

## РЕЦЕНЗИЯ

от доцент **Красимира Николова Идакиева, д-р**, Институт по органична химия с Център по фитохимия - БАН, член на научно жури, сформирано със заповед № РД-09-436/08.05.2014 г. на Директора на Институт по органична химия с Център по фитохимия - БАН

**по конкурс за професор по професионално направление 4.2.** Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ (01.05.10), обявен в ДВ бр. 12/11.02.2014 г., за нуждите на лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими“ при Институт по органична химия с Център по фитохимия - БАН

**кандидат по конкурса:** доц. д-р Павлинка Александрова Долашка

### **1. Кратки биографични данни за кандидата.**

Павлинка Долашка е родена през 1954 г. Висшето си образование завършва през 1980 г. в Химико-технологичен институт „Асен Златарев“, гр. Бургас, квалификация „инженер-химик“. През периода 1982 - 1987 г. работи в Базата за развитие и внедряване към ЕЦХ- БАН. Постъпва на работа в ИОХЦФ, БАН като специалист-химик през м. май 1987 г. Разработва дисертация на тема “Структурни изследвания върху протеиназа К и сродни ензими със спектрални и кинетични методи” под ръководството на проф. дн Николай Генов. През 1993 г. придобива научна и образователна степен „доктор“ („кандидат на химическите науки“). Заема последователно длъжностите научен сътрудник II степен от 1993 г. и научен сътрудник I степен от 1996 г. Хабилитира се като „старши научен сътрудник“ II степен („доцент“) в лаб. „Структурен анализ на белтъци“ (понастоящем лаб. „Химия и биофизика на белтъци и ензими“) на ИОХЦФ-БАН през 2003 г., където продължава да работи. Специализирала е многократно в Университета в гр. Тюбинген, Германия и Университета в гр. Гент, Белгия, със стипендии от Volkswagen-Stiftung, DLR, EMBO, DAAD и DFG. От тези кратки биографични данни се вижда, че работата на доц. Долашка от защита на дисертацията до хабилизацията ѝ, е изцяло в рамките на професионалното и научното направление на обявения конкурс.

## **2. Научно-изследователска дейност.**

### ***Научни статии***

В конкурса за „професор” доц. д-р Долашка участва с 58 научни труда. Общо 42 от статиите са публикувани в международни списания с импакт фактор, 5 публикации са излезли от печат в международни списания без импакт фактор. В списанието Antiviral Research (ИФ 4.301) са публикувани 4 кратки съобщения. В българско списание с импакт-фактор (Доклади на БАН) са публикувани 3 статии и 1 – в българско списание без импакт фактор (Списание на БАН). Резултати от научно-изследователската дейност на доц. Долашка са публикувани в 3 научни книги. Общият импакт фактор е 96.492 (по данни на кандидата). Всички трудове са публикувани след 2003 г. Няма публикации с които доц. Долашка да е участвала в конкурса за получаване на научното звание „доцент”.

### ***Участие в национални и международни научни форуми***

Резултати, получени с участието на доц. Долашка, са представени с 26 доклада и 32 постера на национални и международни научни форуми.

### ***Патенти***

Доц. Долашка е съавтор на патент: „Биологично активен продукт, съдържащ хемоцианин”. Публикувана е една заявка за изобретение: „Биокомпоненти от охлюви”.

### ***Участие в научни проекти***

През периода 2003 - 2013 г. доц. Долашка е била ръководител на 5 и участник в 3 научно-изследователски проекти с национално финансиране (МОН). Финансирани са и 2 нейни проекта, съответно за подкрепа за издаване на тематичен сборник и за публикация в реферирано издание и издание с импакт фактор, по програма „Наука и бизнес” на МОН. Доц. Долашка е била ръководител на 7 международни проекта с Германия, финансирани от DAAD, DFG и NATO, на проект с Украйна, както и на проекти по линия на ЕБР на БАН с FWO, Белгия и CNR, Италия. Участвала е в проект „Леонардо да Винчи” „Трансфер на иновации”, за който получава Сертификат за цялостно качество и изпълнение на проекта. Участвала е и в проект „Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми” финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” на Европейски социален фонд и МОН.

