

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд **“Разработване на мултифункционални бионанопроби на основата на квантови точки: структура, физикохимични характеристики и приложение за флуоресцентни имиджинг анализи и фотосенсибилизация”**,

на 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: доц. д-р Божидар Петков Галуцов, кат. Биофизика и радиобиология, Биологически факултет, СУ “Св. Кл. Охридски”

Разработването на нови методи за образна диагностика за нуждите на медицината, на основата на съвременни високотехнологични подходи, насочва през последните години вниманието на изследователите към нанокристалите, които притежават уникални свойства. Те се определят от структурата на кристала и възможността за получаване на нанохибридни проби, специфично взаимодействащи с биологичните молекули и са приложими за флуоресцентна образна диагностика *in vivo* и *in vitro*, както и за терапевтични цели. Изследванията на доц. Бакалова са изцяло насочени в това перспективно направление и допринасят за разширяване на възможностите за практическо приложение на нанокристалите в медицината. Актуалността и значението на получените от дисертантката научни резултати и разработки се потвърждава от факта, че значителна част от тях са защитени с международни патенти.

Представената дисертация е написана на 275 страници, от които 75 стр. – Обзор, 2 стр. – Цели и задачи, 22 стр. – Материали и методи, 121 стр. – Резултати, обсъждане и изводи, 36 стр. – Литературни източници (526 заглавия, в голямата си част публикувани след 2000 г), 5 стр. – Приложения.

Публикациите, отразяващи резултатите в дисертацията са публикувани в 27 статии, от които една на японски език. Те са излезли от печат в периода 2004-2008 год. 17 от тях са в списания с висок импакт фактор и авторитет като *Nature Biotechnology*, *Nature Photonics*, *Nano Letters*, *Chemical Communications (Cambridge)*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Anal. Chem.*, *Inorganic Chemistry*, *Bioconjugate Chemistry*, *Appl. Phys. Letters*. 8 статии са публикувани в материали на научни форуми и една статия в поредицата *Nanotechnologies for the Life Science*. В 16 от статиите в списания с импакт фактор Румяна Бакалова е кореспондиращ автор, а в 13 работи е първи автор, което недвусмислено показва нейният основен принос в разработките. Общият импакт фактор на публикациите, е 122.7. Съавтор е на 8 международни патента, ръководител и участник в два проекта по темата на дисертацията. Високият ѝ международен авторитет е отразен и в големия брой цитирания – над 500 до настоящия момент.

Литературният обзор е написан стегнато, с точни формулировки и включва илюстративен материал от 25 фигури и 8 таблици. Представени са проблемите пред флуоресцентната образна диагностика и е съсредоточено вниманието върху флуоресцентните наночастици с техните фотофизични физикохимични характеристики, методите за получаване на високо флуоресцентни CdSe и CdSe/ZnS нанокристали, за модифициране на повърхността им с биологично поносими обвивки и създаване на Квантови точки-проби (КТ-проби) със специфични, мултифункционални и биологично-активни свойства, изискванията за приложението им в *in vivo* анализите. Последователно са разгледани различните приложения на флуоресцентните КТ-проби за биомедицински анализи *in vitro* и *in vivo* и подходите при създаване на мултимодални КТ-проби. Последната глава от обзора е посветена на използването на КТ като фотосенсибилизатори при терапията на тумори. Като цяло литературният обзор е написан с логична последователност, компетентно отразява достиженията в областта и благодарение на високата информативност на илюстративния материал и точните формулировки го прави разбираем дори за неспециалисти.

Целите и задачите са представени стегнато, точно и конкретно. Описанието на използваните методи и подходи отразява високата

експериментална компетентност на дисертантката при прилагане на съвременни физикохимични, биохимични и биофизични методи, а подробностите в отделните методики ги правят лесно възпроизводими.

