

До
Председателя на научното жури, определено
със заповед № РД-15-121 /19.07.2022 г.
на Директора на ИЕМПАМ-БАН

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Йоаннис Василиос Папатанасиу, дм

Катедра по Кинезитерапия

Факултет по Обществено Здраве „проф. д-р Цекомир Воденичаров, дмн“

Медицински университет – София

Относно: придобиване на образователна и научна степен ОНС „доктор“ по професионално направление 4.3. Природни науки, научна специалност Биохимия, шифър 01.06.10 в ИЕМПАМ-БАН.

Автор: Маг.-фарм. Ангелики Николаос Константииду докторант на самостоятелна подготовка към Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей на БАН.

Тема: Оптимизация на продукцията на биологичноактивни вещества от бактерии и водорасли и оценка на потенциалното им действие като антитуморни агенти в *in vitro* експерименти.

Представеният комплект документи на хартиен и електронен носител е в съответствие с правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИЕМПАМ-БАН. При прегледа на предоставения ми дисертационен труд не бе установено плагиатство или данни за такова.

Кратки биографични данни и професионално развитие на докторанта

Маг.-фарм. Ангелики Николаос Константиниду е родена в град Атина, Република Гърция през 1993 г. Завършва средното си образование в 3-ти общообразователен лицей в град Комотини, през 2011 г. Дипломира се през месец януари 2018 г., като магистър фармацевт, от Фармацевтичен Факултет на МУ - Пловдив. В периода от 01.12.2018 г. до 31.01.2021 г. работи като фармацевт в голяма аптечна верига, а от април до октомври 2021 г., е била търговски представител на българска фармацевтична компания. Маг.-фарм. Ангелики Константиниду е член на Българския фармацевтичен съюз (БФС) от 2018 г. Докторантката владее писмено и говоримо английски език и притежава изключително висока компютърна грамотност.

Актуалност и значимост на проблема

Дисертационният труд на маг.-фарм. Ангелики Константиниду е написан компетентно и изчерпателно. Темата на дисертационния труд озаглавен “ Оптимизация на продукцията на биологичноактивни вещества от бактерии и водорасли и оценка на потенциалното им действие като антигуморни агенти в *in vitro* експерименти“, е посветена върху един все още недостатъчно разработен въпрос за съвременната биохимия и биотехнологиите.

Днес в глобален план научните изследвания са фокусирани върху новите биологичноактивни вещества и новите технологии за използването им в различни сектори. Те се провеждат с надеждата, че биологичните и медицинските им приложения ще бъдат широко използвани през следващите десетилетия. Това до голяма степен обосновава сериозните усилия да се намерят разрешения на различни медицински проблеми. Въвеждането в практиката на терапевтични агенти с биологичен произход, изолирани от някои видове бактерии и водорасли и потенциалната възможност да бъдат използвани при лечение на ракови заболявания се обосновава на по-ниската им токсичност, а от там и по-голяма безопасност в сравнение със синтетичните фармацевтични продукти. От биологичноактивните компоненти, изолирани от водорасли с най-голямо значение за биологията и медицината са комплексните полизахариди, както и някои пигменти. Имайки предвид ефекта на някои вещества, изолирани от бактерии или водорасли срещу раковите клетки, съединенията, които проявяват цитотоксична активност, показват изключителни ефекти при химиотерапията, само когато тяхната токсичност е по-висока за раковите клетки, отколкото за нераковите такива. Тази селективност спрямо специфични ракови клетъчни линии е едно от изискванията за разработването на нови лекарства, които имат намалена степен на страничните ефекти.

Въпреки интензивните през последните години проучвания в тази област, съществуват въпросителни относно механизма на действие на различните биопродукти от различен естествен произход на клетъчно ниво, които дават сериозно основание на докторантката

да насочи нейните научни интереси в търсене на нови природни субстанции с бактериален и водораслов произход.

Структура, оформяне и онагледяване на дисертационния труд

Дисертационният труд е в обем 95 стандартни машинописни страници, за онагледяването му са използвани 42 фигури. Структуриран е правилно в следните основни раздели: увод, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, изводи, приноси и литература. Библиографската справка е актуална и обхваща 124 литературни източника, от които всички са на латиница.

Литературен обзор

Литературният обзор е правилно структуриран, подробен и изчерпателно представя ролята на биологичноактивни вещества с бактериален произход, приложими в биомедицината за решаването на проблеми, свързани с човешкото здраве. Докторантката обръща специално внимание върху биологичноактивните вещества, синтезирани от водорасли, както и върху имобилизацията на микробните клетки. Литературният обзор показва, че докторантката е проучила задълбочено въпросите свързани с дисертационния й труд, вкл. и най-новите изследвания в тази насока.