### ***Награди***

За своята научно-приложна дейност доц. Долашка е носител на редица награди. През 2011 г. научният колектив, който тя ръководи е награден със сребърен медал за иновации на III-то национално изложение „Изобретения, технологии, иновации”. Една година по-късно колективът получава най-голямата награда, статуетка и грамота „Изобретател на годината 2012” на IV-то национално изложение „Изобретения, технологии, иновации” за разработката „Биоактивни компоненти с доказани терапевтични свойства”. През 2012 г. доц. Долашка е номинирана за индивидуална награда за наука „ПИТАГОР”2011. През 2013 г. е присъдена награда „ПИТАГОР”2012 за научен колектив с внедрени разработки в бизнеса.

### ***Отзвук в научната литература***

Доказателство за научната значимост на публикуваните резултати е интересът на научната общност, изразяващ се в забелязаните 247 цитата на статии, включени в материалите за конкурса. Особено внимание са предизвикали резултатите, докладвани в публикация № 6 от списъка – 21 цитата, публикация № 16 – 15 цитата, публикация № 20 – 18 цитата. Трябва да се отбележи и високия h-фактор на кандидатката – 12 (по данни от Scopus).

### **3. Научни приноси.**

Научните приноси на доц. д-р Долашка са детайлно описани в приложената справка, съгласно която те са групирани в 4 направления:

- получаване и характеризиране на гликопротеини с един меден йон в активния център – мед/цинкови супероксид дисмутази;
- получаване и характеризиране на гликопротеини с два медни йона в активния център – хемоцианини от молюски и артроподи;
- определяне на въглехидратните структури и установяване на влиянието им върху структурата и свойствата на гликопротеините;
- възможности за използване на гликопротеините и пептидите в практиката.

Ще обобща накратко най-съществените по мое мнение резултати и приноси, като акцентът ще бъде върху тези, в които доц. д-р Долашка има водеща роля.

Първото направление е свързано с изследване на Cu/Zn-супероксид дисмутаза, ензим който играе важна роля в антиоксидантната защита като елиминира супероксидните радикали. Резултатите от тези изследвания са отразени в *публикации*: 2,

3, 6, 8, 9, 12, 17, 19, 20, 24, 27, 29, 33, 39, 41 и 46. Изолирани и пречистени са ензими от гъбични щамове *Humicola lutea* 103, *Humicola lutea* 72, *Aspergillus niger* 26 и от дрожди *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984. Супероксид дисмутазите са охарактеризирани структурно с помощта на съвременни методи и техники като: секвентен анализ, матричен лазерен десорбционен масспектрометър (MALDI-TOF), MALDI-TOF-TOF тандем масспектрометър, кръгов дихроизъм, флуоресцентна спектроскопия, атомно-абсорбционна спектроскопия и др., което е възможно благодарение на сътрудничество с изследователски центрове в Германия и Белгия. Определени са първичните структури на Cu/Zn-супероксид дисмутаза от *H. lutea* 103 (публ. 3), *A. niger* 26 (публ. 19) и *K. marxianus* NBIMCC 1984 (публ. 27, 33). Показана е близката хомология в отделните аминокиселинни последователности, особено в областта на активните центрове. Построен е модел на триизмерната структура (3D) на ензимите, определени са елементи на вторичната структура. Проведен е задълбочен анализ на стабилността на супероксид дисмутазите в зависимост от рН на средата и температурата, както и на факторите които оказват влияние върху стабилността на тези ензими (публ. 19, 29, 39).

Изследванията върху структурата и възможностите за медицинско приложение на кислород-пренасящите протеини от безгръбначни (хемоцианини) представляват едно от най-успешните изследователски направления в лаб. „Химия и биофизика на белтъци и ензими” на ИОХЦФ-БАН, въведено от проф. дн Николай Генев през 1990 г. Тласък в тези изследвания и по-конкретно върху хемоцианина, изолиран от черноморска рапана (*Rapana thomasiana*), даде сътрудничеството с Университета в гр. Падуа, Италия и особено с Университета в гр. Тюбинген, Германия. Резултатите на доц. д-р Долашка в получаване и структурно охарактеризиране на хемоцианини от молюски и артроподи са отразени в публикации: 4, 5, 7, 14, 16, 18, 25, 31, 32, 36, 40, 42, 43 и 49 (от материалите за участие в конкурса). Получени са данни за структурата и стабилността на хемоцианини от артроподи *Limulus polyphemus* и *Carcinus aestuarii*. Определена е първичната структура на субединица от *C. aestuarii*, която представлява полипептид с молекулна маса 75 kDa (публ. 5). Проведени са редица изследвания върху свойствата и стабилността на молюскови хемоцианини при промяна на рН на средата, температурата и в присъствие на денатуранти посредством трансмисионна електронна микроскопия, флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм (публ. 7, 18, 25, 32). Показано е, че хемоцианинът от охлюви *Helix vulgaris* проявява по-висока *o*-дифенолоксидазна активност, в сравнение с други хемоцианини от молюски. След третиране с денатуриращи детергенти натриев додецилсулфат (SDS), карбамид, промяна на рН и

