

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Мариела Константинова Оджаклова-Байтошева,
СУ „Св.Климент Охридски“

относно дисертационен труд за присъждане на научна степен
“доктор на науките”

по професионално направление „Химически науки“ – 4.2, научна специалност
„Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“

Автор: проф. д-р Павлинка Александрова Долашка,
Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, БАН

Тема: „Структура и функция на медни гликопротеини, свързващи кислородни
форми“

Общо представяне на процедурата и дисертанта

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ и отговаря на критериите за придобиване на научната степен „доктор на науките“.

Павлинка Долашка завършва Висшия Химико-Технологичен Институт „Асен Златарев“, гр. Бургас през 1980 г с придобита квалификация инженер-химик. От 1990 г. досега работи в ИОХЦФ последователно като химик (1990-94) и гл. асистент (1994-2004). През 1993 защитава дисертационен труд на тема „Структурни изследвания върху протеиназа К и сродни ензими със спектрални и кинетични методи“ и придобива научна степен „кандидат на химическите науки“. През 2004 г. е избрана за доцент, а през 2014 г. за професор. Ръководител е на научна група „Научно-приложни разработки в областта на биохимията“ От 2011 г. работи и като мениджър в „Биокомпоненти“ ООД.

Актуалност на тематиката

Представеният дисертационен труд е обобщение на получената информация от проведените от проф. Долашка изследвания върху различни гликопротеини. Обект на изследване са два вида медни гликопротеини, хемоцианини и супероксид дисмутази, които притежават сложни въглеродни структури и участват в различни процеси с кислорода и кислородните радикали. През последните години медните гликопротеини намират все по-голямо приложение за терапия на редица заболявания и различни видове тумори. Разширяват се областите на приложението им и като диагностични и антимикробни реагенти при лечение на различни инфекции. Въпреки представената информация за голямото значение и различните области на прилагане на хемоцианините и Cu/Zn-СОД-зи, все още не са удовлетворени изискванията на пазара за по-широкото им включване в експерименталната и приложна медицина. Това налага откриване и пречистване на нови Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини, и задълбочен анализ на връзката между структурата и биологично действие на новите гликопротеини. Изясняване структурата на олигозахаридните комплекси има значение за допълване на информацията за структурната организация на гликопротеините и установяване на влиянието им върху тяхната функция.

Познаване на проблема

Дисертационният труд ясно демонстрира задълбочените теоретични познания, професионалните умения и научно-изследователски интереси на проф. Долашка в редица специфични области на биоорганичната химия като геномен, протеомен, гликомен анализи, функцията на гликаните и потенциалната им роля като терапевтични агенти.

Методика на изследването

Раздел „Материали и методи“ препраща към оригиналните научни трудове, включени в дисертацията. Описани са само експериментални резултати, които не са публикувани в научната литература. Обобщено са представени различните експериментални подходи при решаване на заложените задачи. Използвана е много разнообразна и съвременна методология, което илюстрира високата професионална компетентност на проф. Долашка и е в основата на високото качество и стойност на дисертационния труд. На места е представена много добре известна информация като например определенията за геномика, протеомика, гликомика, което според мен е напълно излишно.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Формулирани са ясно 5 основни задачи, от които произтичат 17 конкретни подзадачи, подредени в хронологичен ред и отразяващи развитието на научните интереси на проф. Долашка и стремежът ѝ към разработване на съвременни тематика, свързани със социално значими проблеми като например изолиране и използване на гликопротеините като терапевтични и диагностични агенти. Разделът „Резултати и дискусия“ съдържа 6 глави подредени в логичен ред и изложени на 145 страници.

Въз основа на получените резултати и тяхното обсъждане са направени 17 извода. Научните приноси на дисертационния труд са групирани като приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация; приноси с потвърдителен характер; приноси с методичен характер и приноси с приложен характер.