Цел и задачи

Целта е точно и ясно формулирана, да бъдат търсени нови природни субстанции с бактериален и водораслов произход, както и да бъде извършена оптимизация на тяхната продукция и изпитването на получените биологичноактивни вещества като потенциални агенти, притежаващи антитуморен ефект върху някои видове ракови клетки, като към нея са изведени следните 6 задачи:

1. Да се повиши продукцията на биологичноактивните вещества с потенциално антитуморно действие чрез оптимизацията на условията за растеж и развитие на подбрани бактериални и водораслови щамове.
2. Да се определят възможностите за имобилизация на клетките от избраните щамове и да бъде избран най-ефективния подход и съответна матрица.
3. Да бъдат изпитани избраните имобилизационни процедури за клетките от бактериалните и водораслови продуценти за увеличаване синтеза на таргетните биологичноактивни вещества.

4. Да бъдат проучени възможностите на подобрите имобилизирани препарати за многократно използване и оценка на получения продукт.
5. Да бъде разработена цялостна схема за получаване чрез включване на имобилизация, изолиране и изпитване на антитуморни свойства на получените гликолипидни биосърфактанти от бактерии и екзополисахаридите, получени от водорасли в *in vitro* експерименти.
6. Да бъде оценено действието на получените гликолипиди и полизахариди върху преживяемостта на здрави и някои ракови клетъчни линии.

Материал и методи

Тази част от дисертационния труд се отличава с изключително детайлно и компетентно представяне структурата на проучването. Използваният методичен подход е съвременен и адекватен за изпълнение на поставените цел и задачи. За нуждите на настоящото проучване маг.-фарм. Ангелики Константинову е включила гликолипиди изолирани чрез изпитване на различни родове бактерии от колекцията на ИМикБ, БАН - (*Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas* и др.). Изборът на изолатите беше осъществен според наличието на повърхностна активност на получените вещества. Докторантката е изолирала щама *Pseudomonas aeruginosa* BN10 от почва, замърсена с въглеродороди. *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и другият избран като продуцент щам *Rhodococcus wratislavensis* се размножават чрез стандартна техника за обогатяване и избрани поради способността им да произвеждат повърхностно активни съединения от гликолипиден тип. И двата щама бяха поддържани в наклонени хранителни агари (Difco Laboratories Inc., Детройт, Мичиган, САЩ) при 4 °C. Маг.-фарм. Ангелики Константинову е инкубирана културите при разклащане на клатачен апарат (120 rpm) при 30 °C в продължение на 7 дни. Полученият културален бульон беше центрофугиран при 8000 g за период от 20 минути.

Супернатантата се подкиселява с 6M HCl и се оставя да престои при 4 °C за една нощ. След ново центрофугиране при 12 500 g в продължение на 20 минути, утайката се събираше. Изборът на изолати беше осъществен според наличието на повърхностна активност на получените вещества.

Култивирането бе извършено в минерална солева среда, съдържаща в (g/L): K₂HPO₄ 3H₂O (4.8); KH₂PO₄ (1.5); (NH₄)₂SO₄ (1.0); Na₃(C₆H₅O₇) 2H₂O (0,5); MgSO₄ 7H₂O (0,2); дрождев екстракт (0,1), допълнен с разтвор на микроелементи със следния състав в (mg/L): CaCl₂ 2H₂O (2.0); MnCl₂ 4H₂O (0.4); NiCl₂ 6H₂O (0.4); ZnSO₄ 7H₂O (0,4); FeCl₃ 6H₂O (0,2); Na₂MoO₄ 2H₂O (0,2) и 2% n-хексадекан.

Резултати

Резултатите от проведеното изследване за изложени задълбочено, аргументирано като са много добре онагледени с 42 фигури. Получените собствени резултати са представени анализирани и сравнени в абсолютни стойности. Маг.-фарм. Ангелики Константинову е осъществила подбор на бактериални продуценти на гликолипидни биосърфактанти - *Pseudomonas aeruginosa* и *Rhodococcus wratislavensis*.

