

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Ивелин Панчев

на дисертационния труд на Вишня Стойчева Стоянова
на тема: Анализ на взаимодействието на C1q с IgG в норма и патология
за придобиване на научната и образователна степен „доктор“
по научна специалност 01.06.04 – Молекулярна биология

Научен ръководител: доц. д-р Светла Петрова

Научен консултант: доц. д-р Иванка Цачева

Актуалност и значимост на темата.

C1q е ключов компонент на класическия път на активиране на системата на комплемента. Показано е, че той е свързан с възникването и развитието на патологични процеси при автоимунни заболявания като системен лупус еритематозус и лупусен нефрит. Има малко данни относно причините, поради които C1q активира създаването на автоантитела срещу него. Поради това от особен интерес представляват данни, които могат да допринесат за разбирането на механизмите, свързани с участието на молекулата в патологичните процеси при тези заболявания. В тази връзка поставените от настоящата работа цели и задачи са с важно значение както от научна, така и от гледна точка на клиничната практика и диагностиката на тези автоимунни заболявания.

Трябва да отбележа, че представената работа е органична част и логично продължение на една от основните научни теми в Катедрата по биохимия.

Структура на дисертационния труд.

Дисертационния труд е написан на 106 страници и допълнително съдържа три приложения.

Основните раздели са: Литературен обзор, Цел и Задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Дискусия, Изводи, Приноси, Цитирана литература. Съдържа и три приложения.

Тези основни раздели се предшестват от Съдържание, Използвани съкращения, Благодарности, старниците на които би следвало да са номерирани дори и когато не са включени в общата номерация; например в друг стил – i, ii, iii и т. н. Това се отнася и за номерацията на приложенията.

Литературният обзор е на 33 страници. В него подробно са разгледани механизмите на действие на системата на комплемента в организма.

Особено внимание в обзора е отделено на функциите на C1q и по-специално значението му за опсонизацията, роля при възпалителните процеси както и участие в апоптотичните процеси. Разгледана е

геномната организация на гените за трите вериги на C1q. Подробно е разгледана структурата на молекулата, като особено внимание е отделено на възможните конформационни преходи в различните състояния на глобуларните фрагменти.

Голямо внимание е отделено на ролята на C1q при възникването и развитието на системния лупус еритематозус и при лупусния нефрит. Тези две заболявания спадат към групата на така наречените автоимунни заболявания. Показано е, че за развитието на патологичното състояние важна роля играе системата на комплемента и по-точно C1q. При тези заболявания C1q се явява антиген за имунната система и формирането на анти-C1q IgG антитела е един от ключовите механизми, водещи до патологични състояния в тъканите и по-специално в бъбреците.

Разделът е подходящо илюстриран с 12 фигури. На базата на публикуваните данни е предложен модел за по-нататъшно изследване и са изброени подходите, чрез които да се провери неговата валидност.

Като цяло литературният обзор дава ясна представа за съвременното състояние на изследванията върху структурата на C1q и неговите функции в организма.

Цел и задачи. Целта на работата е формулирана като анализ на превръщането на взаимодействието между C1q и IgG от физиологично в патологично.

Поставени са шест задачи, които могат да бъдат разделени в следните групи:

- Събиране на клиничен материал,
- Епитопно характеризиране на свързването на анти-C1q антитела от автоимунни серуми с C1q;
- Изследване на ефекта на синтетични цвистерйонни съединения върху взаимодействието на C1q с IgG и с анти-C1q антитела;
- Сравнителен анализ на имуногенното поведение на C1q в норма и патология;

Според мен целта на работата е правилно формулирана и определя областите на изследването. Поставените задачи са в съответствие с общата цел на работата и са достатъчни за нейното постигане.

Материали и методи. Разделът е на седем страници и включва описание на всички използвани процедури. Описанието като цяло е достатъчно пълно, за да могат да бъдат възпроизведени експериментите. Не е посочен обаче начина за разтваряне на цвистерйонните съединения – предварително ли се разтварят като изходен разтвор или се добавят като субстанция към вече приготвен буфер.

