



## РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационния труд на асистент Бояна Кънчева Първанова на тема „**Диелектроскопично изследване на подмембранныта белтъчна мрежа при еритроцити**“.

За: присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Биофизика“.

Рецензент: проф. Стефан Рачев Рибаров, дф, дбн.

Реологичните свойства на кръвта безспорно са жизнено важни за човека и бозайниците. В голяма степен те зависят от еритроцитите и главно от състоянието на плазматичната им мембрана и подмембрания скелет изграден от периферни бетъци като спектрин и актин. Тези бетъци поддържат в голяма степен физиологично необходимата форма на еритроцитите, деформируемостта и еластичността им. Съгласно съвременните представи, в мембрания скелет протичат процеси на постоянно променящи се връзки между неговите бетъци, осигуряващи адаптация на клетъчните механични параметри към условията на кръвотока.

Много тежки патологии (наследствена сферицитоза, инфаркт на миокарда, захарен диабет и др.) водят и/или са свързани с изменения на реологичните параметри на кръвта като деформируемост и еластичност на еритроцитите.

В този контекст, всички изследвания относно реологичните свойства на кръвта в норма и патология са много важни и представляват определен научен и практически интерес. Особено това се отнася до изследвания върху молекулната динамика на еритроцитарната подмембранска белтъчна мрежа и влиянието на някои външни фактори върху нея. Това е било и основната цел на рецензирания дисертационен труд.

Поставената цел е трудно да бъде решена с използване на традиционната флуоресцентна спектроскопия, методите на електронен парамагнитен или ядрен магнитен резонанс, тъй като те са чувствителни към значително по-малки молекулни образования от сегментите на подмембранныта белтъчна мрежа.

Ето защо, Дисертантката правилно е използвала метода на диелектричната спектроскопия, който прилага в съчетание с процедура на увеличаваща се с постоянна скорост температура на изследваната проба. Основните ѝ съображения за това са както следва. Еритроцитната мембрана има трислойна структура: външен слой (гликокаликс) който е изграден от олигозахаридните вериги на гликопротеини и гликолипиди, среден слой представляващ липиден бислой инкрустиран с трансмембрани белтъци и вътрешен (цитоплазматичен) слой, изграден изцяло от периферни хидрофилни белтъци свързани чрез слаби връзки за средния слой. Този подмембранен цитоскелет съдържа главно белтъците спектрин и актин.

Спектриновите молекули притежават тройно-спирално повтарящите се домени с голям диполен момент. Предвид на сравнително големите им размери, се очаква, че при използване на метода на диелектричната спектроскопия върху образци от еритроцитни суспензии, суспензии на еритроцитни мембрани или подмембрани цитоскелети, стойностите на измерените диелектрични параметри в голяма степен са повлияни от състоянието на спектриновата мрежа и могат да бъдат използвани за изследването ѝ.

Съчетаването на диелектричната спектроскопия с процедура на увеличаваща се с постоянна скорост температура на изследваната проба дава допълнителна възможност да бъдат регистрирани температурно-индуцираните промени на молекулните групировки определящи диелектричните свойства, както и на тяхната идентификация.

За постигане на целта на Дисертационния труд е работено по следните основни задачи:

1. Чрез топлинна денатурация на главните мембрани белтъци – спектрин и анионен обменник да се изучи влиянието им върху диелектричната поляризация на подмембранныта белтъчна мрежа и честотния профил на диелектричните загуби върху еритроцитната мембрана.
2. Да се изследва механизма на нискочестотна релаксация върху спектриновата мрежа при еритроцити от човек, както и да се определят разликите в честотата на диполна релаксация върху спектриновата мрежа при еритроцити от човек, бозайници и птици.
3. Да се използва методът термична диелектроскопия с цел да се проучи ефекта на хипертоничност и  $\text{OsO}_4$  с различни концентрации върху динамичното състояние на подмембранныта спектринова мрежа при еритроцити от човек.
4. Да се използва методът термична диелектроскопия за изследване на структурните промени в подмембранныата спектринова мрежа при еритроцити от плъхове с индуциран диабет.

Така дефинираните задачи показват желанието на Дисертантката да осветли поставената цел не само от научна, но доколкото е възможно и от гледна точка на медицинската практика.

Дисертационният труд е написан на 164 страници. Структурата му е класическа.

Литературната справка е изчерпателна: реферирани са 316 научни публикации, от които 5 на кирилица и 311 на латиница. Тя илюстрира отличната осведоменост на Дисертантката с известното по проблема преди нея.

