

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Кристина Мирчева Мирчева, озаглавен „Механизъм на действие на липолитични и протеолитични ензими върху субстрати, организирани в моделни наноразмерни структури”, 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 ензимната хидролиза в двумерна фаза. Много ензими катализират метаболитни реакции, които *in vivo* се извършват на повърхността на неразтворими във водна среда субстрати. Тази група ензими включва както липолитичните ензими, чиито субстрати са неразтворими липидни структури, така и някои протеолитични ензими, със субстрат белтъчни молекули. На повърхността на субстрата каталитичната реакция се комбинира с различни повърхностни явления и процеси.

Триацилглицерол хидролазите или липази, хидролизират триацилглицериди и имат ключова роля в метаболизма на мазнините, което ги определя като много подходящо лекарствено средство срещу нарушения в храносмилането. Тези ензими намират приложение и в биотехнологиите като катализатори при органични синтези и производство на специални химикали. Към същата група естерази спадат и фосфолипазите, които катализират ключови метаболитни процеси, участват в реорганизация на биологичните мембрани и в клетъчната сигнализация. Фосфолипазите А₂ (ФЛА₂), са ензимите, които хидролизират естерната връзка на 2 място в молекулите на глицерофосфолипидите. Те са едно от най-големите семейства на липид-хидролизиращи ензими. Освен добре известната им роля в разграждане на фосфолипиди и защита на организма срещу инфекции, имат връзката и с патологични състояния като атеросклероза и рак.

От друга страна тези ензими предизвикват значителен научен интерес и при разкриване механизма на каталитичното им действие, който зависи силно от вида, под който са организирани липидните субстрати – монослой, мембранни бислоеве, мицели, везикули или мастни капки във водна среда. През последните години, са предложени различни кинетични модели с цел да се опише механизма на ензимно действие на гранични повърхности. Установено е, че процесите на адсорбция, десорбция и пенетрация, ориентацията и конформацията на молекулите, формиращи граничната повърхност, молекулната опаковка, плътност на зарядите и структурирането на водните молекули на тази граница, повърхностния вискозитет и др. играят решаваща роля в изследване механизмите на действие на липолитичните ензими. Принципно, кинетичните модели трябва да държат

сметка за процесите свързани с молекулната реорганизация на повърхността и отделянето на разтворими или неразтворимите продукти, което повлиява на т. нар. „interfacial quality” на липидните структури.

Тези разнообразни и важни от фундаментална и практическа гледна точка проблеми са в основата на засиления научен интерес върху молекулните механизми на действието на хидролитичните ензими. Това ми дава основание да определя тематиката на представената докторска работа като актуална и значима.

Дисертацията на Кристина Мирчева е структурирана в седем раздела, като основните от тях следват общоприетата схема – увод, литературен обзор, материали и методи, експериментална част, заключение и основни резултати, изводи и използвана литература. Тя включва 130 страници, 64 фигури, 5 таблици и литература от 172 заглавия на английски език и 4 на кирилица.

Заглавието на дисертацията е добре подбрано и ясно дефинира периметъра на проведените изследвания. Уводът завършва с поставянето на целта и задачите. В литературния обзор, богато илюстриран с 26 фигури, е направен преглед на мономолекулния слой като моделна система за изследване на процеси и явления на фазовата граница разтвор/въздух. Подробно са разгледани ензимите, субстратите и каталитичните реакции, протичащи в двумерна фаза, както и основните кинетични модели, използвани при изследването им. Некоректно е посочено, че „Липидите са естери на глицерола ...” (стр. 30), в раздела, който също е озаглавен не много правилно, т.к хидролитични са ензимите и реакциите в които те участват, а не субстратите. Добре би било литературният обзор да завърши с връзката между направения преглед на литературата и целта на дисертацията.

Резултатите са подкрепени с илюстративен материал представен в 37 фигури и 5 таблици. Много добро впечатление прави допълнителното схематично изобразяване както на ензимните реакции, така и на повърхностната организация на субстратите и продуктите, което спомага за по-голяма яснота на развитите кинетични модели.

Специфичните задачи напълно съответстват на поставения научен проблем. Те следват логична последователност като започват с проследяване на кинетиката на ензимната хидролиза в еднокомпонентен монослой под действието на липазата *Humicola lanuginosa* (HLL), преминават през изследвания на смесени монослоеове, подложени на едновременното действие на липаза HLL и фосфолипаза A2 (ФлA2), докато се стигне до действие на хидролитични ензими върху липозоми, нанокapsули и коацервати. За всяка една от изброените системи, от експериментално измерените параметри с подходящ кинетичен модел са изчислени съответните каталитични константи на хидролизната реакция.

В изследването са използвани методи за измерване на двумерното налягане и повърхностния потенциал на монослой формиран в Лангмюрова вана, стоящо мехурче и висяща капка. Ясно и подробно са описани техниките за приготвяне на различните субстрати под формата на липозоми, нанокapsули и коацервати, както и начините на провеждане на експериментите в модифицирана лангмюрова вана от „нулев порядък“, което оставя впечатление за много доброто им владение от докторантката.

