

Вх. № 375.КП. / 21.04.2022.

## РЕЦЕНЗИЯ

по конкурс за академичната длъжност „професор“, в област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност „Биофизика“, обявен в ДВ бр. 109/21.12.2021 год. за нуждите на секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“ при Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

**Рецензент:** акад. Румен Панков, катедра Клетъчна биология и биология на развитието, Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски", определен за член на Научното жури съгласно заповед № 98/21.02.2022г. на Директора на ИБФБМИ – БАН.

Единствен кандидат, подал документи за обявения конкурс е доцент Наталия Александрова Кръстева от Института по биофизика и биомедицинско инженерство. Към датата на издаване на документа за трудов стаж - 27.01.2022 г., доцент Кръстева има стаж по специалността от 24 г. 10 м. и 23 дни, от които научен стаж 16 г. и 9 м., а стажът ѝ след хабилитиране надхвърля 11 години. Това напълно удовлетворява изискванията на т. 6.3. от Правилника за прилагане на ЗРАС в ИБФБМИ, изискваща не по-малко от 2 г. стаж като доцент или поне 7 г. научен стаж по някое от основните тематични направления на Института.

За конкурса, доцент д-р Наталия Кръстева е представила всички необходими документи съгласно законовите изисквания. Всички представени материали са прецизно изготвени и подредени.

Декларирам, че нямам общи публикации с кандидата.

### Кратки биографични данни за кандидата

Доцент д-р Наталия Кръстева е родена през 1969 година. Завършва висшето си образование в Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ в магистърска програма по „Клетъчна биология и биология на развитието“ през 1994 год. Започва кариерата си като биолог-специалист в ИБФБМИ (тогава Институт по биофизика) при БАН. От 2001 год. е докторант по биофизика на свободна подготовка в Лаборатория „Клетъчна адхезия“ към същия институт, където през 2003 год. успешно защитава докторска теза на тема „Взаимодействие на хепатоцити със синтетични мембрани - перспективи за създаването на изкуствен черен дроб“. Научната кариера на д-р Кръстева преминава в Института по биофизика, където тя последователно преминава през научен сътрудник II степен (2004-2007), научен сътрудник I степен (2007-2010) и старши научен сътрудник II степен и доцент, съгласно новото законодателство (2010 до днес) към секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“. През периода 2015-2019 година е избрана за ръководител на същата секция.

Доц. д-р Кръстева е провела едногодишна пост-докторска специализация в Тетлов, Германия - Institute fuer Polymer Forschung през 2005 година и множество краткосрочни специализации в Германия, Испания, Словения и Полша. Освен с учени от тези страни, тя поддържа интензивно сътрудничество и с изследователи от други страни като Китай, Италия, Египет, Австрия и Турция.

Член е на научния съвет и апелативната комисия на ИБФБМИ - БАН.

### **Научна продукция и анализ на наукометричните данни**

Общата научна продукция, представена от доц. Кръстева включва 49 научни публикации, автореферат на дисертация и 43 участия в национални и международни научни форуми. От всички научни статии, 41 са публикувани в международни списания с ИФ и/или SJR, като сред тях се открояват такива престижни журнари като *Cells* (IF 6.6), *Particle and Fibre Toxicology* (IF 6.56), *Int J Mol Sci* (IF 5.9), *Journal of Nanobiotechnology* (IF 5.3) и др. Осемнадесет от тези статии са публикувани в списания, принадлежащи към най-високия квантил (Q1) според Scimago Journal Rank (SJR). Общият импакт фактор от представената научна продукция е над 80, а цитатите са над 630. Съгласно данните от Scopus, индексът на Хирш на доц. Кръстева е 15.

В настоящия конкурс доц. Кръстева участва с 20 научни труда (19 статии и една глава от книга на издателство Elsevier), които не са рецензирани в предходни конкурси за присъждане на научни степени или академични длъжности. Осемнадесет от тях са публикувани съвсем наскоро - в периода 2018-2021 г. (средно по 4.5 статии годишно), което определено демонстрира висока интензивност и продуктивност на научно-изследователската дейност на доц. Кръстева. Импакт факторът от статиите по конкурса е 64 (80% от общия ИФ), като повече от половината (11 бр.) са в списания от Q1, а документиранияте цитирания на тези статии са 243. Тези наукометрични данни без съмнение показват не само интензивността, но и много доброто качество на научните изследвания, провеждани от доц. Кръстева.

