

РЕЦЕНЗИЯ

от **Маргарита Ангелова Кузманова**, доцент в катедра Биофизика и радиобиология при Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, член на Научното жури, определено със Заповед № 684/04.09.2023 г. на Директора на ИБФБМИ – БАН във връзка със защита на **дисертационен труд** за получаване на образователната и научна степен „**доктор**“

в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Биофизика“

Автор на дисертационния труд: Ариана Ануар Лангари, докторант към секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия“ – ИБФБМИ, БАН.

Тема на дисертационния труд:

Биофизични характеристики на тромбоцити и еритроцити при жени със спонтанни аборти. Маркери за нарушение на коагулационната система.

Научен ръководител: проф. д-р Светла Желязкова Тодинова, ИБФБМИ – БАН

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният ми за рецензиране комплект материали е в съответствие с Правилника на ИБФБМИ – БАН за прилагане на ЗРАСРБ и включва:

1. Молба за допускане до защита на дисертационен труд.
2. Автобиография по европейски образец.
3. Копие от диплома за завършена магистърска степен.
4. Протоколи от успешно положени изпити по специалността и по английски език съгласно индивидуалния план за обучение, както и сертификати за завършени курсове.
5. Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд.
6. Копия на публикациите.
7. Списък със забелязани цитати.
8. Дисертационен труд
9. Автореферат на български език.
10. Автореферат на английски език.

Спазени са всички срокове и минималните национални изисквания съгласно ЗРАСРБ.

2. Кратки биографични данни за докторанта.

Ариана Лангари получава своята бакалавърска степен в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ през 2018 г. През същата година тя започва работа като лабораторен техник в ИБФБМИ – БАН, а от 2019 г. е биолог в същия институт. Ариана Лангари се дипломира като магистър по биофизика в Биологически факултет, катедра Биофизика и радиобиология, със защита на дипломна работа на тема „Термодинамични и морфологични характеристики на еритроцити, изолирани от жени със спонтанни аборти, в процеса на стареене на клетките“ под научното ръководство на д-р Светла Тодинова, тогава доцент в ИБФБМИ на БАН. Интересите на Ариана в тази област определят и нейния по-нататъшен път в науката – от 2020 г. Ариана Лангари е асистент и докторант в секция Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия – ИБФБМИ.

За срока на докторантурата Ариана Лангари е изпълнила всички задачи по индивидуалния ѝ план. Отчислена е през 2023 г. с право на защита. Тя е представила в срок

всички документи, изисквани във връзка със защитата, вкл. сертификати за завършени курсове „Статистически анализ на данни“, „Мезенхимни стволови клетки“, „Компютърно подпомогнат лекарствен дизайн“, които са й дали допълнителни знания, подпомагащи завършването на дисертационния ѝ труд.

3. Данни за дисертацията

Дисертационният труд е написан в добър научен стил, на разбираем и достъпен език, на 128 страници и съдържа 194 литературни източника. Структуриран е съгласно изискванията, представени в чл. 27, ал. 2 на Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България, и съдържа следните основни части: Увод (3 стр.); I. Цел и задачи (2 стр.); II. Литературен обзор (37 стр.), III. Обекти на изследване и използвани методи (8 стр.), IV. Експериментални резултати и дискусия (41 стр.), V. Обобщение (3 стр.), VI. Изводи (2 стр.), VII. Използвана литература (21 стр.). В дисертационния труд са включени още: Справка за научните приноси, списък с Изнесени доклади на научни форуми, списък Статии, свързани с дисертационния труд, Забелязани цитати – общо 5 стр.

Темата на дисертационния труд е свързана с често срещан проблем с неизяснена етиология – спонтанно прекъсване на бременността поради проблеми с коагулацията. Тъй като все още не са известни причините за възникване на тези усложнения, то няма разработени методи за оценка на риска, ранна диагностика и предотвратяване на спонтанните аборти.

Целта на дисертационния труд е да се определят нови, специфични характеристики на тромбоцитите и еритроцитите – морфометрични, наномеханични и термодинамични, при жени с ранна загуба на плода, които да са свързани с нарушения в хемостазата и да могат да служат като маркери за ранна диагностика на патологичното състояние по време на бременността.

За постигането на тази цел са формулирани *7 задачи*, очертаващи логиката за провеждане на планираните експерименти. Отбелязан е и основният метод, по който ще бъде изпълнена съответната експериментална задача.

В *литературния обзор* са цитирани 123 източника, които дават добра теоретична обосновка на поставените цел и задачи. В него са обяснени измененията в хемостазата на жените при настъпване на бременност, както и нарушенията, установени при бременни жени със спонтанни аборти. Описани са структурата и функциите на тромбоцитите и еритроцитите и тяхната роля в хемостазата; нарушенията, настъпващи при наследствени или придобити промени в клетките. Обяснена е ролята на оксидативния стрес за стареенето на еритроцитите. Описан е също принципът на работа на използваните съвременни методи – атомно-силова и оптична микроскопия, поточна цитометрия, полимеразна верижна реакция, диференциална сканираща калориметрия. Мотивирано е тяхното използване за изпълнението на поставената цел. Представената информация е онагледена с 16 фигури.