Също така някои съкращения звучат странно – напр IgG/pregnant. От описанието е ясно какво представлява препаратът, терминът е използван в публикацията, но би могло да се предложи друго съкращение вместо този работен жаргон.

Според мен тези две забележки са с технически характер и нямат отношение към научната стойност на работата.

Резултати и обсъждане. Разделът е написан на 44 страници, съдържа 26 фигури и 4 таблици.

В началото на раздела са показани данните от препартивното получаване на C1q, колагеноподобния фрагмент на молекулата, както и на рекомбинантните глобуларни фрагменти.

Чрез ELISA са получени данни за епитопното характеризиране на анти-C1q антитела от пациенти с лупусен нефрит. Броят на пробите е 78 от 43 пациенти и е достатъчен за подобен род изследвания и дава възможност за статистическа обработка на данните. Получените резултати позволяват да се твърди, че липсва ясно изразена връзка между клиничната картина и епитопната специфичност на анти-C1q антителата при пациенти с лупусен нефрит.

При анализа на анти-C1q антитела при болни бременни е установено преимуществено формиране на антитела срещу глобуларните фрагменти, но не и срещу колагеноподобния фрагмент. Направено е предположение, че тези автоантитела предхождат автоимунното заболяване и могат да служат като ранен маркер за неговото установяване. В тази връзка настоящата работа представлява интерес за клиничната практика за ранна диагностика на автоимунни заболявания особено при бременни жени.

В хода на тези изследвания са установени поне три различни епитопа на свързване на анти-C1q антитела от серуми на пациенти с лупусен нефрит, два от които са от конформационен тип. За определяне на типа на епитопите са използвани както нативни молекули C1q, така и рекомбинантни глобуларни фрагменти.

Особен интерес представляват изследванията на докторантката върху ефекта на цвитерйонни съединения върху взаимодействието между C1q и IgG. C1q се характеризира с комплексна лиганд-свързваща повърхност, която е резултат от разнообразие от конформерни форми на белтъка. Подобна възможност за конформационни изменения води до поява на нео-епитопи; предполага се, че такива нео-епитопи могат да доведат до формиране на автоантитела в организма и да провоцират автоимунни заболявания. В работата са изследвани ефектите на три цвитерйонни молекули – PZ, ZM и ZS върху взаимодействието на C1q с IgG. От тези цвитерйони ZM и ZS са мономери, докато PZ е полимер.

В работата е направен детайлен анализ на ефекта от тези цвитерйонни молекули върху взаимодействието между C1q и IgG. Получени са следните по-важни резултати:

- за PZ е показан шапероно-подобен ефект върху взаимодействието между C1q и IgG;
- ZM, който не формира амфифилни молекули, не показва подобен ефект;
- ефектът на ZS върху взаимодействието между C1q и IgG поради склонността на мономерния цвитерйон към мицелообразуване, има комплексен характер.

Резултатите от ELISA тестовете, заедно със спектрофлуорометричния анализ показват, че при определени условия е възможно възникване на нео-епитопи в глобуларните фрагменти на C1q. Разгледана е ролята на отделните глобуларни фрагменти при тяхното формиране. Данните от ефекта на PZ върху взаимодействието между C1q и IgG позволяват да се предложи модел на механизмите на възникване на нео-епитопи след експониране на хидрофобни участъци от молекулата в резултат на имобилизиране на C1q върху повърхности. Според мен това е един от най-важните резултати от изследването, който има не само теоретично приложение, но и представлява определен практически интерес.

В края на раздела е направен грамотен анализ на получените резултати. Показана е връзката на извършената работа със съществуващите изследвания по проблема. Посочени са ограниченията на използваните подходи и са набелязани пътища за бъдещи изследвания.

