

## РЕЦЕНЗИЯ

От проф. Нина Ивановска дбн, Департамент по имунология, Институт по микробиология, БАН

Член на научно жури, съгласно заповед № НО-05-05-9Д/30.10.2014 г. на Директора на Институт по органична химия с Център по фитохимия, за получаване на образователната и научна степен “доктор”, научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”

на дисертационния труд на **Вера Владимирова Гешева** на тема „Биологична активност на хемоцианини от гастроподни организми”

Научни ръководители: доц. д-р Крсимира Идакиева  
доц. д-р Андрей Чорбанов

**Актуалност и значимост на дисертационния труд:** Едно от най-важните достижения в историята на медицината е откриването на ваксините. Въпреки несъмнените терапевтични успехи, не е преодоляно противоречието, че ваксините стават по-безопасни, но заедно с това и по-слабо имуногенни и в резултат по-малко ефективни. Използването на рекомбинантни или синтетични ваксини рядко е свързано със странични ефекти, но те обикновено са придружени от адювант за увеличаване на имуногенността им. Алуминиевите производни са най-широко прилаганите адюванти в клиничната практика, като те могат да причиняват и редица странични реакции и усложнения. Това предизвиква нарастващ интерес към търсене на адюванти, които са ефективни и безопасни и освен това да са евтини за производство. Биоактивните субстанции от природен произход до голяма степен отговарят на тези изисквания. Хемоцианините са перспективна и ефективна група адюванти комбинирана с различни антигени. КЛН е най-известният и най-добре изученият техен представител, който влиза в състава на редица разработвани в последното десетилетие анти-туморни ваксини. Представената научна разработка е фокусирана върху изследването на адювантните и имуностимулиращи свойства на хемоцианини от гастроподи, както и на техния потенциален анти-туморен ефект *in vitro* и *in vivo* в миша моделна система на рак на дебелото черво. Считаю, че темата на дисертационния труд е актуална и перспективна както от научна, така и от приложна гледна точка.

**Структура на дисертационния труд:** Дисертационният труд е написан на 153 страници и съдържа общо приетите за този вид научни трудове части: Увод - 2 стр, Литературен обзор - 33 стр, Цел и задачи - 2 стр, Материали и

методи - 21 стр, Резултати - 43 стр, Дискусия - 18 стр, Изводи - 1 стр, Приноси - 1 стр, Литература – 19 стр. Литературният указател включва 169 литературни източника на български и чуждестранни автори на латиница, от които над половината са от последните 10 години. Онагледен е общо с 51 фигури, от които 7 в литературния обзор, с коректно цитиран източник, 1 в раздел „Материали и методи” и 31 комбинирани фигури в раздел „Резултати”.

**Литературният обзор** представя един сериозен и широк преглед на литературата по темата на дисертацията. В него се подлагат на задълбочен анализ литературни данни за: Структурата на хемоцианините като фактор определящ тяхната имуностимулираща и анти-туморна активност; Изясняване на ролята им за насочване на имунния отговор към Th1 или Th2 тип; Участието на хемоцианините в различни ваксини, като особено внимание е обърнато на анти-туморните ваксини и тяхното изследване в експериментални модели и при пациенти с рак на пикочния мехур; Клиничните изследвания върху тези съединения. Базирайки се на данните на авторитетни автори, докторантката обоснова формулира основната цел - Да се определи биоадювантният потенциал на два хемоцианина - RtH, изолиран от *Rapana thomasiana*, и HpH, изолиран от *Helix pomatia*, да се анализира сравнително прекия цитопатичен анти-туморен ефект на двата хемоцианина *in vitro* върху различни миши и човешки ракови клетъчни линии и да се проследи анти-туморния им ефект *in vivo* в моделна система на рак на дебелото черво при мишки. За постигането на целта точно и изчерпателно са дефинирани 7 конкретни задачи, които са изпълнени.

#### **Оценка на използваните материали и методи на изследване:**

Изчерпателно са описани използваните химикали, реагенти, антитела, китове, разтвори, среди, клетъчни линии и експериментални животни. Използваната методология показва комплексност на изследването, убедителна логика и много добра теоретична и лабораторна подготовка. Тя включва голям набор от конвенционални и съвременни молекулярно-биологични, имунологични, биохимични, хистопатологични, цитохимични и статистически методи. Опитите са поставени методологично правилно и са стриктно изведени при наличието на съответни контроли. Подробно е охарактеризиран моделът на рак на дебелото черво при мишки. Опитните животни са обработени прецизно, детайлно и подробно. Статистическите методи са съвременни, съответстват на целта и задачите и дават възможност за получаване на обективни резултати и изводи.

**Оценка на получените резултати:** Резултатите са представени в 9 раздела, следващи логично и последователно поставените за решаване в дисертацията задачи. Представени са резултати за изолирането и

пречистването на хемоцианините и тяхната имуногенност. Последователно и обосновано са изложени резултати за биоадювантните свойства на двата хемоцианина в състава на анти-вирусни и анти-бактериални ваксини. Изследван е проапоптичния и антипролиферативен потенциал на хемоцианините върху човешки и миши туморни клетъчни линии. Описан е пътят на установяване на миши модел на рак на дебелото черво, като са определени промените в различните популации имунни клетки, установен е ефектът на хемоцианините върху преживяемостта на животните, скоростта на нарастване на туморите и образуването на метастази в белите дробове. Удачно е изучаването на фенотипа на клетките в туморните инфилтрати, като показатели за развитието, прогнозата и протичането на заболяването. Направен е опит да се установи връзката между ефекта на хемоцианините и разликите в тяхната структура, като се предполага, че подобрява ефект на НрН се дължи на присъствието на определени въглихидратни антигени. Изследванията са не само с фундаментална насоченост, но и определено биха имали значение за клиничната практика. Обемът на използвания експериментален материал е напълно достатъчен за да се приеме, че проведените експерименти, както и получените резултати отразени на 31 фигури са достоверни и статистически добре документирани. Илюстративният материал не само онагледява резултатите, но има и доказателствена стойност. Всичко това показва способностите на докторанта да използва и прилага комплексни, разнообразни съвременни методи за изпълнение на задачите и реализиране целта на дисертационния труд.

