

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на

образователната и научна степен доктор

тема на дисертационния : „ИЗОЛИРАНЕ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ

автор на дисертационния труд: Лъчезар Стефанов Мановски

НА ЛИПОКСИГЕНАЗА ОТ АВОКАДО (PERSEA AMERICANA MILL.)”

рецензент: Проф. дбн Милка Асенова Кръстева

Лъчезар Стефанов Мановски е роден на 26.12.1988г в София. Висшето си образование завършва през 2013 г. със степен Бакалавър по специалност „Биотехнология” на ХТМУ София. През 2014г получава степента магистър по „Биотехнология” с общ успех отличен 5.88 в кат. Биотехнология на ХТМУ. Същата година е зачислен като редовен докторант при катедра Биотехнология, по научната специалност 5.11 Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества), с ръководител проф.д-р Любов Йотова и в последствие доц.д-р Иво Лалов.

Лъчезар Мановски е положил всичките изпити от докторската си програмата с общ успех отличен 5.60 През Март 2018г е отчислен от докторантурата с право на защита.

Интересите на Лъчезар Мановски са върху изследване на ензими с възможни приложни аспекти в областта на медицината, което е отразено в научни публикации, доклади и съобщения, както и постери от различни научни форуми и проекти в които той е участвал.

Докторският труд третира един интересен въпрос, свързан с изолиране и охарактериране на липоксигеназа от Авокадо. Темата е интересна и свързана с значителна научно-изследователна работа, което прави докторския труд дисертабилен.

Дисертационният труд е написан на 94 страници, 59 фигури и 3 таблици, както и списък с използваните съкращения.

Литературният обзор е написан на 40 страници, обобщавайки 99 литературни източника, повечето от които са съвременни. Предвид на това, че липоксигеназата спада към първия клас от ензимната класификация- оксидоредуктази, докторантът разглежда изследвания ензим, в светлината на известни данни за липоксигенази от различни източници. Най-напред той се позовава на възможния механизъм на ензимно действие на липоксигеназа, като обяснява ефекти предизвикани от нея напр. участие в биосинтезата на фитохормони, различни вторични метаболити като флаваноиди и алкалоиди, защитна роля при нараняване на растения чрез отделяне на сигнални съединения и други. Представени са данни за тридименсионална структура на липоксигеназа от соя със съответни илюстрации и обяснения на активния център на ензима както и присъствието на двувалентно желязо в катализата. Изследването на кристалната структура на ензима дава ясна картина за елементите на неговата вторично- структурна организация(α , β и други сегменти). Представени са хактеристични данни като рН, температура, мол. маса и др в таблична форма на липоксигеназа от различни плодове и зеленчуци. Дискутирано е и наличието на изо форми в ензима и значението на дължината на веригата на мастната киселина, използвана като субстрат на ензима, както и броя на двойните връзки в нея. Двойни връзки при въглеродни атоми 6 и 9 позволяват бързо протичане на ензимната реакция при използване на такива мастни киселини като субстрати. Друг важен механизъм при протичане на ензимните реакции е инхибирането. Докторантът разглежда най-общо теоритичните аспекти на този процес при ензимите, както и графичното им изобразяване и определение на основните параметри.Изброени са различни природни и синтетични инхибитори, което се явява важен параметър особено, когато ензимното действие на липоксигеназата не е желателно и даже пагубно. Показани са различни инхибитори със структурните им формули и това позволява да се дискутира значението на структурата на съединението в зависимост от структурната организация на ензима. Последната част от обзора е посветена на възможностите за имобилизиране на липоксигеназите върху различни носители с оглед на тяхното стабилизиране и повишаване на тяхния време-живот. Литературният обзор е написан добре и стегнато, анализира постигнатите резултати от различни автори, свързани с

механизма на действие на липоксигенази от различни източници на фона на оредената кристална структура на липоксигеназа от соя. Препоръчвам вместо термина белтък, което е общо понятие, да се използва полипептидна верига. След този литературен анализ докторантът Мановски дефинира целта и задачите на докторския труд, а именно липоксигеназа от авокадо да бъде изолирана, пречистена, охарактеризирана и имобилизирана върху носители с подходящи характеристики. Наред с това се цели изследване на неизвестни инхибитори на ензима, с потенциал на бъдещи лекарствени средства. За изпълнение на тази цел са представени 5 задачи. Към тях е включена и задача, която проучва нови подходи за определяне на ензимната активност на липоксигеназа.

За изпълнение на задачите са представени основните материали с тяхната характеристика. Подробно са описани методите, използвани в дисертацията, придружени с уравнения, където е необходимо, както и подходяща апаратура.

