БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ЕЛЕКТРОНИКА
Вх. № 183 / 06.03 20

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „доктор"
по професионално направление 4.1 Физически науки (специалност „Физика на вълновите процеси")
на тема " Флуоресцентна спектроскопия на биологични тъкани за туморна диагностика",
с автор Цанислава Иванова Генова,
редовен докторант в Институт по електроника, Българска академия на науките

Рецензент: доц. д-р Таня Николова Драйшу,
Институт по електроника, Българска академия на науките,
член на научно жури съгласно Заповед No. 170/13.12.2019 г. на Директора на ИЕ-БАН

1. Кратки биографични данни за докторанта

Цанислава Иванова Генова е завършила през 2014 г. Физическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски" като магистър със специалност „Медицинска физика". От 01.01.2015 до 05.03.2019 г.е редовен докторант в Института по електроника – БАН, отчислена с право на защита. Работила е като физик в ИЕ-БАН (09.2013-10.2018) и като продуктов специалист „Оптични инструменти" във фирма Аквахим АД (08.2018 - 10.04.2019). От 10.04.2019 г. е изследовател по НП „Млади учени и пост-докторанти" в ИЕ-БАН.

Представен е списък за участие в изпълнението на работната програма на две COST-акции, на 10 научни проекта, финансирани от ФНИ, и на 1- по междуакадемичен обмен. Цанислава Генова е била ръководител на проект по Програмата за подпомагане на младите учени и докторанти в БАН – 2016 г. Участвала е в стажантска програма за чуждестранни студенти и докторанти на École Polytechnique, Франция.

По време на докторантурата си е била отличена с награди за най-добър постерен доклад на IV^{та} Национална студентска научна сесия по физика и инженерни технологии, 2015, Пловдив, България и на 19th International Conference and School on Quantum Electronics "Laser Physics and Applications", 2016, Созопол, България, а също така и със стипендия на World Federation of Scientists в рамките на Националната стипендиантска програма за 2016 г.

За обучението си в докторантура Цанислава Генова е получила 1114 кредита, много повече от необходимите 250 за откриване на процедура по защита.

2. Общо описание на представените материали

Дисертацията е в обем от 127 страници и отразява резултатите от 10 публикации, от които 3 статии с импакт-фактор и 6 - с импакт ранк. Състои се от увод, две глави и заключение. Цитирани са 178 литературни източника. Резултатите по подходящ начин са илюстрирани с 42 фигури и 16 таблици. Представени са също автореферат, автобиография, списък на публикациите и на изнесените доклади на конференции, включени в дисертацията,

както и таблица със събраните кредити по изпълнение на образователната и научната програми.

3. Характеристики и оценка на дисертационния труд

3.1. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Навременната терапия при ранна диагностика на онкологични заболявания води до много по-голям процент преживяемост на пациентите. От съществено значение за подобряване на диагностичната точност е разширяването на методите за ранна диагностика. Развитието на оптични методи за медицинска диагностика е важна съвременна изследователска област, насочена към създаване на точни, неинвазивни и безопасни техники за диагностика на сериозни заболявания на човешките тъкани.

Целите на дисертацията са да бъдат систематично изследвани спектралните характеристики на тъкани на гастроинтестиналния тракт (ГИТ) с използване на методите на флуоресцентната спектроскопия и синхронна флуоресцентна спектроскопия, както и създаване на методи за ранна, безконтактна диагностика на патологични изменения в изследваните човешки тъкани и диференциация на техните фази. За постигане на тези цели са формулирани 4 конкретни задачи, чието решаване да доведе до създаване на комплексни подходи за ранна, безконтактна диагностика на човешки тъкани в реално време. Всичко това за мен по безспорен начин говори за актуалността и обществената значимост на темата и целите на дисертационния труд.

