

РЕЦЕНЗИЯ



върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен "доктор": Област 4. Природни науки, математика и информатика: Направление 4.2. Химически науки; Научна специалност 01.05.05. Физикохимия

Автор на дисертационния труд: Светлана Христова Христова, докторант при Института по Физикохимия "Акад. Ростислав Каишев" БАН

Тема на дисертационния труд: „Електрически свойства и антираково действие на цитохром с, адсорбиран върху колоидни частици от монтморилонит“

Рецензент: Христо Н. Нанев, професор, дхн

Научна организация: Институт по физикохимия "Акад. Ростислав Каишев" - БАН

1. Кратки биографични данни за Дисертанта.

Светлана Христова е завършила с отличен успех висше образование в Биологическия факултет на Софийския Университет „св. Климент Охридски“. Бакалавърската ѝ степен е по специалността „Молекулярна биология“, а магистратурата - по „Биофизика“. Допълнително тя е специализирала по: електрични, оптични и електро-оптични методи; ядрено-магнитна спектроскопия; изследвания на протеини; компютърни умения и инструментален анализ. Светлана Христова има и солидна практическа подготовка за работа с кръвни продукти в стерилни условия. През 2013 г. тя печели стипендия и участва в международна конференция в Полша. Участва в научен проект с Руската академия на науките на тема: „Влияние на синтетични и природни полимери върху електрическия потенциал на липидни мембрани, капиляри и колоидни частици“. Всичко това ѝ дава интердисциплинарната подготовка, необходимите практически познания и опит, които ѝ позволяват да проведе научните изследвания, залегнали в основата на нейния дисертационен труд.

От 2014 г. Светлана Христова е назначена на длъжност физик на половин работен ден в ИФХ по съвместителство, а преди това (от 2009 г. и до сега), тя работи като биолог в Националната специализирана болницата по хематология. Там тя провежда изследвания в три направления: изолиране, пречистване и съхранение на хемопоетични стволови клетки; разработване на анти-ракови дендритно-клетъчни ваксини; поддръжка на база ракови клетъчни линии. Светлана Христова е зачислена като докторант в Института по Физикохимия "Акад. Ростислав Каишев" БАН на 1 септември 2008 г. (Тя прекъсва докторантурата си по майчинство на два пъти - майка е на две деца.)

2. Обща характеристика на дисертацията и описание на представените материали.

Представената ми за рецензиране дисертация е написана на 130 страници. В нея са цитирани 226 литературни източника. В дисертацията на Светлана Христова има 44 фигури, 2 таблици и 9 математически израза. Направени са 7 добре обосновани извода.

Авторефератът на дисертацията е написан на 25 страници и правилно отразява основните резултати, приносите и постиженията на дисертационния труд.

Дисертационният труд на Светлана Христова е резултат на едно обширно, много добре планирано и отлично проведено изследване върху електрическите характеристики на цитохром *c*, адсорбиран върху колоидни частици от монтморилонит. (Последният е вид бентонит, който при подходящо обработване с неорганични киселини се разпада на моноламени с наноразмерна дебелина. По този начин съотношението площ/маса, а оттам и адсорбционният капацитет на материала, нарастват драстично. Освен това, моноламените се характеризират с постоянен, рН-независим, отрицателен електрически заряд.) Изследването на тази сложна система се оправдава от потенциалната ѝ приложимост при антиракова терапия. Преди всичко обаче, дисертационният труд на Светлана Христова представлява едно фундаментално физико-химично изследване на биологичен обект - протеинът цитохром *c* и неговата адсорбция върху гореспоменатите колоидни частици. Това изследване напълно съответства на тематиката на Института по физико-химия при БАН.

