

РЕЦЕНЗИЯ

**на дисертационния труд на Ася Свиленова Цанова
на тема „Свойства и механизми на действие на неврoпептиди с моделни
мембрани с оглед приложението им във фармакологията”, представен за
присъждане на образователната и научна степен „доктор”**

Рецензент: доц. д-р Цветанка Иванова

Представената ми за рецензия дисертация на г-ца Ася Цанова е в една актуална област на науката с важно значение за разбиране процесите в сложно организирани живи системи-мембранологията. Тази област обединява идеи и методи на молекулярната биология, биохимия, биофизика и физикохимия на повърхностите, а също така има и приложно значение във фармацевцията и медицината.

Основна цел на дисертацията е изследване на взаимодействието на синтетичните неврoпептиди метионин-енкефалин (Met-enk) и левцин-енкефалин (Leu-enk), както и на техните амидирани производни, с монослойни и бислойни липидни моделни мембранни системи.

Конкретните задачи на дисертацията са формулирани ясно. Направеният литературен обзор въз основа на 262 източника показва, че дисертантката познава добре идеите и подходите развити в областта и творчески използва литературния материал.

За решаването на поставената цел г-ца Ася Цанова е използвала следните техники и методики - измерване на повърхностното налягане, микроскопия под Брюстеров ъгъл (ВАМ) за изследване на морфологията на формираните повърхностни монослоеви, микроинтерферометричния метод за изследване на бислойни тънки течни филми.

Изборът на моделните системи - монослоеви и тънки течни филми от различни по заряд фосфолипиди, „рафтови” липиди и такива, изграждащи мембраните на нервните клетки, както и на методите за тяхното изследване, с оглед на поставените цели е удачен и характеризира компетентното отношение на дисертантката към изследваните проблеми.

Някои от по-важните резултати и коментарите ми към тях ще представя в три групи:

1. Взаимодействие на синтетичен метионин-енкефалин (Met-enk) и амидираната му форма (Met-enk-NH₂) с нанесени монослоеве от димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG).

Получени са изотермите повърхностно налягане (π) – площ (A) за двата фосфолипида DMPC и DMPG (Фиг. 19). Добре би било на същата фигура да се представят и изотермите след инжектирането на пептидите, както това е направено за всички останали системи.

Резултатите от изследванията за проникването на невропептидите Met-enk и Met-enk-NH₂ в монослоеве от DMPC и DMPG ясно показват, че пептидите се включват и в двата липидни монослоя, като за амидираната форма проникването е по-значително. Съвсем логично при по-ниските налягания, където слой е в течно-разтегнато състояние, включването и на двата невропептида е по-силно изразено, а при по-плътната опаковка на липидните молекули е затруднено. Освен това от кинетичните зависимости $\pi(t)$ на Фиг. 24-26 се вижда, че проникването на Met-enk-NH₂ е по-подчертано при монослоят от зареденият фосфолипид DMPG в сравнение с този от неутралния DMPC. Тези резултати, които говорят в полза на електростатични взаимодействия между Met-enk-NH₂ и отрицателно заредения липид DMPG корелират с тези за максималното повърхностно налягане на включване на изследваните невропептиди, определени от данните за $\Delta\pi(\pi_0)$ на Фиг. 28.

Докторантката отбелязва екстраполираното налягане, при което не се наблюдава проникване на пептида като $\pi_{critical}$. В литературата това налягане се отбелязва като „maximal insertion pressure”-MIP (максимално налягане на включване). Да отбележа, че информация за синергизма на взаимодействие между липидните молекули и проникващите невропептиди може да бъде получена и от анализа на опитно намерените наклони $d\Delta\pi/d\pi_0$ [É. Boisselier, P. Calvez, E. Demers, L. Cantin and Christian Salessse – *Langmuir*, 28 (2012) 9680–9688].

Заклученията от монослойните измервания се потвърждават, както от изображенията на морфологията на монослоеве след инжектиране на Met-enk и на Met-

enk-NH₂, получени с помощта на микроскопия под брьустеров ъгъл, така и от изследванията с тънки течни филми, посредством микроинтерферометричния метод.

2. Взаимодействие на немодифициран и амидиран метионин-енкефалин с липиди, основни компоненти на мембраната на нервните клетки и с липиди, съставлящи мембранните рафтове.

