

Вх. № 165
Дата 14.07.2022

До Председателя на научното жури,
Проф. д-р Светлозара Петкова,
Назначено със заповед № РД-15-54 от 03.06.2022 г. от директора на
Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей
(ИЕМПАМ), БАН

Приложено представям РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „доктор“
в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление: 4.3. Биологически науки
научна специалност Биохимия, шифър 01.06.10.

с автор Инна Александровна Суликовска, свободен докторант в ИЕМПАМ-БАН
на тема „Оптимизиране и адаптиране на метода за определяне на фототоксичност *in vitro* 3Т3 NRU phototoxicity test, към LED – слънчев симулатор Helios-iO”

С уважение:


(Проф. Людмил Пенюв Кирацов, дбн)

София, 14.07.2022 г.

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Людмил Пенюв Кирацов, дбн

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей
(ИЕМПАМ) - БАН

на дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „доктор“
в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление: 4.3. Биологически науки
научна специалност Биохимия, шифър 01.06.10.

с автор Инна Александровна Суликовска, свободен докторант в ИЕМПАМ-БАН

на тема „**Оптимизиране и адаптиране на метода за определяне на
фототоксичност *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, към LED – слънчев симулатор
Helios-iO**”

Научен консултант: доц. Иван Илиев, доктор

Общо представяне на процедурата и докторантката

Със заповед № РД-15-54 от 03.06.2022 г. от директора на ИЕМПАМ съм назначен за вътрешен член на научното жури за защита на дисертационния труд и на първото му заседание съм избран за рецензент. Получих всички документи, изискващи се от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИЕМПАМ и съобразени с правилата за приложение на ЗРАС в Република България и БАН.

Авторът на дисертационния труд Инна Александровна Суликовска е докторант на самостоятелна подготовка към ИЕМПАМ-БАН. В периода 2011 – 2017 г. тя придобива магистърска степен по специалност биомедицински инженер-изследовател в националния технически университет на Украйна "Политехнически институт Игор Сикорский", факултет "Биомедицинско инженерство". През 2017 г. е била на тримесечна специализация по праграмата Erasmus+ в Университета Патра, Гърция, лаборатория по Биомедицинска електроника. След завършване на висшето образование

е работила половин година като рентгенов лаборант, конусно-лъчева компютърна томография. През 2017 г. започва докторантура в Института по молекулярна биология и генетика при Националната академия на науките на Украйна, а от 2019 г. е биолог в секция „Патология“ при ИЕМПАМ – БАН.

Актуалност на тематиката

Дисертацията е насочена към актуален и значим проблем – фототоксичността. Този термин описва свойството на природни и синтетични вещества да променят структурата си под въздействие на слънчевата светлина (предимно на ултравиолетовото излъчване) при което се образуват производни имащи токсичен ефект в организма. Установени са стотици лекарства, които проявяват фототоксичност. Сред тях са антибиотици, диуретици, нестероидни противовъзпалителни средства, ретиноиди, невролептици и други. Фототоксичност проявяват и редица вещества с природен произход. Затова е препоръчително всички вещества, които се използват в медицината и козметиката да се тестват за да се избегне риска от нежелани ефекти. В дисертацията се характеризира и адаптира метод за бързо и сравнително лесно изследване на вещества за тяхната фоточувствителност, който може да намери приложение в практиката.

Познаване на състоянието на изследванията по проблема

Уводът, литературният обзор и използването на цитирания литературен материал показват добро познаване на състоянието на изследванията по проблема, третиран в дисертацията.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертацията е написана на 147 страници и е онагледена с 16 таблици и 60 фигури. Тя съдържа обичайните за подобен научен труд раздели: въведение (2 стр.), литературен обзор (39 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (22 стр.), резултати и обсъждане (45 стр.), заключение (1 стр.), изводи (1 стр.), оригинални приноси (1 стр.), публикации свързани с дисертацията (1 стр.) и използвана литература (26 стр.). В библиографската справка са използвани 322 източника. Тази структура представлява едно добре балансирано съдържание на дисертацията, като в нея доминират резултатите и тяхното обсъждане.