Представената научна продукция и постигнатите наукометрични данни надхвърлят съществено минималните изисквания за присъждане на академичната длъжност „професор“, определени в Приложение 1 към Правилника за прилагане на ЗРАС в Института по биофизика и биомедицинско инженерство. Представени са данни за постигнати 135 т. от показатели от група В (при изискуеми 100 т.), 259 т. от група Г (при изискуеми 220 т.) и 486 т. от група Д (при изискуеми 120 т.). Освен научно-изследователска, доц. Кръстева има и активна проектна дейност. В материалите са отбелязани 17 проекта, с обща сума на привлечените средства над 154 000 лева. Ръководените от нея проекти включват 3 международни и 3 национални проекта, като е участвала още и в 4 международни и 7 български проекта. В резултат от тази активна работа, доц. Кръстева събира 440 т. от група Е, които надхвърлят почти трикратно изискуемите 150 точки.

Доц. Кръстева активно участва и в подготовката на докторанти и дипломанти. Тя е научен ръководител на един, вече защитил докторант и един, който е зачислен през 2020 година. Ръководила е още и 4 дипломанта от СУ „Св. Кл. Охридски“ и ХТМУ.

### **Анализ на научните приноси**

Научните изследвания, представени в неречензираните досега публикации, с които доц. Кръстева участва в настоящия конкурс са обобщени в групи В и Г, съгласно Приложение 1 от ППЗРАСРБ на ИБФБМИ. Ще разгледам представените статии така, както са систематизирани от кандидата, като в резюмиран вид ще представя най-важните научни постижения, от които следват и научните приноси.

В група „В“ са представени 7 публикации (4 от Q1, 1 от Q3 и 2 от Q4), фокусирани върху проучване на възможностите за използване на графеновия оксид (ГО), като основа за нови противоракови терапии. Наночастици от графенов оксид не само могат да въздействат директно върху клетките, но предоставят възможност да се използват като

преносители на биологично-активни субстанции, създавайки по такъв начин възможност за насочено им доставяне и атакуване на раковите клетки. Качествата на ГО могат да бъдат модулирани чрез химични модификации, които съществено променят свойствата на наночастиците. Този подход е използван и от доц. Кръстева, която представя нов метод за аминирание на ГО с хидроксиламин. Методът довежда до намаляване размера и отрицателния дзета потенциал на частиците и повишава повърхността им чрез набръчкване като тези промени подобряват способността за преминаване през клетъчната мембрана и увеличават възможността за натоварване с биологично-активни молекули. Използвайки така модифицирани наночастици от ГО, доц. Кръстева показва, че те предизвикват снижаване на клетъчна преживяемост, увреждане на клетъчната мембрана, повишено производство на ROS, както и митохондриална дисфункция при хепатоцелуларни клетки от линията HepG2. Ефектите са дозозависими и по-изявени в сравнение с немодифицирания графенов оксид. Подобна по-висока и клетъчно-специфична токсичност е установена и при аминирани с амоняк нано частици от ГО. От тествания набор от различни ракови (A549, Colon26 и Hep3) и контролни клетъчни линии най-висока токсичност е регистрирана за клетките от рак на дебелото черво. Проучване върху механизмите на въздействие показват, че ефектите на наночастиците са свързани със стимулиране производството на ROS и блокиране на клетъчния цикъл във фазите G0-G1.

