

РЕЦЕНЗИЯ

ОТНОСНО: Дисертационен труд за защита и придобиване на образователната и научна степен „Доктор”, по Професионално направление: Биологични науки, шифър 4.3 (стар шифър – Биофизика – 01.06.08) , представен пред Научно жури, определено със заповед № 42/05.03.2013г на Директора на ИБФБМИ, БАН

Тема на дисертационния труд:

„Влияние на електрични импулси и антитуморни агенти върху адхезивното поведение на ракови и соматични клетки”

Автор на дисертационния труд:

Виктория Николаева Пехливанова, редовен докторант в секция ”Електроиндуцирани и адхезивни свойства” при Институт по биофизика и биомедицинско инженерство(ИБФБМИ) - БАН

Научен ръководител: проф. д-р. Яна Цонева, д.б.н.

Научен консултант: доц. д-р Румяна Цонева

Рецензент: проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор, ИЕМПАМ – БАН

Актуалност и значимост на дисертационния труд:

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем на човешката патология – злокачествените заболявания. Всяка година от рак заболяват повече от 10 млн, а на лечение се подлагат над 20 млн човека. Въпреки несъмнените успехи в профилактиката, ранната диагностика и лечение на някои неоплазии, ракът в световен мащаб се превръща в проблем № 1 по своята социална и икономическа значимост. **Ракът на гърдата** е сред първите по смъртност онкологични заболявания и това се дължи главно на високия му метастатичен потенциал и резистентност към стандартно прилаганите химиотерапевтици (антрациклини и таксани), водещи и до сериозни странични ефекти. Електро(химио)терапията е алтернативен и ефективен метод за лечение на злокачествени тумори, при който се използва феномена на електропорацията за ефективното проникване (чрез дифузия) в раковата клетка на различни антитуморни лекарства.

Настоящата научна разработка е фокусирана върху модулирането на клетъчната адхезия и реорганизация на цитоскелета на туморни и соматични клетки под влияние на самостоятелно или комбинирано приложени високоволтови електрични импулси и новия антитуморен агент еруфозин. Тя е провокирана от търсенето на нови средства, методи и терапевтични схеми за по-ефективно третиране и лечение на рак на гърдата. В тази връзка смятам, че темата на дисертационния труд е актуална и перспективна както от научна, така и от приложна гледна точка.

Структура на дисертационния труд:

Предложеният ми за рецензиране дисертационен труд е написан на 88 страници и съдържа в 17 фигури в литературния обзор, които са коректно цитирани и 27 фигури в раздел „Резултати и обсъждане”. Литературният указател включва 146 литературни източника на латиница, от които 73 са от последните 10 години.

Дисертационният труд е структуриран съобразно общо приетия за този вид научни трудове модел: Титулна страница; Увод - 2 стр; Литературен обзор – 25 стр; Цел и задачи – 1 стр; Материали и методи – 8 стр; Резултати и обсъждане -28 стр; Обобщение - 3 стр; Изводи – 1 стр; Приноси към медицинската практика- 1 стр; Литература – 11стр. Много добро впечатление прави обособяването на отделен раздел „Обобщение”.

В обзора се подлагат на задълбочен анализ литературни данни за: **Електропорация** - Прилагането на външно електрично поле за биомедицински цели, с насоченост към изясняване на влиянието на външно електрично поле върху пропускливостта на клетъчната мембрана; **Клетъчна адхезия** с акцент върху контакта на клетката към подлежащия субстрат (клетка - ЕЦМ контакт) и към друга клетка (клетка-клетка контакт), цитоскелетната организация на еукариотните клетки и влиянието на външно електрично поле върху клетъчната адхезия и цитоскелет; **Туморно метастазиране с фокус** върху серия от патологични събития обуславящи процесът на метастазиране; **Клетъчен цикъл и апоптоза** - с насоченост за изучаване връзката на важни биологични феномени като клетъчна пролиферация и клетъчна смърт в многоклетъчния организъм и **Алкилфосфохолини (АФХ)** с представител Еруфозин - нова група антитуморни агенти, различни по механизъм на действие от конвенционалните цитостатици, които действат на ниво клетъчна мембрана.

Обзорът показва отлична литературна осведоменост, свободно боравене с професионална терминология и способността на кандидатката умело да анализира научните факти и сполучливо разкрива връзките между широкия кръг дискутирани проблеми. Анализирайки тези толкова важни проблеми, базирайки се на данните на авторитетни автори и предходни изследвания на колектива, докторантката обоснова формулира основните цели на дисертационния труд, а именно:

1. Да се проследи ефекта на бифазни (биполярни) електрични импулси (200V/cm-1000V/cm) върху адхезивното поведение и преживяемост на две туморни клетъчни линии от рак на гърдата и една нетрансформирана клетъчна линия, за доказване ефекта на електричното поле върху адхезивното клетъчно поведение и туморната прогресия.

