

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на тема: „Комбиниран подход за *in vitro* и *in vivo* визуализиране на проникването и локализирането на флуоресцентни наночастици в тумори след електропорация”

представен от **Северина Йорданова Семкова**  
секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“  
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“, Научна област 4. „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление 4.3. „Биологически науки” (научна специалност „Биофизика”)

Рецензент: проф. дбн Стефка Германова Танева, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, София, член на научно жури съгласно заповед № 741/16.01.2017г. на Директора на Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН.

Северина Йорданова Семкова е бакалавър по Молекулярна биология от 2011 г. и магистър по Биофизика от 2013 г., Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”. Зачислена е като редовен докторант към секция „Електроиндуцирани и адхезивни свойства“, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН през януари 2014 г., а от април 2016 г. е специалист-биолог в същата секция.

Дисертационният труд, представен от Северина Йорданова Семкова, е насочен към анализ на мултимодални наночастици, на пасивното и електроиндуцирано интернализиране на наночастиците в туморни клетки и тъкани, ефекта на електропорацията за повишаване на локалната концентрация на наночастиците в туморни клетки и тъкани, и възможностите за визуализиране на локализацията им и фармакокинетиката *in vitro* и *in vivo*. Темата за създаване на нано-платформи за диагностика и пренос на противоракови лекарства е изключително актуална в областта на тераностичната персонализирана медицина.

Дисертационният труд е в обем от 112 страници и е структуриран в следните раздели – увод (1 страница), литературен обзор (35 страници), цели и задачи (1 страница), методи (9 страници), експериментални резултати и дискусия (44 страници) и включва 40 фигури и 2 таблици. В края на дисертацията са формулирани основните изводи и приноси, представен е списък с използваната литература (цитирани са 214 литературни източника), описани са и наукометричните данни във връзка с представеното изследване (публикации, участия в научни форуми и изследователски проекти).

Авторефератът е подготвен съгласно изискванията и отразява коректно основните резултати и научни приноси на дисертацията.

Уводът представя накратко значимостта на разработването на мултифункционални наноматериали, съчетаващи възможностите за диагностика и терапия, и прилагането им за повишаване както на диагностичния потенциал така и на терапевтичния ефект, и комбинирането им с електрохимиотерапията, което определя научното направление, целта и формулираните основни задачи на дисертационния труд.

Литературният обзор, илюстриран с 14 фигури, представя задълбочен преглед на принципите на електропорацията и приложението ѝ в електрохимиотерапията; съвременните техники за флуоресцентна визуализация на молекули, клетки и тъкани; магнитно-резонансна томография; физико-химични характеристики на нанофлуорофори и квантови точки, и приложението им за визуализиране на клетки, както и мултимодални наночастици, съдържащи квантови точки за мултимодално визуализиране; характеристика на различни класове тераностични наночастици и основните предимства на тераностичната наномедицина. Обзорът е написан стегнато и показва задълбочено познаване на разработваната тема.

В глава Материали и методи са описани подготовката на наночастици, клетъчни култури и експериментални туморни модели; приложените методи за електропориране на туморни клетки и животински модели; модели за анализ на цитотоксичност; методи за визуализация – флуоресцентна конфокална микроскопия, флуоресцентен анализ за визуализиране на локализацията на наночастиците *in vivo*, магнитно-резонансна томография; и спин-ултрафилтрация.

В глава Експериментални резултати и дискусия са представени оригиналните експериментални данни. Установените физико-химични характеристики на набор от флуорофори (FITC, Oregon Green, Rhodamine 6G и квантови точки) за маркиране на полимерзоми и възможността за задържането им в полимерния носител, определят избора на полимерзомите натоварени с квантови точки като най-подходящи за изследванията в дисертационния труд, поради продължителното им задържане (100%) в структурата на наночастиците. Използвани са квантови точки, които не проникват пасивно в клетки и тъкани, в два вида полимерзоми – (i) получени на базата на химично модифициран хитозан и (ii) бимодални хидрогелни наночастици, получени на базата на химично модифициран PEG, маркирани с манганови йони. Сравнено е пасивното проникване на двата вида полимерзоми в туморни клетки и в туморни тъкани в експериментални модели с това след електропорация.

Показано е, че прилагането на електрични импулси с интензитет до 1000 V/cm не влияе върху структурата на наночастиците, а до 500 V/cm на виталността на клетките, и че квантовите точки се задържат дълго време в наночастиците. Наблюдава се най-

висока степен на проникване на QD@Mn@нанохидрогелите в туморни клетки след електропорация при интензитет 1000 V/cm.