Раздела „Материали и методи“ на Дисертацията е написан коректно и създава доверие към получените експериментални резултати. Дисертантката владее множество методи и технологии за получаване на еритроцитни суспензии, мембрани, цитоскелети с различна степен на връзки между липидния бислой и подмембранныта мрежа и т.н. Научните резултати са коректно представени в 40 графики и 1 таблица

Добре формулираната цел и задачи на Дисертацията, отличната литературна усведоменост на Дисертантката, както и адекватността на използвани препаративни и измерителни методи са дали възможност да бъдат получени множество интересни експериментални резултати, интерпретации и заключения. Ето някои от тях:

- Показано е, че диелектричните свойства на еритроцитите и основните им структурни компоненти мембрана и цитоскелет (наречени за краткост, но не съвсем коректно „еритроцитни модели“) търпят рязка промяна при две температури:  $49.5^{\circ}\text{C}$  и  $62-67^{\circ}\text{C}$ . Тези температури са характерни за денатурацията на спектрина и анионния обменник. Допълнителни изследвания на еритроцити и техните „модели“, с топлинно модифицирана или модифицирана чрез омрежаване спектринова мрежа, подкрепят предположението, че

диелектроскопичната промяна при  $49.5^{\circ}\text{C}$  действително се дължи на денатурационни процеси в тази мрежа.

- Диполните, а от там и диелектричните свойства на спектрина вероятно се дължат на тройно-спиралните повтарящи се домени във всеки мономер на молекулата. Следователно, изглежда логично допускането, че диполните моменти на сегментите от спектриновата мрежа са от „свързан“ тип. Ако това е така, то информацията която се получава чрез диелектроскопичния метод отразява в никаква степен състоянието на мрежата и цитоскелета като цяло.
- За определяне на приноса на спектрина за диелектричните свойства на супензии от еритроцити и еритроцитни мембрани, Дисертантката въвежда величините комплексен импеданс  $\Delta Z^*$  и комплексен капацитет  $\Delta C^*$ . Дефинира ги като разлика ( $\Delta$ ) между стойностите на величините, измерени непосредствено преди и след температурната денатурация на спектрина на клетките. Оказва се, че тези величини имат едни и същи стойности при двата вида супензии. Това вероятно показва, че  $\Delta Z^*$  и  $\Delta C^*$  отразяват вътремембрани взаимодействия.
- Основните величини които се определят при диелектричната спектроскопия са комплексния импеданс, комплексния капацитет и диелектричните загуби на енергия. Техните стойности са определени от взаимодействието на приложеното променливо електрично поле със свързаните диполи на изследваната проба. При определено висока честота на полето, наречена „Честота на релаксация“ това взаимодействие не може да се осъществи поради невъзможност свободните заряди и свързаните диполи да следват промените на електричното поле. Ето защо, честотата на релаксация информира за подвижността на структурните единици (сегменти) на изследваната проба, притежаващи значим диполен момент. За еритроцитната мембрана може да се допусне, че това са тройно-спиралните повтарящи се домени в спектриновата мрежа.
- Изследвайки този проблем върху еритроцити и еритроцитни мембрани Дисертантката установява две честоти на релаксация. Неочаквана е по-ниската честота. При такава честота на приложеното електрично поле молекулите на липидния бислой на мембраната вероятно екранират електрически спектриновата мрежа, т.е. върху нея не е приложено променливо електрично поле и е безсмислено да се говори за честота на релаксация на спектриновите диполни сегменти.

Направено е правдоподобно допускане, че ефекта може да се дължи на тъй наречения флексоелектричен ефект. Както е известно, цитоскелета е прикрепен към липидния бислой на мембраната посредством обратими нековалентни връзки: калциеви мостчета между спектрина и липидния бислой, анкиринови възли свързващи белтъци от мрежата и интегрални белтъци от липидния бислой и възли на белтък 4.1 свързващ спектрин – актиновия комплекс за гликофорин С. Променливото електрично поле със сравнително ниска честота предизвиква механични деформации на липидния бислой, а чрез връзките му с цитоскелета и на него. Това вероятно води до генерация на електрични заряди в цитоскелета (флексоелектричен ефект) и никакви диелектрични свойства. При нискочестотната релаксация изчезват деформациите на липидния бислой, а от там и зависещите от него диелектрични свойства на цитоскелета.

Високочестотната релаксация наблюдавана при проведените експерименти вероятно се дължи на отпадане на екраниращия ефект на липидния бислой върху цитоскелета и пряко взаимодействие на електричното поле с диполните сегменти на спектрина.