Експерименталните изследвания на Светлана Христова и техните резултати са представени в дисертационния труд логически последователно и много ясно. Тях тя провежда на високо професионално ниво, като ги подкрепя и с пресмятания на белтъчната електростатика (за което използва три различни компютърни програми). Проведената от нея пред-защита ме убеди, че тези изследвания са (поне в преобладаващата си част) нейно лично дело. В дисертацията си Светлана Христова ясно разграничава собствените си резултати от известните чужди данни и изследвания. Последните са цитирани обективно.

- Дисертацията започва със задълбочен литературен обзор, от който логично следват поставената цел и проведените експериментални изследвания. Още този Увод говори за отличната подготовка на Дисертантката. В него тя представя по един много ясен и достъпен (но същевременно научно-издържан) начин всички необходими за провеждане на изследването сведения и факти. Представеният в Увода материал е систематизиран много добре, което показва, че Светлана Христова е навлязла дълбоко в изследваната от нея област - тя познава отлично специализираната научна литература. В потвърждение на тази констатация се явява и направеният от нея критичен анализ на някои литературни данни.

- Целта на дисертацията е поставена ясно и се преследва систематично. Без никакво съмнение, всички поставени от Дисертантката задачи са изпълнени изцяло.

- В работата си по дисертацията Светлана Христова използва сполучливо подбрана комбинация от изследователски методи - съпадението на техните данни гарантира достоверността на резултатите и направените заключения. Дисертантката е овладяла и прилага успешно цяла палитра от методи – физични (свето-разсейване в електрично поле), химични способности (приготвяне на водни разтвори с подходящи рН, буфери, титруване и пр.), физико-химични и биохимични методи (електрофореза и микро-електрофореза, изоелектрично фокусиране), както и биологични такива (третиране на ракови клетки с цитохром *c*, адсорбиран върху селектирани колоидни частици от монтморилонит). Най-основно са използвани методите на свето-разсейване в електрично поле, електрофореза, микроелектрофореза и изоелектрично фокусиране.

Резултатите от приложението им, както и ефективността на антираковото действие на цитохром *c*, определят научния облик на дисертацията.

- Изводите и заключенията в дисертацията са направени въз основа на логично тълкуване на получените от Дисертантката експериментални резултати. Проведените сравнения (на страници 92 и 94) на цитохром *c* с лизозим са напълно оправдани, тъй като двата протеина са близки по размер и имат структурно стабилни молекули.

3. Обща характеристика на научно-изследователската и научно-приложна дейност на кандидатката.

Светлана Христова е съавтор на общо 8 публикации в научни списания и сборници на международни научни форуми. В дисертацията ѝ са включени резултатите от 4 от статиите ѝ – тези, които отразяват най-съществените ѝ изследвания. Тя е участвала с доклади и постери в общо 28 научни форума - семинари, колоквиуми и конференции (пет от които са международни, провеждани в Полша, Белгия и Испания, а останалите са у нас). Светлана Христова е участвала активно в 3 проекта – един образователен и два научни, на единия от които тя е била ръководител. По кредитната система, при изискуем минимум 250 точки, Дисертантката има натрупани 1142 точки. Тя е издържала изпита си по специалността с отличие. Освен това, Светлана Христова е посещавала два задължително избираеми курса по обща специализирана подготовка за докторанти, както и курсове по английски език.

Изследванията относно антираковият ефект на цитохром *c* не са някаква приумица на Дисертантката и/или нейния Ръководител. Този факт е установен от редица чужди изследователи (цитирани са статии под номера [124], [140-145]). Надграждайки наличните знания обаче, въз основа на собствените си изследвания, Светлана Христова намира начин за значително подобряване на терапевтичното въздействие на цитохром *c*, адсорбиран върху колоидни частици от монтморилонит. Перспективите за приложение на постигнатите фундаментални научни резултати са свързани именно с този ефект на изследваната субстанция. Без да съм сведущ в областта на рако-образуването, виждам че значителното подобрене на антираковото въздействие не е случайно налучкано от Дисертантката, а е плод на проведените от нея фундаментални научни изследвания.