Литературният обзор е задълбочен и изчерпателен. В него са оформени три основни раздела. В първия раздел се разглежда ролята на слънчевата светлина при протичане на биологични процеси, нейните характеристики и механизмите на абсорбцията ѝ от кожата. Представят се различните видове симулатори на слънчевата светлина, като подробно се разглеждат техните предимства и недостатъци.

Втория раздел е посветен на фототоксичността. Проследено е развитието на познанието за фототоксичността през вековете и приложението му в медицината и фармацията. Подробно са разгледани механизмите чрез които се проявява фототоксичността, като се онагледяват с реакциите на конкретни вещества. Показана е ролята на активните форми на кислорода при увреждане на биологичните молекули и при различни форми на рак. Изчерпателно са коментирани различни класове лекарствени средства предизвикващи фоточувствителност. Описани са предимствата и недостатъците на различните видове тестове (*in chemico*, *in silico*, *in vitro* и *in vivo*) за оценка на фототоксичността, като много подробно се разглеждат *in vitro* тестовете с акцент на използвания в дисертацията *in vitro* BALB/c 3T3 NRU тест за фототоксичност.

В третия раздел е разгледано приложението на явлението фототоксичност, като тук се проследява развитието на регулацията на тестовете за фотобезопасност на вещества използвани в медицината. Обяснен е метода на фотодинамичната терапия при който се причинява селективно унищожаване на патологични зони чрез фотохимична реакция и неговото използване в онкологията.

Целта на настоящото проучване е формулирана точно и ясно и изпълнението на поставените **задачи** гарантират постигането ѝ.

Подробно описани са **Материалите и методите** използвани адекватно в дисертацията за постигане на поставените задачи. Методите включват култивиране на клетъчни култури, третиране с тестваните вещества, определяне на клетъчната жизнениост, определяне на цитотоксичността и на фототоксичността, определяне на клетъчната пролиферация, светлинна и флуоресцентна микроскопия, флоуцитометричен анализ. За статистически анализ са използвани софтуерните продукти GraphPad Prism 4 и Origin8, които убеждават в достоверността на докладваните резултати.

Представените в **Резултати и обсъждане** (45 стр.) изследвания са обособени в четири основни раздела.

Определяне на характеристиките на слънчев симулатор LE-9ND55-H.

Авторката е направила необходимите изследвания за да определи характеристиките на избрания за опитите слънчев симулатор, които не са обявени от фирмата производител, но са от решаващо значение за пригодността на уреда за решаване на поставените задачи.

Направено е сравнение на спектъра на слънчевия симулатор и спектъра на естествената слънчева светлина. Определена е светлинната мощност на симулатора и разпределението на плътността на мощността на лъчението върху двумерен модел на 96-ямкова плака. Резултатите дават възможност да се определи кои ямки могат да бъдат използвани, така че максималната разлика в мощността на попадащото в тях лъчение да е 5%. Симулаторът е валидиран и при лабораторни условия за определяне на фототоксичност по стандартен протокол с използването на вещества за които от литературни данни е известно, че имат силна, средна и такива, които не проявяват фототоксичност. За пълнота на характеризирането са използвани три различни клетъчни линии.

За валидиране на симулатора е направен и цитохимичен анализ с двуетапно оцветяване Май-Грюнвалт Гимза, както и флуоресцентен анализ на апоптоза при различни концентрации на фототоксичното вещество.

Изследване за фототоксичност на природни продукти.

Този раздел е посветен на доказване на ефективността и практическата приложимост на слънчевия симулатор при изследване за фототоксичност на растителни екстракти. Използвани са екстракти от 4 растения получени с различни органични разтворители и е показана липсата на фототоксичност при тях.