При визуализация на тумори в експериментални модели също се наблюдава флуоресцентен сигнал с по-висок интензитет след електропорация. За електропориране на имплантираните тумори в тези модели и избягване на артефакти в изображенията са използвани специално модифицирани електроди с изолирана долна повърхност.

Тествани са възможностите за приложение на QD@Mn@nanogel наночастици като контраст за магнитно резонансна томография и за визуализиране на фармакодинамиката им в колоректален карцином в експериментални модели. Освен в областта на тумора е наблюдаван контраст в бъбреците и пикочния мехур, дължащ се на освобождаване на  $Mn^{2+}$  от QD@Mn@nanogel, както е показано чрез *in vitro* анализ с помощта на магнитно резонансна томография. Тези данни очертават задачи за бъдещи изследвания с цел модифициране на протокола за натоварване и задържане на манган във вътрешността на нанохидрогела.

**Основни приноси на дисертационния труд** Показани са предимствата на наночастиците, съдържащи квантови точки, в сравнение с тези съдържащи флуорофорите FITC, Oregon Green и Rhodamine 6G, за визуализиране и локализиране в клетки *in vitro* и в туморни тъкани в експериментални модели *in vivo*.

Установено е, че електропорирането повишава степента на проникване на натоварените с квантови точки нанозоми в туморни клетки и в експериментални туморни модели в сравнение с пасивното им проникване, и не влияе на задържането на контрастните субстанции в полимерзомите.

Приемам формулираните 6 извода и 3 основни приноса, които добре обобщават оригиналните експериментални факти и определят научната стойност на дисертационния труд.

**Наукометрични показатели** По материалите от дисертационната работа са публикувани 4 научни статии в реферирани международни списания, общият импакт фактор на публикациите е 7. В 2 от публикациите Северина Семкова е първи автор, което показва личния ѝ принос. Забелязани са 3 цитирания на една от работите. Прави впечатление активното участие на докторантката в научни форуми, общо 12 участия, повечето с международно участие, от тях 1 е в чужбина, а останалите в България. Две от участията – на Научна сесия за докторанти и млади учени „Биомедицина и качество на живота“, организирана по повод 145-годишнината на БАН, 2014 г. и на международния конгрес по медицински науки, 2016 г., са наградени. Както броят на статиите, така и нивото на чуждестранните списания, в които са публикувани –

Anticancer Research, Anal. Bioanal. Chem., показват значимостта на тематиката и на получените резултати. Докторантката е участвала в разработването на 7 проекта.

Дисертацията е написана ясно и стегнато, но имам някои критични забележки.

Би било добре да не се използват термини като резолюция вместо разделителна способност, флуоресцентни проби вместо флуоресцентни маркери и други. Форматирането на цитираната литература е необичайно – заглавия и автори на латиница, а “том” и “стр.” са изписани на кирилица.

Не е описано как са анализирани данните от динамично светоразсейване и АСМ за наночастиците QD@Mn@Nanogel и FITC@Mn@Nanogel, и определянето на размерите им. АСМ дава триизмерни образи на изследваните обекти, а на Фигура 30С са представени непълни данни за наночастиците QD@Mn@Nanogel и FITC@Mn@Nanogel, като един от латералните размери липсва. Например на Фигурата за FITC@Mn@Nanogel са посочени ширина 600 nm и височина 15 nm, а в текста ширина 15 nm и дължина 600 nm; същото се отнася за QD@Mn@Nanogel.

#### **Въпроси във връзка с представените резултати**

Има ли данни за статистическото разпределение на размерите на частиците, определени с АСМ?

Какви модификации на процедурата биха довели до задържане или удължаване на задържането на манган в нанохидрогелите?

**Заклучение** Представеният дисертационен труд, получените експериментални резултати и научни приноси, свързаните с него публикации, които вече са получили отзвук в научната литература, и наукометричните им данни надхвърлят препоръчителните критерии на БАН и в частност на ИБФБМИ за придобиване на научната и образователна степен „Доктор”, поради което убедено препоръчвам на Уважаемото Научно Жури да присъди единодушно на Северина Йорданова Семкова образователната и научна степен „доктор” в професионално направление 4.3. „Биологически науки”.

17.02.2017 г.

София

/проф. дбн Стефка Танева/