**Обсъждането** на получените резултати е направено в отделен раздел, в светлината на литературните данни. Докторантката умело ги анализира и подхожда критично при съпоставянето им, като отчита възможностите за потенциалното им използване в практиката. То завършва с правилно изведени и точно формулирани 9 изводи, като ще отбележа само най-значимите. Действието на хемоцианините е селективно - те не потискат пролиферацията и апоптозата при лимфомни клетъчни линии, докато индуцират апоптоза в карциномна клетъчна линия от рак на дебелото черво. Това е основание за изучаването на антитуморния им ефект *in vivo* в модел на рак на дебелото черво. При сравнението на различни схеми на третиране се установява, че предварителното сенсibiliзиране и интензивната терапия водят освен до подобрене на редица клинични показатели, а и до по-силен хуморален имуноен отговор. За първи път е установено, че двата хемоцианина и С-26 клетките експресират общ епитоп, който се разпознава от антитяло срещу тумор-асоциирания олигозахарид sLe<sup>X</sup>. Рецензираният дисертационен труд представя едно задълбочено и цялостно изследване, проведено на съвременен научно ниво.

**Оценка на приносите в дисертационния труд:** Приносите са безспорни, обогатяват науката с нови оригинални данни и са с потенциално значение за медицинската практиката.

- Изследвани са основни имунологични характеристики на RtH и HpH хемоцианините. Доказани са имуногенните качества на HpH хемоцианина.
- Анализирани и потвърдени са възможността за употребата на тези респираторни молекули като биоадюванти в състава на неконюгирани анти-бактериални и анти-вирусни ваксини.
- Установен е анти-туморния ефект на двата хемоцианина, както върху клетъчни култури, така и в миши модел на рак на дебелото черво. Демонстриран е ефекта от прилагането на различни терапевтични подходи (предварително сенсibiliзиране с хемоцианините и прилагане на различни по интензитет терапии) за ефективността на повлияване на заболяването.
- Върху двата изследвани хемоцианина е доказано наличието на кръстосано реактивен епитоп с ключовия тумор-асоцииран въглехидратен антиген sLeX.

Приемам истинността и коректността на приносите в дисертацията, посочени от докторантката, които допълват даните върху механизма на действие на адювантите и специално на тези от природен произход.

**Критични бележки:** Нямам критични бележки по същество. Основната ми забележка е по отношение на извод 9 и принос 4, които се отнасят до антигена sLeX . Приносът е безспорен, но не е добре формулиран, за да не звучи като извод. На някои места може би твърдението, че изследваните хемоцианини нямат странични ефекта да е в по-мека форма. Резултатите са убедителни, но за да бъде завършен пътят им към клиниката предстоят още експерименти върху евентуалните отрицателни ефекти. Имам и някои незначителни забележки, предимно от технически характер, като някои изрази, правописни грешки и номериране на списъка на литературата, които няма да коментирам подробно. Дисертационният труд като цяло е написан на много добър научен и литературен език.

**Оценка на Автореферата** - Авторефератът като неразделна част от дисертацията в резюмиран вид отразява основните моменти и дава реална представа за последователността на проведените изследвания, получените резултати и направените изводи. Оформен е много добре графично в съответствие с дисертацията.

**Публикации във връзка с дисертационния труд:** Обективен критерий за високото качество на представения ми за рецензия материал са приложените по темата на дисертацията общо 5 научни статии (3

отпечатани статии и 1 глава от книга и 1 статия предложена за печат), с общ **ИФ - 5.57**. Личният принос на В. Гешева в разработването на дисертационния труд е несъмнен. Научните публикации са в съавторство, като в 4 от тях - тя е първи автор и в една е втори. Част от резултатите от дисертационния труд са представени в 10 участия на научни форуми, 6 от които международни. Съгласно приложената справка (към датата на подаване на документите) са установени 3 цитата в международни списания.

Проучванията по дисертацията са финансово подкрепени от Фонда за Научни изследвания при МОН.

### **Придобита компетентност съобразно изискванията на образователната и научна степен „Доктор”**

В хода на изпълнение на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд, Вера Гешева е придобила теоритични знания и професионални умения, които напълно съответстват на изискванията на образователната и научна степен „Доктор”. Тя притежава способността самостоятелно да анализира и обобщава данни, да обсъжда резултати и да оформя научни статии.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертацията представлява актуален и дисертабилен научно-експериментален труд и заслужава висока оценка. Третира актуален проблем на науката, съдържа значими научни резултати и реални приноси за медицинската практика. Докторантката се е утвърдила като способен и перспективен млад учен. Познава много добре литературните източници, умее да ги интерпретира и да обосновава научни задачи.

Имайки предвид, гореизложеното считам, че представеният дисертационен труд по обем, съдържание и актуалност отговаря на изискванията на Закона за развитие на Академичния състав в РБ и вътрешните правилници на БАН и на Института по органична химия с Център по фитохимия, БАН, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Оценявам го положително и убедено препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор” на Вера Владимировна Гешева, по научната специалност «Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества»(01.05.10).

Рецензент:

(Проф. Нина Ивановска, дбн)

19.12.2014 г.  
Гр. София