



РЕЦЕНЗИЯ

ОТ

проф. д-р, дбн Яна Илиева Топалова

(Член на НЖ в изпълнение на Заповед № РД 09-150/24.06.2019 г.)

на дисертационен труд за присъждане на научна степен „Доктор на науките“ в област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

Автор: проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка, ИОХЦФ, БАН

Тема: „Структура и функция на медни гликопротеини свързващи кислородни форми“

1. Предмет на рецензиране

Представените за рецензиране материали за присъждане на научната степен на „Доктор на науките“ по **обем, съдържание, оформление напълно отговарят на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и вътрешния Правилник на ИОХЦФ-БАН.**

Пакет документи за рецензиране: 1/ Дисертационен труд, 2/ Автореферат на дисертационен труд, 3/ Списък на публикации и патенти /50 бр. Публикации и 6 патента/ и приложение с пълния им текст, на които е базиран дисертационният труд, 4/ Списък на конференциите, на които е представен дисертационният труд заедно с доказателствения материал – 89 бр. резюмета, 5/ Списък на цитатите, които не се припокриват с тези, предоставени за научната и образователната степен „Доктор“,

Пакет административни документи: 1/ Автобиография на докторанта, 2/ Справка за изпълнение на критериите за научна степен „Доктор на науките“, 3/ Копие от диплома за придобита образователна и научна степен „Доктор“, 4/ Списък на научно-изследователски проекти, награди, 5/ Протокол от 28.05.2019 г. от разширено заседание на колоквиум за обсъждане на проекто-дисертационния труд.

2. Кратки биографични данни

Павлинка Долашка е завършила ВХТИ „Асен Златарев“, гр. Бургас (днес Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас). Тя се дипломира като магистър специалност „Органична химия“ през 1980 г. . През 1993 г. защитава кандидатска (сега докторска) дисертация по научната специалност „Биоорганична химия и химия на природните и физиологично активни вещества“ (шифър 01.05.10).

Професионалната си кариера инж. Долашка развива в ИОХЦФ, където последователно израства от длъжност от химик до професор. След защитата на докторската си дисертация тя ръководи научен екип по научно-приложни разработки в областта на биоорганичната химия, промишленостите за здравословен начин на живот – фармацевтична, козметична, хранително-вкусова. Тя е един от **основоположниците** на направление „препарати за персонализирана медицина“ и до днес работи активно в тези области като **изследовател, вдъхновител на екипи, партньор и бизнес – дама.**

Проф. д-р Долашка е автор на 137 научни статии, от които 105 са в реномирани международни списания със сумарен ИФ 178,042. Трудовете ѝ са цитирани досега 750 пъти. Тя е съавтор и на 3 университетски учебни пособия, от които 1 е издадено в чужбина. Съавтор е и на 6 патента и полезни модела в областта на фармацевтичната биотехнология. Участвала в разработването на 21 научни

проекти с национално финансиране и 23 научни проекти с международно финансиране, както и на 3 договорни теми с биотехнологични фирми. Ръководител е на 6 успешно защитили докторанти и 10 дипломанти. Член е на СУБ и на Европейското пептидно дружество.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Дисертационният труд е фокусиран върху **силна комбинация** от актуални за съвременната наука и практика проблеми: 1/ Изолиране, характеризирание на нови, медни гликопротеини, свързващи различни кислородни форми, определянето на структурата на гликаните и влиянието им върху биологичните свойства на гликопротеини каквито са Cu/Zn-SOD от плесенни и дрождеви щамове и хемоцианини от тип *Arthropoda* и тип *Mollusca*; 2/ Изследване на структурата и физикохимичните свойства на новите гликопротеини; 3/ Определяне на въглехидратните структури на новите Cu/Zn-SOD-зи, хемоцианини от тип *Arthropoda* и тип *Mollusca*. Изследване на връзката на въглехидратната структура с пречистените гликопротеини; 4/ Проучване на терапевтичния потенциал на новите гликопротеини и значението на гликозилирания им характер.

Така представената комбинация от проблеми, изследователски подходи и резултати е **изключително съвременна и навременна** – точно в момента, когато се изисква ускорено развитие на биоикономиката на база съвременните биотехнологии и **стимулирането на иновациите в белите технологии** /Стратегия на ЕС за Иновации и Биоикономика от 2013 г/, изпълнение на комплексните цели пред ОП НОИР и националните научни програми за развитието на нови биологично-активни вещества и приложението им за персонализирана медицина. Макар разработката да има сериозна история – около 20 годишни изследвания като цяло, нейната ценност е, че тя е **готова и се появява навреме**, за да срещне най-новите приоритети на Европейската наука, икономиката в т. ч. **Биоикономиката**.

