

СТАНОВИЩЕ

на проф. д-р Албена Владимирова Александрова,
НСА „Васил Левски“, катедра Физиология и биохимия

относно: дисертационен труд на Юлия Георгиева Пецева 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“ в професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност Молекулярна биология с научни ръководители: проф. д-р Светла Петрова и проф. д-р Йордан Думанов

1. Актуалност и значимост на темата

Дисертационният труд е посветен на изследване на ефектите на биологично активния компонент на змийската отрова от *Vipera ammodytes meridionalis*, хетеродимерния невротоксин випоксин и неговите индивидуални субединици VBC-sPLA₂ и VAC върху клетки от ретинален пигментен епител, включително преживяемост, промени в мембрания интегритет, реорганизацията на цитоскелета, индукция на генотоксичност и сигнализационни събития.

Темата на дисертацията е актуална и научно значима, тъй като секреторните фосфолипази A₂, към които принадлежи силно токсичната субединица VBC-sPLA₂, са ключови фактори в патогенезата на отровните ухапвания, а механизмите на взаимодействие между токсина, както и неговите мономери и клетъчните мембрани остават недостатъчно изяснени. Провеждането на изследвания върху човешки ретинални клетки е нов подход с потенциално биомедицинско значение, а анализът на каталитичните и некаталитичните механизми на действие е пряко свързан с разработването на нови терапевтични прототипи. В този контекст трудът запълва съществена празнина в познанията за структура–функционалните зависимости на випоксина и очертава перспективни възможности за неговото приложение в биомедицината.

2. Цели и задачи на дисертацията

Формулираната цел на дисертационния труд, а именно да се изследват взаимодействията на хетеродимерния випоксин и неговите мономерни субединици с клетъчни мембрани и еукариотни клетки, е ясно поставена и научно обоснована на базата на направения задълбочен литературен обзор. Определените осем задачи са точно и логично структурирани и обхващат ключови параметри на клетъчната физиология, включително цитотоксичност, мембранен интегритет, бариерна функция, липиден състав, цитоскелетна организация, генотоксичност, сигнални пътища и механизми на клетъчна смърт. Те напълно кореспондират с поставената цел и са изпълними посредством използваните методи.

3. Характеристика и структура на дисертационния труд

Дисертацията има структура, съответстваща на приетите изисквания и включва: Увод – 2 стр., Литературен обзор – 28 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материали и методи – 9

стр., Резултати и Дискусия – 30 стр., Изводи и Приноси – 2 стр. общо и Списък на цитираната литература.

Литературният обзор е фокусиран върху наличните данни за структурата и механизмите на каталитично и некаталитично действие на фосфолипазите, и в частност на фосфолипазите A₂, включително техните фармакологични ефекти. Подробно са представени структурата и биологичната активност на мономерната секреторна фосфолипаза A₂ (VBC-sPLA₂), изолирана от хетеродимерния комплекс випоксин, както и структурата и функционалната роля на киселата субединица VAC (virpoxin acidic component). Детайлно са описани таргетните клетки – ретиналният пигментен епител – и възможностите за използването им като моделна система за изследване на механизмите, участващи в патологични процеси *in vivo*, както и на пътищата за тяхната регулация на клетъчно и молекулно ниво. Обзорът е представен стегнато, демонстрира необходимата задълбоченост, като отразява много добро познаване на теоретичните и методологичните аспекти на темата.

4. Използвани методи и тяхната адекватност

Използваните методи са съвременни, адекватно подбрани и напълно съответстват на поставените задачи. Приложени са утвърдени техники за клетъчно култивиране (на RPE-1, ARPE-19), биохимични методи за пречистване и характеризиране на токсина, както и различни подходи за оценка на клетъчната жизнеспособност, включително МТТ тест и оцветяване с трипаново синьо. Функционалните характеристики на клетките са анализирани чрез измерване на трансепителната електрическа резистентност, а структурните промени са проследени посредством флуоресцентна микроскопия за актин и β-катенин. Сигналните механизми са изследвани чрез Western blot анализ на PLA2R1 и p38/p-p38 MAPK, докато липидният състав е определен чрез тънкослойна хроматография. Генотоксичните ефекти са оценени чрез Кометен анализ, а механизмите на клетъчна смърт чрез определяне на апоптоза и некроза. Подборът и приложението на методите са методологично коректни и позволяват надеждна и обоснована интерпретация на получените резултати.

