

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Ася Свиленова Цанова, озаглавен „Свойства и механизми на действие на неuropeптиди с моделни мембрани с оглед приложението им във фармакологията”, представен за получаване на образователна и научната степен „доктор”

Рецензент: доц. д-р Румен Тодоров, Институт по физикохимия,
Българска академия на науките.

Представената ми за рецензиране дисертация е посветена на изследване на влиянието на структурната организация и хетерогеността на мембраната при взаимодействието с неuropeптиди. Неuropeптите, в частност енкефалините са невротрансмитери открити в централната нервна система, имащи важна роля в контрола на дишането и инхибиране на сигналите за болка. Тези опиати пентапептиди имат същите рецептори като морфина. Смята се, че тези неuropeптиди взаимодействат с мембрана на нервните клетки, водещо да промяна в конформацията им, която позволява навлизане, предвижване и свързване с рецепторите. Проучването на енкефалин/мембранните взаимодействия е от голямо значение за изясняване на механизми за облекчаване на болката, а също така и при създаване и тестване на техни синтетични аналози. Тези важни от фундаментална и практическа гледна точка проблеми са в основата на засиления научен интерес върху молекулните механизми на действие на енкефалините. Това ми дава основание да определя тематиката на представената докторска работа като актуална и значима.

Дисертацията на Ася Цанова е структурирана в 8 раздела, като основните от тях следват общоприетата схема – увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси и използвана литература. Тя включва 134 страници, 69 фигури, 1 таблица и литература от 259 заглавия на английски език и 2 на кирилица.

Заглавието на дисертацията е добре дефинира периметъра на проведените изследвания. В литературния обзор, илюстриран с 10 фигури и 1 таблица, е направен преглед на неuropeптите, характеристики и рецептори, както и липидните моделни мембрани, използвани при изследване на взаимодействието с неuropeптите и техни аналози. Подробно са разгледани липидните везикули и липозоми, мицели, бицели и липидни монослоеви. Бих препоръчал да се избягва използването на чуждици напр. „реутилизиране” (стр. 14) и „Ca²⁺ инфлукс” (стр. 15).

Специфичните задачи напълно съответстват на поставения научен проблем. Те следват логична последователност като започват с анализ на повърхностното поведение на нанесени монослоеви от чисти фосфолипиди, холестерол и техни смеси, които наподобяват по състав мембраните на нервните клетки и рафтовите структури, сравняване на получените

данни при равновесни и динамични условия с тези при добавяне на синтетичните Met- и Leu-енк енкефалини и завършват с охарактеризиране на повърхностната им морфология.

В изследването са използвани методи за измерване на двумерното налягане, при равновесни и динамични условия, на нанесен монослой формиран в Лангмюрова вана, Брюстър-ъглова микроскопия за изследване морфологията на нанесени монослоеве и микроинтерферометричния метод на Шелудко и Ексерова за образуване и изследване на бислойни тънки течни филми. Ясно и подробно са описани техниките за приготвяне на разтворите, както и начините на провеждане на експериментите, което оставя впечатление за много доброто им владеене от докторантката.

Резултатите са подкрепени с илюстративен материал представен в 40, като стриктно следват оригинално поставените задачи. Изследвано е взаимодействието на синтетични метионин-енкефалини с моделни мембранни системи с оглед влиянието на заряда на липидните молекули. Изследването на взаимодействието между метионин-енкефалин (Met-enk) и амидираната му форма (Met-enk-NH₂) към Лангмюирови монослоеве, съставени от различни по заряд фосфолипиди, показват, че проникването им в монослоеве от отрицателно заредения димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG) е по-силно, спрямо това в димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и намалява с увеличаване на плътността на монослоя, съответно за монослоеве от DMPC под 80 Å²/молекула), а за монослоеве от DMPG под 50 Å²/молекула). Катионният Met-enk-NH₂ прониква към фосфолипидните монослоеве в значително по-висока степен, спрямо немодифицирания Met-enk. Ефектът е по-ясно изразен за монослоеве от DMPG, което предполага действието на електростатичните взаимодействия между енкефалините и фосфолипидите. Определено е, че критичното повърхностно налягане на фосфолипидните монослоеве, над което двете форми на енкефалините не могат да проникват в тях, с Брюстър-ъгловата микроскопия са регистрирани различия в повърхностната морфология на монослоеве от DMPC и от DMPG и в присъствие на Met-enk и Met-enk-NH₂, които са в съответствие с данните от монослойните изследвания, потвърждаващи по-силното проникване на амидираната форма на енкефалина.

Особено внимание искам да обърна на втората група резултати свързана с изследване на влиянието на енкефалините върху образуването, кинетиката на изтичане и стабилността на тънки течни филми от DMPC и DMPG. Получените данни показват възможностите на метода при изясняване на междумолекулните механизми при липид/протеинни взаимодействия в биологичните мембрани. Установено е, че присъствието на Met-enk води до увеличаване на дебелината на филмите от сместа с DMPC, спрямо тази на филмите от чистия фосфолипид. Двете форми на енкефалина имат различен ефект по отношение кинетиката на изтичане и стабилността на филмите. Амидираният катионен енкефалин дестабилизира ТТФ от

DMPC, за разлика от немодифицирания енкефалин. Сравнението с данните от монослойните изследвания потвърждава и чрез модела на тънките течни филми електростатичният характер на взаимодействията между метионин-енкефалини и фосфолипиди.