От тази гледна точка авторът е проявил **далновидност, научен нюх** и разбира се намирам, че има своя голям шанс за **внедряване в практиката и комерсиализация на получените резултати**. Като имам предвид острата нужда от биологично-активни препарати с природен и еко-произход, дисертационният труд има **голям приложен икономически, социален и екологичен потенциал и потенциал за интелигентно приложение в персонализираната медицина и козметика**.

Точно така си представям и ролята на една голяма докторска дисертация, не самоцелно **иновационна, а отговаряща на икономическите приоритети на съвременността**.

4. Познаване на проблема и характеристика на литературния обзор

През последните години откриването, изолирането, охарактеризирането и приложението на биологично-активни вещества за терапевтични цели срещу най-значимите от социална гледна точка заболявания изисква детайлно познаване на литературните източници в теоретичен, методически и приложен план. Лансирането на такива препарати, преминава през **дълги, многопластови, интердисциплинарни научни изследвания**, които могат да бъдат извършени от екипи, ръководени от компетентни, далновидни, комплексни, устойчиви, мотивирани и талантиви изследователи, какъвто е и проф. Долашка. Ако се съди по първите публикации, обект на обобщението в този дисертационен труд, първите изследвания са направени в 1999 год. Близко 20-години целенасочено са разработвани научни въпроси, свързани с посочената тематика.

Литературният обзор веднага показва, че неговият автор познава проблема в детайли, в неговото развитие в годините. В него акцентите отбелязват критичните научни и приложни проблеми, а тяхната разработка е обърната към **поставяне и решаване на ключови и критични проблеми**. В литературния обзор са резюмирани и преосмислени творчески повече от **400 литературни източници, повечето на латиница**.

От гледна точка на структурата, авторът е изложил огромния литературен материал в три добре дозирани раздела: 1/ Първият разкрива класификацията и структурната организация на мед-съдържащите, кислород-свързващи гликопротеини от *Arthropoda* и *Mollusca*. 2/ Вторият раздел е фокусиран върху структурата на въглехидратната компонента на Cu/Zn-супероксид дисмутазите и хемоцианините от артроподи и молюски. 3/ Третият раздел поставя силен и завършващ акцент върху биологичните функции на гликопротеините. 4/ Важно място е отредено и на терапевтичния потенциал на СОД-азите и хемоцианините.

Като обща оценка на литературния обзор и на осведомостта и компетентността на автора може да се изнесат пред скоби следните особености: 1/ **Критически** е преосмислен огромен пакет литературни източници; 2/ От тях е извлечено основното и перспективното, което **насочва бъдещите изследвания към високи научни и приложни постижения**; 3/ Написан е **интелигентно, компетентно**, оформен е със стил и класа с многобройни цветни снимки, фигури и картинки на молекули и модели на механизми на действие на изследвани биологични молекули; 4/ Самият литературен обзор представлява ценно научно четиво, което би могло **да служи за обучение на многобройни специалисти в областта на протеомиката и гликобиологията**. Тези изводи намират своята подкрепа не само в представените писмени материали, но и в действията на многобройните ученици и последователи на автора – докторанти, дипломанти, партньори, съмишленици, съавтори и др.

5. Методики, методични подходи на изследванията

В дисертационния труд е използван изключително **богат, интердисциплинарен и най-съвременен методичен арсенал** - едни от най-ценените методи на геномиката, протеомиката, а в него се създават, апробират, верифицират уникални и иновационни методи и методични подходи в гликобиологията и гликомиката.

Сред списъка на най-съвременни и сложни методи могат да бъдат изброени: Като основни бих отбелязала масспектралните методи (MALDI-TOF-TOF, LC/ESI-MS, LC-Q-trap-MS/MS, нано-ESI-MS и др.) приложени за определяне на аминокиселинната последователност и структурата на нови протеини, ензими и гликопротеини. Пречистените гликани и гликопептиди са изследвани с Q-trap система Absciex 4000 на Q-trap масспектрометър, снабден с наноспрей йонен източник, както и с тандемен масспектрометър (Q-TOF), снабден с нано-ESI и хибриден квадраполен анализатор.

