

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд **“Разработване на мултифункционални бионанопроби на основата на квантови точки: структура, физикохимични характеристики и приложение за флуоресцентни имиджинг анализи и фотосенсибилизация”**, представена от доц. д-р Румяна Атанасова Бакалова–Желева, Катедра “Физика, биофизика и рентгенология”, Медицински факултет на СУ “Св. Кл. Охридски” за присъждане на научната степен “доктор на науките”.

Научна специалност: 4.3. Биологически науки /01.06.08 “Биофизика”/

Рецензент: чл.-кор. Андон Радев Косев, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство” – БАН.

Актуалност на изследванията. Изследванията на доц. Бакалова са свързани с разработването на нанохбридни проби на основата на квантови точки (QD) и приложението им за флуоресцентни и мултимодални образни анализи в *in vivo* или *in vitro* условия, както и евентуални терапевтични приложения на квантови точки. Актуалността на научните изследвания на д-р Бакалова не буди никакво съмнение. Едва през последните 6-7 години с разработването на QD с подходящи характеристики изследванията се насочиха към флуоресцентна образна диагностика *in vivo*. Още в самото начало искам да отбележа, че изследванията на д-р Бакалова имат подчертано приложен характер и не случайно значителна част от получените резултати са защитени с 8 патента.

Обща характеристика на публикационната дейност във връзка с дисертационния труд. В дисертацията си доц. Бакалова е обобщила изследванията си, публикувани в 27 статии (26 от тях на английски и една на японски), излезли от печат в периода 2004 – 2008 г. Основната част от публикациите (17 публ.) са в изключително реномирани международни списания, някои от които с изключително висок импакт фактор: по 1 публ. в *Nature Biotechnology* (IF – 29,495), *Nature Photonics* (IF – 22,869), *Nano Lett.* (IF – 9,991) и *Chemical Communications (Cambridge)* (IF – 5,504); 3 публ. в *J. Am. Chem. Soc.* (IF – 8,580); 2 публ. в *Anal. Chem.* (IF – 5,214); по 1 публ. в *Inorganic Chemistry* (IF – 4,657), *Bioconjugate Chemistry* (IF – 4,350); *Appl. Phys. Lett.* (IF – 3,554); 2 публ. в *J. Nanosci. Nanotechnol.* (IF – 1,435); и по 1 публ. в *J. Photochem. Photobiol. B* (IF – 1,871) и *Gen. Physiol. Biophys.* (IF – 0,741). Публикуването в споменатите по-горе списания само по себе си е атестат за качеството на изследванията и значимостта на получените

резултатите. Това предварително впечатление се засилва и от големия брой отзиви и цитирания на статиите (към момента над 550). Освен публикациите в списания с импакт фактор (17 публ.), една от публикациите е в специализирано списание на японски език и още една статия е публикувана в международна поредица “Nanotechnologies for the Life Science”. Останалите 8 публикации са в сборници материали от научни форуми.

Принос на д-р Бакалова в публикациите. За мен водещата роля на Р. Бакалова-Желева в обобщените в дисертационния труд работи не буди съмнение. Тя е първи автор на 13 работи, като дела на работите в публикациите в списания с импакт фактор, в която е водещ автор, е още по-голям (в 10 от 17 публ.). трябва да се отбележи, че д-р Бакалова е кореспондиращ автор на почти всички публикации с импакт фактор (16 публ. от 17). Тя е съавтор на 8 патента и е ръководител на един финансиран проект /Ministry of Science, Labor and Technology of Japan/, като темата на проекта “Nanobioprobes for multimodal imaging diagnostics of cancer in experimental animals” напълно съвпада с темата на дисертацията. Тя е участник и в научния колектив на още един финансиран договор, имащ пряко отношение към темата на дисертацията (“Target-selective magnetic resonance imaging of colon cancer in experimental animals using originally synthesized multifunctional bionanoprobes” финансиран от: President of the National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Japan).

Обща характеристика на дисертационния труд.

Дисертацията е написана на общо 275 страници и е илюстрирана с 87 фигури, 19 схеми и 23 таблици. Използван е добър и най-вече максимално разбираем научен език. Мисля, че някои от чуждите (включително “имджинг”) могат бъдат избегнати. Би било по-добре таблиците и текстът към фигурите и схемите да са на български. Качеството и информационната стойност на илюстрациите е много високо, като това определено допринася за възприемането на текста на една специфична и не толкова лесна за възприятие област.

Дисертацията има сравнително традиционната структура. Литературният обзор обхваща 75 страници, като отразява актуалното състояние на проблема и напълно изпълнява предназначението си – да изведе целите и задачите на собствените изследвания и да служи за дискусия на получените собствени резултати. За актуалността на литературния обзор може да се съди и от цитираната

литература – общо 526 заглавия (всичките на английски), 80% от тях са публикувани през последните 10 години (след 2000 г), а 42% са излезли от печат през последните 5 години (след 2005 г).

Целите (3 на брой) на изследванията и съответните конкретни задачи (8 на брой) следват логично от направения обзор. Трите формулирани цели са тясно свързани помежду си в съответствие и с определено приложния характер на изследванията.