В резултати и дискусия, Докторантът подлага на изолиране и пречистване липоксигеназа от авокадо. Ензимът се изолира в началото чрез фракционно утаяване с амониев сулфат и последващо центрофугиране. Намерено е, че фракцията при 35-50% насищане с амониев сулфат съдържа ензима. По-нататък за пречистване на ензима се използва афинитетна колона върху модифицирана агароза, приготвена от докторанта. Ензимът е елуиран от колоната с ацетатен буфер с рН 5 и нарастващ градиент на натриев хлорид. На отделните фракции е определяно белтъчно съдържание и ензимна активност. Пречистеният ензим е изследван с помощта на полиакриламидна електрофореза. Използването на белтъчни стандарти с различна молекулна маса е позволило да се определи молекулната маса на изследвания ензим, която възлиза на 104 кило далтона. Изследването на рН оптимума на ензима, показва, че той е 6.5. Прави впечатление платовидния вид на получената крива, което не е характерно за чистите ензими. Може да се предположи, че ензимът има наличие на изо форми, които се различават по техните рН-та. Намереният температурен оптимум е 40° С, който е потвърден и от други автори. Изследваните кинетични параметри сочат стойности за K_m -7.22.10⁻⁴ М и V_{max} 1,64.10⁻⁶М.min.mg. Докторантът намира известно различие в тези константи от други автори, което се обяснява с различие в сорта на

растението авокадо. Друг важен раздел от изследванията върху пречистеният ензим е търсенето на подходящ инхибитор. Докторантът изпитва три инхибитори, два структурни аналози на L-серин и L-каналин и установява, по-ясно изразен инхибиращ ефект при L-каналин, свързан с повишение на K_m и понижение на V_{max} . В молекулата на липоксигеназа участва двувалентно желязо, свързано с координационни връзки към полипептидната верига на ензима. Това желязо играе важна роля в каталитичния акт. Правени ли са опити за определянето му след пречистването на липоксигеназата? Докторантът подлага липоксигеназа на имобилизиране върху синтетични полимерни носители. При имобилизираните ензими обикновено се определя така наречена относителна активност, изразена в проценти, която дава реална представа за ензимно работещата част от свързания към матрицата ензим. В дисертационния труд е направен опит за използване на кондуктометричен метод за определяне на ензимна активност посредством определяне на консумация на кислород. Определените с този метод кинетични параметри, при спазване на определени условия на експериментите, показват сравними данни със спектрометричния метод. Изводите към дисертацията отразяват същността на изследването.

Научната значимост на дисертационния труд намирам в:

- Липоксигеназа от авокадо е изолирана и пречистена до хомогенност при използване на съвременни методи. Чистотата на ензима е доказана с помощта на гелна електрофореза, като са определени основните му характеристики като, субстратна специфичност, рН оптимум, температурен оптимум, и молекулна маса.
- Изследването на инхибиторният ефект на два вида различно модифициран L-серин и L-каналин показват, че ефектът е значително по-добре изразен при L-каналина. Механизмът на този ефект обаче е дискуссионен, вероятно поради сложната структурна организация на активния център и наличието на двувалентно желязо в него.
- С оглед на стабилизация на ензима и удължаване на неговия живот той е имобилизиран върху два полимерни носители и получените имобилизирани ензими са охарактеризирани.

- Успешно е приложен кондуктометричен метод за определяне на ензимна активност, чрез проследяване на кислородната консумация.

Научните резултати от докторския труд са отразени в специализирани научни издания както следва: 1 статия с импакт фактор в Bulgarian Chemical Communication.Special Edition. E, 2017, 107-112. 1 статия в Journal of Chemical Technology and Metallurgy 50, 3, 2015, 249-254. Наред с това докторантът е участвал в 13 научни форуми с доклади и постери, както и 2 проекта с ръководител проф. Йотова. Авторефератът отразява съдържанието на дисертационния труд.

Към докторанта имам един въпрос: Какви са синтетичните полимери към които е имобилизирана липоксигеназата от химична гледна точка и какъв вид връзка е осъществена?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Лъчезар Мановски представлява съвременно научно изследване, което третира въпроса за изолиране на ензима липоксигеназа от авокадо, както и неговото охарактеризиране, поради възможностите за неговото медицинско приложение. Ензимът има сложна молекулна организация, което е изисквало особено внимание при тълкуване на някои от резултатите, както и теоритични познания. Дисертантът по време на разработката на докторския труд е изучил голм брой методи и различни техники, което го е оформило като добър изследоавател. Научните резултати са публикувани в специализирани научни издания и участия в голям брой научни форуми.

Смятам, че докторският труд отговаря на изискванията на закона за придобиване на докторска степен, както по отношение на научната и възможната му приложна значимост в бъдеще. Излагането и онагледяването на резултатите е добро.

Предлагам на Почитаемото Жури да присъди на инж. Лъчезар Стефанов Мановски **образователната и научна степен доктор.**

Рецензент:

Проф.дбн Милка Кръстева