

.РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д.б.н. Диана Христова Петкова

Член на Научно жури съгласно заповед № РД-38-692/ 11.11.2025 г. на Ректора на СУ „Климент Охридски“ на дисертационния труд на Юлия Георгиева Пецева ‘ ‘Изследване на взаимодействията на биологично активни агенти с мембранни домени и тяхната роля в еукариотни клетки‘ ‘ представен за присъждане на научната степен „Доктор“ в област на висше образование 4 „Природни науки, математика и информатика“ професионално направление 4.3 Биологически науки (молекулярна биология) с научни ръководители проф. д-р Светла Петрова и проф. д.б.н. Йордан Думанов

Кратки биографични данни

Юлия Георгиева Пецева е родена през 1987 г. в гр. Петрич. През 2010 г. завършва Софийски университет „Св. Климент Охридски“ специалност Биология и магистратура Клетъчна биология и патология. След завършване на висшето си образование постъпва в Института по молекулярна биология – БАН като биолог. От 2019 до 2024 г. е асистент в Катедрата по анатомия и физиология към Югозападен университет „Неофит Рилски“. От 2016 до 2019 е докторант към Катедра Биохимия, Биологически факултет СУ „Св. Климент Охридски“. От 2024 г. е хонорован асистент в Катедрата по анатомия и физиология към Югозападен университет „Неофит Рилски“.

Информация за документацията свързана с дисертационния труд и автореферата

Всички документи свързани с процедурата по защитата, както и дисертацията и автореферата отговарят на изискванията на ЗРАСРАБ и Правилника за неговото приложение в СУ „Климент Охридски“. Дисертацията обхваща 92 страници, цитирани са 173 литературни източници. По-голямата част от цитираната литература са източници след 2000 г., което е доказателство, че авторката е запозната с най-новите тенденции в научната област на дисертацията.

Трудът е онагледен с 28 фигури и една таблица. Той обхваща следните раздели: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси и Цитирана литература. Резултатите от дисертацията са публикувани в 2 статии- една , от които с IF и една с SJR и са представени на 5 научни форума у нас с международно участие.. Независимо, че статията в списанието с IF е публикувана през 2025 г. вече е

цитирана от чужди автори. Авторефератът е 45 стр. и напълно отговаря на структурата и съдържанието на дисертацията като отразява основните резултати. При направената справка за съответствие с минималните национални изисквания за научната степен „доктор“ в дадената област се установява, че по групите показатели Юлия Пецева покрива изискуемите точки, а именно по показател А – 50 т. и по показател Г – 31 т.

Актуалност на проблема

Темата на дисертацията е много актуална тъй като изследването на взаимодействието на випоксина (активният компонент на змийската отрова) и неговите съставни мономерни с моделни системи ще допринесе до изясняване на редица молекулни механизми на патологичните състояния предизвикани от секреторните фосфолипази. Тези изследвания биха допринесли и до изясняване на фармакологичните ефекти на отделните субединици на комплекса, както и степента на токсичното им действие, и възможността за приложението им в биомедицината с цел създаване на медикаменти , които биха могли да предотвратят действието на токсините на пепелянката върху организмите.

За изпълнение на поставените задачи докторантката е използвала съвременни и адекватни методи. Те са описани точно и подробно, което говори, че докторантката е добре запозната с тях, което ѝ е позволило да ги използва за постигане на поставените цели. Ето защо считам, че Юлия Пецева има отлична теоретична и методична подготовка.

Целта на дисертацията и поставените задачи за нейното изпълнение са много ясно дефинирани и произлизат от нерешените проблеми след преглед на литературата.

Резултати и обсъждане

1. Определяне на цитотоксичността на випоксин и двете му субединици – VBC-sPLA₂ и VAC

За да се определи механизма на цитотоксичността на випоксина и неговите две субединици са използвани два вида ретинални клетъчни линии RPE - RPE-1 и ARPE-19. Третирането на двата вида клетки с VBC-s PL₂ води до различни отговори като жизнеността на RPE-1 спада до 50%, а ARPE-19 се оказва значително по-стабилна. Авторката предполага ,че тези различия се дължат на

разликите във фосфолипидния и белтъчен състав на мембраните. Според нея количеството на анионните липиди във външния слой на мембраните на RPE-1 е по-високо, което води до дезорганизация на мембрания бислой и така той става по-податлив на въздействие.