Разширявайки изследванията си върху модифицираните наночастици от ГО доц. Кръстева изследва и биологичните ефекти на модифицирания с полиетилен гликол (ПЕГ) графенов оксид. Като използва собствена оптимизация на съществуващ метод за ПЕГилиране, която подобрява качествата на наночастиците, тя показва, че тази модификация снижава хематотоксичността, смекчава инхибиращия ефект на немодифицирания ГО върху растежа и миграционната активност на меланомни клетки и повишава биосъвместимостта на наночастиците при клетки от колоректален карцином с различен инвазивен потенциал (Colon26 и HT29). С цел изясняване механизмите, по които наночастиците индуцират биологичните ефекти, са снети и експресионните профили на няколко гена (ATM, RAD51, TP53, BCC3 и CDKN1A), които се активират при стресови състояния.

Важно предимство на ПЕГилираните наночастици от ГО е високият абсорбционен капацитет на светлина от близкия инфрачервен спектър (NIR). Тази възможност е експлоатирана от доц. Кръстева чрез изследване потенциала на ПЕГилирания ГО в комбинация с NIR облъчване за третиране на раковите клетки Colon 26 и HT29. Резултатите доказват, че ПЕГилирането на ГО и неговата комбинация с NIR намаляват цито-, гено- и митотоксичността на тези наночастици. Данните подкрепят възможността наночастиците от ПЕГилиран ГО да се използват като щадящ нормалните клетки многофункционален наноносител на противотуморни лекарства в бъдещи комбинирани химио-фото терапии на рак на дебелото черво.

Статиите от втората група - Г, с които доц. Кръстева участва в настоящия конкурс включват 13 статии от които 7 от Q1, 1 от Q2, 1 от Q3, 2 от Q4, една статия с SJR без дефиниран квантил и една глава от книга на издателството Elsevier. Представените разработки могат да бъдат обобщени в три групи, включващи разширяване на изследванията върху токсичността на наночастиците от графенов оксид, създаване и характеризирание на нови материали за тъканното инженерство и проучвания върху промените в хроматиновата структура, свързани с преждевременното стареене.

Първата група обединява изследвания добавящи нови факти за биологичната съвместимост на наночастиците от ГО. Потенциалното им приложение като преносители на лекарства изисква интравенозното им вливане и задължителна хемосъвместимост. Използвайки кръв от здрави донори, доц. Кръстева показва, че ПЕГилянето намалява хемолитичната активност на ГО и забавя промяната в морфологията на еритроцитите. В допълнение и двата вида (немодифицирани и модифицирани) наночастици намаляват плазменния фибриноген, което предполага възможност за намаляване на системното възпаление при прилагането им.

За разлика от тестовете върху клетъчни култури, анализите за токсичност при използване на *C. elegans* предоставят данни от цялостен организъм със запазени и метаболитно активни храносмилателни, репродуктивни, ендокринни, сензорни и нервномускулни системи. Като междинен етап между *in vitro* и тестването при бозайници, характеризирането на токсините чрез анализи с нематода *C. elegans*, предоставя полезна информация за токсичността при бозайниците. Използвайки тази моделна система, доц. Кръстева получава нови данни за наночастиците от ГО, които могат да бъдат обобщени както следва:

- Графеновият оксид потиска двигателната активност на нематодите, като е установено, че този ефект се медира от невролигина – адхезивен мембранен белтък от постисинаптичната мембрана на невроните.

- Установено е, че няколко гена отговорни за развитието на червата, регулират както чревната пропускливост на ГО, така и токсичността му. Идентифицирани са и две сигнални каскади *PKC-3-SEC-8-WTS-1* и *PKC-3-ISP-1/SOD-3*, които участват в тези процеси.

- Показано е, че потискането на *mlt-7* (хем-пероксидаза, отговорна за подмяната на кутикулата), довеждащо до увреждане на бариерните епидермални функции, води до успешно преминаване на ПЕГилян ГО към органите и проява на токсичното му действие.

- Установено е, че контролът върху токсичността на ПЕГиляния ГО е зависим от сигналната каскада *BLI-1-let-7-HBL-1/LIN-41*

- Показано е, че сигналната каскада *DAF-2-AGE-1-AKT-1-DAF-16-SOD-3/MTL-1/GPD-2*, в чревните клетки на нематодите, регулира токсичността на частиците от нанополестирол.