Същите екстракти са тествани за антитуморна активност върху 8 туморни клетъчни линии. Антипролиферативната активност се отчита с МТТ тест. Получени са оригинални данни за въздействието на различните екстракти върху различните клетъчни линии.

Направени са експерименти за определяне на механизма на антитуморно действие на растителните екстракти. С помощта на флоуцитометричен анализ е изследвано разпределението на клетките в различните фази от клетъчния цикъл. За целта са избрани екстракти и клетъчни линии при които се наблюдава най-силна антипролиферативна активност и са получени оригинални резултати, които са дискутирани и сравнени с литературни данни.

Върху 4 туморни клетъчни линии са проведени изследвания за определяне на проапоптичния потенциал на избрани екстракти. Резултатите показват селективност на въздействието на различните екстракти върху различни клетъчни линии.

Тест за безопасност на новосинтезирани пептиди.

В рамките на дисертацията тези изследвания са включени за да се покаже практическото приложение на слънчевия симулатор и адаптираният *in vitro* 3T3 NRU тест за определяне на фототоксичност. Изследвани са 8 аналози на естествен антимикробен пептид (KLAKLAK)₂ и е показано високо ниво на тяхната фотобезопасност.

Тест за безопасност на химично синтезирани съединения.

За фототоксичност са тествани и производни на тиенопиримидините, които са обещаващ клас синтетични съединения с широк спектър от биологични свойства между които противотуморни и антимикробни. Използвани са 6 новосинтезирани съединения, които показват различни характеристики след облъчване, но всички не са фототоксични.

В дисертацията се предлага в допълнение към регламентирания тест за фототоксичност да се прави и тест с използването на *in vitro* модела на човешка кожа, като за целта най-подходящи са кератиноцитите. При проведените опити се доказва тяхната приложимост.

В този раздел се показват и резултатите от изследвания за потенциална антитуморна активност на химично синтезирани съединения. При това са използвани 6 производни на тиено[3,2-d] пиримидина и клетъчни линии от рак на гърдата. Характеризирано е въздействието на съединенията при двете туморни клетъчни линии и контролата.

Изводите и приносите са ясно дефинирани от авторката и отразяват точно резултатите от нейните изследвания.

Авторефератът представлява съкратена версия на дисертационния труд и отразява най-важното от него.

Преценка на публикациите и личния принос на докторантката

Докторантаката е публикувала част от получените резултати в две статии. Едната, в която е съавтор, е с висок ранг в научната област (импакт фактор 4,412, Q1).

Убеден съм в съществения принос на Инна Суликовска. Другата, в която е първи автор е също с импакт фактор (0,198, Q3) и нейния принос е основен.

Справката за изпълнение на минималните изисквания за придобиване на ОНС „доктор“ според ЗРАСРБ и Правилника на ИЕМПАМ показва изпълнение на изискванията (90 точки при изискване 80). Справката за получените кредити съгласно кредитната система на ЦО-БАН сочи изпълнение на задължителния минимум (130 от 130 изисквани).

Препоръки

Да се работи активно за приложение на получените резултати в практиката.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблемът третиран в дисертационния труд е актуален и значим. Целта е формулирана точно и ясно, което показва добро познаване на проблема. Използван е богат набор, правилно подбрани методи. В резултат на проведените изследвания са получени данни, които имат научно, научно-приложно и приложно значение.

Дисертационният труд и авторефератът са оформени много добре. Резултатите са дискутирани изчерпателно, което показва добро познаване на литературата по проблема. Докторантката доказва, че притежава теоретични познания и умения за провеждане на самостоятелни научни изследвания. Представените материали и документи по процедурата отговарят на изискванията на ЗРАС в РБ и на Правилника за прилагането му на ИЕМПАМ.

Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото научно жури да гласуват положително за присъждане на Инна Алесксандровна Суликовска образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност Биохимия (шифър 01.06.10.).



Проф. Людмил Пенюв Кирацов, дбн

София, 14.07.2022 г.