2. Да се проследи ефекта на еруфозина върху клетъчната преживяемост, клетъчната смърт и реорганизаця на цитоскелета на туморни и нетуморогенни клетки.

3. Да се изследва комбинираното цитотоксично влияние на еруфозин и приложено електрично поле (електропорация) върху реорганизацията на актиновия цитоскелет, миграционен потенциал и способността да се индуцира апоптоза.

За постигане на тези цели правилно са набелязани и проведени 6 конкретни задачи.

Оценка на използваните материали и методи на изследване

Трябва с удоволствие да отбележа, че работата е изпълнена на съвременно методично ниво при използването на голям набор от конвенционални и съвременни биофизични, биохимични, цитохимични, молекулярно-биологични, и статистически методи, включващи клетъчно култивиране, клетъчна електропорация, флуоресценция, клетъчна адхезия, клетъчна преживяемост, оцветяване за актин и тубулин, оцветяване на ядрото с DAPI, FACS анализ, клетъчна миграция, статистически анализ. Проведените изследвания са поставени методологично правилно. Опитите са стриктно изведени при наличието на съответни контроли.

Експериментите са изведени върху *in vitro* клетъчен модел на рак на гърдата, включващи високометастатичната ракова клетъчна линия MDA-MB-231, неинвазивната ракова клетъчна линия MCF-7 и нераковата клетъчна линия от млечна жлеза MCF-10A, при използване на 3T3 (миши фибробласти) като контрола на доминиращия тип стромални клетки, срещащи се във всеки тумор. Използваната

методология показва дълбочина на мисленето, убедителна логика и много добра професионална подготовка – теоретична и лабораторна.

Оценка на получените резултати

Разделът „Резултати и дискусии” е разпределен в три части следващи логично и последователно поставените за решаване в дисертацията задачи.

Обемът на използвания експериментален материал е напълно достатъчен за да се приеме, че проведените експерименти, както и получените резултати са достоверни и статистически добре документирани. Получените резултати, отразени на 27 фигури представят дисертантката като висококвалифициран експериментатор, компетентно боравещ с използваните методи. Фигурите не само онагледяват резултатите, но имат и доказателствена стойност.

Обсъждането на получените резултати е направено в светлината на литературните данни. Докторантката умело ги анализира и подхожда критично при съпоставянето им, като отчита възможностите за потенциалното им използване в практиката

Рецензияният дисертационен труд е едно задълбочено научно изследване, проведено на съвременно научно ниво, довело до правилно изведени и точно формулирани 6 изводи.

1. Доказано е, че клетъчната адхезия и преживяемост на фибробласти и MCF-7 не се повлиява значително от електропорацията. Електротретирането на инвазивната клетъчна линия от рак на гърдата MDA-MB-231 индуцира увеличаване на клетъчната адхезия при пониски интензитети на полето и намаляване при 1000 V/cm. Клетъчната пролиферация и при двете туморни линии е нарушена от електропермеабилзацията.

2. Доказано е, че влиянието на електропорацията върху актиновия цитоскелет на фибробласти и туморни клетки е клетъчно специфично. В 3T3 клетките актиновият цитоскелет е временно разрушен, докато в раковите клетки, третирани с ниски и средни интензитети, актиновият цитоскелет образува добре оформени стрес фибри, ламелоподи и филоподи.

3. Типът клетъчна адхезия (клетка-субстрат или клетка-клетка), индуциран от електропорацията, е също клетъчно специфичен. Докато при MDA-MB-231 доминира клетка-субстрат адхезията, при MCF-7 по-често се открива клетка-клетка адхезията.

4. Показано е, че най-чувствителна към действието на еруфозина е високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231 (естроген

негативна), докато нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A не се повлиява. Концентрация на еруфозина от 15 μ M причинява клетъчна смърт и провокира адхерентен клетъчен фенотип при високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231.

5. Тубулиновата мрежа не се повлиява от действието на еруфозина, като може да се предположи, че микротубулите не участват в трафика на еруфозина в клетката.

6. Прилагането на електрични импулси има синергичен ефект върху противотуморното действие на еруфозина.