В раздела *Обекти на изследване и използвани методи* е описано подробно как са подбрани пациентите в изследваните групи – 1. контрола (жени с неустановена бременност, NPC); 2. контрола бременни жени с нормално протичаща бременност (CP); и 3. жени, които са претърпели ранна загуба на плода (EPL). Изследването е одобрено от комисията по етика на Университетската акушеро-гинекологична болница, София и Медицински университет – Плевен. Всички жени, участващи в изследването са дали информирано съгласие. Описани са подробно начините на вземане на кръв, изолирането на клетките и методите на изследване, с ясна теоретична обосновка за тяхната приложимост за изпълнение на поставените задачи. Подробно

е описана апаратурата и режимите на работа при измерванията. Експериментите могат да бъдат повторени при описаните условия. За оценка на разликите в изследваните показатели и корелацията между тях са приложени адекватни статистически методи за анализ – тест на Shapiro–Wilk за определяне на вида на разпределението; непараметричен Wilcoxon тест за определяне на статистически значими разлики и *t*-тест на Стюдънт за статистическа значимост на разликите между групите за данните с нормално разпределение.

Извършена е огромна по обем експериментална работа, в съответствие с поставените задачи. **Получените резултати** са добре обяснени и са онагледени с 22 фигури и 7 таблици. Те са разделени в три основни раздела: изследване на морфометрични и наномеханични характеристики и степен на активиране на тромбоцитите (PCR, атомно-силова микроскопия, поточна цитометрия); определяне на морфометрични и наномеханични характеристики на еритроцити, и изследване термодинамичното поведение (диференциална сканираща калориметрия) на еритроцити. Веднага след представянето на конкретни резултати са направени анализ и обсъждане.

Изследвана е честотата на носителство на полиморфизми в гените на тромбофилните фактори и са установени повече мутации в EPL групата. Носители на мутации сред жените от EPL групата, включени в изследванията с ACM, са 88% (30% от тях имат повече от една мутация), а при двете контролни групи – 22%. Изображенията, получени от ACM, показват значителна разлика в морфологията (форма и грапавост) на тромбоцитите, изолирани от жените, претърпели спонтанни аборти (EPL) в сравнение с двете контролни групи. Тези различия корелират със степента на активиране на тромбоцитите, което е свързано с носителството на полиморфизми в гените за тромбофилия при пациенти с EPL. Установени са и различия в наномеханичните характеристики на тромбоцитите, взети от жени с EPL – еластичност, модул на Юнг. Увеличено е отделянето на тромбоцитни микрочастици от клетките, изолирани от EPL пациентите, които са носители на тромбофилни мутации, в сравнение с контролните групи жени.

Групата на жените със спонтанни аборти е разделена на две подгрупи в зависимост от срока на прекъсване на бременността: EPL1 включва жени, при които спонтанният аборт е настъпил между 6-та и 9-та гестационна седмица, а EPL2 – жени, при които това се е случило между 10 и 12 гестационна седмица. Не е посочен броят на жените в тези две групи.

Изследването на промяната на формата на клетките и еластичността на мембраната им в хода на нормално или индуцирано с оксидативен стрес стареене на еритроцитите показва по-бърза поява на структурни промени в мембраната, по-висок модул на Юнг, по-бърза трансформация от нормалната дискоцитна форма към клетки с променени форми, т.е. ускорен процес на стареене на еритроцитите при жените от EPL групата в сравнение с двете контроли. Доказана е отрицателна корелация между грапавостта на плазмената мембрана и модула на Юнг. Детайлно са описани промените в мембранни компоненти в хода на стареенето на клетките и при оксидативен стрес, които могат да са отговорни за наблюдаваните различия в поведението на еритроцитите между EPL групата и контролите.

Интересни различия са наблюдавани в термодинамичните характеристики на червените кръвни клетки от трите изследвани групи, като измененията в топлинния капацитет на хемоглобина и температурите на преход на хемоглобина и на белтъка от ивица 3 са в корелация с резултатите от ACM изследването. Това показва, че структурните промени в еритроцитите

повлияват термодинамичното им поведение. При тези измервания EPL групата също е разделена на две подгрупи – EPL1 и EPL2, но не става ясно *дали пациентките в тези групи са същите като в EPL1 и EPL2 групите при изследването на тромбоцитите.*

В *обобщението* е направен общ анализ на получените резултати и се обсъжда връзката между изследваните показатели. Показва се, че с приложените методи – АСМ и ДСК, на основата на отклонения от нормата в тромбоцитите и еритроцитите, може да се разработят нови маркери за ранно откриване на патологии.

Въз основа на получените резултати са формулирани **6 извода**, които съответстват на представените данни и направените анализи. Посочени са характеристики на тромбоцитите и еритроцитите с изразени отклонения от нормата при жените със спонтанни аборти, които биха могли да се приложат като маркери за ранна диагностика и оценка на риска от спонтанен аборт.