Втората група е свързана с разработване и охарактеризиране на нови биоматериали, предназначени за костното тъканно инженерство. Използвайки нова моделна система за създаване на субстрати с различна еластичност, основана на отлагане на тънки композитни слоеве от полидиметилсилоксан и детонационен нанодиамант (DND/PPHMDS) по метода на плазмената полимеризация, доц. Кръстева показва, че увеличаването на частиците довежда до увеличаване модула на еластичност на субстрата, а това от своя страна стимулира остеогенната диференциация на човешките мезенхимни стволови клетки. В допълнение е установено, че плазмено отлагане на DND частиците като външен слой върху PPHMDS полимера стимулира клетъчното спредиране, организацията на актиновия цитоскелет и активността на алкалната фосфатаза. Общо, резултатите убедително демонстрират, че начина на приготвяне на DND/PPHMDS композита може активно да се използва за контролиране на клетъчното поведение.

Актуални от практическа гледна точка са и резултатите за влиянието на еластичността на субстрата върху миогенната диференциация. Използвайки миобластни

клетки от линията C2C12 и миши първични миобласти, изолирани от сателитни клетки доц. Кръстева показва, че PPHMDS материали с модул на еластичност 2,5–4 МРа, който е по-висок от този на скелетномускулната тъкан, не нарушава миогенната диференциация, а само временно ограничава пролиферацията на изследваните клетки.

Интересни резултати, разширяващи възможностите за използване на различни субстрати в костното тъканно инженерство са получени при използване на многослойни покрития от TiN/TiO<sub>2</sub> отложени върху неръждаема стомана 304 чрез DC магнетронно разпрашване. Установено е, че тези покрития не потискат клетъчното разстилане и не провокират намаляване на пролиферативния капацитет на остеобластните клетки от линията MG63, което ги прави подходящи за повърхностно укрепване на костни и дентални импланти. Подобрените качества и биосъвместимост на многостенни въглеродни нанотръбички е демонстрирана и след прилагане на нов подход за функционализиране с аминокиселините Arg и Asp, базиран на зол-гел техниката. Резултатите убедително демонстрират големите възможности на този нов подход.

Разширявайки палитрата от методични подходи, доц. Кръстева прилага и метода на електроовлажняване за проучване ролята на подредеността на субстрата в остеогенната диференциация на мезенхимните стволови клетки. Създавайки хибридни нановлакна от фибриноген и полимлечна киселина с различна конфигурация (случайна и подредена) и размерност (2D и 3D) е показано, че подредените нановлакна както в 2D, така и в 3D конфигурации са предпочитани за остеодиференциация.

Третата група е свързана с едно ново направление, насочено към изследване на промените в хроматиновата организация, свързани с процесите на клетъчното остаряване. Проучванията са извършени върху щам от дрождите *Saccharomyces cerevisiae* с нокаутиран ген за линкерния хистон и мутация в актин-подобния протеин 4 (*ARP4*), които изменят структурата на хроматина и снижават преживяемостта при UVA/B облъчване. По време на хронологичния живот на тези дрожди са регистрирани промени в генната експресия на подгрупа от гени, участващи във възстановяването на ДНК и автофагията (*RAD9*, *CDC28*, *ATG18*). Резултатите подкрепят хипотезата, според която висшите нива на хроматиновата организация и взаимодействията между хроматиновите белтъци са от съществено значение за нормалните процеси на стареене при оптимални и UVA-B стресови условия.

#### **Заключение:**

Доц. Наталия Кръстева е учен с висока професионална квалификация и добре обособен научноизследователски профил в областта на биофизиката. Научната ѝ продукция е тематично целенасочена и значителна както по обем, така и по качество. Резултатите, с които се представя в този конкурс са оригинални, публикувани са в поредица от престижни научни списания и са намерили много добър прием от международната и наша научни общности. Това ми дава основание убедено да дам своята положителна оценка и да препоръчам на членовете на Научното жури да избере доц. д-р Наталия Александрова Кръстева за „професор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, с научна специалност „Биофизика“.

София, 21/04/2022г.

Рецензент:

акад. Румен Панков