Разделът “Материали и методи” прави впечатление с изключителната си стегнатост, като на 23 страници са изложени голям набор от препаративни и аналитични методики и методи за конюгиране на водоразтворими QD с биоорганични лиганди.

Основният и най-голям по обем раздел “Експериментални резултати и дискусия” (118 стр.) е написан в монографичен стил, което заедно с илюстративния материал (цветни фигури и схеми) улеснява възприемането и осмислянето на резултатите от изследванията.

В първата част на раздела са изложени изследванията, свързани със синтеза и следващата обработка за получаването на QD подходящи за образен биоанализ, като по-важните резултати са:

- при “стайна” температура на нуклеиране и растеж (22-25°C) са получени CdSe нанокристали, характеризиращи се с “deep-trap” флуоресценция с висок квантов добив (~ 40-50 %) и много малки и хомогенни размери (~2 nm) на кристалното ядро, висока колоидна стабилност във физиологични разтвори и телесни течности, дълго време на полуживот на флуоресценцията. Синтезата е високовъзпроизводима и представлява оригинален метод, защитен с патенти. Известен недостатък е широката флуоресцентна емисия на QD, който се компенсира от другите му качества. Малките размери и високият квантов добив позволяват конюгирането на няколко QD върху една макромолекула и усилването на флуоресцентния сигнал, идващ от тази молекула. За първи път е показана възможността за получаване на такива QD-конюгати;

- разработен е нов метод за получаване на QD CdSe в условията на бавно нарастващ температурен градиент. Методът е високовъзпроизводим, изолират се няколко хомогенни по размер фракции от една реакционна система. Процесът се характеризира с прецизен контрол на растежа на наночастиците и възможност за

изолиране на фракции с желани размери и фотофизични свойства. Този метод също е защитен с патент. QD-фракциите се характеризират с хомогенен размер, висок квантов добив (~ 35-62 %), фокусирана (“band-edge”) флуоресцентна емисия и висока колоидна стабилност в органичен разтворител. Пасивирането на повърхността на наночастиците с обвивка ZnS води до повишаване на квантовия добив до 42-73 % в органичен разтворител. Водоразтворимите QD CdSe/ZnS, получени чрез замяна на хидрофобните координационни лиганди с хидрофилни, се характеризират с квантов добив 14-20%, фокусирана флуоресцентна емисия и висока колоидна стабилност. Наличието на няколко (6 и повече) фракции с различен размер и съответно различни максимуми на емисия дава възможност за мултиплексни образни анализи;

- Показано е, че свободните кадмиеви и селениеви прекурсори в непречистени QD CdSe са основен фактор за пасивиране на повърхността на кристалните ядра при “стареене” в органичен разтвор. Този процес на “самопасивиране” на QD CdSe прави възможно модифицирането на структурата и спектралните характеристики, което безспорно има важно практическо приложение – повишаване на квантовия добив на наночастиците в органичен разтворител.

Основният недостатък на споменатите по-горе водоразтворими QD CdSe/ZnS с фокусирана флуоресцентна емисия е сравнително ниския квантов добив. Това се дължи на директния пренос на наночастиците от органична във водна фаза, чрез замяна на хидрофобните координационни лиганди с амфифилни.

Във **втората част** на раздела “Експериментални резултати и дискусия” са описани изследванията, свързани с разработването на оригинален метод за опаковане на наночастиците CdSe/ZnS, така че да бъдат подходящи за мултиплексен и мултимодален образен анализ:

- Разработен е оригинален метод за получаване на водоразтворими QD CdSe/ZnS чрез запазване на хидрофобните координационни лиганди около кристалното ядро и опаковането на „QD-мицела” в силика-шел. Така получените QD се характеризират с тесни спектри на флуоресцентна емисия, висока колоидна стабилност и висок квантов добив в дестилирана вода (30-40%). Конюгирането им с полиетилен гликол (PEG) повишава колоидната им стабилност във физиологични разтвори. Капсулираните в силика-шел “единични QD-мицели” се оказват

подходящи за *in vitro* и *in vivo* образни анализи. Те и методът за получаването им са защитен с патент;

Третата част на раздела “Експериментални резултати и дискусия” е посветена на разработването на таргет-специфични QD-проби и прилагането им в биомедицински анализи *in vitro*.

- На базата на водоразтворими QD CdSe с „deep-trap” флуоресцентна емисия са разработени две таргет-специфични флуоресцентни проби - QD-лектин и QD-антитяло;

- Показано е, че QD-лектинът е подходящ флуоресцентен маркер за идентифициране на високодиференцирани левкемични лимфоцити от нормални лимфоцити с флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия. Пробата е защитена с патент;

- Показано е също, че конюгатите QD-антитяло са подходящи за анализ на вътреклетъчни антигени във фиксирани клетки, с използване на флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия;

- Разработени са два високочувствителни QD-базирани имуноблот анализа на протеини с флуоресцентна детекция (“моно-тип” и “тип сандвич”). Анализът “тип сандвич” позволява детекция на протеини, намиращи се в много ниски количества в клетъчния лизат, без предварителната им преципитация и концентриране, което съкращава времето за анализа. Процедурата е защитена с патент;

- На базата на QD-олигонуклеотидните хибриди е разработен *in vitro* анализ, базиран на флуоресцентен резонансен енергетичен пренос (FRET-анализ) за селекция на интерферираща РНК с малки размери (siRNA) с висок афинитет към таргетната матрична РНК. Показано е, че разработеният метод може да се използва и за прогнозиране на ефективността на siRNA секвенциите по отношение на регулацията на генната експресия, преди да бъдат трансфектирани в клетки и анализирани със стандартните молекулярно-биологични тестове.