Цитираните 194 литературни източника имат пряко отношение към темата на дисертацията.

В дисертационния труд на Ариана Лангари за пръв път са използвани редица съвременни методи – АСМ, ДСК, PCR, поточна цитометрия, за характеризиране на функционалното състояние на тромбоцити и еритроцити от жени, претърпяли ранна загуба на плода, като са установени специфични промени в морфологията на клетките, еластичността на мембраните, скоростта на стареене на еритроцитите. *Приносите* са обобщени в 6 точки.

Резултатите от дисертационния труд са представени на 10 международни и национални научни форума; публикувани са в три статии с квантил Q2, с общ JCR IF (Web of Science) 16.758, в две от тях Ариана Лангари е първи автор. До момента на подаване на документите са забелязани 3 цитирания на тези статии.

Наукометричните показатели на Ариана Лангари надхвърлят минималните изисквания на ЗРАСПБ за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ (Приложение 1 на ЗРАСПБ).

Авторефератът е написан на 40 страници и коректно отразява съдържанието на дисертационния труд. Разделите Материали и методи и Резултати са представени в съкратен вид. Получените резултати са описани и обсъдени на 20 страници и са илюстрирани със 17 фигури и 4 таблици (в номерирането е пропусната Таблица 4). Обобщението, Изводи и Приноси са дадени без съкращения. В списъка на Използваната литература има 55 цитирани източника. Показани са публикуваните статии във връзка с дисертационния труд и техните цитирания, както и участията в научни форуми.

4. Критични забележки и въпроси:

В текста на дисертационния труд има много технически и граматически грешки, което затруднява четенето. Има неясно формулирани изречения, изречения с пропусната дума.

Има грешка в номерирането на таблиците – две таблици (на стр. 61 и 71) са с номер 3. В заглавието на Табл. 2 е спомената групата NPC, а в самата таблица тя липсва.

Фигурите: някои са с лошо качество. В публикация на български език надписите във фигурите трябва да са на български, не на английски език. Когато се използва фигура, схема от друг автор, е редно да се цитира статията, не линка към фигурата. Линк [23] и линк [70] не работят. Линк [83] <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/atomic-force-microscope> е към информация за публикации по темата Атомна силова спектроскопия, различни книги и

години на публикуване. Трябва да се цитира статията, от която е взета фигурата. Цитат [40] не е подреден правилно. Литературен източник [193] не е цитиран на правилното място в текста.

„здравен“ и „здравословен“ не са подходящи прилагателни за „статус на клетките“.

Водородният пероксид (H_2O_2) не е радикал. (стр. 35) *Каква е разликата между радикални и нерадикални активни форми на кислорода?*

В раздел III.4.3. ДСК експерименти (стр. 53) е описано как се подготвят еритроцитите за калориметричното измерване. „Преди всяко измерване, еритроцитите са промити 3 пъти с PBS буфер с ЕДТА и разредени до концентрация 8.5mg Hb/ml.“ *Как е измервана концентрацията на хемоглобина?*

EPL групата включва 26 жени със спонтанни аборти. Тя е разделена на две подгрупи – EPL1 и EPL2. *По колко жени има в подгрупите? Не става ясно как е сформирана групата от 82 жени за определяне честотата на полиморфизми в гените на тромбофилните фактори.*

Атомно силовата микроскопия и диференциалната сканираща калориметрия са информативни методи за установяване на промени в биофизичните характеристики на тромбоцити и еритроцити, вкл. свързани с преждевременно прекъсване на бременността. Но това са методи, изискващи скъпа апаратура и много време. След като получените резултати са потвърдили вече връзката между промени в свойствата на мембраните и риска за загуба на плода, *можете ли да препоръчате други, по-достъпни методи за ранна оценка на риска?*

Направените забележки не намаляват научната стойност на огромното количество свършена експериментална работа и задълбочения анализ на получените резултати, нито намаляват доброто ми впечатление от дисертационния труд.

Нямам лични впечатления от работата на Ариана Лангари, но от представения дисертационен труд оставам с впечатление, че тя умее да систематизира и анализира прочетена литература – направила го е със 194 статии. Не се съмнявам, че е усвоила всички използвани методи и апаратура и основната част от приносите на дисертационния труд са нейно дело.

Заклучение

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на Ариана Ануар Лангари на тема *„Биофизични характеристики на тромбоцити и еритроцити при жени със спонтанни аборти. Маркери за нарушение на коагулационната система“* отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и на Правилника за неговото прилагане в Института по биофизика и биомедицинско инженерство при БАН. Извършена е огромна по обем работа. Получени са оригинални научни резултати, които могат да намерят приложение в ранно определяне на риска от спонтанен аборт.

Въз основа на казаното дотук, давам своята **положителна оценка** и бих препоръчала на уважаемите членове на Научното жури да подкрепят присъждането на Ариана Ануар Лангари на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Биофизика“.

22.11.2023

София



доц. д-р Маргарита Кузманова