

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред Научно жури, сформирано със Заповед № НО-05-05-9Д/30.10.2014 г. на Директора на Института по органична химия с център по фитохимия – БАН, за защита и придобиване на образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление: 4.2. ”Химични науки”, научна специалност ”Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества” - 01.05.10.

Автор на дисертационния труд: Вера Владимировна Гешева, редовен докторант в Института по органична химия с център по фитохимия – БАН.

Тема на дисертационния труд: ”Биологична активност на хемоцианини от гастроподни организми”.

Научни ръководители: доц. Красимира Идакиева, доктор (Институт по органична химия с център по фитохимия – БАН) и доц. Андрей Чорбанов, доктор (Институт по микробиология „Стефан Ангелов” – БАН).

Рецензент: доц. Радостина Александрова, доктор (Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН).

Актуалност и значимост на дисертационния труд

Темата на дисертационния труд е изключително актуална, тъй като е свързана с два от основните проблеми пред съвременните природни науки в лицето на биоорганичната химия и биомедицината:

- 1) Необходимост от откриване и използване на ефективни, безопасни, биоразградими и икономически изгодни за производство адюванти;
- 2) Търсене на агенти с висока антитуморна активност и добра биологична поносимост.

Интерес в това отношение представляват хемоцианините – група гликопротеини със сложна пространствена структура (декамерни или дидекамерни форми, организирани в цилиндрични структури с диаметър ~ 35 nm) и големи размери (субединиците на хемоцианините са едни от най-големите полипептиди в природата), излирани от хемолимфата на молюски и артроподи, чиято физиологична функция е свързана с преноса на кислород до тъканите и органите на тези организми. Именно чуждеродният характер на хемоцианините, големината на молекулите им (4-8 MDa) и въглехидратните структури по повърхността им, ги правят силни имуногени и обуславят биологичната им активност и потенциално приложение в различни области на медицината. Въпреки усилените проучвания в тази област обаче, натрупаните до момента знания са все още крайно недостатъчни: 1) изследвани са малка част от съществуващите хемоцианини; 2) независимо от наличието на редица прилики между отделните молекули, налице са и различия, което налага индивидуален подход при

изследванията; 3) крайно ограничен е броят на хемоцианините, достигнали до приложение в медицинската практика: KLH (хемоцианин, изолиран от морския гастроподен организъм *Megathura crenulata*) - имуностимулант, белтък-носител за малки хаптенни молекули, както и антитуморен препарат в лечението на рака на пикочния мехур. Всичко това налага провеждане на целенасочени интердисциплинарни проучвания за изясняване на биологичните активности на тези природни съединения.

Предмет на представения дисертационен труд е анализирането на два хемоцианина – RtH, изолиран от морския охлюв *Rapana thomasi* и HpH, изолиран от градинския охлюв *Helix pomatia*, а целта е съсредоточена именно върху изследване на възможността за използването им като биоадюванти в състава на неконюгирани антивирусни и антибактериални ваксини и определяне на антитуморния им ефект *in vitro* върху култивирани в лабораторни условия ракови клетъчни линии и *in vivo* в миша моделна система на рак на дебелото черво.

Дисертационният труд достойно продължава многогодишните традиции в изучаването на хемоцианините в лаборатория „Химия и биофизика на протеини и ензими” в Института по органична химия с център по фитохимия и лаборатория „Експериментална имунология” в Института по микробиология „Стефан Ангелов” и е успешен пример за провеждане на интердисциплинарни проучвания на високо ниво.

Преглед на дисертационния труд

Дисертационният труд е изготвен съобразно общоприетата схема. Написан е на 153 страници и включва: Заглавна страница, Благодарности – 1 стр., Списък на използваните съкращения – 2 стр., Съдържание – 4 стр., Увод – 2 стр., Литературен обзор – 34 стр., Цели и задачи – 2 стр., Материали и методи – 19 стр., Резултати – 45 стр., Дискусия – 18 стр., Изводи – 1 стр. Приноси – 1 стр., Списък на публикациите по темата на дисертационния труд – 1 стр., Участия в конференции и конгреси по темата на дисертацията – 2 стр., Цитати – 1 стр, Списък на използваната литература – 19 стр. Онагледен е с 40 фигури с високо качество. Много добро впечатление прави Списъкът с използваните съкращения, където термините са представени и на български, и на английски езици. Отделните раздели в дисертационния труд са добре балансирани.

Още в Увода докторантът Вера Гешева насочва вниманието на читателя към биологичната активност на хемоцианините и възможните им медицински приложения, обуславя накратко мотивите, насочили я към избора на темата на дисертационния труд.

Литературният обзор започва с исторически преглед на изследванията с хемоцианини, запознава със структурата на хемоцианините, изолирани от различни видове мекотели (Тихоокеанското мекотело *Megathura crenulata*, морския охлюв *Rapana thomasi*, сухоземния градински охлюв *Helix pomatia* и др.), описва въглефидратния състав на тези съединения. Специално място е отделено на влиянието на хемоцианините върху имунната система, на хемоцианините, влизащи в състава на различни ваксини срещу бактерии, вируси, гъби и паразити, както и във ваксини, целящи да предотвратят отключването на зависимост към лекарствени препарати с невврологичен или психотропен ефект.