Използването на метода на имобилизация и подбора на подходяща матрица – полиетиленоксидна криогелна матрицата при избрания бактериален щам *Pseudomonas aeruginosa* се оказва подходящи, като използването и доведе до увеличен синтез на рамнолипиди. Докторантката е доказала намаление в преживяемостта на изпитаните две ракови клетъчни линии, след прилагане на различни концентрации от синтезирания бактериален продукт, най-силно изразено върху високомета статичната клетъчна линия - MDA-MB 231, с незначимо намаление на действието върху нормалната клетъчна линия - MCF-10A. Моно-рамнолипидите са по-ефективни от ди-рамнолипидите. Криогелната матрица, синтезирана на основата на полиакриламид, води до увеличена продукция, се оказва най-подходяща за имобилизацията на *Rhodococcus wratislavensis*. След осъществяване на имобилизация в НЕС криогелна матрица води до увеличение в продукцията на полизахариди и от двата изпитвани щама. Маг.-фарм. Ангелики Николаос Константинову е отчетла сигнификантно намаление в жизнеността на раковите клетъчни линии в зависимост от концентрацията на хетерополизахарида и от двете червени микроводорасли, като по-силен е ефект е установен при високо мета статичната клетъчна линия на рак на млечната жлеза MCF-7 и почти никакъв инхибиращ върху нормалната клетъчна линия. Докторантката потвърждава сигнификантния антипролиферативен и цитотоксичен ефект на полизахарида *Porphyridium cruentum*, като е доказала и изменения в ядрената морфология на туморните клетки MCF-7, включително кондензация на хроматин, фрагментация на ядрото и образуване на апоптотични тела.

Изводи и научни приноси

Личното участие на маг.-фарм. Ангелики Константинову в проведените изследвания е безспорно. Изводите, до които тя достига докторантката са 13 и имат логична последователност на базата извършения компетентен анализ от получените резултати. Кандидатката е обособила общо 7 оригинални приноса, като те са с потвърдителен и научно-приложен характер.

Автореферат и наукометрични показатели

Авторефератът е структуриран правилно и съдържа 56 страници, 42 фигури, като отразява адекватно всички съществени елементи на дисертационния труд и получените резултати. Във връзка с дисертационния труд маг.-фарм. Ангелики Константинову е представила списък с 2 публикации, както едната е отпечатана в реферирано индексирани издание регистрирано във втория квартил (Q2) и втората в трети квартил (Q3). Кандидатката напълно покрива задължителния минимум по този критерий от 30 т.

Критични бележки и препоръки

В дисертационния труд на маг.-фарм. Ангелики Константинову, прави впечатление, че резултатите са слети в една обща глава (V. РЕУЛТАТИ) с дискусията, без това да е отразено в съдържанието, а в автореферата фигурират обединени в глава III. (РЕУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ). С оглед спазване на академичния стандарт за дисертации, съдържанието на автореферата следва последователността и структурата на дисертацията и обратно, с изключение на литературния обзор. Допълнително, докторантката е пропуснала да обособи характера на изведените от нея приноси в следните категории: съществени научни приноси, научно-приложни, приноси, методични приноси и приноси с потвърдителен характер. Направените забележки в никакъв случай не намаляват качествата и значимостта на настоящия дисертационен труд.

Бих препоръчал на маг.-фарм. Ангелики Константинову да издаде монография, посветена върху продукцията на биологичноактивни вещества от бактерии и водорасли и оценка на потенциалното им действие като антигуморни агенти в *in vitro* експерименти. Такава все-още не е издадена в България и би била изключително полезна за биолозите, микробиолозите, биохимиците и други специалисти.

Заклучение

Считам, че дисертационният труд на маг.-фарм. Ангелики Николаос Константинову, е изключително, актуален, правилно построен с отлична методология и достоверни резултати. Той съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос за биохимията и биотехнологиите и напълно отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагането му, както и Правилника на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей на БАН. Представените материали и дисертационните резултати напълно съответстват на специфичните изисквания, приети във връзка Правилника на ИЕМПАМ-БАН за приложение на ЗРАСРБ. Дисертационният труд показва, че маг.-фарм. Ангелики Николаос Константинову притежава широки и задълбочени теоретични знания, като същевременно демонстрира високи компетенции и потенциал за самостоятелно провеждане, проследяване и координация на научни изследвания.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка на дисертационния труд, като предлагам на почитаемото научно жури да присъдят на маг.-фарм. Ангелики Николаос Константинову, образователната и научна степен „доктор” в професионално направление 4.3. Природни науки, научна специалност Биохимия.

30.08.2022 г.

гр. София

Рецензент:

проф. д-р Йоаннис Папатанасиу, дм

