



## СТАНОВИЩЕ ПО ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

от проф. Иван Танев Иванов, дб, дбн, ръководител на катедра Физика, биофизика, рентгенология и радиология, Медицински факултет на Тракийски университет – Стара Загора, член на Научно жури по защита на дисертационен труд

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

Тема на дисертационния труд: "Диелектроскопично изследване на подмембранныя белтъчна мрежа при еритроцити".

Докторант: Бояна Кънчева Първанова, асистент в катедра Физика, биофизика, рентгенология и радиология, МФ – ТрУ – Стара Загора

Научен ръководител: проф. Иван Танев Иванов, дб, дбн

Научен консултант: доц. Мирослав Иванов Карабалиев, дб

Дисертационният труд има за цел диелектроскопично изследване на вътрешмолекулната (сегментна) подвижност на подмембранныя спектринова мрежа при еритроцити от човек. В него са използвани общо 11 метода, от които 3 препаративни и 8 изследователски.

Безядрените еритроцити от човек и бозайници дължат своите уникални механични свойства – деформируемост и еластичност, на своята мембра и главно на подмембранныя спектрин-актинова мрежа от периферни белтъци, известна като мембрлен скелет. Спектриновият мономер, главният фибриларен белтък на този скелет съдържа средно 20 повтарящи се тройно-спирални сегменти. В подмембранныя мрежа спектриновите мономери съществуват само под формата на димери (взаимно осукани мономери) и двойно по-дълги тетramerи (члено свързани димери), които проявяват свойствата на силно удължени пружини с висока еластичност. На тази основа първоначално възниква представата, че спектрин-актиновата мрежа е изградена от постоянни, нековалентни връзки, а нейните механични качества могат да се обяснят изцяло чрез еластичността на спектрина.

Тази представа обаче се оказва несъвършена и неспособна да обясни такива допълнителни качества на еритроцитите като екстремна деформируемост и пластичност. Съвременната представа включва една динамична картина на постоянно променящи се връзки между белтъците на мембрания скелет, което позволява бързо адаптиране на клетъчната форма към механичните предизвикателства в кръвното русло.

В тази връзка вътрешмолекулната подвижност на подмембранныя скелет е подробно изследвана с подходящи методи, между които ЕПР, ЯМР и флуоресцентна спектроскопия, които дават един твърде широк диапазон за времената на трептене и релаксация на елементите от скелета, от  $10^{-9}$  s до  $10^{-5}$  s. Причината за този резултат е, че посочените методи са чувствителни към подвижността на различни по своята големина и не-добре обособени групи, в състава на които досега не са включени посочените тройно-спирални сегменти на спектрина.

За изследване на вътрешмолекулната подвижност на подмембранныя скелет в настоящия дисертационен труд е приложен друг, неизползван досега метод – диелектрична спектроскопия в съчетание с избирателна топлинна денатурация на спектрина при 49.5 °C. При бързо загряване на суспензии от еритроцити и еритроцитни модели (изолирани мембрани и изолирани мембрани скелети), при температурата на денатурация на спектрина методът е детектиран

рязка промяна в диелектричните свойства – комплексен импеданс, комплексна капацитивност и диелектрични загуби на енергия. Тъй като диелектричната активност на спектрина отпада при неговата денатурация, тези промени са разгледани като мярка за приноса на интактната спектринова мрежа към диелектричните свойства на еритроцитната мембрана. Получените резултати показват, че посочените промени в изброените диелектрични параметри са отразили както прякото, така и косвено взаимодействие на външното променливо електрично поле с диполите, свързани с подмембраната спектринова мрежа на еритроцитите.

Както е известно, над определена критична честота това взаимодействие отпада и настъпва диелектрична релаксация на диполите. Установени са две диелектрични релаксации върху спектриновата мрежа на еритроцитната мембрана. Първата релаксация се проявява при ниски честоти, когато подмембранната спектринова мрежа е изолирана от външното електрично поле. Тя включва структурната поляризация на липидния бислой и напречните белъчни връзки на мрежата с липидния бислой. При разкъсване на връзките липиден бислой – спектринова мрежа тази релаксация силно намалява своята амплитуда. Получените данни показват, че тази релаксация представлява проява на т.н. пиезоелектричен ефект върху подмембранныя скелет, т.е. превръщане на механичната деформация на спектрина в електрични заряди.

