

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на **Юлия Георгиева Пецева**
за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по професионално
направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)

Рецензент: доц. д-р Георги Николаев Георгиев, катедра „Клетъчна биология и биология на развитието“, Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски“

I. Обща характеристика на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд представлява цялостно, систематично и концептуално завършено научно изследване, насочено към задълбочено изучаване на взаимодействията на биологично активни белтъчни агенти с мембранни домени и отражението на тези взаимодействия върху различни аспекти от клетъчната физиология на еукариотни клетки. В центъра на изследването е поставен хетеродимерният невротоксичен комплекс випоксин и неговите индивидуални субединици, разгледани както в контекста на техните ензимни характеристики, така и по отношение на некаталитичните им ефекти върху клетъчни структури и сигнални механизми. Подобна изследователска рамка предполага едновременно владеене на биохимични, клетъчнобиологични и молекулярни подходи и демонстрира интердисциплинарен научен обхват.

Темата на дисертацията е ясно позиционирана в полето на съвременната молекулярна биология и клетъчната биохимия, като същевременно има отчетлив биомедицински потенциал. Изборът на клетъчни модели от ретинален пигментен епител допълнително разширява приложното измерение на труда, поставяйки го в контекста на офталмологичните и невробиологичните изследвания. По този начин дисертационният труд надхвърля чисто фундаменталния интерес и прави връзка между базовата наука и възможните бъдещи приложни интерпретации.

Структурно трудът е изграден в съответствие с утвърдените академични стандарти и включва увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси, публикации и библиография. Отделните раздели са балансирани по обем и съдържание, като логиката на изложението е последователна и аргументирана. Наблюдава се ясно проследима връзка между теоретичната рамка и експерименталната част, което е белег за зрял научен подход и умение за систематизиране на сложна научна информация.

Особено съществено е, че трудът не се ограничава до описателен анализ на наблюдавани ефекти, а се стреми към разграничаване на механистични нива – каталитични и некаталитични, мембранни и рецепторно медирирани, структурни и сигнални. Тази

аналитична насоченост придава на изследването научна дълбочина и свидетелства за способност за формулиране на изследователски въпроси отвъд повърхностното емпирично наблюдение.

II. Актуалност и научна значимост на темата

Актуалността на дисертационния труд се определя от няколко ключови направления, които се пресичат в съвременната биологична наука. На първо място, секреторните фосфолипази A₂ представляват ензими с широко участие в регулацията на клетъчни процеси, свързани с възпаление, апоптоза, мембранна динамика, сигнална трансдукция и клетъчна диференциация. Тяхното значение далеч надхвърля класическото разбиране за ензимна активност и включва взаимодействия с рецепторни структури и участие в регулаторни мрежи на клетъчно ниво.

На второ място, изследването на мембранните домени и липидните микрообласти се утвърди като една от водещите теми в клетъчната биофизика и молекулярната клетъчна биология. Мембраната се разглежда като динамична, функционално организирана и структурно хетерогенна система, в която белтъчните и липидните компоненти изграждат сложни функционални модули. В този контекст използването на белтъчни токсини като експериментален инструмент за изследване на мембранната организация представлява научно обоснован и продуктивен подход.

На трето място, изборът на ретинален пигментен епител като моделна система е особено уместен. Тези клетки изпълняват бариерни, метаболитни и трофични функции, които са от съществено значение за зрителната система. Следователно изследванията върху тях имат значение както за базовата клетъчна биология, така и за патогенезата на дегенеративни и възпалителни очни заболявания.

Сравнителният анализ между нативния токсичен комплекс и неговите субединици придава допълнителна научна стойност на труда. Този подход позволява по-фина диференциация на структурно-функционалните зависимости и създава предпоставки за формулиране на хипотези, свързани с модулната организация на белтъчните комплекси и тяхното биологично действие. В по-широк план това има потенциални отражения върху разработването на инхибиторни стратегии, биомиметични молекули и терапевтични модели.

III. Литературен обзор

Литературният обзор се отличава с висока степен на изчерпателност, аналитичност и логическа последователност. Авторът демонстрира задълбочено познаване на научната литература, като умело съчетава класически фундаментални изследвания с актуални публикации от последните години. Това съчетание осигурява едновременно историческа перспектива и съвременна научна релевантност.