Получените резултати стриктно следват оригинално поставените задачи. Предложен е подход на базата на експериментално измерени характеристики на мономолекулни слоеве на фазовата граница разтвор/въздух и с помощта на развити кинетични модели да се определи феноменологичната глобална константа (Q_m), отчитаща влиянието на структурната организация и физикохимичните явления и процеси на повърхността на субстрата. Последователността на конкретните задачи, както бе отбелязано по-горе, позволява стойности на Q_m да бъдат сравнявани. Получени са кинетичните константи за хидролитични реакции при които продуктите са разтворими или неразтворими във водната фаза. Установено е, че стойността на глобалната кинетична константа на първия етап от разграждането на трикаприлина (ТК) под действието на HLL до неразтворимия дикаприлин (ДК) е с порядък по-голяма от тази на втория етап на превръщане на ДК в разтворимия монокаприлин (МК). Демонстрирана е, ролята на молекулното обкръжение върху ензимната активност на HLL и ФлА2 в смесени монослоеви от ТК и дилаурилфасфатидилхолин (ДЛФХ). При едновременното действие на двата ензима в двукомпонентни монослоеви от съответните им субстрати е наблюдавано понижаване в каталитичната им активност.

Втората група резултати е свързана с изследване на ензимната активност при различна организация на субстратните молекули. Сравнена е каталитичната активност на ФлА2 в монослоеви формиран в Лангмюрова вана, стоящо мехурче и висяща капка. Развита е подход за сравнително изследване на ефикасността на ФлА2 върху субстрати, организирани като монослоеви, бислойни везикули и нанокapsули. Показано е, че монослойната организация на субстрата е по-благоприятна за действието на ензима, като получената стойност на Q_m е съответно с 5 и 6 порядъка по-малка от тези за везикули и нанокapsули.

Последната група резултати разширяват изследването на хидролитичната ензимна активност и за групата на протеолитичните ензими. Ензимното действие при разграждане на растителния протеин α -глиадин на граничната повърхност вода/въздух под действието на протеазата Savinase, е описано като процес на случайно фрагментиране ("random scission") и прогресивно разтваряне на получаващите се аминокиселинни остатъци. От експерименталните данни и използвайки развития за този случай кинетичен модел, са

определени глобалните кинетични константи за разграждане на α -глиадин, организиран като монослой и под формата на коацервати. И за двата случая стойностите на Q_m съвпадат и са с няколко порядъка по-ниски от тези за липолитичните ензими. Тук бих си позволил да отбележа, че причина за този резултат може да бъде ниската активност на ензима при условията на експеримента: температура от 22°C и рН 8. Тези стойности са в началото на съответните интервали (20-60°C) и (рН 8-12), осигуряващи оптималните условия за действие на ензима Savinase, с оптимуми при 55°C и рН 10.

В края искам да отбележа, че е налице едно оригинално по идея, добре премислено и извършено научно изследване, проведено в Лабораторията по Биофизикохимия, която е сред пионерните и водещи в областта. Основната ми забележка е лаконичната дискусия на получените резултати. Работата би спечелила ако в последната глава от дисертацията, авторката не се беше ограничила в схемата на изброяване на основните резултати, а бе дискутирала ролята на молекулната организация на различните субстрати за разкриване механизма на ензимна хидролиза на липиди и протеини. Представената дисертация прави много приятно впечатление с минималния брой печатни грешки. По техническото оформление забележката ми е свързана с текста към фигурите, които много често преминава и на следващата страница, което затруднява читателя.

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

1. Какво разбирате под „адитивност на ензимното действие“ (стр. 77)?
2. Как може да се обясни, че експерименталните резултати за хидролитичното действие на HLL в смесен монослой от ТК и ДЛФХ (фиг. 48 панел А) показват, че „с увеличаване съдържанието на ТК, кривите се отместват към тази за монослой от чист ТК“, докато изчислените Q_m за този случай (Фиг. 54, панел А), показват максимална стойност при 0.5 съотношение на ТК към ДЛФХ?

3. По който метод е измервано повърхностното налягане (π) в случая на стоящо мехурче и висяща капка и как може да се обясни променения вид на кривите π (време) за тези два случая, спрямо резултатите за плоска повърхност (Фиг. 58, криви 1).

Получените от Кристина Мирчева резултати представляват безспорен принос за изясняване действието на хидролитични ензими върху субстрати, организирани в мономолекулни липидни слоеве, липозоми, нанкапсули и коацервати, което е видно и от 5 публикувани статии, свързани с дисертацията. Четири от тях са отпечатани в реномираните международни списания в областта: една в *Journal of Colloid and Interface Science* (IF 3.02) и три в *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (IF 2.60). Една от публикациите е в Сборника *Nanoscience & Nanotechnology* 9, под редакцията на Е. Балабанова и Й. Драгиева. В четири от статиите К. Мирчева е на първо място, което определя нейния

съществен дял в разработването на дисертационния труд. Справка в базите данни ISI Web of Knowledge и Scopus показва, че две от тези публикации са цитирани вече 3 пъти и това ми дава основание да считам, че те са получили и международно признание. Резултати от дисертацията са представени на шест научни форума. Трябва да се отбележи, че представените публикации надхвърлят многократно препоръчителните критерии на Химическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски” за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

Авторефератът правилно отразява основните резултати на дисертационния труд, като при изработването му е избягната забележката за текста към фигурите.

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 Кристина Мирчева Мирчева образователната и научна степен „доктор”.

29.06.2011 г.

София

Рецензент:

/доц. д-р Румен Тодоров/