Първият раздел на експерименталната част на дисертацията е посветен на разработването на нов подход при получаване на КТ, а именно чрез нуклеиране и растеж при „стайна температура“. За първи път, при ниски температури – 22-25°C са получени CdSe нанокристали, отличаващи се с хомогенни размери до 2 nm (доказано чрез трансмисионна електронна микроскопия и рентгеноструктурен анализ), висок квантов добив (40-50% в PBS буфер), изключително висока водоразтворимост със запазен флуоресцентен квантов добив, без наложително пост-синтетично пасивиране на повърхността с неорганична или органична обвивка, както и продължителен полуживот на флуоресценцията (20-40 ns в PBS). Най-флуоресциращи водоразтворими КТ са получени при използване на меркаптосукцинова киселина като повърхностно-модифициращ лиганд (квантов добив – 50%). Резултатите са защитени с патент. Неудобството от широкия спектър на излъчване на така получените КТ се компенсира от много малките им размери и високия квантов добив, което позволява конюгирането на няколко КТ с една биомакромолекула, което до този момент е било непостижимо поради големите размери на КТ, получени при висока температура.

Подробно е описано получаването на КТ CdSe с висока “band-edge” флуоресценция при растеж в бавно увеличаващ се температурен градиент. От една система е постигнато изолиране на шест различаващи се по размер хомогенни фракции в диапазона от 2.2-4.3 nm, като експериментално е доказана необходимостта от поддържане на съотношението Cd:Se в определени граници за предотвратяване на агрегацията и за постигане на тесен спектър на излъчване. Методът е защитен с патент.

Показана е ролята на концентрацията на Cd- и Se-прекурсори за изменението на спектралните характеристики на непречистени CdSe КТ по време на „стареене“ за 12 часа при стайна температура в органични разтворители, както и способността им да повишават интензитета на флуоресценцията в хода на „стареенето“ от 11-27% в хлороформ и от 5-20% в

бутанол. При КТ CdSe, синтезирани при „стайна температура“, добавянето на Cd Se предизвиква драстично изменение на абсорбционния и емисионния спектри на частиците, което не се наблюдава при КТ синтезирани при 120°C. Това повърхностно „самопасивиране“ на КТ CdSe дава възможност за пост-синтетична модификация на структурата и спектралните им характеристики.

Във втората част е разработена оригинална стратегия за получаване на водоразтворими наночастици CdSe/ZnS за мултиплексни и мултимодални анализи. Основно изискване при използването на КТ-проби за биологични анализи е да се снижи до минимум тяхната цитотоксичност. За целта са получени стабилни единични лиганд-координирани КТ-мицели, капсулирани в силика-обвивка. ТЕМ показва сферична форма на частиците с диаметър около 17.4 nm и висока хомогенност. Над 92% от популацията са частици изградени от 1 КТ и една силика-обвивка, а повърхността е положително заредена. Водният разтвор на така получените частици е с висока прозрачност, висок квантов добив (30-40%) и висока колоидална стабилност във физиологичен разтвор, особено при конюгиране на повърхността с полиетиленгликол. Създадени са 2 мултимодални КТ-проби с хелатори за парамагнитни йони, свързани с мицела и/или обвивката, и конюгирани на повърхността. При първата проба (оригинална) с Resolve-AlTM/Gd, мицеларната структура около КТ позволява включването на хидрофобни субстанции в силика-обвивката като ¹⁹F- и ¹⁴C-белязани мастни киселини, Gd- и Mn-йони, които са най-често използвани в образната диагностика. Хидрофобният мицел предпазва кристалното ядро от окисление и запазва флуоресцентния добив, а аминокфункционализираната повърхност е готова за конюгиране с биологично-активни лиганди.