Получена е нова информация за въглехидратните структури на кислород-свързващи гликопротеини с два медни атома в активния център. Проведените изследвания доказват гликозилирания характер на хемоцианини от различни организми от Arthropoda и Mollusca. Продуцираните хемоцианини от молюски свързват сложни въглехидратни структури с предимно N-свързани гликани, които се различават от продуцираните къси O-гликанови структури на хемоцианини от артроподни организми. Определена е нова въглехидратна структура на кисели гликани при хемоцианин от *R. venosa*, която се среща за първи път при хемоцианини. За първи път са представени нуклеотидните, аминокиселинни последователности и потенциалните центрове на гликозилиране на три изоформи на хемоцианин от тип Mollusca. Определените специфични позиции на гликозилиране допълват информацията за структурата на хемоцианините, което дава възможност за по-задълбочено вникване в процеса на гликозилиране и изясняване на значението му за тези огромни молекули. Приложените подходи и разработени нови методи са подходящи за определяне и на други гликопротеини, които имат различна специфика, разкриването на която е от интерес за използването им в бъдещи изследвания или за рекомбинантна продукция на гликани за диагностика или терапия. Установено е влиянието на въглехидратната структура върху стабилитетните характеристики на интактната молекула, структурните субединици и една функционална единица от RvH,

след оценка чрез термодинамични подходи на стабилността на протеина. За първи път е представено участието на хемоцианини от тип Mollusca в защитната функция на организма срещу инфекциозни патогени като субединица β -HaN е доказана, като много перспективна за включване във фармацевтични препарати срещу по-устойчиви инфекции от *Staphylococcus*. Доказана е антитуморната активност на RvH, Hh, HaN и изоформите им върху клетъчни линии T-24 и CAL-29 от рак на пикочния мехур, който е изразен най-силно при β -Hh-h. За първи път е предоставена протеомна карта за цитостатичното действие на хемоцианина от *H. lucorum* върху човешката клетъчна линия CAL-29. Изказано е предположение за специфичната роля на олигозахаридните структури на протеините за тяхното биологично действие срещу рак на пикочния мехур.

Предложени са различни методи и условия за пречистване на свързващи кислородни форми гликопротеини с един и два медни йони в активния център. Предложен е нов метод за анализ на гликани в смеси и нов подход за определяне на сложни въглехидратни структури и центъра на свързване на гликаните в гликопротеините.

Преценка на публикациите и личния принос на дисертанта

Дисертационният труд отразява публикуваните резултати за периода след 1999 г. Няма използвани материали свързани със защитата на докторската дисертация. Приложен е списък на 50 научни публикации включени в дисертационния труд с общ ИФ 98.359. Според квантилите, в които *Journal Citation Reports (JCR)* на *Web of Science* групира научните списания с импакт-фактор (ИФ) 20 от тях са с Q1; 18 са с Q2; 8 - Q3; 2 - Q4 и 2 са в реферирани списания без ИФ. В 24 публикации проф. Долашка е първи автор, в 10 – втори, а в останалите е трети или последен. Има една самостоятелна глава от книга. Отделно са представени и 4 кратки съобщения от конференции, публикувани в списания с ИФ. Забелязаните цитати, свързани с публикациите от дисертационния труд са 527. Приложен е подробен списък на автори и публикации, цитирали научни трудове. Част от резултатите са представени на 83 международни и национални научни форуми.

Проф. Долашка е съавтор и на четири патента и два полезни модела.

Изследванията включени в дисертационния труд са финансирани по различни научни и образователни проекти: 21 национални проекта като ръководител и участник и 21 международни проекта като ръководител на български екип.

Автореферат

Авторефератът е с обем 113 страници и отразява съдържанието на дисертационния труд, изводите, приносите, публикациите, свързани с него и цитиранията. Включва и списък на проектите, финансирани изследванията, както и патенти и полезни модели.

Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Предложените лабораторни технологии и пречистените Cu/Zn-COD-зи и хемоцианини могат да намерят приложение в терапията на вирусни, бактериални и туморни заболявания. Създадената генна банка и база от структури на гликани могат да се използват при бъдещи изследвания по тази тематика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационния труд съдържа научни, научно –приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на правилника на ИОХЦФ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че дисертантът Павлинка Долашка притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“ като демонстрира качества и умения за провеждане на изследвания с получаване на оригинални и значими научни приноси.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведените изследвания, постигнатите резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „доктор на науките“ на Павлинка Александра Долашка в област на висше образование: професионално направление „Химически науки“ – 4.2, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“.

