

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Светла Димитрова Петрова

Катедра «Биохимия», Биологически факултет, Софийски университет «Св. Климент Охридски»

Член на Научно жури, съгласно Заповед № РД 38-692/11.11.2025г. на Ректора на Софийския Университет «Св. Климент Охридски», проф. д-р Г. Вълчев

Относно: Дисертационен труд на тема: „Изследване на взаимодействията на биологично активни агенти с мембранни домени и тяхната роля в еукариотни клетки“

за придобиване на Образователна и Научна степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)

Докторант: Юлия Георгиева Пецева

Докторска програма: „Молекулярна биология“,

Катедра: „Биохимия“, Софийски Университет «Св. Климент Охридски»

Научни ръководители:

Проф. д-р Светла Петрова

Проф. д-р Йордан Думанов

1. Обща характеристика на дисертационния труд и представените материали

Дисертационният труд на Юлия Пецева е написан, следвайки стандартен принцип – Въведение, Литературен обзор (22 стр.), Цели и задачи (1 стр.), Материали и методи (10 стр.), Резултати и обсъждане (30 стр.), Изводи (1 стр.), Приложения - Приноси, Списък с публикации и участия в научни форуми (1 публикация с импакт фактор (IF 3.8, Q1); 1 публикация без IF (international peer-reviewed) и двете реферирани в Scopus, Web of Science; 5 конференции с международно участие и библиография с цитирани 173 литературни източника (75% след 2000г.) Дисертационният труд съдържа 89 страници, 28 фигури и 1 таблица, оформени отлично. Авторефератът и всички представени материали отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

2. Данни за докторанта

Докторант Юлия Пецева завършва ОКС „Бакалавър“ по Биология и магистърска степен по Клетъчна биология и патология в СУ „Св. Климент Охридски“. Веднага след това започва работа в Института по молекулярна биология на БАН, а от 07. 2016г. е зачислена като редовен докторант по Молекулярна биология в Катедрата по Биохимия на БФ, СУ. След отчисляване, с право на защита през 2019г., започва работа като хоноруван асистент в ЮЗУ „Неофит Рилски“- Благоевград, а от 2025г. в МУ-София.

3. Актуалност на дисертационната тема

Темата на дисертационния труд е посветена на изследване на свойствата и функционалната активност на невротоксичната секреторна фосфолипаза А2 (sPLA2) Випоксин, изолирана от змийска отрова на *Vipera ammodytes ssp. meridionalis*. Това, което прави изследването особено актуално е свързано със задълбочено изучаване на молекулните механизми на действие на випоксина като sPLA2 ензим (в хетеродимерна и мономерна форма) върху клетъчни мембрани на ретинални пигментни епителни клетки (RPE cells) с различия в мембранныя състав, метаболитната динамика, организацията на цитоскелета, трансепителната мембранна резистентност, клетъчната сигнализация и пролиферацията. Тези механизми изискват изследване на различни параметри и зависимости: мембранен фосфолипиден (PLs) състав; мембранно разпределение на различни PLs, асоциация и организация; механистична зависимост на ензима от Ca^{2+} йони; сложна ензимна кинетика, включваща последователни стъпки на директна адсорбция, зависимо от заряда ензим-субстратно свързване, междуфазова активация, хидролиза и инхибиращо действие на продуктите (лизифосфолипиди и свободни мастни киселини (LyoPLs, FFA), променящи мембранната организация; фармакологична активност и биологична функционалност на ензима в качеството му на невротоксин; и висок потенциал за терапевтично използване. През последните години, уникалните молекулярни характеристики на някои от биологично активните компоненти на змийските отрови ги превръщат в ценни научни инструменти за медицината и

фармакологията, особено след като е доказано, че проявяват аналгетични, антитромботични, хипотензивни, противотуморни, противо/провъзпалителни и др. свойства и могат да се използват като диагностични и терапевтични средства. В този смисъл, *проведеното за първи път*, изследване на каталитичната (хидролиза на PLs) и фармакологичната (свързване със специфични PLA2 рецептори) активности на хетеродимерния невротоксин випоксин върху RPE клетки, е актуално и новаторско за установяване на биологичните му ефекти.

