



# СТАНОВИЩЕ

от доц. Радостина Николова Георгиева, дб

кат. „Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология“

Медицински Факултет на Тракийски Университет – Стара Загора

член на научно жури (Заповед № 827/04.04.2016 г. на Ректора на Тракийски Университет –  
Стара Загора)

на дисертационния труд на БОЯНА КЪНЧЕВА ПЪРВАНОВА, зачислена в докторантura, самостоятелна форма на обучение със заповед № 1366/18.07.2013 г. към катедра „Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология“ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Биофизика“.

**Тема на дисертационния труд: „Диелектроскопично изследване на подмембрannата белтъчна мрежа при еритроцити“**

**Научен ръководител:** проф. Иван Танев Иванов, дфн

**Научен консултант:** доц. Мирослав Карабалиев, дб

## 1. Кратки биографични данни за докторантката

Бояна Кънчева Първанова е родена на 11.12.1976 г. в град Стара Загора. През 1999 г. завършила ПУ „Паисий Хиландарски“ с квалификация магистър по химия и физика и професионална квалификация учител по химия и физика. Работи като учител в Средно общеобразователно училище „Иван Вазов“, гр. Стара Загора от 1999 до 2009 г. През 2009 г. спечелила конкурс и е назначена като асистент в катедра „Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология“, където води лабораторни упражнения по дисциплините „Медицинска физика“ и „Биофизика“. Владее писмено и говоримо английски език на добро ниво и притежава много добри компютърни умения.

Със заповед № 1366/18.07.2013 г. Бояна Първанова е зачислена в докторантura, самостоятелна форма на обучение със срок на завършване на докторантурата 15.07.2016 г.

## 2. Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е разработен в Катедрата по физика, биофизика, рентгенология и радиология, Медицински факултет, Тракийски университет, гр. Стара Загора. Написан е на 164 страници и включва: Въведение – 3 стр., Литературен обзор – 39 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 30 стр.; Собствени резултати и обсъждане – 60 стр.; Заключение, изводи и научни приноси – 6 стр., Литература – 21 стр. Цитирани са общо 316 заглавия, от които 311 на латиница и 5 на кирилица. Прави впечатление добрият баланс между актуални и по-стари литературни източници.

### **3. Актуалност на тематиката**

Основна цел на дисертационния труд е изследването на диелектричните свойства на подмембранныта белтъчна мрежа при цели еритроцити, изолирани еритроцитни мембрани и на изолирани от еритроцити подмембрани белтъчни мрежи, чрез денатурацията на спектрина с цел да се получи информация за вътрекулната динамика на белтъците в тази част от плазматичната мембра на еритроцитите.

Темата безспорно е изключително актуална. Сложността и динамичността на структурата на клетъчните мембрани превръщат изясняването на биофизичните механизми, стоящи зад редица физиологични процеси, патологични състояния и ефекти на различни физични и химични фактори, изключително трудна задача. Тематиката е интердисциплинарна и включва подходи от различни научни области за решаването за поставените задачи – биофизика, биохимия, физикохимията, електрохимия. Разработваните в дисертационния труд проблеми са значими както в научно-теоретично, така и в научно-приложно отношение.

### **4. Литературен обзор и познаване на проблема**

Прегледът на литературата е направен компетентно и задълбочено. Прави впечатление широкото ползване и познаване на световната литература по проблема. Обзорът е разделен на 2 части. Първоначално дисертантката е разглеждала структурата на еритроцитната мембра като се спира на нейния липиден и белтъчен състав в количествено и качествено отношение. Особено внимание е отделено на структурата на подмембранныта мрежа, на нейните компоненти, взаимодействията между тях, функциите им, както и на методите за тяхното изолиране и изследване. Във втория подраздел, Бояна Първанова описва пасивните електрични свойства на биологичните системи тъй като основният инструмент за постигане на целите на дисертацията е измерване на импеданса на суспензии от еритроцити, еритроцитни мембрани и екстрагирани с Triton X-100 еритроцитни подмембрани цитоскелети при различни условия на средата. Тук подробно са описани явленията на поляризация и дисперсия на импеданса, както и биофизичните механизми, които ги обуславят. Направен е анализ на известното в литературата, което позволява определянето на насоката на оригиналните научни изследвания и подчертава тяхната значимост.

За постигането на целите ясно и точно са формулирани осем задачи, което подвърждава впечатлението за задълбочено познаване на проблемите, които са обект на изследване в дисертационния труд, както и на приложените методи.

### **5. Материали и методи**

За постигане целите на разработката са изследвани човешки и животински еритроцити, техни изолирани мембрани и тритонови скелети. Усвоени и усъвършенствани са протоколите за изолиране на тритонови скелети. Използвани са биохимични,

физико-химични и биофизични подходи за манипулиране на структурата на мембранныте протеини като специфични инхибитори (DIDS), омрежители на протеини ( $\text{OsO}_4$ , glutar aldehyde), pH, температура, осмотично налягане. Приложени са разнообразни и съвременни методи за изследване и характеризиране на мембрани – диелектрична спектроскопия, спектрофотометрия, конфокална лазерна микроскопия, сканираща микрокалориметрия, както и подходящи математични, статистически и физични методи за анализ на резултатите от измерванията.

## 6. Резултати и обсъждане

Експерименталните резултати са представени в седем раздела и са онагледени с добре изработени фигури (40 бр.) и 1 таблица. Получени са много оригинални резултати, които са описани и интерпретирани подробно и ясно.

