

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Димитър Кадийски, доктор на медицинските науки,
Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей
(ИЕМПАМ) при БАН, София

Относно: дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор” в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3 „Биологически науки“, Научна специалност - Биохимия

Представен от докторант на самостоятелна подготовка за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в Институт по експериментална морфология, патология и антропология - БАН.

на тема:

Оптимизация на продукцията на биологично активни вещества от бактерии и водорасли и оценка на потенциалното им действие като антитуморни агенти в *in vitro* експерименти

Автор: Ангелики Николаос Константинову

Научни консултанти: проф. д-р Светлозара Петкова и доц. д-р. Людмила Кабаиванова

Общо представяне на процедурата и докторантката.

Със заповед № РД-15 – 121 от 19.07.2022 г. на Директора на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей - БАН съм определен за член на научно жури във връзка с процедурата за защита на дисертационен труд на тема "*Оптимизация на продукцията на биологично активни вещества от бактерии и водорасли и оценка на потенциалното им действие като антитуморни агенти в in vitro експерименти*" за придобиване на образователната и научна степен (ОНС) „Доктор” по научна специалност - Биохимия. Автор на дисертационния труд е специалист Ангелики

Николаос Константиниду – докторант на самостоятелна форма на обучение в ИЕМПАМ - БАН.

За изготвяне на рецензията във връзка с процедура за защита на дисертационен труд с автор Ангелики Константиниду ми бе предоставен комплект материали на авторката, изискващ се от Правилника за развитие на академичния състав в ИЕМПАМ и съобразен с правилата за приложение на ЗРАС в Република България и БАН . Докторантката е родена в гр. Атина, Гърция, учи там и в гр. Комотини, а висше образование по специалността Фармация тя завършва през 2018 г. в Медицински университет – Пловдив като магистър фармацевт. Към момента на провеждане на процедурата по защита на дисертационния труд тя заема длъжността „специалист“ в ИЕМПАМ, секция Патология на ИЕМПАМ. Основните нейни познания, произтичащи от образованието ѝ в МУ Пловдив, работата ѝ като специалист в ИЕМПАМ и посещаваните курсове към Центъра по обучение на БАН са в полето на биохимията, органичната и аналитична химия, физикохимия, химията и анализа на биопродукти и терапевтични агенти.

Актуалност на тематиката.

Резултатите от проведената научноизследователска дейност на Ангелики Константиниду е обобщена в компактен научен труд, съдържащ всички необходими раздели на една дисертация – увод, пълен литературен обзор на темата, цел и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, изводи и приноси от постигнатите резултати.

Работата по дисертационния труд е консултирана от опитни молекулярни биолози и морфолози, каквито са проф. д-р Светлозара Петкова и доц. д-р Людмила Кабаиванова, с което е създадена възможност за прецизна дискусия и обективна оценка на резултатите на авторката.

Тематиката на дисертационния труд е важна, като се има предвид засиленият интерес към биомедицински проучвания с приложна насоченост за търсене и промотиране на нови комплексни терапевтични подходи при злокачествените заболявания. Скринингът на свойствата на новонавлизащи в практиката биоактивни съединения обогатява с нови възможности стандартните класически медикаментозни подходи за лечение при рака. Дисертационната тема е свързана директно и индиректно с тези проблеми като поставената цел е търсене и промоция на нови природни субстанции

от бактериален и водораслов произход, оптимизация на тяхното получаване и биомедицинска оценка на тези субстанции като потенциални агенти, притежаващи антитуморен ефект. Основание за търсенето и въвеждането на нови терапевтични агенти с биологичен произход, изолирани от бактерии и водорасли в практиката се основава на по-ниската им токсичност, а от там и на по-голямата им безопасност в сравнение с някои от синтетичните фармацевтични продукти.

Познаване на проблема. Оценка на дисертационния труд и приносите.

Дисертационният труд е структуриран според общоприетите изисквания – увод и литературен обзор (21 стр.), цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия (33 стр.), изводи, приноси и литература. Съвременни над 100 литературни източника пряко свързани с тематиката на дисертационния труд са посочени в библиографската справка. Дисертацията обхваща 95 страници интегрален текст и е илюстрирана с 45 фигури.