Написан стегнато и на високо професионално ниво, литературният обзор е доказателство за способността на докторанта да борава с литературни източници, да се ориентира в морето от научна информация, извличайки от него необходимите детайли, илюстрира уменията ѝ да анализира и обобщава.

Целите и задачите са ясно и точно формулирани, което говори за добра предварителна организаци и правилна стратегия.

Материали и методи. Използваните материали и методи са описани подробно и точно, което би помогнало подобен експериментален дизайн да бъде възпроизведен от всеки, който проявява интерес. Отлично впечатление прави богатството и уелото комбиниране на класически и съвременни методи и техники (биохимични, физикохимични, имунологични), чиито подбор отговаря напълно на поставените цели и задачи, гарантирайки успешното им изпълнение.

Резултти. Получените експериментални данни са обобщени в няколко групи и напълно отговарят на целите и задачите. Въз основа на изработената стратегия, изследванията следват своя логичен ход, постепенно разширяват и задълбочават обхвата си. Съвсем логично, работата започва с изолиране, пречистване и определяне на концентрацията на хемоцианините; преминава в проучвания върху имуногенността и биоадювантните им свойства; продължава с определяне на цитотоксичния ефект на тези съединения върху култивирани в лабораторни условия ракови клетъчни линии и завършва с *in vivo* изследвания върху антитуморния потенциал на хемоцианините при модел на рак на дебелото черво при мишка и доказване наличието на сиализираната форма на олигозахарида Lewis^x (SLe^x) по повърхността на хемоцианините RтН, НрН и карциномните клетки от линия С-26. Експериментите са изведени чисто, с необходимия брой повторения (най-малко три), в тях са включени всички необходими контроли. Резултатите са онагледени с 31 отлично изработени фигури, които улесняват възприемането им. Проведен е прецизен статистически анализ.

Отличен атестат за високото качество на получените резултати е и публикуването им в престижни международни научни издания, проявеният към тях интерес на наши и международни научни форуми, тяхното цитиране.

Дискусия. Този раздел безспорно е най-трудният при подготовката на всеки дисертационен труд. В същото време, именно обсъждането дава възможност за максимална изява на подготовката, уменията, творческото мислене, личния почерк на всеки учен. Вера Гешева се е справила отлично с предизвикателствата на тази задача, несъмнен принос за което са имали и ценните напътствия на научните й ръководители. Получените резултати са разгледани и критично анализирани в светлината на известните от литературата данни. Докторантът задава въпроси и търси техните отговори, не подминава без внимание нито един детайл, анализирайки биологичната активност и възможните медицински приложения на изследваните хемоцианини.

Изводи. Въз основа на получените резултати са изведени 9 извода, които напълно приемам. Формулирани са и 4 приноса.

Приноси. Не е тайна, че гигантските крачки, с които съвременната наука върви напред, се дължат на мечтите, усилията и себеотрицанието на хиляди учени в целия свят. В този смисъл, дисертационният труд на Вера Гешева е сериозен принос в изучаването на биологичната активност на хемоцианините; поредният щрих в пъзела, който трябва да бъде изцяло подреден, за да стане напълно ясно по какъв начин тези съединения могат да намерят място в медицинската практика, да разкрият и «приложат» напълно своя потенциал в полза на човешкото здраве и благополучие.

Специално внимание заслужават получените от Вера Гешева нови данни за имуногенните качества на хемоцианините (по-специално на НрН), за антитуморния

ефект на НpН и RтН не само върху култивирани в лабораторни условия миши и човешки ракови (лимфоми, рак на дебелото черво) клетки, но и *in vivo*, при модел на рак на дебелото черво у мишка; демонстриран е ефектът от прилагането на различни терапевтични подходи (предварително сенсibiliзиране с хемоцианините и прилагане на различни по интензитет терапии) за ефективността на повлияване на заболяването. За първи е установено, че хемоцианините RтН и НpН от една страна, и мишите карциномни клетки от линия С-26 от друга, притежават общ епитоп, разпознаван от анти-sLeX антитяло – факт, който не само подсказва предполагаем механизъм, отговорен за антитуморните свойства на изследваните хемоцианини, но и дава път на нови идеи за възможни приложения в профилактиката и лечението на неоплазиите.

Анализирана и потвърдена е и възможността за употребата на хемоцианините (RтН, НpН) като биоадюванти в състава на неконюгирани антибактериални и антивирусни ваксини.

Списъкът с цитираната литература обхваща 161 заглавия на латиница с пълно библиографско описание, преобладаващата част от които са от последните 10 години. Хубаво впечатление прави познаването и цитирането на статии на други български специалисти със заслужен принос в проучванията върху хемоцианините.

Оценка на съответствието между Автореферата и дисертационния труд

Авторефератът е оформен много добре и отразява в резюмиран вид дисертационния труд, давайки реална представа за последователността на проведените изследвания, получените резултати и направените изводи. Изработен е в пълно съответствие с дисертационния труд.

