



## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд  
за получаване на образователната и научна степен "Доктор"  
Професионално направление: 4.2 Химически науки  
Докторска програма: Физикохимия

Автор на дисертацията: Светлана Христова Христова

Тема: "Електрически свойства и антираково действие на цитохром с, адсорбиран върху колоидни частици от монтморилонит"

Рецензент: академик Борис Тенчов

Светлана Христова Христова е била зачислена като редовен докторант в Института по физикохимия "Акад. Ростислав Каишев" при БАН на 1.09.2008 г. и е била отчислена с право на защита през 2014 г. Работата по дисертацията ѝ продължава над 10 години, но трябва да се има предвид, че през половината от това време Христова е била в отпуски по майчинство и по болест, така че времето, през което е имала възможност да работи върху своята дисертация е около 5 години. Първоначално тя има двама научни ръководители – Александър Живков от ИФХ при БАН и Борис Атанасов от ИОХЦФ при БАН, като впоследствие Борис Атанасов се отказва и към момента на защитата неин научен ръководител е доцент Александър Живков. Експерименталните изследвания в дисертационния труд са проведени в секция "Повърхности и колоиди" на Института по физикохимия при БАН и в Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания.

Основните цели в дисертационната работа на Светлана Христова са да се изследва адсорбцията на цитохром С (белтък от респираторната верига в митохондриите) върху дисковидни колоидни частици от монтморилонит (ММ, бентонит) и да се изучат електрическите свойства и противотуморното действие на комплексите на цитохром С с тези колоидни частици.

Идеята в дисертацията да се изследва противотуморното действие на комплексите на цитохром С с ММ частици се основава на добре известния ефект на цитохром С да предизвиква апоптоза (клетъчна смърт) при определени условия. Цитохром С е малък Fe-съдържащ хемопротейн с молекулно тегло около 12 kD, който е едно от звената в респираторната верига на митохондриите. Той е периферен мембранен белтък, разположен в пространството между вътрешната и външната митохондриални мембрани

и закотвен към вътрешната мембрана посредством електростатичното си взаимодействие с фосфолипида кардиолипин. Производството на активни форми на кислорода при оксидативен стрес води до деструкция на кардиолипина и освобождаване на цитохром С в цитоплазмата, което от своя страна довежда до инициране на каскада от реакции, водещи до клетъчна смърт.

За достигане на поставените цели в дисертацията са формулирани следните задачи:

1. Изследване на рН-зависимостта на сумарния електричен заряд на свободен цитохром С посредством методите на белтъчната електростатика и изоелектрично фокусиране.
2. Изследване на концентрационната зависимост на адсорбция на цитохром С върху ММ пластинки чрез (???) на масата, електрофоретичната подвижност и електрическата поляризуемост на цитохром С – ММ частиците.
3. Изследване на коагулационната стабилност на цитохром С – ММ суспензия.
4. Изследване на рН-зависимия заряд на цитохром С – ММ частиците.
5. Изследване на противотуморното действие на цитохром С – ММ комплекса върху култура от метастазирани клетки от рак на дебелото черво на човек.

Дисертацията на Христова е написана на 130 стр. и съдържа 44 фигури, 12 от които са в обзора, и 1 таблица. Оформена е по стандартен начин с въведение, обзор на литературата, цел и задачи, материали и методи, четири глави с експериментални резултати и дискусията им, и изводи. Списъкът на използваната литература съдържа 220 заглавия.

В литературния обзор, заемащ около 30 страници, са изложени основните сведения за структурата и електростатичните свойства на глобуларните белтъци, в частност, за свойствата на цитохром С, включително за способността му да предизвиква апоптоза, когато е локализиран в клетъчната цитоплазма. Като цяло, обзорът е добре написан и илюстриран. В него е направен добре систематизиран преглед на основните сведения за цитохром С и за ММ частиците. Правят добро впечатление задълбочените познания на литературата и способността на авторката на дисертацията да излага сбито, но същевременно разбираемо и достатъчно подробно необходимите за целите на дисертацията сведения от публикуваните в литературата работи.

Използваните в работата експериментални методи са описани в Глава II на дисертацията (10 стр.). Те включват електрооптика (светоразсейване в електрично поле), микроелектрофореза, изоелектрично фокусиране, компютърно моделиране на електростатиката на протеини, работа с клетъчни култури и оценка на виталността на клетките. Този набор от разнообразни методи е в голяма степен адекватен на изучаваните проблеми и показва, че дисертационната работа е изпълнена на добро методично ниво. Следва да се отбележи обаче липсата на методи, които биха позволили по-задълбочено и

пълноценно охарактеризиране на размерите, формата и структурата на изследваните обекти, например, електронна микроскопия, атомно силова микроскопия, динамично светоразсейване. Не ми е известно дали някой от тези методи е бил на разположение на авторката на дисертацията по време на работата ѝ.