В третата част е са изложени резултатите по създаването на таргет-специфични КТ за биомедицински анализи с флуоресцентна детекция *in vitro*. Получените КТ-SBA проби успешни са приложени за визуализация на левкемични клетки от линии Jurkat, MOLT-4, Raji и Daudi, характерни за различни кръвни патологии. Направеното сравнение с конвенционално белязания с флуоресцентни маркери (Alexa, FITC) SBA показва недвусмислено голямото преимущество на КТ-SBA пробата по отношение на флуоресценцията

и нейната продължителност при непрекъснато осветяване (четирикратно по-висок интензитет на флуоресценцията и близо трикратна по-висока продължителност). Пробата е патентована.

Създадени са КТ-проби конюгирани с антитела срещу β -актин, ламин A/C и c-alb и чрез флуориметрия и конфокална микроскопия е доказано, че нанопробите показват същите резултати, както конвенционалните флуорофори.

С помощта на разработените два чувствителни имуноблот анализа – „моно-тип” и „сандвич” е показано, че могат да бъдат установени бързо белтъци в ниски концентрации, без необходимост от предварителна преципитация и концентрация, като КТ-сандвичов тип са с много по-голяма чувствителност. Процедурата е защитена с патент.

Чрез FRET-анализ е показано че КТ, конюгирани с олигонуклеотиди могат да бъдат използвани за високоспецифична селекция на siRNAs, по отношение на иРНК, респ. за прогнозиране ефективността на siRNA при регулацията на генната експресия и за потвърждаване на резултатите от microarray анализа.

Особено важна в практически аспект е предпоследната част от дисертацията, посветена на получаването на КТ-проби за флуоресцентна мултимодална образна диагностика *in vivo*. Доказано е, че КТ-капсулирани в анионни дендримери КТ нямат цитотосичен ефект и успешно могат да бъдат прилагани чрез двуфотонно възбуждане за визуализиране на мозъчни кръвоносни съдове, на дълбочина до 600-750 μm под мозъчната кора. Посочена е важната роля на ПЕГ в структурата на КТ. Пробите не променят кръвното налягане, сърдечния ритъм и размера на съдовете – до 20 мин след инжектирането.

Реализирани са КТ-проби в силика-обвивка, ПЕГ и хелатори с време на полуживот на мултимодалните частици от 90 минути, което ги прави удобни за интравенозно въвеждане и локализиране на местата на туморообразуването. Високата чувствителност позволява диагностициране в ранни етапи от развитието на туморите.

В последната част са посочени проучванията за потенциалното използване на КТ-проби за фотосенсибилизация на ракови клетки. Показан е фотосенсибизиращ ефект върху левкемични клетки при облъчване с ултравиолетова светлина. Тези първи резултати са патентовани и публикувани. По-късно са потвърдени от редица изследователи.

Изводите са конкретни и отразяват точно получените резултати и тяхното значение. От особено значение е, значителна част от изследванията са пионерни и представляват принос в разработването на КТ-проби с различно медицинско приложение – биомедицински анализи, флуоресцентна образна диагностика и терапия.

Приносите на настоящата дисертация са ясно формулирани и могат да бъдат приети без забележки.

Имам някои бележки, които са по-скоро към оформлението на дисертацията: не е прието текста към фигурите да бъде на английски език, многократно се споменава PBS-буфер при различни методики, но не е описан състава и моларността му, има несъответствие между легендата и текста под графиката на фиг.48. Тези бележки не намаляват в никаква степен стойността на дисертацията.

Заключение: Представената дисертация е на високо научно ниво и е посветена на актуалния въпрос за приложение на нанотехнологиите в биологията и медицината. Целите и задачите, които си е поставила дисертантката са отлично обосновани в литературния обзор, който може да бъде използван като научно помагало за студенти и научни работници. Проведените изследвания са на високо методично ниво с използване на съвременни методи. Приносът ѝ в световната наука е безспорен и се потвърждава от големия брой цитирания на трудовете и по дисертацията.

Всичко казано дотук ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемите членове на журито да присъди на Румяна Атанасова Бакалова–Желева научната степен “доктор на науките”.

10.09.2011 г.

Рецензент:

/Доц. Д-р Б. Галуцов/