3.2. Познаване на съвременното състояние на изследванията по проблема

Дисертационният труд започва с Увод, в който е направен кратък анализ на актуалните проблеми при прилагане на автофлуоресцентни методи за диагностика на туморни образования в ГИТ, на базата на който са формулирани основната цел на дисертацията и съответните изследователски задачи.

В литературния обзор (Глава 1, 44 страници, структурирана в 6 раздела) са разгледани процесите на взаимодействие на оптичното лъчение с биологичните тъкани и оптичните свойства на самите тъкани. Представени са основите на използваните в дисертацията техники за флуоресцентна спектроскопия на биологични тъкани – синтезиране на матрици на възбуждане и флуоресценция, синхронна флуоресцентна спектроскопия и поляризационна флуоресцентна спектроскопия. Направеният литературен обзор показва добро ниво на познаване на съвременното състояние на изследванията, свързани с приложение на флуоресцентните методи за диагностика на гастроинтестиналните тумори и разграничаването им от здрава тъкан. Подробно са изложени и анализирани експериментални резултати, получени от други автори. Очертани са съществуващите проблеми при диагностика на гастроинтестиналните тумори и разграничаването им от здрава тъкан, като е поставен акцент върху недостатъчната диагностична точност на изполваните методи. За решаване на този проблем е необходимо да се идентифицират и използват високо информативни и достатъчно специфични диагностични параметри, базирани на

флуоресценцията на тъканите в норма и патология. За изпълнение на тази задача в дисертацията е проведено детайлно изследване на флуоресцентните характеристики на туморна и на здрава тъкан, с отчитане на техния тъканен произход и диагностично значение.

По мое мнение, докторантката е много добре запозната с изследванията по разглежданата тематика и с постигнатите от други групи резултати, както и с методите и подходите, необходими за постигане на поставената цел. Забележката ми към тази част на дисертацията е свързана с наличието на технически грешки в четири уравнения от Раздел 1.1, както и на някои печатни и пунктуационни неточности при оформянето на текста, които съм коментирала с дисертантката.

3.3. Характеристика на получените резултати и оценка на научните приноси

Изследванията и получените резултати с приносен характер са представени във втора глава на дисертацията, озаглавена "Експериментална част" (47 стр., структурирана в 6 раздела). В началото отново накратко са представени използваните спектрални методи и техники за флуоресцентна спектроскопия – синтезиране на матрици на възбуждане и флуоресценция (EEM флуоресцентна спектроскопия), синхронна флуоресцентна спектроскопия (СФС) и поляризационна флуоресцентна спектроскопия. След анализ на литературните данни, представени в Глава 1, са избрани работните спектрални дипазони на възбуждане и детектиране на флуоресценцията. Представени са и два микроскопски метода - конфокална флуоресцентна микроскопия и двуфотонна микроскопия, провеждането на които е осъществено в Политехническия университет - Букурещ и Саратовския държавен университет. Микроскопските изследвания дават възможност за детайлно наблюдаване на изменението на структурата на тъканта при канцерогенезата.

За провеждане на изследванията са избрани 31 тъканни образци от различни части на ГИТ, представящи различни стадии на развитие на туморните лезии, както и 14 стандартни хистологични срезове. Изследваните тъканни образци са получени по време на хирургични интервенции в УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ" за отстраняване на туморни образувания, а хистологичните срезове са подготвени в отделението по патоанатомия на същата болница, с разрешение на Етичната комисия на болницата.

Получените експериментални данни, при приложение на представените по-горе спектрални методики, са изложени подробно. Флуоресцентните спектри на здрава и на туморна тъкан са анализирани детайлно, използвайки литературни данни за флуоресценцията на флуорофорите в чисто състояние и за тъканната флуоресценция. В резултат са идентифицирани флуорофорите, които имат принос за наблюдаваната флуоресценция от ГИТ тъкани. Експериментално са установени характерни разлики във флуоресцентните спектри на туморна и на здрава тъкан, дължащи се на флуоресценцията на аминокиселините тирозин и триптофан, структурните протеини колаген и еластин, коензимите редуциран никотинамид аденин динуклеотид (НАД.Н) и флавин аденин динуклеотид (ФАД) и порфирините. Проведен е подробен анализ за установяване на диагностичното значение на наблюдаваните спектрални особености.