Получените в дисертационната работа резултати са представени в главите III, IV, V и VI (общо около 60 стр.). Тези резултати се отнасят към категорията получаване на нови факти относно известни от литературата проблеми. Безспорен интерес представляват установените нови факти относно адсорбцията на цитохром С върху ММ частици, както и относно свойствата на ММ-цитохром С частиците. По-конкретно, показано е, че при наситена адсорбция частиците се презареждат и придобиват заряда и  $Pi$  стойността, характерни за цитохром С, т.е., изглежда, че се получава в голяма степен плътно покритие на ММ повърхностите от молекули на цитохром С (около 65% според данните на Христова, което е близо до максимално възможната плътност на покритието). В съчетание с наблюдението, че адсорбираните върху ММ молекули на цитохром С не са ориентирани, т.е., техните електрически диполни моменти са хаотично ориентирани, тези резултати навеждат на мисълта, че електростатичните взаимодействия всъщност не играят определяща роля в адсорбцията на цитохром С и че тази адсорбция възможно се обуславя в голяма степен от неелектростатични взаимодействия. Последните биха могли да имат, например, ентропиен характер или да са обусловени от вандервалсови сили. Този въпрос обаче не е коментиран в дисертацията.

Представлява значителен интерес и наблюдението, че комплексите на цитохром С с ММ частиците имат много голям цитотоксичен ефект (над 90%), демонстриран върху клетъчни култури от туморни клетки от рак на дебелото черво. Този ефект се оказва значително по-голям от ефектите на други носители на цитохром С. Въпреки това, описаните в дисертацията резултати по този въпрос могат да се разглеждат само като първа стъпка в разработването на нов противотуморен агент, от която далеч не може да се заключи дали този агент е перспективен или не. Например, няма сравнения със здрави клетки, т.е., не е ясно доколко този ефект е специфичен за туморните клетки и дали няма да се проявява в същата степен и при здрави клетки, което, ако се окаже така, вероятно ще обезсмисли този подход. Още по-съществено е това, че цитотоксичният ефект е наблюдаван *in vitro* (в клетъчна култура), докато основният интерес в тази област е към носители, които могат да се използват не само *in vitro*, но също така и *in vivo*. В работата на Христова и Живков засега няма индикации дали ММ-цитохром С комплексите биха могли да се прилагат *in vivo* или не.

От професионалното описание на резултатите и от задълбочената дискусия върху тях оставам с впечатлението, че Светлана Христова има значителни познания в своята област и значителен личен принос в получаването на изложените в дисертацията

резултати. Независимо от направените в рецензията критични коментари, от казаното дотук следва безспорното заключение, че изследванията в дисертационната работа на Христова са изпълнени на високо научно ниво. Те са актуални и представляват интерес както за колоидната химия, така и от гледна точка на евентуални приложения за третиране на туморни заболявания. Нямам съществени забележки към формулировките на приносите в работата и ги приемам така, както са направени.

Дисертацията на Светлана Христова е добре написана и оформена. Езикът е ясен и разбираем, фигурите са добре направени и ясно илюстрират получените резултати. Броят на допуснатите технически и печатни грешки не е голям. Най-съществената от забелязаните от мен грешки е в Задача 2 на стр. 39, където изглежда е изпусната дума (или няколко думи), което затруднява разбирането на текста. Авторефератът коректно и достатъчно пълно отразява съдържанието на дисертацията. Списъкът на публикациите на Христова по материали от дисертационната работа съдържа 4 статии с IF, които имат общ IF около 13. Всички статии са с двама съавтори – Светлана Христова и нейния научен ръководител Александър Живков, като Христова е първи автор и в 4-те статии, което подчертава личния ѝ принос. Според Web of Science, статията в J Colloid Int Sci от 2015 г. има 7 цитирания (без автоцитиранията), докато останалите 3 статии са от 2019 г. и за момента нямат цитирания. В автореферата са приведени и данни за голям брой участия в конференции и семинари, 5 от които са международни. Тези високи показатели означават, че изискванията към броя и качеството на публикациите в дисертациите за ОНС "Доктор" са безусловно изпълнени и даже значително надхвърлени.

В заключение, в дисертационната работа са получени интересни нови резултати относно адсорбцията на белтъци към неорганични колоидни частици и относно противотуморната активност на получените комплекси. Тези резултати са публикувани в авторитетни списания и вече са намерили отражение в научната литература. Считаю, че с тази дисертация безспорно са изпълнени всички необходими изисквания и затова предлагам с пълна убеденост на уважаемото жури да присъди на Светлана Христова Христова исканата образователна и научна степен "доктор".

28 май 2019 г.

Рецензент:

(академик Борис Тенчов)