Първичната структура на новите Cu/Zn-СОД-ази и хемоцианини е изучавана чрез хидролиза с химотрипсин и трипсин, и анализ на получените фрагменти чрез Едманово разграждане и MALDI-MS/MS, а четвъртичната структура на холопротеините - чрез ПАГЕ, ТЕМ - анализ с микроскоп Philips CM10, тандемен мас-масспектрометричен анализ и др. За определяне на първичната структура на някои високомолекулни хемоцианинови субединици е приложено ДНК-секвениране на техните гени, изолирани от кДНК-библиотеки.

Тук специално искам да подчертая, **разработените от автора, нови методи и подходи за определяне на въглехидратните структури** на СОД-зи и хемоцианини - **нов подход за определяне на гликозилираните центрове** след белязане с ^{18}O и генно фрагментиране; нов метод за анализ на олигозахаридни структури на хемоцианини - Идентифициране на въглехидратните структури след титруване на N,N'-бис-(бензил-2-боронова киселина)-[4,4']бипиридин дибромид (*o*-BBV) комплекс. Тези и други иновативни модификации на приложените методи и подходи утвърждават един кръг от методични приноси, които оценявам високо.

Към горепосочения обемен методологичен пакет могат да се прибавят и подходяща комбинация от методи за определяне на функцията на гликаните в медните протеини. Проследяване на рН-зависимата топлинна денатурация - чрез елиптичността $[\Theta]_{222}$, като функция на температурата при различни стойности на рН; Проследяване на Т-зависима рН-денатурация - чрез елиптичността $[\Theta]_{222}$, като функция на рН, при различни стойности на температурата; Определяне на термодинамичните параметри на Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианините, методи за превръщането на хемоцианините в ензими с фенол-оксидазна активност и др.

Към методическите приноси не мога да не отбележа и целево подобреният комплекс от методи и подходи за изясняване на потенциалния терапевтичен ефект на изследваните БАВ и **участието на гликаните на Cu/Zn-SOD-зи и хемоцианини**: това са съвременни методи за определяне на противотумурен, антивирусен, антибактериален ефект, възможността на изследваните гликопротеини да бъдат използвани като имуностимулатори, агенти за детоксикация и увеличаване на антиоксидантната защита на клетките. С тази група методи се прави **връзката на съвременните научни изследвания с потенциалното им приложение за решаване на критични и трудно-решими проблеми, свързани с най-тежките заболявания** като тумурни, вирусни и бактериални заболявания и инфекции. Сред групата на изследваните тежки фактори на патогенезата могат да бъдат посочени: тумор на Graffi в хамстери, асцитен тумор на Guerin, тумор на пикочния мехур, антивирусен ефект спрямо Полио вирус - вид 1 (LSc-2ab), CV-B1, RSV и HSV-тип 1, антибактериален ефект спрямо патогени от родове *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*.

Има и още нещо, което макар и да не е описано директно в раздела М&М, то прозира във всички компоненти на дисертационния труд. Авторът е овладял и приложил ключови подходи в стратегическия и оперативния научен мениджмънт – правилно е поставял и преследвал цели, в близо двадесет годишен период е планирал изследванията, резултатите и публикационната дейност по факторите – време, ресурси, материално-техническа база, екип, вграждане в екип, включване и обучение на млади изследователи, **изграждане, надграждане и усъвършенстване на добрите лабораторни практики в ИОХЦФ - БАН** и в други чуждестрани институции. Всичко това много ясно личи от авторските екипи на научните публикации, върху които е изграден дисертационният труд.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Замисълът, общата структура и композицията на дисертационния труд на пръв поглед отговаря на традиционните изисквания за подобен род трудове. При по-внимателен прочит обаче, се виждат специално и майсторски вплетените научно-изследователски и дискуссионни линии, които разкриват последователно резултати, получени с **богат арсенал от методи**, всички те групирани на няколко равнища:

- 1/ Подбор на биологични източници за изолиране на гликопротеини;
- 2/ Изолиране и пречистване на СОД-зи и хемоцианини чрез специално разработени схеми и подходи за това;
- 3/ Определяне на физикохимичните характеристики на БАВ - първична структура, МТ, активни и гликозилирани центрове, изоформи /позволявам си да ги наричам така още сега, тъй като вече знам крайния им ефект/;
- 4/ Характеристика на самите въглеводородни структури с разработени, приложени и верифицирани на два нови подхода за това и нов метод за анализ на смеси от олигозахаридни структури;
- 5/ Характеристика на функциите на олигозахаридните структури в медните гликопротеини, свързващи кислородни форми - ролята им в изграждането на третичната и четвъртичната им структура и стабилността на молекулите на гликопротеините;
- 6/ Разшифроване на механизмите на участието на гликаните в преодоляване на факторите на патогенност в широк кръг причинители за опасни заболявания - с проявяване на целеви антитумурен, антивирусен, антибактериален ефект и чрез стимулация на имунната и антиоксидантната защита на макроорганизмите.

