

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд
за получаване на научната и образователна степен "Доктор"

Автор на дисертацията: инж. Светла Желязкова Тодинова

Тема: "Термодинамичен профил на плазмения протеом при злокачествени заболявания"

Рецензент: академик Борис Тенчов

В дисертационната работа на Светла Тодинова са изследвани промените в термодинамичните характеристики на протеома на кръвна плазма и на кръвен серум при ракови заболявания, между които са множествения миелом и два епителни тумора (колоректален карцином и карцином на стомаха). Основният експериментален метод в работата е диференциална сканираща микрокалориметрия (ДСК), а използваният подход в идейно и методично отношение е основан на публикуваните от 2007 г. насам статии на Chaires и съавтори, в които е показано, че регистрираните посредством ДСК термограми, отразяващи топлинната денатурация на кръвния протеом, претърпяват значителни промени при заболявания. Въз основа на тези резултати Chaires et al. достигат до извода, че ДСК дава нови възможности за диагностика и мониторинг на изследваните заболявания. Целта на настоящата дисертационна работа е да се установи дали подобни отклонения на термограмите от нормата се наблюдават също и при споменатите по-горе злокачествени заболявания и дали тези отклонения биха имали стойност като диагностичен критерий.

Дисертацията е написана на 131 стр. и е оформена по стандартния начин. Съдържа увод, цел и задачи, литературен обзор, методи и обекти на изследване, експериментални резултати и дискусия, обобщение, изводи, справка за приносите и литература. В литературния обзор са изложени сведения за няколко основни белтъчни компоненти на кръвния протеом (албумин, имуноглобулини и трансферин), както и за изследваните онкологични заболявания (секреторен и несекреторен множествен миелом, колоректален карцином и карцином на стомаха). В обзора са изложени също и някои основни сведения за използвания метод диференциална сканираща микрокалориметрия (ДСК) и за приложенията ѝ в изследванията на белтъци. В последния раздел на обзора, който е посветен на изследванията на протеома посредством ДСК, са включени работите на Chaires et al., с които това направление започва, но не са намерили място работи от

последните 2-3 години, включително и от други автори, в които същият подход е използван, например, за изследвания върху рак на гърдата (Zapf et al. 2011), както и при други заболявания.

В работата са изследвани проби от около 500 души, между които 53 здрави доброволци, чиито проби са използвани като контрола, и около 450 души с вече диагностицирани злокачествени заболявания (370 с множествен миелом, 74 с рак на дебелото черво и 8 с рак на стомаха). Проведеното изследване е наистина мащабно, както се отбелязва и в справката за приносите. Известно е от литературата, че термограмите на протеома на здрави хора показват значими вариации в зависимост от възрастта и расата, които трябва да се отчитат при сравнение с патологични промени, предизвикани от заболявания. Уместно е да се отбележи във връзка с това, че усреднената възраст на групата здрави доброволци е близка до средната възраст на болните пациенти, т.е., контролата, използвана в дисертацията, е представителна за възрастовия диапазон, в който са болните от рак пациенти.

Пробите от пациенти с множествен миелом са предоставени от Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, където са направени и описаните в дисертацията вспомогателни изследвания като електрофореза на серумни белтъци и определяне на концентрацията на свободни леки вериги на имоноглобулини. Пробите от пациенти с карциноми на дебелото черво и на стомаха са предоставени от Специализираната болница за активно лечение по онкология. Концентрацията на белтъка в пробите е определяна по биуретов метод. Тъй като неточностите в концентрацията на пробите са основен източник на грешки в микрокалориметричните измервания, по конкретно, при определяне на специфичната топлемост и на енталпията на преходите, би било уместно да се спомене в методичната част какви са грешките в тези определяния на белтъчните концентрации, за да може да се оцени влиянието им върху разсейването при усредняване на термограмите, принадлежащи към една и съща група.

Най-интересните нови резултати, получени в дисертационната работа, могат да се представят накратко по следния начин. Преди всичко, няма съмнение, че при всяко едно от трите изследвани онкозаболявания в денатурационния профил на протеома са настъпили значителни промени, които лесно се регистрират посредством ДСК. Няма съмнение също, че отклоненията във формата на термограмите съдържат важна информация относно настъпилите в състава на протеома промени. Друг важен резултат се състои в това, че термограмите, измерени за дадено заболяване, например, множествен миелом, не са еднородни, а в зависимост от термодинамичните си характеристики като специфична топлина, температура и енталпия на

преходите се разпределят в ясно обособени групи със съществено различни параметри. Значителен интерес представлява обстоятелството, че направената по този начин класификация посредством ДСК на заболяванията по групи не съвпада с досега известни, направени по други принципи класификации, т.е., може да се очаква, че ДСК класификацията ще допринесе за по-задълбочено разбиране на природата на тези заболявания и разграничаване на различните им форми. Интересни са и наблюденията върху проби, взети след хирургическа намеса, които показват, че от 1 до 3 месеца след отстраняването на тумора термограмата на протеома не е възстановила нормалния си вид. Тези резултати са подробно описани в глава III. "Експериментални резултати и дискусия" на дисертацията и са намерили отражение в справката за научните приноси. Те се отнасят към категорията получаване на нови факти, които съществено допълват и разширяват познанията относно известно от литературата явление. Тези резултати не оставят съмнение, че ДСК дава важна информация относно природата на настъпващите в кръвния протеом патологични промени при ракови заболявания.