Литературните познания на докторантката са отлични по отношение на изследвания проблем - продукция на биологично активни вещества от бактерии и водорасли и антитуморен капацитет на тези клетъчни продукти. Осведомеността ѝ допринася за точно формулиране на целта на научноизследователската работа, задачите и различните експериментални подходи при провеждането на изследването. Изучаването на ролята на биологичноактивните вещества с бактериален произход приложими в биомедицината, представлява интерес за фармацевтичните производители, тъй като води до разширяването на комплекса от терапевтични подходи в онкологията. В изчерпателния обзор, както и в увода на дисертацията, се набляга на видовете и свойствата на прилагани в момента биологичноактивни компоненти от водорасли, основно комплексни полизахариди и пигменти, важни за биологията и медицината. Общеизвестно е, че морските организми и най-общо различни представители на биоценозата и микробоценозата са източници на активни вторични метаболити, част от които отдавна са се наложили като полезни терапевтични агенти в здравеопазването. В повечето случаи става въпрос за биопопулации, които лесно се култивират, бързо се размножават и са активни продуценти на вторични метаболити. Въпрос на биохимични проучвания и биотехнологични подходи е тези продукти да бъдат пречистени и характеризирани, химически модифицирани и тяхната биоактивност да бъде подобрена за по-нататъшно биомедицинско терапевтично

приложение. В обзора на дисертационния труд е направена оценка на хетерополизахаридите, продукт на червените водорасли, които напоследък привличат внимание с противораковите си ефекти, способност да инхибират растежа, да стимулират имунния отговор и да индуцират апоптоза.

В методологично отношение е направен преглед на съществуващите възможности за получаването на биологичноактивни вещества от бактерии, чрез подбор на подходящи щамове продуценти и оптимизиране на условията за увеличен синтез. Разглеждани са възможностите за характеризирание и усилване на специфични качества на биологичноактивните вещества, имащи отношение към преживяемостта на туморни клетки.

Освен резюмиране на наличните литературни данни за определени биоактивни субстанции авторката обобщава съществуващите досега методологични опции, свързани с получаването им. Обърнато е внимание на характеристиките на повърхностноактивни вещества и гликолипиди. Включен е преглед на видове микроорганизми, продуценти на гликолипидни биосърфактанти. Поставен е акцент върху методите за клетъчна имобилизация.

Закономерно произтичащи от поставената цел **задачи** включват: оптимизиране на условията за растеж и развитие на подобрени бактериални и водораслови щамове, имобилизация на клетките от избрани щамове, усилия за увеличаване на синтеза на търсените биологичноактивни вещества, създаване на възможности за многократно използване на подобрените имобилизирани препарати. Разработената схема за получаване на гликолипидни биосърфактанти от бактерии и екзополisahариди от водорасли (в *in vitro* експерименти чрез изолиране и имобилизация) улеснява скрининга на ефекта на получените гликолипиди и полизахариди върху преживяемостта на здрави и ракови клетъчни линии, което е финалната фаза на експерименталния подход на Ангелики Константинову във връзка с дисертацията. Тук е редно да посоча, че методите за оценка на резултатите включват подходи, характерни както за биохимичните изследвания, така и методи за клетъчното култивиране, имунологични и включително морфологични начини за оценка, каквато е визуализацията със сканиращ електронен микроскоп (SEM).

Основни обекти на изследването във връзка с дисертацията са продукти на *Pseudomonas aeruginosa* BN10, *Rhodococcus wratislavensis*. **Методологията** на разработката обхваща многопосочни изследователски направления: стандартни техники за мултиплициране на щамове *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и *Rhodococcus wratislavensis*, оценка на концентрациите на рамнолипиди и трехалозолипиди, получаване на полизахариди от червени микроводорасли *Rhodella reticulata* и *Porphyridium cruentum*, измерване на цитотоксичната активност на рамнолипиди и полизахариди върху избрани култивирани клетки с МТТ [3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил тетразолиев бромид] колориметричен тест и други подобни. Доброто калибриране на експерименталните изследователски подходи е спомогнало за постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите по темата.

Разделите **резултати и дискусия** (вкл. направените изводи) заемат общо 33 страници от изложението. Една съществена част от получените резултати е свързана с имобилизация на клетките от избраните бактериални щамове *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и *Rhodococcus wratislavensis* с цел създаване на условия за увеличаване продукцията на гликолипиди. Отразени и дискутирани са резултати относно кинетиката на биосърфактантната продукция. Извършен е биомедицински анализ на антитуморния ефект на продуктите от *Pseudomonas aeruginosa* BN10 RL-1 и RL-2, както и на продуцираните от *Rhodococcus wratislavensis* трехалозолипиди. Въз основа на получените данни, авторката допуска, че демонстрираната разлика в действието на RL-1 и RL-2 е резултат на по-силното взаимодействие с клетъчната повърхност, което води до по-голям ефект върху клетъчното оцеляване, както и че съществува зависимост с разликите в метастатичния потенциал на изпитваните линии на рак на гърдата. За изследването на структурата и визуализацията на използваните матрици докторантката прилага модерни морфологични методи - изследване със сканиращ електронен микроскоп (СЕМ), създаващ 3D представа за тези структури. В резултат от проучването докторантката е направила оптимален подбор на бактериални продуценти на гликолипидни биосърфактанти - *Pseudomonas aeruginosa* BN10 и *Rhodococcus wratislavensis*, включително на водораслови продуценти на екзохетерополизахариди – червени микроводорасли – *Porphyridium cruentum* и *Rhodella reticulata*. Чрез метода на имобилизация и подбора на подходяща матрица – полиетиленоксидна криогелна матрица, избраният бактериален щам *Pseudomonas*

