

Р Е Ц Е Н З И Я

върху трудовете на доц. д-р Павлинка Александрова Долашка, кандидат за ПРОФЕСОР по професионално направление 4.2 “Химични науки“, научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

Рецензент : дхн. Борис Василев Алексиев, професор при катедра „Химия и химични технологии“ на Филиал-Разград към Университет „Ангел Кънчев“-Русе

На конкурса за професор по научната специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ се е явил само един кандидат – доц. д-р Павлинка Долашка от ИОХЦФ-БАН. Тя е родена през 1954 г. Завършва средното си образование през 1973 г. в Математическа гимназия в Лом. След това постъпва във ВХТИ „Проф. Ас. Златаров“ – Бургас и завършва висшето си образование като инженер-химик през 1980 г. с много добра оценка. В следващите почти 10 години тя е работила като технолог в База за развитие и внедряване към БАН, а от 1990 г. постъпва в Института по органична химия с център по фитохимия. Там изработва и защитава докторската си дисертация през 1993 г. на тема „Структурни изследвания върху протеиназа К и сродни ензими със спектрални и кинетични методи“ при научен ръководител проф.(тогава ст. н. с. I-ва ст.) дхн. Н. Генов. През 2004 г. след конкурс става доцент и работи на тази длъжност досега.

През периода 1990-2014 г. д-р Долашка е специализирала и работила по съвместни проекти с известни специалисти в Университетите в Хале и Тюбинген (Германия), Университета в Падова (Италия), Университета в Гент (Белгия), Академията на науките в Киев (Украйна), в Болницата по урология в Тюбинген и в лаборатории в Гърция, Швейцария и Китай. Тези активни международни контакти с учени от ранга на проф. Волфганг Фьолтер, проф. Ван Бееман и др. очевидно са допринесли съществено за повишаване на нивото на научната дейност на кандидатката. Добро впечатление правят и деловите ѝ контакти с фирми от Германия, Белгия, Италия и нашата страна.

Д-р Долашка се изявява и като научен ръководител на докторанти, лектор на студенти и специализанти. Тя е ръководила и е участвала в разработването на 24 проекти, финансирани от Фонд Научни Изследвания при Министерство на науката и образованието, НАТО и институции от Германия, Белгия, Италия и Европейския Съюз. За разработките си е получила няколко награди, сред които се откроява „Изобретател на годината 2012“. Научен ръководител е на 6 докторанти, от които 4 вече са защитили успешно дисертациите си, на 6 защитили дипломанти от ХТМУ и Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ и на 4 специализанти. Лекционната ѝ работа се характеризира предимно с изнасяне на магистърски програми, сред които познавам добре и високо ценя разработките по масспектрометрия и протеомика.

На конкурса за професор доц. Долашка се представя със 110 научни работи (общ импакт фактор 160), част от които вече са били оценени в конкурса за доцент и няма да

бъдат разгледани подробно в рецензията, но ще бъдат взети предвид при крайната оценка, 55 работи (ИФ 96) от тези 110 са публикувани след хабилитацията за доцент (2004 г.), 57 участия в научни симпозиуми и конференции, 2 авторски свидетелства, списък с общо 512 цитати, 247 от които се отнасят за работите, отпечатани след 2004 г. Кандидатката е участвала и в написването на глави от 3 книги, издадени през 2011-2012 г. Тук трябва да се отбележи и нейната значителна гражданска и административна ангажираност. Специално отбелязване заслужава фактът, че доц. Долашка е представител на нашата страна в Международния съюз за чиста и приложна химия (IUPAC), участва и в редколегиите на международни списания.

Най-съществените приноси с фундаментален, приложен и методичен характер в трудовете на доц. Долашка виждам в следното :

1. Най-голямо значение от фундаментална гледна точка, по мое мнение, имат работите на кандидатката върху структурата и свойствата на въглеродните съставки на изследваните от нея и сътрудниците ѝ обекти – супероксиддисмутази и хемоцианини, изолирани от гъбни шамове, от молюски и артроподи. Докато при супероксиддисмутазите въглеродните съставки са по-просто построени / трудовете №№ 33,39,58 от списъка на д-р Долашка след хабилитацията за доцент /, при хемоцианините те имат по-сложен и в значителна степен преди нейните работи неизяснен строеж /примерна публикация 1 и много други от списъка /. Като отчитаме и сравнително ниския процент на захарните части в тези огромни гликопротеинови молекули, може да си представим сложността на задачите, които си е поставила кандидатката. Решаването на тези задачи става възможно едва след създаването на микро-, ултрамикро- и нано-методи за изследване на подобни биологично активни обекти. В съгласие с тези тенденции, доц. Долашка е усвоила и успешно приложила методи като капилярна електрофореза, лазерна десорбционна и електроспрей йонизационна маспектрометрия, система от квадруполен маспектрометър и течен хроматограф / трудовете №№ 15,43,58 и много други /. Успешно са приложени и ензимни техники / трудовете №№ 13, 27 и много други /. По този начин тя е постигнала значителни успехи и при установяването на местата на О- и N-гликозилиране / трудовете №№ 23, 44 и т.2 от рецензията /. Интересна находка при изследване структурата на супероксиддисмутазите е фактът, че изолираната от дрожди СОД е гликозилиран ензим с прикачване на захарната част към аспарагинов остатък от активния център на гликопротеина. Като отчитам неимоверното нарастване в световен мащаб на интереса към процесите на гликозилиране, намирам сигурните доказателства по въпроса в трудовете на доц. Долашка за съществен фундаментален принос. За постигане на тези резултати и при охарактеризирането на изучаваните обекти съществено значение има и усвояването и прилагането на флуоресцентния анализ и кръговия дихроизъм / трудовете №№ 12,18,29,31,33,36,39,46 /.
2. Висока оценка заслужават създадените два подхода при структурните изследвания върху въглеродните съставки на гликопротеините. При първия подход след