4. Обща характеристика на дисертацията и познаване на състоянието на проблема от докторанта.

Изследователският труд на Юлия Пецева се фокусира върху ролята на сложните взаимодействия между мономерните субединици на хетеродимерния невротоксичен комплекс випоксин при осъществяване на множество диференцирани и регулирани биологични активности в RPE клетки от две различни RPE клетъчни линии. В *литературния обзор* са разгледани много информативно структурата и свойствата на невротоксина випоксин, изолиран от отровата на *Vipera ammodytes ssp. meridionalis*, чиито две индивидуални субединици – *ензимна и токсична секреторна фосфолипаза A2* (GIIA sPLA2, EC 3.2.1.4, нар. *víroxin basic component - VBC*) и *ензимно неактивна и нетоксична субединица* (*víroxin acidic component - VAC*) - образуват много стабилен хетеродимерен комплекс, проявяващ динамична биологична функционалност и регулация в зависимост от мембранный субстрат. Разгледани са характеристиките на фосфолипазните ензими, както и тези на фосфолипазо-подобните неензимни белтъчни компоненти на змийските отрови (подобни на неензимната VAC). Подробно са описани морфологичните и функционални характеристики на двете клетъчни линии от ретинален пигментен епител, използвани като моделна система, които се характеризират със специализиран фосфолипиден състав и микродоменна организация.

Целта на дисертационния труд е формулирана конкретно - изследване на взаимодействията на хетеродимерния випоксин и дисоциираните му индивидуални мономерни субединици с мембранны домени в еукариотни клетки, като така се поставя ударение върху различията в биологичната функционалност на димерната и мономерна форма на фосфолипазния ензим и най-вече на *регулаторната функция на неензимната субединица*, което доказва необходимостта от биохимична регулация при випоксина.

Разделът *„Материали и методи“* е написан стегнато, но достатъчно информативно, като демонстрира изследователската подготовка на докторантката, приложила голям арсенал от биохимични, ензимологични, молекулярно-биологични и клетъчно-биологични методи, отговарящи на интердисциплинарността на изследването.

Резултатите са описани прецизно с точен изказ и без излишни подробности, следвайки логиката на задачите и експерименталната част. Тъй като випоксинът е фосфолипаза A2 ензим, чиито субстрати са клетъчните мембрани, дисертационният труд започва с изучаване на *ензимната специфичност и цитотоксичността* на хетеродимерната и мономерна форми на ензима, доказвайки съществена разлика в отговора на близки по функция ретинални пигментни епителни клетки от две линии - RPE-1 и ARPE-19. При въздействие с най-високата използвана ензимна концентрация, клетъчната преживяемост се оказва по-висока при клетките от линията ARPE-19 (~80%) в сравнение с тази на RPE-1 линията (~58%), доказващо различна мембранный организация, т.е. субстратна специфичност, афинитет и адсорбция на ензима (напр., влиянието на мономерния ензим VBC върху интегритета на клетъчните мембрани показва експоненциална концентрационна зависимост при клетките от RPE-1 линията, докато при ARPE-19 клетки зависимостта е хиперболична). Хетеродимерната и мономерната фосфолипаза A2 повлияват *трансепителна резистентност* на двете клетъчни линии в еднаква степен, докато некаталитичната субединица VAC няма ефект върху клетъчния пермеабилитет, което доказва ролята на каталитичния механизъм. Следващата логична стъпка в изследванията са *промените в цитоскелетната реорганизация* като основен клетъчен отговор на действието на випоксина и неговите компоненти. За разлика от нормалната диспергирана организация на актина в контролните клетки, в третираните, с випоксин/мономерни субединици, две клетъчни линии се наблюдава защитна реакция на уплътняване на F-актиновите филаменти по външните граници на клетките и увеличаване на „стрес влакната“, която е с по-голям ефект при RPE-1 клетките. Подобни резултати са получени при изследването на *разпределението на β -катенина*, отговорен за *междуклетъчната адхезия и контакти*, като транслокацията му в цитоплазмата доказва ролята на випоксина за нарушаване на междуклетъчните контакти (по-силно изразено отново при RPE-1 клетките). *„Фармакологичната“ активност* на випоксина и съществуването на специфични фосфолипазни A2 рецептори по повърхността на ретиналните епителни клетки е доказана чрез сигнализацията през PLA2R, която отключва p38 MAPK киназния път, отговорен за стресовия отговор и регулацията на клетъчния растеж, диференциацията, апоптозата и експресията на гени за синтезата на про-възпалителни цитокини. Установената бърза и