Оценка на приносите в дисертационния труд:

Приемам справката с приносите като самооценка на дисертационния труд. Приносите са безспорни и обогатяват науката и медицинската практиката с нови оригинални данни. Проведените изследвания са пионерни по своя характер и за първи път дават представа: 1) за промените в клетъчния фенотип под действие на високоволтови електрични импулси и мембранотропния антитуморен агент Еруфозин, 2) за съчетаване на два ефекта на приложеното електрично поле: терапевтичен ефект, който е резултат от повишаване на локалната концентрация на цитостатика в отговор на електропорацията и адхезивен ефект, водещ до намалена подвижност и инвазивност на туморните клетки, обусловени от промяната на актиновия цитоскелет 3) изясняване механизма на действие на новия мембранотропен агент Еруфозин на ниво клетъчна мембрана.

Тези приноси биха били база за разработване на нови схеми за клиничната практика при лечение на тумори чрез електро(химио) терапия.

Критични бележки, препоръки и въпроси - Нямам критични бележки по същество. По-скоро бих отбелязала 2 пропуски - Отсъствието на номерация на използваните литературни източници, затруднява справката и спестените на места данни в раздел „Материал и методи”.

Полезно би било авторефератът /или като обзор/ на тази актуална и иновативна работа да бъде представен, и на английски език в Интернет пространството.

Как докторантката вижда бъдещите насоки на изследванията си върху практическото приложение на разработваните в дисертацията въпроси?

Оценка на Автореферата

Авторефератът като неразделна част от дисертацията в резюмиран вид отразява основните положения и дава реална представа за последователността на проведените изследвания, получените резултати и направените изводи.

Публикации във връзка с дисертационния труд

Обективен критерий за високото качество на представения ми за рецензия материал са приложените по темата на дисертацията общо 4 публикации на английски език, от които 3 отпечатани в списания с ИФ (Cancer Cell Int - 1; Biotech and Biotechnol. Equip. - 1 и Докл. БАН - 1) с ОИФ - 2.942. Също така докторантката Виктория Пехливанова е представила резултатите от дисертационния труд в 6 участия на научни форуми, две от които в международни форуми. **Личният принос** на Виктория Пехливанова в разработването на дисертационния труд е несъмнен. Във всички приложени научни трудове, Виктория Пехливанова е първи автор.

За отбелязване е, че всички проучвания по дисертацията са финансово подкрепени от Фонда за Научни изследвания при МОМН по проект ДО 02/178.

Биографични данни - Виктория Пехливанова е родена през 1984г. в гр. Ямбол. Дипломира се в СУ „Климент Охридски” през 2007г. като бакалавър по „Молекулярна Биология” и през 2009г. като магистър по „Биофизика”. От 2010г. е редовен докторант в секция ”Електроиндуцирани и адхезивни свойства” при ИБФБМИ – БАН. Докторантката е изпълнила успешно предвидената образователна и научна програма. Тя е представила всички необходими по процедурата документи в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИБФБМИ.

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

В хода на изпълнение на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд, Виктория Пехливанова е придобила компетенции и умения, които напълно съответстват на образователната и научна степен „Доктор”. Разширила е своята теоритична компетентност в областта на биофизичната и биохимична мембранология, придобила е умения да работи с научна литература, да анализира и обобщава данни, както и умело да ги използва при

коментара на получените резултати. Надградила е методичната си подготовка чрез умелия избор на съвременни методи и тяхното прилагане при решаване на конкретни задачи, свързани с изпълнението на дисертационния труд. Придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите от своя труд, да прави съответни изводи и да оформя научни статии. Изработването и оформянето на дисертационния труд, включващо представянето на резултатите, тяхното дискутиране, илюстративният материал, ми дават основание да смятам, че в процеса на докторантурата Виктория Пехливанова е придобила теоритични и практически умения напълно съответстващи на изискванията на образователната и научна степен „Доктор”

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Виктория Пехливанова представлява задълбочено и аргументирано научно изследване, третира актуален проблем на науката, съдържа значими научни резултати и реални приноси за медицинската практика, и заслужава висока оценка. Написан е ясно и стегнато, на много добър научен и литературен език. Докторантката е усвоила и прилага разнообразни методи, може да формулира научни цели и задачи, да анализира и оформя получените резултати в научни статии, за което са допринесли нейните сериозни познания в областта биофизиката и клетъчната биология.

Имайки предвид, гореизложеното считам, че представеният дисертационен труд по своя обем, съдържание и актуалност отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на Академичния състав в РБ и вътрешните правилници на БАН и на Института по биофизика и биомедицинско инженерство при БАН, за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”. Оценявам го положително и убедено препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да присъди на докторант Виктория Николаева Пехливанова образователната и научна степен „Доктор”.

Рецензент:

Проф. д-р Ренета Тошкова, Доктор

10.април. 2013г

Гр.София