хидролиз, катализиран от трипсин, се изолират и изследват възникналите гликопептиди. Тук е уместно да добавя и приносите при определяне на аминокиселинната последователност на обектите. Получената по споменатия начин от 13 изолирани гликопептиди информация се съпоставя с добитата при втория подход - хидролиз, катализиран от специфични гликозидази и изследване на възникналите въглехидрати /трудове №№ 34, 43, 44, 56 /. Така са доказани 53 гликанови структури. Определено е участието на алфа-1,6-фукоза и хексууронова киселина – вероятно глюкуронова, мануронова или галактууронова киселина. Решаването на толкова сложни структури намирам за съществен принос не само с фундаментален характер, а и с практическо значение с оглед изясняване на важната връзка структура / биологично действие на изследваните обекти.

3. Биологичната активност на изучените гликопротеини и техни съставки е подложена на всестранно проучване в трудовете на кандидатката. Най-съществена, по мое мнение, е високата активност срещу специфични труднолечими видове тумори (например рак на пикочния мехур) / трудове №№ 11,22,30,35,47,55 /. Специално отбелязване заслужава и намерената антивирусна активност, с оглед все по-нарастващите и лесно предаващи се вирусни заболявания / трудове №№ 26,28,34,45,48,52,53,54 /. Имуностимулиращо действие и отношение към имунологията е констатирано при някои от изследваните продукти / трудове №№ 10,21 /, а при някои от пептидите – антибактериална активност /труд № 37 /.
4. Много усилия доц. Долашка е положила за създаване на подходящи методики за изолиране и пречистване на супероксиддисмутази от различни източници (от гъбни шамове /трудове №№ 3,12,17 / и от дрожди / трудове №№ 27,29 /). Открити са четири продуценти на СОД – три от гъбни шамове и един – от дрожди. За всеки от тези случаи са разработени подходящи начини за изолиране и пречистване чрез използване на съвременни методи като йонообменна, разпределителна и високоефективна течна хроматография и е доказано, че изолираните ензими съдържат по един меден и един цинков йон в активния си център. Определени са важни параметри на изолираните нови ензими като субединичен състав, молекулни маси и аминокиселинна последователност / трудове №№ 19,20,33,39 /. Тази трудоемка работа по определяне на първичните структури на ензимите е осъществена чрез два подхода – първи : хидролиз с трипсин, разделяне на получените фрагменти, определяне на първичната им структура чрез автоматизирания метод на Едман и подреждане в цялостна молекула и втори подход : директен анализ на получената след хидролиза смес от пептиди чрез масспектрални техники и обработка на получените резултати с компютърни програми като BLASTA и др. Вторият подход очевидно спестява много време, но не осигурява 100 % сигурност на получените секвенции (сигурността достига 95 %). Сравняването на аминокиселинните последователности на новооткритите ензими е показало значителна хомоложност при СОД от различни източници, особено в областта на активния център. Чрез подходящи масспектрални техники, компютърна програма и известни данни за сродна СОД е изготвен и пространствен модел на третичната структура на изолираните ензими. Информацията за новооткритите обекти е публикувана в широко следени специализирани списания.