В четвъртата част на раздела “Експериментални резултати и дискусия” са изложени резултатите от разработването на биопоносими QD-проби и прилагането им за образен анализ на експериментални животни *in vivo*. В тази част са показани резултати, имащи съществено значение в изключително важна приложна област.

- Показано е, че обвитите в амфифилни катионни дендримери, но некапсулирани QD имат цитотоксично действие и не са подходящи проби за *in*

in vivo анализи. Показано е също, че капсулираните в анионни денримери QD не показват цитотоксични ефекти (в концентрации до 500 nM). При инжектирането им в плъхове не се наблюдават промени във физиологичните характеристики на животното и са подходящи за визуализиране на кръвоносни съдове *in vivo*;

- Разработена е QD-проба за приложение в *in vivo* анализи. Пробите са капсулирани в силика-обвивка и конюгирани с полиетилен гликол QD CdSe/ZnS. Пробата е подходяща за визуализиране на кръвоносни съдове до 600-700 μm дълбочина под мозъчната кора с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия. При интравенозното ѝ инжектиране в плъх (до 1 $\mu\text{mol/kg b.w.}$) не се наблюдават промени в кръвното налягане и сърдечния ритъм на животното, а до 400 nmol/kg b.w. не се наблюдават и промени в диаметъра на мозъчните кръвоносни съдове. QD-пробата позволява да се визуализират кръвоносни съдове с диаметър 6-10 μm в 3D проекция с продължително скениране. Показани са предимствата на разработената проба от конвенционалните за тази цел проби (например, FITC-декстран);

- На базата на капсулирани в силика-обвивка QD CdSe/ZnS са разработени две мултифункционални QD-проби. Конюгирането на капсулирани в силика-обвивка и PEG-илирани QD-проби с хелатори за парамагнитни йони, позволяват разработването на проби с две и повече образни модалности. Показано е, че и двете мултимодални проби се характеризират с висок флуоресцентен и MRI контраст и са подходящи за визуализиране на тумори в експериментални животни *in vivo* на базата на ангиогенезата, чрез използване на флуоресцентен имиджинг и MRI.

В последната **пета част** на раздела “Експериментални резултати и дискусия” са показани и потенциалните възможности на QD-пробите за фотосенсибилизация на ракови клетки. Използвана е QD-проба на базата на водоразтворими наночастици CdSe с широк спектър на емисия, конюгирани с анти-CD90 антитяло за фотосенсибилизация на туморни клетки при облъчване с ултравиолетова светлина. Макар и кратка тази част от експерименталните резултати демонстрират големия потенциал на QD-пробите за фотодинамична терапия на тумори.

Макар, че изводите са малко дълги и в тях са включени и най-съществените части от резултатите, те са добре формулирани и дават ясна представа за получените резултати и тяхната значимост. А тези резултати без съмнение представляват нови знания за разработването на мултифункционални бионанопроби на основата на квантови точки. Тези резултати с приносен характер имат и определена приложна насоченост. По принцип нямам никакви възражения по същество и към приносите, така както са формулирани от автора.

Представеният ми автореферат отразява добре проведените изследвания и получените резултати.

Нямам критични забележки, които по същество да повлияят високата ми оценка на дисертационния труд.

Заключение: Цялостното ми впечатление от дисертацията е отлично. Актуалността на изследванията е без всякакво съмнение. Добре формулираните цели с конкретните изследователски задачи, следват логично обзора на литературата. Последният представя актуалното състояние на проблема и е написан на подходящ език (разбира се могат да се положат усилия да се избегне употребата на някои чуждици). Обзорът на литературата представлява сам по себе си едно полезно четиво за специалисти и дори за студенти. Изследванията са направени на високо методологично ниво, а получените резултати имат значителен приносен характер, нещо което се потвърждава и от изключително големия брой цитирания на публикациите, свързани с дисертацията. Моето лично мнение е, че тази дисертация представлява комплимент не само за катедрата “Физика, биофизика и рентгенология”, но и за Медицинския факултет на СУ “Св. Кл. Охридски”.

Всичко казано по-горе, както и фактът, че са изпълнени и изискванията на Закона за развитие на академичния състав и на Правилника за неговото приложение ми дава основание без резерви да препоръчам на уважаемите членове на журито да присъди на Румяна Атанасова Бакалова–Желева научната степен “доктор на науките”. Не се съмнявам, че достойнствата на дисертационния труд ще бъдат оценени от журито с подobaващо мнозинство.

16.09.2011 г.

Рецензент:

София

/чл.-кор. Андон Р. Косев/