Установена е различна степен на проникване на енкефалини към монослоевете от основни липидни компоненти на невроните. Значително по-висока степен на проникване е показана за амидирания Met-enk-NH₂, спрямо Met-enk, в зависимост от състава на монослоя. Определени са условията, при които двата енкефалина не могат да проникват в монослойните филми. За обяснение на наблюдаваното силно проникване на амидирания Met-enk-NH₂ към монослой от холестерол е предложена хипотеза за формиране на водородни връзки между NH₂-крайната група на амидирания енкефалин и ОН-групата на холестерола.

Последната група резултати разширяват изследването и върху липидни смеси наподобяващи мембранните рафтове. Това е от особен интерес, т.к. в тези участъци от мембраната се разположени рецепторите, с които енкефалините взаимодействат. Резултатите показват, че за всички индивидуални липиди и техните смеси, двете форми на енкефалините проникват по-силно в монослоевете в течно-разтегнато състояние (LE) отколкото в течно-кондензирано състояние (LC), като ефектът е по-силен при амидираната форма. Енкефалините увеличават еластичността на холестерол-съдържащи монослоеве, а ефектът е най-силно изразен при Met-enk-NH₂. На базата на получените резултати то π/A -изотермите и модулите на компресия (C_s^{-1}) на монослоеве от рафтови смеси е предложена хипотеза за повишен афинитет на катионния Met-enk-NH₂ към течно-подредената фаза на Sm/Cho-домените в монослоя, а на цвтерйонния Met-enk – към течно-неподредената фаза на цвтерйонните POPC молекули в монослоя.

Изследвани са и взаимодействията на левцин-енкефалин (Leu-enk) и неговата амидирана форма с липиди, съставлящи мембранните рафтове. Установени са различията в ефектите на двете форми по отношение на латералната еластичност на липидните монослоеве, изместване на точката на колапс в π/A -изотермите, значително хомогенизиране на смесените монослоеве и намаляване на контраста на БАМ изображенията. Тези резултати са позволили да бъде направен сравнителен анализ между двата аналога на природните енкефалини (Met-enk и Leu-enk) и техните амидирани форми по отношение на взаимодействията им с липиди монослоеве. Направено е заключението, че метионин-енкефалините променят в по-голяма степен изследваните равновесни и динамични характеристики на липидните монослоеве, в сравнение с левцин-енкефалините.

В края искам да отбележа, че е налице едно оригинално по идея, добре премислено и извършено научно изследване, проведено в Лабораторията по Моделни мембрани, която е сред пионерните и водещи в областта на моделните мембранни системи. Работата би спечелила ако в последната глава от дисертацията, авторката не се беше ограничила в

схемата на изброяване на основните резултати, а ги бе обобщила за ролята на молекулната организация на монослоя за енкефалин/липидните Представената дисертация прави много приятно впечатление с малкия брой печатни грешки. По техническото оформяне на използвана литература имам следните забележки: статии с един и същи първи автор, излезли през една и съща година, се цитират с един номер с индекс отбелязан с букви; № 122. Kruglyakov PM and Ekerowa D, Foam and foam films, Himija, Moskwa, 1990 е руското издание и трябва да се цитира на кирилица.

Във връзка с представените резултати бих искал да задам следните въпроси:

1. При измерване на повърхностното налягане, при равновесни условия, наблюдавана ли е разлика в стойностите, дължаща се на повишаване на обема при добавяне на енкефалините?

2. Отчетана ли е ролята на NaCl, ако експериментите са проведени в негово присъствие, предизвикващ свиване на дифузионните части на двойния електричен слой, за обяснение на дестабилизиране на тънките течни филми от DMPC в присъствие на Met-enk-NH₂ (стр. 71).

Получените от Ася Цанова резултати представляват безспорен принос за изясняване ролята на структурната организация и хетерогеността на мембраната при сложните пептид-липидни взаимодействия, което е видно и от 4 публикувани статии, свързани с дисертацията. Три от тях са в международни специализирани научни списания с импакт фактор и една в международното on-line списание Science & Technologies. А. Цанова е първи автор в четирите статиите, което определя нейния съществен дял в разработването на дисертационния труд. Справка в базите данни ISI Web of Knowledge и Scopus показва, че една от тези публикации е цитирана вече 3 пъти и това ми дава основание да считам, че резултатите от дисертацията са получили и международно признание. Материали свързани с дисертацията са докладвани 8 пъти. Трябва да се отбележи, че представените публикации надхвърлят препоръчителните критерии на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски” за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

Авторефератът правилно отразява основните резултати на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на гореописаните аргументи в подкрепа на актуалност на дисертационната тема, структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения и реализирани резултати, оценявам

представения труд като дисертабилен. Давайки своята положителна оценка, препоръчвам на почитаемото Научно Жури, да присъди на Ася Свиленова Цанова образователната и научна степен „доктор”.

29.09.2014 г.

София

Рецензент:

/доц. д-р Румен Тодоров/