трипсинолиза, ензимната активност нараства като резултат от подобрения достъп на субстратите до активния център (публ. 16, 36). За първи път е демонстриран метод за изолиране на функционални единици чрез неензимно разграждане на субединицата RvH1 след деполимеризация с ZnCl<sub>2</sub> или карбамид (публ. 1, 14). Направено е предположение, че въглехидратните вериги участват в изграждане на третичната структура на хемоцианините от молюски. За първи път е изолиран и структурно охарактеризиран хемоцианин от градински охлюв *Helix lucorum* (НН), както и трите му изоформи  $\beta$ -изоформа  $\beta$ -НН) и два  $\alpha$ -изоформи ( $\alpha_N$ -НН и  $\alpha_D$ -НН) (публ. 31). В сътрудничество с Университета в гр. Гент, Белгия е определена пълната генна секвенция на две от изоформите на НН ( $\beta$ -НН и  $\alpha_D$ -НН) и частично на третата ( $\alpha_N$ -НН). Посредством анализ на нуклеотидната последователност е определена тяхната първичната структура (публ. 40). Това несъмнено е най-ефективният подход за определяне на първичната структура на високомолекулни протеини, каквито са хемоцианините. Пълното структурно охарактеризиране на хемоцианина от *H. lucorum* представлява сериозен научен принос в познанието за кислород-пренасящите протеини от безгръбначни.

Изследванията на доц. д-р Долашка върху определяне на въглехидратните структури и установяване на влиянието им върху структурата и свойствата на гликопротеини, каквито са супероксид дисмутаза и хемоцианини, представляват друго направление с безспорен научен принос. Резултатите са отразени в следните публикации: 1, 13, 15, 23, 27, 33, 34, 38, 43, 44 и 58. При анализа на въглехидратните структури на гликопротеините са приложени най-съвременни мас-спектрални методи като електроспрей йонизационен маспектрометър (Q-TOF-ESI-MS), система от квадрополен маспектрометър и течен хроматограф (Q-Trap-LC/MS), матричен лазерен десорбционен маспектрометър (MALDI-TOF-MS), капилярна електрофореза (CE) и др., което е било възможно благодарение на сътрудничеството с Университета в гр. Тюбинген, Германия и Университета в гр. Гент, Белгия. Идентифицирани са центровете на N-гликозилиране в полипептидните вериги на супероксид дисмутази (публ. 27, 33). След анализ с MALDI-MS и квадрополен маспектрометър Q-Trap-MS/MS е определено, че гликан с маса 1234.4 Da и структура GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> е свързан към полипептидната верига на супероксид дисмутазата от *K. marxianus*. Определени са центрове на гликозилиране и са определени структурите на въглехидратните вериги в молекулата на хемоцианина от *Rapana venosa*. Описан е нов клас N-гликани при хемоцианините от молюски, включващ хексуронова киселина и GlcNAc, свързани към

вътрешен фукозен остатък. На базата на големия брой изследвания са доказани 53 сложни въглехидратни структури на хемоцианин от *R. venosa*. Установено е, че въглехидратните структури в двете субединици RvH1 и RvH2 са сходни, но съществено се различават от структурите на други хемоцианини от молюски (публ. 1, 13, 15, 23). Установено е, че към полипептидната верига на структурната субединица HtH1 от хемоцианин от *Haliotis tuberculata* са свързани 15 гликана, които притежават сложни въглехидратни структури (публ. 15). Предложен е нов спектрален метод за определяне на разположението на въглехидратните вериги в протеини (публ. 43, 44). Резултати от изследванията на доц. д-р Долашка върху гликопротеини с помощта на мас-спектрометрия са публикувани и в 3 научни книги.