Обзорът проследява структурните характеристики и класификацията на фосфолипазите, каталитичните механизми и ролята на металните кофактори, особеностите на повърхностното активиране и субстратната специфичност, както и некаталитичните ефекти и рецепторно медираните взаимодействия. Подробното разглеждане на фармакологичните прояви на змийските фосфолипази и структурно-функционалните особености на випоксина създава стабилна теоретична основа за последващото експериментално изследване.

Особено положително впечатление прави критичният характер на изложението. Авторът не се ограничава до механично възпроизвеждане на данни, а извежда научни противоречия, отбелязва недостатъчно изследвани области и формулира логически преход към собственото си изследване. Това свидетелства за умение за научен синтез и за способност за позициониране на дисертационния труд в по-широкия контекст на съвременните изследвания.

IV. Цели и задачи

Поставените цели са ясно дефинирани, научно обосновани и логически произтичат от анализа на литературните източници. Те са насочени към изясняване на молекулните и клетъчните механизми на действие на випоксин и неговите субединици, както и към оценка на тяхното влияние върху мембранната цялост, цитоскелетната организация и сигналните пътища.

Задачите са конкретни, последователни и методологично изпълними. Те обхващат различни равнища на анализ – от биохимични и структурни до функционални клетъчни ефекти. Наблюдава се ясна корелация между формулираните задачи и използваните експериментални подходи, което е показател за добре планиран експериментален дизайн и стратегическо мислене.

V. Материали и методи

Методичната част се характеризира с висока степен на детайлност и демонстрира отлична лабораторна подготовка. Използван е широк спектър от съвременни клетъчни, биохимични и молекулярни методи, които позволяват многостранно изследване на поставените проблеми. Приложените техники включват клетъчно култивиране, ензимни анализи, електрофоретични и имунохимични методи, тестове за метаболитна активност, флуоресцентна микроскопия, липиден анализ, измерване на трансепителна резистентност, както и генотоксични и апоптотични тестове.

Използването на два независими клетъчни модела повишава надеждността на резултатите и позволява сравнителен анализ. Описанието на методите е достатъчно подробно и гарантира възпроизводимост на експериментите – ключов критерий за научна валидност.

VI. Резултати и дискусия

Разделът „Резултати и дискусия“ на дисертационния труд демонстрира висока степен на експериментална последователност, методологична прецизност и аналитична зрялост. Получените данни са представени систематично и логически групирани, което позволява ясно проследяване на ефектите на хетеродимерния комплекс випоксин и неговите индивидуални субединици VBC-sPLA₂ и VAC върху различни равнища на клетъчната организация.

Особено положително впечатление прави изборът на два независими клетъчни модела на ретинален пигментен епител – RPE-1 и ARPE-19 – което позволява не само възпроизводимост на наблюденията, но и оценка на евентуални клетъчно-специфични различия в отговора към изследваните агенти. Този подход значително повишава валидността на направените изводи.

VI.1. Цитотоксичност и метаболитна активност

Резултатите от МТТ анализа и оцветяването с трипаново синьо очертават ясна диференциация между ефектите на нативния комплекс и отделните субединици. Докато VBC-sPLA₂ проявява по-изразена цитотоксичност, VAC демонстрира значително по-умерен ефект, което подкрепя тезата за модулиращата роля на киселинната субединица в рамките на хетеродимерния комплекс. Наблюдаваните разлики между RPE-1 и ARPE-19 клетките подсказват възможна зависимост от клетъчния метаболитен статус и мембранната композиция, което представлява интересна отправна точка за бъдещи изследвания.

VI.2. Мембранен интегритет и трансепителна резистентност

Измерването на трансепителната електрическа резистентност (TEER) представлява особено силен аспект на експерименталния дизайн. Получените данни показват, че випоксинът и каталитичната му субединица индуцират по-изразени промени в бариерната функция на клетъчните монослое в сравнение с VAC, което насочва към пряка връзка между ензимната активност и нарушаването на мембранната цялост. Тези резултати се подкрепят и от анализа на липидните фракции чрез тънкослойна хроматография, където се наблюдават изменения в относителното съотношение на отделни липидни компоненти.

Комбинирането на TEER измервания с липиден анализ демонстрира комплексен подход към мембранната биология и позволява интерпретация на резултатите не само на функционално, но и на структурно равнище.