Втората релаксация се демонстрира при далеч по-високи честоти в условията на пряко взаимодействие на полето с подмембранната спектринова мрежа. Нейната критична честота е много близка до честотата ( $v \sim 10^6 \text{ s}^{-1}$ ), с която се върят интегралните белъци в плазматичните мембрани на клетките.

Научната стойност на използванятия в дисертационния труд метод се състои в това, че по принцип критичната честота на диполната релаксация е мярка за подвижността на онези структурни единици (сегменти), които притежават силен диполен момент. В тази връзка е важно да се посочат онези сегменти в спектриновата молекула, които участват в посочената релаксация. Като такива са посочени основните структурни единици на спектриновата молекула, т.н. тройно-спирални повтарящи се домени, защото от структурни съображения те могат да имат силен некомпенсиран диполен момент. Този извод се подкрепя от данните на други автори, които чрез метода на електро-ориентационно разсейване на светлина са установили диелектрична релаксация върху изолирани в разтвор спектринови димери и тетramerи с времена на релаксация, съответно 4 и 7  $\mu\text{s}$ . В настоящия дисертационен труд, в условията на пряко взаимодействие на електричното поле с молекулите на спектрина е измерено време на релаксация (0.16  $\mu\text{s}$ ). Тази стойност е около 20 пъти по-малко от посоченото време на релаксация (4  $\mu\text{s}$ ) на спектриновия димер, което подкрепя извода, че диполната релаксация включва посочените по-горе тройно-спирални повтарящи се домени.

Представените резултати показват, че както при известните диполни релаксации в изолирани макромолекули, установените в еритроцитната мембрана релаксации се влияят по подобен начин от вискозността на средата, от йонната сила и от омрежаването с бифункционални химични реагенти.

Получените резултати оформят една нова методика за изследване на състоянието на еритроцитната мембрана в норма и патология. С тази методика в дисертационния труд е изследвано състоянието на еритроцитната мембрана в среда с повишена осмотичност, каквито състояния възникват при използване на криопротектори, рентгеноконтрастни среди, при т.н. постхипертонична хемолиза и др. Установено е, че при индуциран диабет кооперативността в

денатурацията на спектрина се понижава два пъти по-силно отколкото известното намаление (около 30 %) на деформируемостта на еритроцитите, което има клинично значение. Изследвани са и ядрени клетки от птици (домашна кокошка), чиято критична честота на релаксация е около два пъти по-ниска в сравнение с тази при човешките еритроцити.

Получените резултати имат както общобиологично, така и клинико-медицинско значение с оглед на това, че подобен подмембрани скелет от спектрин-подобни белъци имат почти всички клетки на гръбначните животни. Тези резултати имат пряка връзка с диатермията - класически метод за диелектрично нагряване на клетъчните мембрани на тъканите, както и с най-новите методи за умъртвяване на тумори чрез електрични импулси. И в двата случая се използват честоти от няколко MHz, близки до установената критична честота на релаксация на спектриновата мрежа. Получените резултати могат да бъдат полезни в разработването на нови алгоритми за нуждите на импедансната томография.

Резултатите дават възможност за определяне на критичната честота на релаксация и при други видове клетки с подобни плазмалеми – ядрени еритроцити от птици, слухови клетки, хепатоцити. Особено перспективно е точното определяне на посочената критична честота на релаксация при клетки, претърпели ракова трансформация. В дисертационния труд е посочено, че това може да спомогне за определяне на условията за избирателно депозиране на топлина в техните плазмалеми.

#### Заключение:

Представеният дисертационен труд се явява едно задълбочено изследване на молекулната динамика на еритроцитната подмембрания спектрин-актинова мрежа. Изследването има както методична стойност, така и приносно значение за такива клинични области като диатермия, противотуморна терапия с електрични импулси и изследване на анемични състояния. Резултатите са публикувани в едно международно списание с висок импакт-фактор и четири национални списания. Дисертационният труд характеризира докторантката ас. Бояна Първанова като специалистка, способна да прилага сложни експериментални методи и да провежда самостоятелни научни изследвания. Считам, че са налице всички изисквания за присъждане на научно-образователната степен "Доктор". 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".

проф. Иван Танев Иванов, дб, дбн

27 април 2016 г.