продължителна активация на р38 MAPK киназата в клетки, третирани както с хетеродимерния випоксин, така и с двете мономерни субединици показват недвусмислено, че насищането на рецептора и последвалите сигнализационни събития в клетката се дължат на допълнителната фармакологична активност на всички форми на випоксина и също така съществуване на специфичен структурен „фармакологичен“ център, различен от каталитичния. Различната степен на интернализация на випоксина и индивидуалните мономерни субединици в клетките предоставя определена информация за *генотоксичния им потенциал*, което е доказано чрез кометен анализ – всички форми на випоксина притежават способността да индуцират повреди (двойноверижно фрагментиране) в клетъчната ДНК на RPE-1 и ARPE-19 клетките, дължащи се на комбинираното действие на каталитични (чрез продуктите LysoPLs и FFA - сигнални посредници), некаталитични (рецептор сигнализация) механизми и интернализирани в клетката. Най-интересният резултат тук е свързан с *по-високия генотоксичен потенциал на некаталитичната субединица VAC*, което налага схващането за допълнителна функция на VAC, разглеждана досега само като инхибитор на ензимния VBC.

Изводите са обобщени, следвайки хода на експерименталната част, като най-важният се основава на доказателството за съществуване на динамично взаимодействие между двете мономерни субединици на випоксина, които независимо от 62% секвенционално и структурно сходство, притежават индивидуални биологични активности - ензимна и некаталитична, което създава нова биологична функционалност на хетеродимера, зависима и диференцирана от типа на прицелните клетки. Фактът, че мономерната и некаталитична субединица - VAC предизвиква висока степен на генотоксичност, апоптотични и некротични ефекти и в двете изследвани линии, доказва съществуване на допълнителен фармакологичен център и активност подобни на тези на ензимната субединица VBC при свързване със специфични фосфолипазни рецептори.

Изясняването на биологичната роля на отделните субединици в комплекса има фундаментална научна стойност и цели установяване на функциите на токсините, които създават нови възможности за приложение в медицината.

5. Публикации

Докторантката е първи автор в представените 2 публикации, което е доказателство за личния ѝ принос - 1 публикация с импакт фактор (IF 3.8, Q1) и 1 реферирана публикация без IF (international peer-reviewed) по Scopus, Web of Science; Дисертационният труд на Юлия Пецева е включен в два изследователски проекта, финансирани от СУ „Св. Кл. Охридски“. Авторефератът отговаря на всички изисквания за изготвянето му и представя коректно резултатите и съдържанието на дисертационния труд.

6. Заключение

Научните и научно-приложните приноси, представени в дисертационния труд на Юлия Пецева, проведеното задълбочено молекулярно-биологично изследване, високооценените публикации, оригиналността на написания труд и отличното му техническо оформление са безспорни. Като един от научните ръководители на докторантката, **потвърждавам**, че дисертационният труд на Юлия Пецева представя оригинални резултати с приноси в науката и отговаря напълно на минималните национални изисквания на ЗРАСРБ и Правилника за приложението му за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в научната област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология).

Всичко това ми дава основание убедено да дам своята **положителна оценка** и да предложа на Научното жури да присъди на Юлия Пецева образователна и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология).

27.01.2026г.

Член на НЖ:

проф. д-р Светла Петрова
(Катедра „Биохимия“, СУ)