По отношение на потенциала на този метод като нов подход за диагностика на онкозаболявания (вж. т. 6 от справката) е необходимо да се направи следното пояснение. Както е известно, диференциалната сканираща микрокалориметрия е високочувствителна техника, която дава възможност за регистрация на топлинни ефекти при много ниски концентрации на изследваните вещества. Затова представлява интерес въпросът дали регистрацията посредством ДСК на профилите на денатурация на кръвния протеом наистина дава възможност за ранна диагностика на заболявания, в това число на ракови заболявания. За да се придобие по-добра представа какви са възможностите на този подход, трябва да се вземе предвид следното обстоятелство. Както се споменава в литературния обзор на дисертацията, в кръвния протеом има около 3500 белтъка, но е важно да се подчертае, че от тях само около 15-20 белтъка, които са в най-високи концентрации, имат забележим принос към неговия денатурационен профил. Тъй като тези 15-20 белтъка са отговорни за около 99 % от ДСК термограмата на протеома, ясно е, че за да настъпят забележими промени в тази термограма, трябва да се случи едно от следните две събития. Трябва или някой от тези 15-20 основни белтъка да претърпи съществени промени в температурата и/или енталпията си на денатурация, което може да стане, примерно, в резултат от белтък-лигандни взаимодействия, или в резултат от патологичния процес в протеома трябва да се появи нов белтък, който да е в достатъчно висока концентрация, сравнима с тази на основните 15-20 компоненти, за да може да предизвика забележима промяна в денатурационния профил. Затова, поне на сегашния етап на изследванията, изглежда малко вероятно този подход да даде

възможности за наистина ранна диагностика на заболявания, когато патологичните промени в протеома току що са започнали и са все още на ниво десетки или стотици нови белтъчни молекули в обема, съдържащ се в калориметричната клетка. В подкрепа на това заключение е и фактът, че всъщност всички изследвания в дисертацията са върху случаи, когато заболяванията са в напреднала фаза и вече са били диагностицирани с други методи.

За да се охарактеризират количествено разликите между термограмите в норма и при патологични отклонения, в дисертационната работа е използван метод за статистически корелационен анализ, заимстван от една от публикациите на Chaires и сътрудници (Fish et al. 2010). Даже без да се прави подробен разбор е ясно, че този метод не е особено подходящ за анализ и сравнения на ДСК термограми. Причината е съвсем проста и физически ясна. При този метод отклоненията от контролната термограма се взимат по абсолютна стойност, без оглед на това дали са с положителен или отрицателен знак, докато при ДСК термограмите разликата между плюс и минус от физическа гледна точка е огромна. Например, ако в дадена термограма се появи нов ендотермен преход, по този метод ще се получи същия резултат за отклонението от нормата, както и в случая, когато към тази термограма е добавен нов екзотермен преход със същите параметри, но с обратен знак, т.е., методът няма да открие разлика между двата случая на ендотермен и екзотермен преход, които физически са коренно различни. Затова считам, че на резултатите от този анализ не трябва да се обръща особено внимание, още повече, че както се вижда от таблиците и от текста, никакви достойни за отбелязване резултати от този анализ като че ли не са получени. От друга страна, в дисертацията не са използвани добре известни и отдавна развити в областта на микрокалориметрията методи за анализ, основани, например, на деконволюция и разложение на термограмите по компоненти, които без съмнение биха позволили да се получи много по-ясна и физически коректна картина за разликите между денатурационните профили в норма и патология и които могат да се окажат особено полезни при анализ на профили със сложна форма, каквито са термограмите на протеома. Това обстоятелство буди недоумение, още повече, че тези методи бяха въведени и рутинно се използваха в микрокалориметричните изследвания в ИБФ още преди повече от 20 години.

Тук е необходимо да се направи още една забележка. За енталпията на преходите е използвана единицата cal/g.deg , която всъщност е мерна единица за специфична топлемост (или топлинен капацитет, както се нарича в дисертацията). Тази грешка очевидно е системна, защото се повторя не само навсякъде в дисертацията (Таблицы 4, 6, 10 и 11), но и в публикуваната върху тези данни статия. Тъй като, наред с температурата, енталпията е най-важната

характеристика на белтъчната денатурация, за която е широко известно, че се измерва в единици за енергия, нормирани към количеството вещество, възниква и въпросът всъщност как са определяни приведените в таблиците стойности на енталпията и дали тези стойности са верни.

Тези забележки, макар и съществени, не помрачават положителното общо впечатление от дисертационната работа и не омаловажават получените нови и без съмнение достоверни експериментални резултати за промените в денатурационните термограми на протеома при различни ракови заболявания. Като цяло, дисертацията е добре написана и оформена. Езикът е ясен и разбираем, допуснати са много малко технически грешки, фигурите са добре направени и илюстрират ясно получените резултати. Личният принос на С. Тодинова в тази работа е напълно безспорен.

Авторефератът коректно отразява съдържанието и приносите на дисертацията. По материали от дисертационната работа са публикувани две статии – в *Analytical Chemistry* (2011) и в *BiochimBiophysActa* (2012). Трета статия е посочена като подготвена за печат. Публикуваните две статии имат общ IF около 9.5 и досега са цитирани 5 пъти, което е добър показател, като се има предвид, че са публикувани съответно през 2011 и 2012 г. Резултатите са докладвани на 5 конференции.

В заключение, в дисертационната работа са получени интересни нови резултати относно промените в параметрите на денатурация на кръвния протеом при няколко онкологични заболявания. Тези резултати са публикувани в авторитетни списания и вече са намерили отражение в световната научна литература. Считаю, че тази дисертация изпълнява всички необходими изисквания и предлагам с пълна увереност на уважаемото жури да присъди на нейния автор инж. Светла Желязкова Тодинова исканата степен "доктор".

3 септември 2013 г.

Подпис:

(Борис Тенчов)