4. Основни научни и научно-приложни приноси.

В дисертацията е изследвана рН зависимостта на електричния заряд на цитохром *c*. По този начин са подбрани подходящи условия за неговото адсорбиране върху противоположно (отрицателно) заредените колоидни частици от монтморилонит. Въз основа на получените данни, чрез наситена (свръх-еквивалентна) адсорбция на цитохром *c* се постига презареждане на повърхността на частиците от монтморилонит - от електроотрицателна в електроположителна. Важно условие е да се избегне коагулацията на комплекса от колоидните частици с отложения върху тях монтморилонит. Причината е, че раковите клетки могат да извършат фагоцитоза („поглъщане“) само на частици с подходяща форма и размер. По този начин раковите клетки могат да „погълнат“ достатъчна доза цитохром *c*, която е необходима за протичането на селективна (само на на функционално-неактивни или повредени клетки) апоптоза (програмирана клетъчна

смърт). Това се потвърждава от цитотоксичния ефект върху клетъчна култура от рак на дебелото черво. Голямото предимство на този терапевтичен подход, в сравнение с химиотерапията и облъчването, е, че адсорбираният протеин задейства механизма на апоптоза ЕДИНСТВЕНО на раковите клетки, а здравата тъкан около тях остава незасегната.

Разбира се, ефектът на фагоцитоза и последваща апоптоза, постигнати посредством третиране с адсорбиран цитохром *c*, не е оригинално откритие на Дисертантката. Дебело трябва да подчертая обаче, че значителното повишение на ефективността на това третиране е постигнато от нея благодарение на сполучливия избор на колоидни частици с плоска форма и подходящ размер (0.5 мкм), както и на отрицателния им заряд, позволяващ наситена адсорбция (на положително заредения, при рН 6, при това без добавен електролит, цитохром *c*), при което протеинът образува плътен монослой. Вследствие на това, монтморилонитовите пластинки се презареждат положително, адсорбират се електростатично върху противоположно (отрицателно) заредената цитоплазматична мембрана на туморните клетки и действат със значително повишена ефективност.

5. Отражение на научните публикации на кандидатката в научната литература.

Три от четирите статии, въз основа на които е написана дисертацията, са публикувани в реномирани международни списания с значим Импакт фактор (една статия в *J. Colloid Interface Sci.*, с IF 5.09 и две други статии в *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, с IF 4.27). Четвъртата ѝ статия е в Доклади на БАН, което също има Импакт фактор (0.27). По първата статия вече са забелязани 8 цитата от чужди автори. Освен това, Светлана Христова е първи съавтор (заедно с научния ѝ Ръководител и проф. Борис Атанасов) в още една статия, по електростатика на цитохром *c* и монтморилонит. Тя също е публикувана в списание с импакт фактор (*Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, IF 1.227) и вече е цитирана 2 пъти от чужди автори. Други 3 нейни статии в съавторство са публикувани в български списания. Броят на публикациите на Светлана Христова (и на забелязаните по тях цитати) са напълно достатъчни за присъждането ѝ на образователната и научна степен "доктор".

6. Критични бележки и препоръки към научните трудове на кандидатката.

Освен някои печатни грешки, не забелязвам (очевидни) методични или фактически грешки - дори няма неточности в израза. Впечатление обаче правят еднаквите под-заглавия на някои параграфи в глава IV, на дисертацията: 4.1.1. и 4.2.2; 4.1.2. и 4.2.3; 4.1.3. и 4.2.4. Моята препоръка е тези повторения да се избягват, като се свържат експерименталните резултати и тяхното дискутиране (по мое мнение, тяхното разделение е ненужно и само затруднява читателя). По-сполучливо ми се струва параграф 4.1.1. да продължава с параграф 4.2.2, параграф 4.1.3 да се допълва с параграф 4.2.4, а параграф 4.2.3. да е увод към параграф 4.1.2. Частични повторения има и на други места в дисертацията, например на страници 69 и 70, на страници 61 и 95 (за това, че свето-разсейването в електрично поле е по-подходящо от двойното лъчепречупване) и прочие. Разбира се, пълно избягване на повторения при представянето на такъв обмен

материал е невъзможно - някои от тях са необходими за яснотата на текста, но те трябва да се сведат до възможния минимум. Моята обща препоръка е: зачеквайки даден въпрос, той да се изяснява докрай на същото място в текста – от получените експериментални резултати и тяхното тълкуване, до направеното заключение.