За тази цел е направен анализ на взаимодействията между изследваните неuropeптиди и моделни системи от сфингомиелин (Sm), холестерол (Cho) и смесен монослой Sm/Cho, както и с монослоеве от липидите съставлящи мембранните рафтове – POPC, Sm и Cho и техни двойни и тройни смеси. И тук, както и в първата група изследвания от получените изотерми $\pi(A)$ и от кинетичните измервания са получени данни за проникването на неuropeптитите в различните моделни мембранни монослоеве. Резултатите показват различна степен на проникване на енкефалините в различните моделни системи. Във всички случаи ефектите са по-изразени при проникването на амидирания метионин-енкефалин (Met- enk-NH_2) в сравнение с немодифицираната му форма. Логично и тук се наблюдава различна степен на включване в зависимост от плътността на монослоеве. От данните за максималното повърхностно налягане на включване на изследваните неuropeптиди прави впечатление, че за монослоя от Cho то е значително по-високо – около 60 mN/m, което се обяснява с образуването на водородни връзки между NH₂-крайната група на пептида и ОН-групата на холестерола, водещо до реорганизация в подреждането на молекулите в смесения пептид/липиден филм. Този ефект се наблюдава и при съпоставянето на резултатите за повърхностната еластичност (модул на компресия - C_s^{-1}). Нарастването на C_s^{-1} след включването на енкефалините е в посока Cho, Sm, POPC и във всички случаи ефектите от амидирания енкефалин са по-силни от тези на немодифицираната му форма.

Ще отбележа, че представлява интерес един количествен анализ на реологичните свойства на изучаваните системи. От този анализ би могло да се получи допълнителна информация за взаимодействията в смесените липид/пептид слоеве и реорганизационните процеси в тях. Такъв тип информация може да се съпостави с получените резултати за визуализацията на слоевете с помощта на микроскопията под брьустеров ъгъл.

3. С развитите подходи и методи в дисертацията са изследвани и взаимодействията на левцин-енкефалин (Leu- enk) с моделни монослоеве от липидите, съставна част на

мембранните рафтове. Резултатите показват и тук различия във взаимодействията на немодифицирания и амидирания Leu-enk с моделните липидни монослое. Наблюдаваните при Leu-enk ефекти са сходни с тези на Met-enk в качествено отношение, но все пак сравнението за проникването между двата аналога (Leu-enk и Met-enk) и техните амидирани форми показва, че при Met-enk тези ефекти са по-ясно подчертани.

От направения кратък преглед на съдържанието на дисертацията оценявам високо качеството на използваните подходи и получени и потвърдени резултати. Приносите имат главно фундаментален характер, но техните приложни аспекти в областта на фармацията и медицината определено заслужават интерес.

Дисертантката е положила усилия за оформянето на дисертационния труд, но на фона на огромния материал са допуснати някои стилови и технически грешки:

Няколко примери:

1. на стр. 44 – фигурира повърхностна концентрация 150 \AA^2 за липидна молекула, вместо повърхностна площ 150 \AA^2 за липидна молекула.

бавна компресия със скорост $3,75 \text{ \AA}^2/\text{молекула}/\text{мин}$, вместо $3,75 \text{ \AA}^2/\text{молекула.мин}$.

2. на стр. 55 – понятията модел на Лангмюир и метод на Вилхелми, използвани в заглавието 1.1 не са еднозначно приемани в световната литература.

3. на стр. 55 – заключението не е точно. При площ $150 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ липидния монослой е в края на двумерната кондензация газ/течно-разтегнато състояние, т.е. практически е в течно-разтегнато състояние, а не в газообразно състояние.

Ще отбележа също така, че легендите към фигурите, даващи кинетичните зависимости $\pi(t)$, създават известно затруднение за разбирането им. Според мен, по правилно е да се отбележи, че 1 – съответства на нанасяне на липидите до съответното повърхностно налягане, а 2 и 3 – на инжектиране на неuropeптидите до крайната им обемна концентрация, вместо и за 1, 2 и 3 – добавяне на

В основата на дисертационния труд са 4 научни публикации, от които 3 са в списания с импакт фактор, като 2 от тях са в централното списание *Amino Acids* с $IF \approx 4$. Върху една от тях (публикация № 2 от приложения списък) има забелязани вече 3 цитата. Материалите по дисертацията са докладвани на 8 международни и национални форуми. Публикациите на докторантката са в съавторство с научния ѝ ръководител – чл. кор. проф. Здр. Лалчев и с други съавтори, като докторантката е първи автор и в четирите

публикации, както впрочем и в работите , представени на научните форуми. Всичко това, както и личните ми впечатления и контакти ми позволяват да твърдя, че г-ца Ася Цанова е един способен изследовател и, че личния ѝ принос в представения дисертационен труд е безспорен.

Авторефератът е направен съгласно изискванията и правилно отразява основните резултати и приноси на дисертационния труд.

В заключение, представената ми за рецензия дисертация напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за приложението му и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски”. Въз основа на всичко изложено до тук препоръчвам на уважаемото жури да присъди единодушно на г-ца Ася Цанова образователната и научна степен „доктор”.

София,
4.08.2014г.

доц. д-р Цветанка Иванова