Експериментално е наблюдаван по-висок интензитет на флуоресцентния максимум в спектъра на туморна тъкан спрямо максимума в спектъра на здрава тъкан на ГИТ за аминокиселините тирозин и триптофан и ендогенните порфирини и по-нисък интензитет на флуоресцентните сигнали на структурните протеини колаген и еластин. Дисертантантката обосновава тези резултати анализирайки патологичните изменения, възникващи при развитие на туморните образувания. Този анализ води и до интерпретиране на наблюдаваното увеличаване или намаляване на интензитета на флуоресцентния максимум на НАД.Н (400-600 nm) в зависимост от специфичните метаболитни изменения при развитие на туморните клетки. Анализирана е и зависимостта, по която се изменя интензитетът на регистрираните флуоресцентни сигнали в зависимост от стадия на развитие на туморното образувание. Това е осъществено чрез регистрация на флуоресцентни спектри на тумори в различни стадии на развитие от един пациент, без да са повлияни от специфични междупациентни разлики.

За оценка на диагностичната стойност на наблюдаваните експериментално разлики във флуоресцентните тъкани на туморна и на здрава тъкан е използван статистически анализ. В резултат е демонстрирано, че статистически значими разлики за осреднените спектри на туморна и здрава ГИТ тъкан се наблюдават за флуоресцентните максимуми на аминокиселините тирозин и триптофан и структурните протеини колаген и еластин. За флуоресцентния максимум на НАД.Н са получени статистически значими разлики за случаите на тумори в напреднал стадий на развитие.

Съществен резултат, получен при работата върху дисертацията, е създаване на алгоритми за ранна диагноза и разграничаване на туморни образувания на базата на регистрираните спектрални характеристики. За прилагане на алгоритмите в реално време, без необходимост да се отчитат апаратни функции, са избрани параметри, базирани на съотношения на интензитети на флуоресценцията за определени дължини на вълните. Като най-подходящи за максимално разграничаване на туморна от здрава тъкан са избрани дължини на вълните на възбуждащата светлина от 310, 340, 370 и 420nm, а за синхронната флуоресцентна спектроскопия - отместване от 60, 90 и 120nm, като за всеки един от тези случаи са определени и изследвани съответните диагностични параметри. Най-висока диагностична точност (95%) е получена за съотношението на интензитетите на флуоресцентните спектри с максимуми 385 nm и 457 nm, при регистрация в режим на синхронна флуоресцентна спектроскопия с отместване 90 nm и възбуждане в диапазона 280-440 nm.

Научните и научно-приложни приноси на дисертацията са резултат от успешно решените поставени задачи. Те могат да бъдат обобщени в следните групи:

- Създаден е протокол за изследване на флуоресцентните характеристики на гастроинтестинални тъкани при прилагане на флуоресцентна спектроскопия, като за първи път е приложен методът на СФС за анализ на тъкани на долен ГИТ.

- Изследвани са флуоресцентните свойства на човешки тъкани на долен ГИТ ex vivo и са определени диагностично-значимите изменения, настъпващи във флуоресцентните

спектри при патологични промени. Създадени са диагностични схеми за анализ и разграничаване на гастроинтестинални туморни образувания на базата на флуоресцентните им свойства.

- Създадени са алгоритми за ранно откриване на тумори на долен ГИТ и са определени диагностично-значимите флуоресцентни характеристики, позволяващи разграничаване по тип и степен на развитие на туморните образувания в гастроинтестиналния тракт. Показано е, че при така подбраните спектрални параметри, се достигат по-високи чувствителност и специфичност на новите диагностични методи, базирани на ЕЕМ и СФС детекция на тумори на ГИТ в сравнение със стандартно прилаганите клинични методи.