Публикации на докторанта по темата на дисертационния труд

По темата на дисертационния труд са излезли от печат 4 публикации, в три от които Вера Гешева е първи автор. Две от статиите са в списания с импакт фактор – Fish and Shellfish Immunology (IF 3.322) и BMC Immunology (IF 2.25): общият импакт фактор е 5.57. Още една, пета статия (отново с първи автор Вера Гешева), е подготвена и предложена за публикуване в престижно научно издание. До момента са забелязани три цитата.

Получените при изпълнението на дисертационния труд резултати са представени с 10 съобщения (доклади и постери) на национални (два) и международни (7) научни форуми проведени у нас (4) и в чужбина (5).

Придобита компетентност, съобразно изискванията за придобиване на ОНС «Доктор»

По време на подготовката на представения дисертационен труд Вера Гешева е имала уникалния шанс да стане част от един висококвалифициран интердисциплинарен екип, да бъде ръководена от двама утвърдени и добре познати в научните среди у нас и в чужбина специалисти, да се включи в изпълнението на комплексен и амбициозен научен проект. По всичко изглежда, че Вера Гешева се е «възползвала» максимално от предоставените ѝ възможности и със своите трудолюбие, упоритост и благороден стремеж към усвояване на нови знания и умения успешно е осъществила поставените ѝ задачи. Като докторант, тя е разширила значително своята култура, при това както в областта на химичните (биоорганична химия), така и на медикобиологичните (имунология, експериментална онкология) науки, усвоила е широк набор от

биохимични, физикохимични и имунологични методи, взела е активно участие във всички етапи на изследователския процес – от библиографската справка и планирането на научния експеримент, неговото изпълнение, до анализа и обсъждането на получените резултати и тяхното разпространяване.

Вера Гешева не се е огрничила с покриването на формалните изисквания (успешно издържани изпити, прослушани курсове, получени кредити) за придобиване на ОНС «Доктор». Със спечелените стипендии (три на брой) от Европейската федерация на имунологичните дружества (EFIS) и участието си в авторитетни международни научни форуми, със съавторството си на статии, публикувани в престижни издания, тя (без преувеличение) е допринесла за утвърждаването на българската наука в европейското и световно научно пространство. Неслучайно през 2013 г. Вера Гешева беше удостоена с наградата на БАН за „най-млад учен” на името на Иван Евстратиев Гешов в направление „Биоразнообразие, биоресурси и екология”. Тази награда е отличен атестат и за работата на нейните научни ръководители.

Критични бележки и коментари

Нямам критични бележки към същността, съдържанието и представянето на дисертационния труд. Забелязах някои незначителни технически грешки и пропуски, като:

- Под някои фигури в Литературния обзор (напр. Фиг. 2 и Фиг. 5) не е посочен източника, от който те са взети;
- В Раздел «Цели и Задачи» (на стр. 45) погрешно е използван изразът «цитопатичен ефект» вместо «цитотоксичен ефект»;
- При представянето на имунизационната схема за хемоцианинова терапия на рак на дебелото черво (на стр. 55) смятам, че изготвянето на подходяща таблица или схема би улеснило възприемането на експерименталния дизайн;
- На стр. 95 погрешно е написано < 5 (метастазни образувания) вместо > 5 . На стр. 96 има подобна грешка.

Макар и рядко, се забелязват и някои правописни грешки – най-често замяна на пълен с непълен член или обратно и др.

Посочените пропуски имат предимно технически характер и по никакъв начин не накърняват качествата на дисертационния труд.

Към докторанта имам два въпроса:

1. В каква посока според нея трябва да продължат проучванията върху хемоцианините?
2. Как би трябвало да изглежда идеалният експериментален модел за предклинична оценка на антитуморния потенциал на нови съединения?

Лични впечатления за докторанта

Познавам Вера Гешева от отличните ѝ представяния на провежданите в ИЕМПАМ-БАН Работни срещи, от участието ѝ в Имунологичното дружество към Съюза на учените в България, както и от работата ѝ в група на доц. Андрей Чорбанов в Института по микробиология - БАН. Тя е подготвен, мотивиран, амбициозен и отговорен млад учен със сериозни интереси в областта на биоорганичната химия и имунологията, с доказана способност за работа в екип и участие в провеждането на комплексни интердисциплинарни проучвания. Смятам, че високото качество на

представения дисертационен труд, завидната публикационна дейност, както и получените от В. Гешева награди, напълно подкрепят изразеното от мен лично мнение.

Заклучение

Разглежданата дисертация е една завършена, комплексна и прецизно изпълнена на високо професионално ниво научно-експериментална разработка. Актуалната тема, мащабът на изследването, качеството на получените резултати, безспорните приноси, както и цялостното израстване на докторанта като способен и перспективен млад учен, заслужават най-висока оценка от академичната общност.

Всичко това ми дава основание да смятам, че дисертационният труд отговаря напълно на Закона за развитие на Академичния състав в Република България, както и на правилниците за неговото приложение в БАН и в Института по органична химия с център по фитохимия – БАН, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят на Вера Владимировна Гешева образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност ”Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества” (01.05.10).

София, 04 януари 2015 г.

Рецензент:.....

/доц. Радостина Александрова, доктор/