31.07. 2019 г.

Изготвил становището:

Проф. д-р Мариела Оджакова

REFeree REPORT

by Prof. Mariela Konstantinova Odjakova-Baytocheva, PhD

of Doctoral Thesis in the field of higher education: 4. "Natural Sciences, Mathematics and Informatics"; professional area: 4.2. "Chemical Sciences"; scientific specialty "Organic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Products"

Author: Prof. Dr. Pavlinka Alexandrova Dolashka, Institute of Organic Chemistry with Center for Phytochemistry, BAS

Subject: "Structure and Function of Copper Containing Oxygen Species Binding Glycoproteins"

General presentation of the procedure and dissertation

The presented set of materials in paper and electronic form is in accordance with the Regulations for the development of the academic staff of IOCCP and fulfills the criteria for obtaining the degree of Doctor of Science.

Pavlinka Dolashka graduated from the Institute of Chemical Technology "Prof. Assen Zlatarev" in Burgas in 1980 with a qualification as a chemical engineer. Since 1990, she has worked at IOFCF consistently as a chemist (1990-94) and a senior assistant (1994-2004). In 1993, she defended her dissertation on "Structural studies on proteinase K and related enzymes by spectral and kinetic methods" and acquired a PhD degree. In 2004 she was elected as an associate professor and in 2014 as a professor. She is the head of the scientific group "Scientific and applied developments in the field of biochemistry" and since 2011 has also worked as a manager at "Bio components" Ltd.

Actuality of the topic

The dissertation presented is a summary of the information received from the research carried out by Prof. Dolashka on various glycoproteins. The subject of these studies is two types of copper glycoproteins, hemocyanins, and superoxide dismutases, with complex carbohydrate structures, which are involved in different processes with oxygen and oxygen radicals. In recent years, copper glycoproteins have been increasingly used to treat a variety of diseases and different types of tumors. Areas of application are also expanding as diagnostic and antimicrobial reagents in the treatment of various infections. Despite the information provided on the high importance and various fields of application of hemocyanins and Cu/Zn-SODs, the requirements of the market for their broader inclusion in experimental and applied medicine are not yet satisfied. This requires the detection and purification of new Cu/Zn-SODs and hemocyanins, and an analysis of the relationship between the structure and biological action of the new glycoproteins. Clarifying the structure of oligosaccharide complexes is important to supplement information on the structural organization of glycoproteins and to determine their effect on their function.

Knowledge of the problem

The dissertation demonstrates the profound theoretical knowledge, professional skills and research interests of Prof. Dolashka in some specific areas of bioorganic chemistry, such as genomics, proteomics, glycomics analyzes, the function of glycans and their potential role as therapeutic agents.

Research methodology

The Materials and Methods section refers to the original scientific papers included in the dissertation. Only experimental results that have not been published in the scientific literature are described. The various experimental approaches to solving the set tasks are summarized. A very diverse and up-to-date methodology is used, which illustrates Prof. Dolashka's high professional competence and is at the heart of the high quality and value of his dissertation. Some well-known information, such as definitions of genomics, proteomics, glycomics, is presented in places, which I think is completely unnecessary.

Characterization and evaluation of dissertation work and contributions

There are 5 key tasks out of which 17 specific sub-tasks are set out, chronologically and reflecting the development of Prof. Dolashka's scientific interests and her desire to develop contemporary topics related to socially significant problems such as isolation and use of glycoproteins such as therapeutic and diagnostic agents. The Results and Discussion section contains 6 chapters, arranged in a logical order and set out on 145 pages.

Based on the results obtained and their discussion, 17 conclusions were drawn. The scientific contributions of the dissertation are grouped as contributions containing new and original information for science; contributions of a confirmatory nature; methodological contributions and applied contributions.