Оформлението на раздела е на високо ниво. Графично представяните данни са добре организирани и с достатъчно описание към тях. Табличните данни също са оформени добре. Показани са резултати от всички изследвания, коментирани в раздела. Данните са правилно интерпретирани в текста на раздела. Обсъждането в дискуссионната част на раздела е на високо ниво. Получените данни и направените изводи са разглеждани съобразно съвременните достижения в областта, за което говори големият брой цитирани публикации в хода на обсъждането.

За досадна печатна грешка считам номерирането на раздела в текста като раздел VI вместо IV тъй като в съдържанието номерирането е посочено правилно.

Изводи. На базата на извършените изследвания са направени 11 извода, подредени в съответствие с изложението в раздела Резултати и обсъждане. Изводите са направени единствено на базата на получените резултати и са есенция на обсъждането им в предходния раздел.

Приноси. Показани са четири основни приноса. Според мен те са правилно формулирани, отговарят на получените експериментални данни и потвърждават работните хипотези. Лично за мен основният принос на работата е свързан с анализа на ефекта на полицивтерйони върху C1q, което открива нов и перспективен подход за анализ на молекулните основи на взаимодействието на C1q с различни лиганди.

Литература. Цитирани са 200 литературни източника, основната част от които е публикувана след 2000 г. Литературните източници са правилно цитирани, оформени са еднотипно и съдържат всички необходими атрибути да бъдат открити в каталог или база данни.

Приложения: Материалите, представени в приложенията са изнесени с основание, тъй като биха утежнили изложението ако бяха оставени в текста.

Автореферат: Авторефератът съдържа 34 страници и включва 20 фигури и 4 таблици. Посочени са всички основни резултати, получени в хода на изследванията. Направено е много добро обобщение на данните, като коментарите включват позоваване на работи на други изследователи в областта на изследванията. Посочени са изводите и приносите, както и списъка с публикации във връзка с дисертацията. Според мен авторефератът е правилно структуриран и дава ясна представа за основните моменти от дисертационния труд.

Участие на докторанта: Моето убеждение, основано на лични наблюдения е, че Вишня Стоянова лично е изработила основните експерименти, описани в дисертационния труд и е взела активно участие при подготовката на спетрофлуорометричните анализи. Тя е получила достатъчен опит, показала е, че може самостоятелно да планира и провежда експериментите, както и да анализира и интерпретира получените данни.

Публикации във връзка с дисертацията: публикувани са осем статии, четири от които са в международни списания с общ импакт-фактор 4.53. Две от тези публикации са цитирани досега три пъти, независимо, че в автореферата е посочен само един цитат. Докторантката има и седем участия в научни форуми. Тези публикации покриват напълно изискванията за присъждането на степента „доктор“.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Представеният дисертационен труд на Вишня Стоянова засяга сложен научен проблем, свързан с анализ на механизмите на взаимодействието между C1q и IgG. Дисертационният труд е правилно структуриран и добре оформен. Целта на изследванията е правилно формулирана и за нейното постигане са използвани съвременни методи и подходи. Направените изводи изцяло се базират на получените

резултати и нямат спекулативен характер. Докторантката самостоятелно е планирала и провела експериментите, както и е анализирала и интерпретирала данните, описани в дисертационния труд. Резултатите от изследванията са представяни на научни форуми и са публикувани в реномирани международни списания в областта на молекулярната биология и имунология. Посочените в настоящата рецензия забележки имат технически характер и не засягат научната стойност на извършената работа.

Въз основа на гореизложеното **считам**, че настоящият дисертационен труд **отговаря** на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България, както и на Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски” и **уверено препоръчвам** на Научното жури **да присъди** на г-ца Вишня Стойчева Стоянова образователната и научна степен „доктор” по научната специалност 01.06.04 – Молекулярна биология.

14 Декември 2011

София

доц. д-р Ивелин Панчев

Катедра по биохимия
Биологически факултет
СУ „Св. Климент Охридски“