aeruginosa демонстрира увеличен синтез на рамнолипиди - 4.6 g L^{-1} в рамките на 7 дни. Доказаното намаление в преживяемостта на две ракови клетъчни линии, след прилагане на различни концентрации от синтезиран бактериален продукт, е най-силно изразено върху високометастатичната клетъчна линия *MDA-MB 231*. При третиране на ниско и високометастатичните ракови клетъчни линии с изолирания водораслов хетерополизахарид от *Rhodella reticulata* - $75 \text{ }\mu\text{g/ml}$ при високо метастатичната клетъчна линия *MDA-MB231* се постига намаление в жизнеността на клетките до 44%. От друга страна като очакван резултат е регистрирано намаление на жизнеността на раковите клетъчни линии в зависимост от промяна на концентрацията на хетерополизахарида. Силен ефект е установен и върху високо метастатичната клетъчна линия на рак на гърдата *MCF-7* и почти никакъв инхибиторен ефект върху нормалната клетъчна линия в проведените *in vitro* експерименти.

Не на последно място по важност като резултат е регистрираната зависимост между естеството на клетъчните линии (ракови и нормални) и ефективността на приложените гликолипиди според химичен състав, време на експозиция, концентрация, както и според нивото на намаляване на повърхностното напрежение. Важен приложен принос (от значение за биотехнологиите) е постигнатото увеличение в продукцията на полизахариди при двата изпитвани щама след осъществяване на имобилизация в криогелна матрица. При добър подбор на матрица за имобилизация, имобилизираните препарати са подходящи за многократно използване и увеличение в продукцията на търсения продукт. Използването на криогелни *PEO*, *PAAm* и *HEC* матрици при осъществената имобилизация на бактериални и водораслови клетки от избраните продуценти представлява ефективен подход, който разчита на нетоксичността, достъпността, бързината и лесната манипулация с тях за повишаване на добива на гликолипидни биосърфактанти и водораслови хетерополизахариди. За финален извод от проучването може да се приеме, че установената слаба цитотоксичност на тестваните концентрации при нормални (неракови) клетъчни линии е най - добрият показател за възможни терапевтични приложения на изследваните вещества. Имайки предвид подтискащия им ефект срещу ракови клетки *in vitro*, след подобаваща фармацевтична модификация и тестване, те могат да представляват допълнителни помощни ресурси при химиотерапията.

Преценка на публикациите, автореферат, личен принос на докторантката и бележки.

Ангелики Константинову е представила списък с 2 публикации, както едната е отпечатана в реферирано индексирано издание, регистрирано във втория квартал (Q2) и друга в трети квартал (Q3). Убеден съм, че резултатите получени от докторантката са изцяло нейно дело, а общият брой набрани кредити по образователната докторска програма покриват минималното изискване за 200 точки. **Авторефератът** е структуриран правилно, достатъчен е по обем и отразява основните резултати и приносите на дисертационния труд - съдържа 56 страници и 42 фигури. Като несъществен минус за дисертацията на Ангелики Константинову считам неотразяването в съдържанието на сливането в обща глава на резултатите с дискусията (допустимо от изискванията за такъв труд). Има подобно минимално разминаване и в автореферата. Тези особености при представяне на резултатите в никакъв случай не намаляват качествата на дисертационния труд.

Заключение: Представеният ми за рецензиране дисертационен труд съдържа научни и научно-практически резултати от полза за биомедицината. Той съдържа приноси, свързани малко или повече с усъвършенстване на терапевтичните подходи при овладяване на неконтролираната клетъчна пролиферация при малигнена патология при човека. Материалът на изследването включен в дисертацията е достатъчен по обем, добре документиран и трудът отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на този закон и Регламентите за придобиване на ОНС „Доктор” в ИЕМПАМ - БАН. Съществена част от резултатите, синтезирани в изводите на докторантката представляват оригинални научно-приложни приноси в науката.

Във връзка с изложеното по-горе, убедено давам своята положителна оценка на представения труд и предлагам на уважаемото научно жури да гласува положително по отношение на качествата на представената дисертация. Предлагам на Ангелики Николаос Константинову да бъде присъдена образователната и научна степен „доктор“.

13.09.2022. г.

Изготвил рецензията:


Проф. д-р Димитър Кадийски, дмн