Сериозен принос има доц. д-р Долашка при разкриването на възможности за приложение на изолираните гликопротеини и пептиди в практиката. Резултатите от тези изследвания са отразени в публикации: 2, 9, 10, 11, 21, 22, 26, 28, 30, 35, 45, 47, 48, 52, 53, 54, 55 и 57. Изследванията показват, че хемоцианините изолирани от *H. lucorum* и *R. venosa* са мощни имуностимулатори (публ. 21) и могат да бъдат използвани като носители и адюванти при приготвяне на имунологични препарати, срещу трихинелоза (публ. 28) и експериментални туморни модели (публ. 11, 22, 30, 35). Показано е, че изследваните хемоцианини проявяват инхибиращ ефект върху развитието на клетъчни линии на тумор на пикочен мехур (публ. 47, 48, 55). Установено е също, че хемоцианините от молюски проявяват антивирусно действие (публ. 26, 45, 48, 52, 53, 54). След анализ на антивирусното действие на гликозилирани и негликозилирани форми на нативни HtH и RvH, техни субединици и функционална единица RvH2-е спрямо HSV-тип 1, е изказано предположение за връзка между въглехидратните структури и антивирусните свойства на хемоцианините. Предложен е механизъм за обяснение на антивирусния ефект на хемоцианин от молюски, като се предполага наличие на Ван-дер-Ваалсови взаимодействия и образуване на водородни връзки между въглехидратните остатъци на RvH2-е и HSV-тип 1. От хемолимфата на *R. venosa* са изолирани и характеризирани пептиди, които проявяват антибактериална активност (публ. 37).

#### **4. Учебно-педагогическа дейност.**

Наред с научно-изследователската дейност доц. д-р Долашка провежда редица лекторски курсове на магистри и докторанти. През периода 2006 – 2011 г. е имала

лекторски курсове на магистри от Биологически и Химически факултети на СУ на тема: „Принципи и приложение на маспектрометрията”, „Маспектрометрия и приложение”, „Протеомика и приложение”. През 2012 – 2013 г. е провеждала лекторски курсове на докторанти, съответно на тема: „Изолиране на протеини и анализ със съвременни методи и техники” „Маспектрометрия и протеомика – методи и приложение”. През 2014 г. има лекторски курс 50 часа по магистърска програма във Факултета по химия и фармация на СУ на тема: „Протеомика и маспектрометрия – методи и приложение”.

Доц. д-р Долашка е научен ръководител общо на 5 докторанти, трима от които са защитили успешно (Росен Абрашев, 2008 г., Иван Димитров, 2011 г., Людмила Велкова, 2013 г.). Втори научен ръководител е на докторант от кат. ”Медицинска генетика” в Медицински университет, София (д-р Олга Боянова, зачислена 2009 г.) и на докторант от Агробиоинститут, София (Мартин Иванов, зачислен 2013 г.). Била е научен консултант на 1 докторант (Иван Илиев, ИЕМПАМ - БАН, 2012 г.). Доц. д-р Долашка е била научен ръководител на 6 дипломанти от ХТМУ и Биологически факултет към СУ, както и на специализанти.

### **5. Експертна дейност.**

Доц. д-р Долашка е национален представител в International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Chemistry and Human Health Division. Член е на Редакционните колегии на IDOSI World Journal of Agricultural Sciences и Biomedical Spectroscopy and Imaging. Член е на Съюза на Учените в България.

### ***Перспективи за научно-изследователската работа***

Доц. д-р Долашка очертава ясно перспективите за бъдещата си научно-изследователска работа, а именно изучаване на антибактериалните и антитуморни свойства на изолираните гликопротеини и пептиди с цел получаване на нови природни лекарствени средства. Планира също да продължи работата си по обучаване на млади специалисти (дипломанти и докторанти).

### **Заклучение.**

Документите и материалите, представени от доц. д-р Павлинка Долашка, отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния

Правилник на БАН, както и на специфичните изисквания на ИОХЦФ при БАН. Кандидатът в конкурса е представил достатъчен брой научни трудове, публикувани след материалите, използвани при защитата на ОНС „доктор” и академичната длъжност „доцент”. В представените работи има оригинални научни приноси, като основната част от тях са публикувани в списания с импакт фактор, издадени от международни академични издателства. Всичко това ми дава основание да дам своята **положителна оценка** и убедено да препоръчам на членовете на Научното жури и на Научния съвет на ИОХЦФ при БАН, да присъдят на доц. д-р Павлинка Александрова Долашка академичната длъжност „професор” в професионално направление 4.2 Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ (01.05.10).

София, 18.06.2014 г.

Подпис:

(доц. д-р Кр. Идакиева)