Действието на неензимната част на випоксина не води до значителни разлики при двата вида клетки и не е концентрационно зависима. Тъй като се наблюдава намаление на жизнената активност на клетките авторката предполага, че съществува някакъв некаталитичен механизъм на въздействие върху жизнеността на клетките.

Кинетиката на ензимното въздействие на VBC отново доказва, че RPE-1 са по-чувствителни. При двете клетъчни линии се достига плато след определено време на третиране, което предполага, че се наблюдава интернализация на ензима в клетките и възстановяване на мембраните и реорганизация на цитоскелета с цел запазване на жизнеността на клетките.

2. Изследване на влиянието на двете субединици на випоксина върху интегритета на плазмените мембрани на двата вида клетки.

Випоксинът и неговите субединици оказват различно въздействие върху мембраните на двата вида клетки. Наблюдаваните промени са концентрационно зависими, което се дължи на увеличеното ново на лизофосфолипиди след въздействие на фосфолипазата, водещи до промени в организацията на мембраните дължащо се на мицели, които нарушават интегритета на плазмените мембрани. Наблюдаваните промени корелират с наблюдаваните изменения при изследване на цитотоксичността на двете субединици и на випоксина като цяло. Това е индикация за единен молекулен механизъм, който протича и не зависи от структурата на мембраните.

3. Изследване на фосфолипидния състав на мембраните при двата вида клетки.

За да се изяснят причините за различното действие на випоксина и неговите субединици върху двата вида клетки е изследван фосфолипидния състав на клетъчните мембрани тъй като там е основното действие на випоксина и неговите компоненти. Наблюдаваните основни различия са при новото на PS като неговото количество е по-високо при RPE-1, което обяснява по-голямата чувствителност, тъй като фосфолипаза A₂ проявява по-голям афинитет към хидрофилните глави на анионните липиди. Различия се наблюдават и при

нивата на PE, който също е добър субстрат на фосфолипазата. Според мен различията в нивата на изследваните фосфолипиди са твърде ниски за да се твърди, че те са причина за наблюдаваните различия при въздействие на фосфолипазите.

4. Сравнителен анализ на влиянието на VBC-sPLA₂, VAC и випоксин върху мембрания интегритет на клетки от ретинален пигментен епител чрез измерване на трансепителната електрическа резистентност (TEER).

TEER е индикатор за физическите свойства на клетъчните мембрани като бариерни функции, пропускливост и плътност на контактите. Въздействието с випоксин или с VAC-PLA₂ върху RPE-1 води до намаление на трансепителната резистентност, което предизвиква повишение на клетъчния пермеабилитет, докато неензимната субединица не оказва промени върху TEER. Следователно неензимната субединица на випоксина не повлиява плътността на клетъчния монослой, което отново налага схващането за участие на каталитичен механизъм при измененията в йонната проводимост на RPE-1 клетките. Постепенно след известно време клетките започват да възстановяват пропускливостта си, следователно това въздействие е обратим процес и клетките притежават компенсаторни механизми, които водят до възстановяване на свойствата на клетъчните мембрани. При проследяване на краткотрайния ефект от випоксина и неговата активна субединица се установява силна редукция на TEER като това се обяснява с натрупване на продукти от ензимната реакция, които водят до промяна на интегритета на клетъчните мембрани.

Наблюдаваните промени при ARPE-19 клетки са в същата посока, но много по-слабо изразени и тенденцията за възстановяване на свойствата на мембраните е сходна с другия вид клетки.

5. Изследване въздействието на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC върху реорганизацията на актиновия цитоскелет и β -катенина в ретинални пигментни клетки-RPE-1 и ARPE-19

Тъй като бариерните свойства на епителните клетки зависят от състоянието на актиновия цитоскелет и междуклетъчните контакти след като са установени нарушения в бариерните функции на монослоя при изследваните RPE-1 е проследена реорганизацията на актиновите филаменти и адхезивните контакти клетка-клетка. Установява се, че след третиране с ензимната

субединица на випоксина се наблюдава значителна реорганизация на актиновите филаменти, нарушение на адхезивните контакти клетка-клетка, формират се междуклетъчни пространства, което води до понижаване на бариерните свойства на монослоя. Наблюдаваните промени при въздействие на хетеродимера випоксин са слабоизразени, докато при другия вид клетки наблюдаваните промени са по-незначителни.

6. Имунодетекция на PLA₂R1 – M - рецептор за sPLA₂ в мембраните на RPE-1 и ARPE-19 клетки

При тези изследвания е доказано наличието на рецептор за фосфолипазата и при двете клетъчни линии.

