за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”, както по качество, така и по значимост на получените научни резултати. С удоволствие препоръчвам на уважаемите колеги, членове на Научното жури, да гласуват за присъждане на образователната и научна степен “Доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология-Биологични мембрани) на докторант Славяна Пламенова Иванова.

07.04.2016

София

Рецензент:

/Доц. д-р Христо Христов/