New information is available on the carbohydrate structures of oxygen-binding glycoproteins with two copper atoms in the active center. Studies have shown the glycosylated character of hemocyanins from various organisms from Arthropods and Molluscs. The molluscan hemocyanins produced associate complex carbohydrate structures with predominantly N-linked glycans, which differ from the produced short O-glycan structures of hemocyanins from arthropodan organisms. A novel carbohydrate structure of acid glycans has been identified for *R. venosa* hemocyanin, which is the first occurrence of hemocyanins. For the first time, the nucleotide, amino acid sequences and potential glycosylation sites of three hemocyanin isoforms of the Mollusca type are presented.

The specific glycosylation positions identified add the information on the structure of hemocyanins, which enables a deeper insight into the glycosylation process and clarifies its importance for these huge molecules. The approaches used and new methods developed are suitable for identifying other glycoproteins that have different specificities, the disclosure of which is of interest for their use in future studies or recombinant production of glycans for diagnosis or therapy. The influence of the carbohydrate structure on the stability characteristics of the intact molecule, the structural subunits and one functional unit of RvH has been established, after evaluation by thermodynamic approaches of protein stability. For the first time, the involvement of hemocyanins of the Mollusca type in the protective function of the body against infectious pathogens as a β c-HaH subunit has been demonstrated to be very promising for inclusion in pharmaceutical preparations against more resistant infections by *Staphylococcus*. The antitumor activity of RvH, H1H, HaH and their isoforms on T-24 and CAL-29 cell lines from bladder cancer, which is most pronounced at β c-H1H-h, has been demonstrated. For the first time, a proteomic map for the cytostatic action of *H. lucorum* hemocyanin on the human CAL-29 cell line has been provided. The specific role of oligosaccharide structures of proteins for their biological action against bladder cancer has been suggested.

Different methods and conditions have been proposed for the purification of oxygen-binding glycoproteins with one and two copper ions at the active site. A new method for the analysis of

glycans in mixtures and a new approach for the determination of complex carbohydrate structures and the center of glycan coupling in glycoproteins are proposed.

Assessment of publications and personal contribution of the dissertation

The dissertation reflects the published results for the period after 1999. There are no used materials related to the defense of the doctoral dissertation. Attached is a list of 50 scientific publications included in the dissertation with a common IF 98.359. According to the queries in which the Web of Science Journal Citation Reports (JCR) groups Impact Factor (IF) scientific journals, 20 of them are Q1; 18 are with Q2; 8 - Q3; 2 - Q4 and 2 are in refereed journals without IF. In 24 publications, Prof. Dolashka is the first author, in 10 - the second, and in the rest, she is the third or last. There is a single chapter in a book. Separately, 4 short conference messages published in IF journals are also presented. The cited citations related to the dissertation publications are 527. A detailed list of authors and publications citing scientific papers is attached. Some of the results were presented at 83 international and national scientific forums.

Prof. Dolashka co-authored four patents and two utility models. The research included in the dissertation is funded by various scientific and educational projects: 21 national projects as a leader and participant and 21 international projects as a leader of a Bulgarian team.

Thesis abstract

The thesis abstract is 113 pages long and reflects the content of the dissertation, the conclusions, contributions, publications related to it and the citations. It also includes a list of the projects that funded the research, as well as patents and utility models.

Recommendations for future use of dissertation contributions and results

The proposed laboratory technologies and purified Cu/Zn-SODs and hemocyanins may find application in the treatment of viral, bacterial and tumor diseases. The established gene bank and base of glycan structures can be used in future research on this topic.

CONCLUSION

The dissertation contains scientific, scientific - applied and applied results, which make an original contribution to science and meet all the requirements of the Law for Scientific Development in the Republic of Bulgaria, the Rules of its Application as well as of the Internal Rules and Regulations of the Institute Organic Chemistry with Center for Phytochemistry for acquiring the scientific degree "Doctor of Sciences". The dissertation shows that the Prof. Pavlinka Dolashka possesses deep theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances", demonstrating qualities and skills for conducting research with obtaining original and significant scientific contributions.

Because of the above, I am convinced of my positive assessment of the research, the results achieved and the contributions made, and I suggest that the Honorable Scientific Jury award the "Doctor of Science" degree in Pavlinka Alexandrova Dolashka in Higher Education: Professional Degree in Chemical Sciences - 4.2 , specialty "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances".

31.07. 2019

Reviewer :

Prof. Dr. Mariela Ozhakova