7. Активация на p38 MAPK в RPE-1 клетки, третирани с VBC-sPLA₂, VAC или випоксин.

За да се проследи дали митоген активираният протеин киназа участва при въздействие на випоксина върху двете клетъчни линии е проследена степента на фосфорилиране на p 38 MAPK киназата след третиране на клетките с випоксин и неговите субединици. Независимо с какво са третирани клетките се наблюдава засилено фосфорилиране почти веднага след въздействието на випоксина или неговите субединици. Това е доказателство, че процесите на фосфорилиране не играят съществена роля при въздействието на фосфолипаза A₂.

8. Оценка на генотоксичността на sPLA₂ върху RPE-1 и ARPE-19 клетъчни линии

Чрез кометен анализ е изследван генотоксичният ефект на випоксина и неговите субединици при различни времена на третиране при двете клетъчни линии. При тези изследвания се установява, че при въздействие с каталитичната субединица на випоксина уврежданията зависят от приложената концентрация при RPE-1 клетки. При третиране с хетеродимера най-силно въздействие се наблюдава при действие с най-ниската концентрация. При по-високи концентрации хетеродимерният комплекс причинява много по-малко на брой разкъсвания на ДНК. Неензимният компонент на випоксина също предизвиква увреждания като при повишени концентрации степента на уврежданията намалява. Предполага се, че при повишени концентрации тази субединица образува димери в разтвора, които са с понижена активност.

Клетките ARPE-19 показват някои различия в поведението си след третиране спрямо RPE-1 клетки. Ензимната субединица уврежда ДНК, но тук не се наблюдава концентрационна зависимост. Нетоксичният компонент предизвиква силни увреждания в интегритета на ДНК независимо от концентрацията. Въздействието на випоксина е аналогично на действието на нензимната субединица. Предполага се, че действието на випоксина се дължи, както на ензимната така и на нензимната субединица, което е индикация, че не само продуктите на хидролиза на фосфолипидите имат значение за ДНК уврежданията, но токсините могат да се интернализират в клетката и така да водят до токсично въздействие.

9. Определяне на апоптоза при въздействие на випоксина и неговите субединици върху двата вида клетки

За да се изяснят механизмите на взаимодействие на випоксина върху двата вида клетки са изследвани апоптичните и некротичните процеси след въздействието. Каталитичната субединица води до ранна или късна апоптоза при малък брой клетки RPE-1, но при част от тях се наблюдава ясно изразена некроза докато при ARPE-19 се наблюдава висок % апоптоза и много нисък % некроза. Неактивният компонент не предизвиква сериозни промени, но независимо от това броя некротични клетки при ARPE-19 е много по-висок от тези при RPE-1. Випоксинът при ARPE-19 отново предизвиква по-голям ефект. Тези процеси се обясняват с факта, че каталитичната субединица води до нарушение на мембранный интегритет при RPE-1 и от там до некроза, докато при ARPE-19 се проявява фармакологичното действие, което води до апоптоза. Тези данни показват, че випоксинът действа на клетките и чрез двете си субединици.

Всички тези изследвания показват сложните механизми, които се отключват при взаимодействие на випоксина или неговите субединици с клетките. Уврежданията на клетките зависят не само от структурата на клетъчната мембрана, но и от генома на таргетната клетка.

От проведените изследвания са формулирани 9 извода и 4 приноса. Приемам изводите, които отразяват точно получените резултати. Считаю че приносите са безспорни и са коректно формулирани..

Заклучение

Представената ми за рецензиране дисертация " Изследване на взаимодействията на биологично активни агенти с мембранни домени и

тяхната роля в еукариотни клетки“ от докторант Юлия Пецева е един завършен труд, който заслужава висока оценка и напълно отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ и правилниците за неговото приложение в БФ и СУ “Св.Кл.Охридски“. Получени са оригинални резултати за механизма на действие на випоксина - основният агент в отровата на пепелянката, които биха могли да се използват в бъдеще за получаване на фармацевтични продукти за противодействие на тази отрова. Ето защо препоръчвам на членовете на Научното жури да подкрепят присъждането на научната и образователна степен „доктор“ на Юлия Георгиева Пецева в област на висше образование 4 „Природни науки, математика и информатика“ професионално направление 4.3 Биологически науки (молекулярна биология) .

6.02.2026 г

проф. Диана Петкова д.б.н.