5. Получени научни резултати

Основните научни резултати на дисертационния труд включват установяването на различен токсичен профил на хетеродимерния випоксин и на отделните му субединици върху клетъчните линии RPE-1 и ARPE-19, което ясно подчертава специфичността на клетъчния отговор. Доказано е наличието на силно увреждащо действие на VBC-sPLA₂ върху мембранната цялост, бариерната функция и организацията на цитоскелета, което разкрива ключови аспекти от механизма на токсичното действие. Идентифицирани са съществени различия в липидния състав между двете клетъчни линии, които корелират с наблюдаваната различна чувствителност към токсина и имат съществено значение за интерпретацията на резултатите. Установено е наличие на PLA2R1 рецептор, участващ в некаталитичните ефекти на компонентите на випоксина, както и активация на сигналната p38 MAPK каскада от всички изследвани фракции. Допълнително е доказано значително увреждане на ДНК и индукция на различни механизми на клетъчна смърт, което допринася за цялостното разбиране на токсикодинамиката на випоксина. Получените резултати са представени стегнато и ясно, подкрепени са с 16 фигури, повечето от които със секции А и

Б, и богат снимков материал от направените анализи, които илюстрират ключовите наблюдения и засилват научната убедителност на заключенията.

6. Научни изводи и научноприложни приноси

Изведените от дисертационния труд изводите са девет. Те са ясно формулирани, логично структурирани и коректно отразяват получените експериментални резултати. Те включват, установен различен токсичен профил на випоксинът и неговите субединици, с най-силно цитотоксично действие на VBC-sPLA₂, особено върху RPE-1 клетките; нарушаване на мембрания интегритет и бариерните свойства на клетъчния монослой от випоксин и VBC-sPLA₂, докато VAC не проявява подобни ефекти, което убедително доказва каталитичния характер на наблюдаваните увреждания; значима реорганизация на актиновия цитоскелет и промяна в клетъчните контакти, по-изразени при RPE-1, както и различия в липидния състав на двете клетъчни линии, обясняващи вариращата им чувствителност към токсина; наличие на PLA2R1 рецептор и активиране на p38 MAPK сигналната каскада от всички компоненти, което подчертава и некаталитичните механизми на действие; потвърждение на сложността на взаимодействието между токсина и клетъчните мембрани на базата на установената висока степен на увреждане на ДНК и различните режими на клетъчна смърт.

Приносите на дисертационния труд са свързани с факта, че за първи път е изследвано действието на молекулно хомогенния хетеродимерен комплекс випоксин и неговите дисоциирани мономерни субединици VBC-sPLA₂ и VAC върху човешки ретинални клетки RPE-1 и ARPE-19. Доказана е сложна комбинация от каталитични и некаталитични механизми, които медирират наблюдаваните клетъчни ефекти, като е установена ключовата роля на некаталитичния компонент VAC за поддържане структурата и функцията на комплекса и за регулиране както на фосфолипазната (VBC), така и на фармакологичната активност. Показано е също, че двете ретинални клетъчни линии проявяват различен функционален отговор към випоксина и неговите мономери, обусловен от вариации в мембрания липиден състав, клетъчното микрообкръжение и специфичните генетично обусловени биохимични и молекулярно-клетъчни характеристики.

Приносите са ясно формулирани, оригинални и представляват реално разширяване на знанията в областта на биохимията на токсините.

7. Автореферат

Представеният автореферат в обем от 45 страници напълно отразява съдържанието на дисертационния труд. Представени са кратък увод в тематиката, целите и задачите на дисертационния труд, използваните методи, основните резултати, коректно описани изводи и приноси. Включени са и публикациите по темата на дисертацията, участията в научни форуми и съкратен списък на цитирана литература.

8. Публикации и научна активност

Докторантката има 2 публикации, една в международно реферирано списание *Archives of Biochemistry and Biophysics* (IF), и една в *Trakia Journal of Sciences*.

Публикационната дейност отговаря на изискуемия минимум според изискванията на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“. Докторантката е приложила и списък с 5 участия в научни конференции, чрез които е популяризирала получените резултати.

9. Критични бележки и препоръки

В дискуссионната част би могло да се акцентира още по-ясно върху сравнителните аспекти между двете клетъчни линии и механистичните различия.

Полезно би било резултатите да се обвържат по-подробно с потенциалните терапевтични приложения на sPLA₂ инхибитори.

Нито една от тези забележки не намалява качеството на работата.

10. Заключение

Дисертационният труд на Юлия Пецева представлява завършено, оригинално и значимо научно изследване. Темата е актуална, използваните методите са съвременни, а получените резултати са убедителни и с принос за разбирането на молекулните механизми на действие на токсичните фосфолипази A₂.

Работата напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и правилника на Софийски университет за присъждане на ОНС „доктор“. Въз основа на гореизложеното давам своето положително становище и предлагам на научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ в научно направление 4.3. Биологични науки, научна специалност Молекулярна биология на Юлия Георгиева Пецева.

10.12.2025 г.

Изготвил становището:

проф. Албена Александрова