- Показано е, че температурата не оказва самостоятелно и непрекъснато влияние върху диелектричните загуби на енергия в еритроцитната мембра. Нейното влияние се проявява само при температури, предизвикващи денатурация на значимите мембрани белтъци. Топлинната денатурация на спектрина намалява силно тези загуби. Денатурацията и на анионния обменник ги унищожава напълно. От тук може да се направи изводът, че двата белтъка генерират диелектрични загуби само когато са в нативно състояние, т.е. при наличие на достатъчна вътрешномолекулна подвижност. При денатурирането им те се обездвижват и губят тази си способност.
- Установено е, че манитол-предизвикана хиперосмотичност на суспензионната среда, предизвиква обратим и двуфазен ефект върху диелектричните релаксации в еритроцитната мембра. При осмотично налягане до 500 mOsm амплитудите на двете релаксации се понижават вероятно поради разкъсване на връзките между мембрания скелет и липидния бислой. При осмотичност над 500 mOsm двете релаксации се сливат, което показва структурен переход в подмембрания скелет. Този резултат има отношение към проблемите, създавани от хипертоничността при криоконсервиране на клетки и тъкани. Необходими са обаче допълнителни изследвания с използване на мембрano-проникващи криоконсерванти.
- Показано е, че OsO<sub>4</sub> във висока концентрация ( $> 4 \text{ mM}$ ) намалява до пълно елиминиране на диелектричните релаксации в еритроцитната мембра. Това вероятно се дължи на неговия омрежаващ ефект върху мембранныте липиди и белтъци.
- Получени са интересни резултати относно диелектричните свойства на еритроцити от плъх преди и след експериментално предизвикан диабет и повлияването му от мелатонин, който е с антиокислителни свойства. Важността на проблема изисква още по-задълбочени изследвания с разработената от Дисертантката методика.
- Честотата на диелектричните релаксации при човешките еритроцити е от порядъка на честотите на импулсите използвани при медицинската диатермия и методите за електро-импулсно умъртвяване на туморни клетки. Това подсказва за добри перспективи за приложения на разработената методика в тези области на практическата медицина.

Материалите включени в дисертационния труд са публикувани на английски език в 5 статии. От тях 1-а е в международно списание, а 4-и в наши научни списания. Забелязани са още 2 статии на Дисертантката: една в международно списание публикувана през 2016 г. и една в наше списание и публикувана през 2014 г. Това е рядко срещан случай на пропуснати ползи на кандидата. Резултатите описани в Дисертационния труд са докладвани на 1 международен и на 3 локални научни мероприятия.

Не са ми представени данни за цитирания на трудовете. Имайки предвид, че те са публикувани в интервала от 2012- 2016 г. смяtam, че още е рано това да се случи.

Резултатите на Дисертационния труд имат не само научно значение за изясняване на ролята на спектриновата мрежа в поляризацията на човешките еритроцити. Считам, че те имат значение и за практическата медицина, в частност за диатермията и методите за умъртвяване на тумори чрез електрични импулси.

Дисертацията като цяло е оформена отлично, но се забелязват и някои макар и незначителни стилови и терминологични неточности. Ето някои от тях:

- Написано е: „...еритроцитни модели (изолирани мембрани и изолирани мембрани скелети...). Коментар: Изолиранные еритроцитни мембрани и мембрани скелети не са модели на клетката а нейни структурни компоненти.
- Написано е: „Методът термична диелектроскопия беше приложен при бързо загряване върху суспензии от клетки и клетъчни модели за детектиране на термо-индуцирани промени в пасивните електрични (диелектрични) свойства – комплексен импеданс, комплексен капацитет и диелектрични загуби на енергия. Тези параметри са взаимно свързани и отразяват взаимодействието на променливото електрично поле със свободните заряди и със свързаните диполи на изследвания обект.“ Въпрос: „Комплексен импеданс, комплексен капацитет и диелектрични загуби на енергия“ свойство ли е или параметри на изследваната чрез диелектроскопия проба?

Авторефератът е добре написан и отразява същността на Дисертационния труд.

Цялата информация която ми беше предоставена във връзка със защитата на Дисертацията е достоверна и е подгответена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и ПРАСТрУ.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Дисертационният труд на тема „ Диелектроскопично изследване на подмембранината белтъчна мрежа при еритроцити“ представлява едно задълбочено изследване на молекулната динамика на еритроцитарната подмембранина белтъчна мрежа и влиянието на някои външни фактори върху нея. Проблемът е актуален и важен не само от научна, но и от гледна точка на практическата медицина. За изследването му е разработен метод на диелектроскопия, съчетан с с процедура на увеличаваща се с постоянна скорост температура на изследваната проба. Това е дало възможност за получаване на информация за подмембраниния спектринов скелет на еритроцитарната мембрана, както и за връзките ѝ с липидния бислой. Получени са важни резултати с добри възможности за приложения в диатермията и електроимпулсното умъртвяване на туморни клетки. Добре очертани възможности има и за приложения в криобиологията. Литературната справка е на много добро ниво. Използваните материали и методи са коректно описани. Получените резултати са обработени статистически и представени по много добър начин. Резултатите са публикувани в 1 международно и 4 наши научни списания. Считам, че всички изисквания за присъждането на научно-образователната степен „Доктор“ са налице. Ето защо, си позволявам убедено да препоръчам на Уважаемото научно жури да присъди на Бояна Кънчева Първанова научно-образователната степен „Доктор“ по научната специалност „Биофизика:“

5.05.2016 г.

Рецензент:

(Проф.,дф Стефан Рибаров, дбн)