5. Не по- малка тежест от фундаментална и приложна гледна точка имат работите на кандидатката върху изолиране и охарактеризиране на гликопротеини от молюски и артроподи /труд № 49 /. Тя изучава предимно хемоцианини, изградени от три и от две субединици, чиято структура е голямо предизвикателство за всеки изследовател предвид огромния размер на обектите и сложността на молекулния им дизайн /трудове №№ 4,5 /. Най-съществен, според мен, е приносът на д-р Долашка по отношение на хемоцианина, изолиран от градинския охлюв *Helix lucorum* /трудове №№ 31,40 /, следван от хемоцианина на черноморския охлюв *Rapana venosa* / трудове №№ 14,23,32 /. В първия случай тя доказва, че новооткритият хемоцианин е изграден от три хетерогенни субединици (СЕ) – една бета- и две алфа-изоформи. Чрез подходяща комбинация от класически и най-нови хроматографски и електрофоретични методики успява да докаже, че две от изоформите са кисели, а една от алфа-изоформите е неутрален гликопротеин / труд № 31 /. При хемоцианина от *R. venosa* се оказва, че са налице две хетерогенни СЕ в огромни молекули с молекулна маса 8455+/-51 кДа. Изследванията върху висшите структури / труд № 42 / на споменатите хемоцианини довеждат също до оригинални научни приноси. Проучванията на третичните структури на обектите показват, че СЕ са изградени от осем различни функционални единици (ФЕ) с молекулни маси около 50 кДа / труд № 32 /. Че наистина осемте ФЕ са различни доц. Долашка и сътрудници доказват чрез Едманово разграждане, което показва осем различни структури от N-края на тези молекули. При изолирането на ФЕ авторите също имат оригинални приноси – те създават неензимен начин за деполимеризация на СЕ и изолиране на изграждащите ги ФЕ. Друг ценен принос при хемоцианина от *R. venosa* е определянето на първичната структура въз основа на известна нуклеотидна последователност / труд № 40 /. Д-р Долашка правилно отбелязва, че този подход при екстремно високи стойности на молекулната маса дава изключителни резултати, трудно постижими по класическите методи на протеиновата химия. Чрез определяне на генната последователност на трите изоформи, споменати по-горе в рецензията се стига до броя и подреждането на двойките нуклеобазы, а от тях и до аминокиселинната последователност в протеиновите части на тези гликопротеини. Така се оформят осем области, които отговарят на осемте ФЕ. Данните от генните секвенции са дали възможност по принцип и за известни заключения, свързани с молекулната еволюция на хемоцианините и уточняване на детайли от генетичното дърво при тях.
6. От хемолимфата на *R. venosa* д-р Долашка и сътрудници са изолирали богати на пролин пептиди с изявена антимикробна активност / труд № 37 /. Молекулната маса на тези пептиди се движи в границите от 3000 до 9500 Да. От тези данни на авторите се вижда, че някои от изолираните непознати досега пептиди са всъщност типични протеини. Това обяснява факта, посочен от кандидатката, че чрез кръгов дихроизъм е установена зависимост на вторичната структура на тези обекти от рН на средата и температурата.

7. Чрез подходящи колонно хроматографски техники доц. Долашка е успяла да определи важни структурни параметри на едно антитяло (IP-2-11-1) / труд № 50 /.
8. Изолирана и изучена е цинк-съдържаща протеиназа, изолирана от *Saccharomonospora canescens* / труд № 51 /. Д-р Долашка констатира, че тази протеиназа, за разлика от други цинк-съдържащи такива, катализира при определени условия хидролизата на ариламидни връзки. Определени са и редица кинетични параметри на този ензим.

Въз основа на извършения дотук анализ на трудовете на доц. Долашка може да се заключи, че те отговарят на обявения конкурс и съдържат съществени фундаментални, приложни и методични приноси в областта на биоорганичната химия и химията на биологично активните природни съединения.

Познавам кандидатката още от времето на работата ѝ като докторантка и бях един от рецензентите на дисертационния ѝ труд. Още тогава тя се открояваше с подчертано трудолюбие и задълбоченост в научната си работа.

Доц. Долашка не е представила дисертационен труд за доктор на науките, но написаните от нея части от три книги, за което беше споменато в началото на рецензията дават основание да се приеме, че тя има данни да получи в близко бъдеще и тази научна степен.

З А К Л Ю Ч Е Н И Е

Трудовете на доц. Долашка съдържат съществени научни и приложни приноси, които бяха вече изложени в рецензията. Не случайно тези постижения, публикувани в реномирани и широко следени списания са многократно цитирани не само от наши, но особено интензивно от чуждестранни учени (общо над 500 цитирания).

Кандидатката е участвала и ръководила разработването на редица проекти с разнообразни източници на финансиране. С това тя е доказала, че умее да ръководи групи от изследователи, докторанти, студенти и специализанти.

Доц. Долашка е развила и интензивна преподавателска дейност. Тя е доказала, че умее да работи със студенти и да ги увлича в научно-изследователски изяви.

Международните връзки и сътрудничеството ѝ с чуждестранни учени заслужават още веднаж позитивно споменаване и адмирации. Същото се отнася и до връзките ѝ с фирми от нашата и европейската промишленост.

От изложеното дотук се вижда, че доц. Долашка отговаря на всички изисквания, които се предявяват към кандидати за исканата академична длъжност. Въз основа на това си позволявам настоятелно да препоръчам на членовете на научното жури по конкурса да гласуват за избирането на доц. д-р Павлинка Александрова Долашка за

професор по Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества, а на членовете на Научния Съвет да утвърдят този избор.

07.06.2014 г.

Рецензент :

София

/ проф. Б. Алексиев /