- Създадени са комплексни подходи за ранна, неинвазивна диагностика на тъкани на долен ГИТ в реално време, основани на спектралните ЕЕМ и СФС характеристики, даващи възможност за разширяване на клиничното приложение на флуоресцентната спектроскопия за ранна и точна диагностика на злокачествените ГИТ образувания.

4. Публикации по дисертационния труд и оценка на личния принос на дисертанта

Дисертационният труд се базира на 10 научни труда, от които 3 са публикувани в специализирани списания с импакт-фактор (Quantum Electronics, Optical and Quantum Electronics и Bulgarian Chemical Communications) и 6 – в списания с импакт-ранк (Proc. SPIE - 4, AIP Conf. Proc. и Frontiers of Optoelectronics). Резултатите са докладвани на 12 международни и 2 национални конференции. До момента са забелязани 3 цитирания от чуждестранни автори на включените в дисертацията статии. Тези наукометрични показатели ясно доказват научната стойност, актуалността и значимостта на изследванията и получените резултати.

Имайки предвид, че дисертантката Цанислава Генова е първи автор на 9 от 10те публикации и на 14 от 15те изнесени доклади на конференции, считам, че приносът й при провеждане на експериментите и представяне на резултатите от изследванията е добре очертан.

Познавам Цанислава Генова от постъпването й в Института по електроника. Като член на комисиите за провеждане на изпит за редовна докторантура и на изпит по специалността съм с много добри впечатления от нейната обща и специализирана физическа подготовка. Считам, че тя се отнася сериозно и задълбочено към поставените й задачи. С отлични впечатления съм и от активното й участие в международни школи и конференции и от представянето на доклади на научни форуми, доказателство за което са спечелените награди.

5. Оценка на автореферата

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява коректно и достатъчно изчерпателно основните резултати и научни приноси на дисертацията.

5. Критични бележки и въпроси

Дисертацията е цялостен и логически последователен труд, написан на добър български език, въпреки наличието на редица пунктуационни и печатни грешки. Някои забелязани технически грешки вече споменах по-горе. Смятам, че отбелязаните пропуски не влият съществено на качеството на дисертацията и не променят високото ми мнение за нея и за личния принос на дисертантката.

Към дисертантката имам въпрос относно статистическата обработка на експерименталните резултати. В някои области на физиката, статистическата обработка предполага набор от, например, няколко хиляди измервания. Нерядко, обаче, особено в области като медицинската физика, е необходимо да се оценява статистически достоверността на диагностични хипотези въз основа на ограничен обем експериментални данни. Във връзка с това, бих помолила дисертантката да коментира какъв е минималният обем данни (образци), осигуряващи достатъчна степен на достоверност на изводите в областта на флуоресцентната спектроскопия на биологични тъкани.

Вторият ми въпрос е свързан с приложението на разработените методи в клиничната практика. В дисертацията е получена много висока диагностична точност при регистрация в режим на синхронна флуоресцентна спектроскопия за конкретен избор на диагностичните параметри. Какви са следващите стъпки, за да могат тези методи да влязат в реална медицинска практика, на която да бъдат обучавани практикуващи лекари?

6. Заключение

Качеството и актуалността на получените резултати, както и съответните наукометрични данни, напълно удовлетворяват и надхвърлят изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане, на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БАН и на съответния Правилник, изисквания, условия, правила и решения към кандидатите за придобиване на научните степени и заемане на академични длъжности в ИЕ-БАН. Високото научно ниво на изследванията на докторантката и значението на получените резултати ми позволяват с убеденост да препоръчам на уважаемото Научно жури да гласува положително за присъждане на образователната и научна степен "Доктор" на Цанислава Иванова Генова.

София,

06.03.2020 г.

Подпис:

доц. д-р Таня Драйшу
член на Научното жури