VI.3. Цитоскелетна реорганизация и β-катенин

Флуоресцентното визуализиране на F-актин и имунодетекцията на β-катенин разкриват съществени промени в цитоскелетната архитектура и клетъчните контакти след третиране с изследваните агенти. Наблюдаваната дезорганизация на актиновите филаменти и

промяната в локализацията на β -катенин предполагат засягане на адхезионните комплекси и междуклетъчните връзки. Тези резултати имат особено значение в контекста на бариерната функция на ретиналния пигментен епител и подкрепят хипотезата за многопластово действие на випоксина – едновременно мембранно и сигнално.

VI.4. PLA₂ рецептори и сигнални пътища

Детекцията на PLA₂R1 и анализът на p38 MAPK фосфорилацията представляват важен принос към разбирането на некаталитичните механизми на действие. Наличието на рецепторно медираните ефекти, съчетано с активация на стрес-асоциирани сигнални пътища, показва, че действието на изследваните молекули не се изчерпва с ензимна хидролиза на мембранни липиди, а включва и сложни вътреклетъчни регулаторни механизми. Този аспект придава на дисертационния труд особена научна стойност, тъй като го позиционира в областта на клетъчната сигнализация, а не единствено в ензимологията.

VI.5. Генотоксичност и апоптоза

Кометният анализ и тестовете за апоптоза допълват цялостната картина на клетъчния отговор. Установените ДНК-увреждания и повишена апоптотична активност при третиране с VBC-sPLA₂ и випоксин, в сравнение с VAC, подкрепят идеята за каталитично зависим компонент на токсичното действие. В същото време умерените ефекти на киселинната субединица подсказват възможно участие в модулиране, а не в директна индукция на генотоксични процеси.

Като цяло разделът „Резултати и дискусия“ се отличава с добра вътрешна логика, методологична последователност и убедителна интерпретация. Съпоставянето на биохимични, морфологични и сигнални показатели позволява многостранно осветляване на проблема и придава на изследването характер на комплексен клетъчнобиологичен анализ, надхвърлящ рамките на еднопосочно ензимно проучване.

VII. Научни приноси

Дисертационният труд съдържа ясно формулирани научни приноси с фундаментален и приложен характер. Сред тях могат да бъдат открити разширяването на познанията за взаимодействието на випоксин с клетъчните мембрани, изясняването на ролята на PLA₂ рецепторите в ретинални клетки, както и експерименталното разграничаване на каталитични и некаталитични механизми на действие. Тези приноси имат потенциално значение за бъдещи изследвания в областта на клетъчната сигнализация и фармакологията.

VIII. Използвана литература

Използваната литература може да бъде оценена като актуална, релевантна и научно адекватна, с добре поддържан баланс между фундаментални класически източници и модерни изследвания. Това свидетелства за задълбочен литературен преглед и за способност

на автора да позиционира собственото си изследване в широк исторически и съвременен научен контекст.

Около една трета от използваните литературни източници са от последните 10 години, а над 65–70% са от последните 20–25 години. По-старите цитати са използвани целенасочено и се отнасят до основополагащи трудове, което е методологично оправдано и характерно за фундаментални изследвания в областта на молекулярната и клетъчната биология.

IX. Бележки и препоръки

Отправените бележки имат конструктивен характер и са насочени към възможности за бъдещо развитие – включване на *in vivo* модели, по-задълбочени статистически анализи и по-широко обсъждане на клиничните приложения. Те не намаляват научната стойност на труда, а очертават перспективи за неговото надграждане.

X. Заключение

Темата на дисертационния труд има предимно фундаментален характер, но притежава ясно изразен потенциал за приложимост в областта на биомедицинските и фармакологичните изследвания. Получените резултати допринасят за изясняване на универсални клетъчни механизми, свързани с мембранната динамика, сигналната трансдукция и клетъчната преживяемост, което ги прави релевантни за бъдещи разработки в областта на токсикологията, фармакологията и биотехнологиите. Поради това трудът може да бъде определен като фундаментално изследване с реална научно-приложна перспектива.

Въз основа на гореизложеното считам, че дисертационният труд напълно отговаря на изискванията за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор по Биология“**, поради което убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди исканата степен на докторанта.

5 февруари 2026г.

гр. София

Рецензент: _____

/доц. Г. Георгиев/