Основен резултат на изследванията представени в дисертацията е, че последователните топлинни денатурации на главните мембрани белъци - спектрин ( $49.5^\circ\text{C}$ ) и анионен обменник ( $62-67^\circ\text{C}$ ) рязко променят диелектричните свойства както на еритроцитите, така и на еритроцитните модели. От тук са направени следните по-важни изводи:

- Топлинните денатурации на спектрина и анионния обменник водят до значими термо-индуктирани промени в диелектричните свойства на плазматичната мембрана и мембранныя скелет на еритроцитите. Двата белъка генерират диелектрични загуби само когато са в нативно състояние при наличие на достатъчна вътримолекулна подвижност.
- Установени са две критични честоти на релаксация върху спектрина на мембранныя скелет - една при ниски честоти, която отразява презареждането на липидния бислой в такт с полето и наличието на механични връзки между липидния бислой и мембранныя скелет и вероятно се дължи на флексоелектричен ефект при деформация на спектрина. Втората релаксация е при по-висока честота и отразява подвижността на отделни фрагменти от спектрина.
- В сравнение с еритроцитите от човек, при кокошите еритроцити втората критична честота е по-ниска, т.е. по-ниска сегментна подвижност на мембранныя скелет поради наличието на цитоскелет и по-слаба деформируемост.
- Хиперосмотичността създадена от нейонно, мемрано-непроникващо осмотично активно вещество (манитол) упражнява обратим и двуфазов ефект върху еритроцитната мембрана.
- Термичната диелектроскопия позволява изучаване на динамичното състояние на мембранныя скелет на еритроцитните мембрани и връзката му с липидния бислой и може да намери приложение за изследване и диагностициране на хемолитични анемии от вида мембанопатия и диабет.

## 7. Преченка на приносите и публикационната активност на дисертантката

Най- важните научните приноси на дисертантката могат да се обобщят, както следва:

- Методът на термична диелектроскопия е приложен за пръв път за изследване на влиянието на спектрина и неговата денатурация върху комплексия импеданс, комплексния капацитет и диелектрични загуби на суспензии, съдържащи еритроцити от човек и техни опростени модели – изолирани еритроцитни мембрани и мембрани белтъчни скелети.
- Доказано е, че диелектричните загуби на енергия върху еритроцитната мембрана зависят силно от двата мажорни белтъка – спектрина и анионния обменник като топлинната денатурация на първия белтък силно намалява тези загуби, а тази на втория белтък ги отстранява напълно. Предизвиканите от денатурацията на спектрина промени се влияят по характерен начин от глицерол и от специфичното омрежаване на спектрина с бифункционални химични реагенти, което свидетелства за участието на диполи, свързани към подвижни сегменти на спектриновите фибрили.
- Разкрити са две диелектрични релаксации върху спектрина на мембранныя скелет. Предполага се, че нискочестотната релаксация отразява пиезоелектричен ефект при деформацията на спектрина. Високочестотната релаксация отразява прякото взаимодействие на полето и основните градивни фрагменти на спектрина.
- Установен е обратим и двуфазен ефект на хиперосмотичността на суспензионната среда (манитол) върху диелектричните релаксации в еритроцитната мембрана в съгласие с ефекта от разкъсване на връзките мем branен скелет-липиден бислой във фаза 1 и структурен преход в подмембранныя скелет във фаза 2.

Резултатите представени в дисертационният труд са публикувани в 5 статии на английски език, от които: 2 в *Trakia Journal of Sciences*, 1 в международното научно on-line списание *Science & Technologies*, 1 статия в *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* и 1 в *Bioelectrochemistry* (IF 3.759).

Приносите несъмнено са в голяма степен лично дело на дисертантката, тъй като Бояна Първанова е първи автор в 3 пълнотекстови публикации, на които се базира дисертационният труд и е първи автор в 3 от 4-те съобщения на научни форуми.

## **8. Автореферат**

Авторефератът е оформлен много добре и включва всички важни резултати и анализи. Представеният в подкрепа на резултатите графичен материал е изработен прецизно.

## **9. Критични бележки и препоръки**

Имам следните по-важни критични забележки, които в никакъв случай не умаловажават значението на дисертационния труд:

- В литературния обзор не е обърнато достатъчно внимание на все още неизяснените аспекти в структурата на мембрата и потенциала на методите за изследване на

пасивните електрични свойства. Това би подчертало по-добре значението на представените в дисертационния труд изследвания и получените резултати.

- При описанието на проведените експерименти и под фигуранте, които представят получените резултати липсва информация за броя на измерванията.
- Изводите и приносите биха могли да се формулират по-кратко, което би подчертало по-добре тяхната значимост.
- Допуснати са някои (не много на брой) печатни грешки.

## 10. Заключение

Дисертационният труд включва обширен експериментален материал, съдържа оригинални резултати и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането му и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски Университет – Стара Загора. Бояна Първанова е способна самостоятелно да формулира научни проблеми и да провежда научни изследвания базирани на модерни биофизични, биологични и спектроскопски методи. Дисертантката демонстрира творческо мислене и способности за задълбочен анализ на получените резултати.

Вземайки предвид обхвата на изследванията, оригиналността на постигнатите резултати и значимостта на научните приноси в дисертацията, както и несъмнения личен принос на Бояна Първанова, давам висока положителна оценка на представения дисертационен труд. Предлагам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Биофизика“ на БОЯНА КЪНЧЕВА ПЪРВАНОВА.

28.04.2016 г.

Изготвил становището: .....

доц. Радостина Георгиева, дб