Като препоръка за бъдещи изследвания по проблеми свързани с тематиката на дисертационния труд, бих могъл да предложа да се обърне внимание и на влиянието на температурата върху изследваните процеси. Предполагам, че до сега тези изследвания са провеждани при стайна температура (която обаче се изменя, по-специално в Института). Още повече, десипацията на енергията на електричните полета води до повишаване температурата на системата. Особено ако се продължават изследванията относно антираковия ефект, те може би трябва да се провеждат и при телесна температура.

Тези бележки и препоръки обаче се отнасят само до подобряване подредбата на материала, но в никаква степен не намаляват неговата висока научна стойност. В този смисъл, те са само `грешки на хубост`.

7. Лични впечатления на Рецензента за Кандидатката.

Лични впечатления за Кандидатката получих едва при нейната отлично проведена пред-защита на дисертационния ѝ труд. Тогава тя отговори много компетентно и задълбочено на поставените от мен въпроси. Сега, запознавайки се подробно с дисертацията, аз се убедих напълно, че резултатите от експерименталните изследвания (поне в преобладаващата си част, ако не и всички) са плод на усилията на Дисертантката. За мен също така е ясно, че Светлана Христова собственооръчно е извършила изследванията, представени в приложна част от дисертацията ѝ – тези, отнасящи се за потенциалната приложимост на цитохром *c* при антиракова терапия. Очевидно, работейки на пълен щат във високо-специализираната (и подходящо обзаведена) лаборатория за хемопоеични и стволови клетки в Националната специализирана болницата по хематология (НСБАЛХЗ), тя е положила значителни усилия за овладяване на необходимите специфични умения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

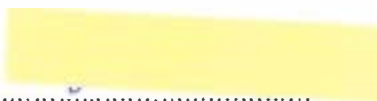
Представеният ми за рецензиране дисертационен труд има интердисциплинарен характер. Основно, той е в областите на физико-химията и колоидната химия, но засяга и биохимията (и дори, бегло, медицината). Придавайки допълнителна стойност на дисертационния труд обаче, интердисциплинарността му е изисквала от Дисертантката по-широко-обхватни познания и практически умения. Тях тя демонстрира посредством получените оригинални резултати.

По брой публикации и научни приноси, както и по методично ниво на проведените изследвания, представеният ми за рецензиране дисертация отговаря напълно (и дори надхвърля) изискванията, посочени в Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИФХ-БАН. Дисертационният труд на Светлана Христова я характеризира като един високо-квалифициран изследовател-експериментатор в областта на физико-химията и колоидната химия (но също така и в

биологията). Аз съм убеден, че Светлана Христова има голям потенциал за значително научно израстване.

Общото ми впечатление от дисертационния труд на Светлана Христова е отлично. Цялото изследване е проведено логически последователно и издържано. Значимите научни приноси на дисертационния труд, както и отличната интердисциплинарна подготовка на Докторантката, ми дават дълбокото вътрешно убеждение да препоръчам на Почитаемото научно жури да гласува положително за присъждане на Светлана Христова Христова на образователната и научна степен "доктор" по професионално направление Химически науки (4.2). Научна специалност Физикохимия, код 01.05.05.

Рецензент:

A yellow rectangular box redacting the signature of the reviewer.

13.05.2019 г.

.....
/проф. д-р Христо Н. Нанев/