Дисертационният труд на П. Долашка обхваща 319 страници и съдържа 156 черно-бели и цветни фигури, 28 таблици и повече от 450 литературни източници. Той е написан на ясен и точен научен език и съдържа традиционните раздели - Увод, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси, Библиография на публикуваните трудове и Списък на техните цитирания.

Най-същественият раздел на дисертацията е Резултати и дискусия, който обхваща 145 страници. Той е добре онагледен с графики, таблици и схеми построени въз основа на собствени експериментални данни. Прави впечатление и **логичността, разбираемостта и четимостта на тяхното**

излагане, което само показва, че авторът е изключително опитен в излагането и обяснението на научни факти и обобщение на научни резултати.

От съдържателна гледна точка разделът Резултати и дискусия съдържа 6 части. Първата е посветена на изолирането, пречистването и молекулното охарактеризиране на Cu/Zn-супероксид дисмутази от гъбичните щамове *Humicola lutea* 110, *Humicola lutea* 103, *Aspergillus niger* 26 и дрождеви щам *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984. По-нататък докторантката определя техните първични структури. Получените аминокиселинни последователности са сравнени с други налични в базите данни с цел да се определят функционалните им домени, а също така да се хвърли светлина върху тяхната филогенеза. Изследването на пространствената структура на гликопротеините показва, че въглехидратните вериги на СОД-азите са разположени на повърхността на молекулата и не влияят съществено върху тяхната ензимна активност.

В части 2 и 3 от Раздел Резултати и дискусия са анализирани резултатите от изолирането и молекулното характеризирание на хемоцианини от различни представители на *Arthropoda* и *Mollusca*. За изследването на структурата на хемоцианините докторантката прилага коренно различен геномен подход.

В част 4 от резултатите са представени и анализирани данните от изследването на структурата на въглехидратните компоненти на СОД-азите и хемоцианините. Тези данни включват информация за типа и мястото на гликозилиране, така и начина на свързване на мономерните въглехидратни остатъци в молекулата на гликана.

Последните две части от раздел Резултати и дискусия са фокусирани върху физиологичните функции (част 5.) и биологичните ефекти (част 6.) на въглехидратните компоненти на мед-съдържащите гликопротеини.

От **съдържателна гледна точка и като ключови раздела Резултати и дискусия** могат да се посочат следните значими от научна и приложна гледна точка резултати. Разработените лабораторни технологии позволяват пречистване с висок добив и с висока степен на чистота нови Cu-съдържащи супероксид дисмутази от гъбични щамове *Humicola lutea* 110 (Cu/Zn-НlСОД 110), *Humicola lutea* 103 (Cu/Zn-НlСОД 103), *Aspergillus niger* 26 (Cu/Zn-АnСОД 26) и от дрождеви щам *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984 (Cu/Zn-КmСОД NBIMCC 1984), както и на хемоцианини от *Carcinus aestuarii* (CaеН), *Eriphia verrucosa* (EvH), *Buthus indicus* (BsH), *Rapana venosa* (RvH), *Helix aspersa* (HaH) и *Helix lucorum* (HlH), със сходни физико-химични свойства с получени от други източници сродни протеини. Установено е, че новите СОД-зи притежават различни въглехидратни структури, като Cu/Zn-НlСОД 103 свързва само един GlcNAc остатък, докато Cu/Zn-КmСОД NBIMCC 1984 притежава комплексна олигозахаридна структура. Въглехидратните вериги са разположени на повърхността на молекулата и не влияят съществено върху структурата и свойствата на ензимите. Значим е установеният факт, че филогенетичните анализи, базирани на първичните структури на субединиците CaеSS2, EvH5 и Bsin1 и на N-крайните АКП на субединици на HaH, MsH, PvH, CaеH, EvH, LpH и BsH от тип *Arthropoda*, потвърждават хипотезата за общ артроподен прародител на хемоцианините от клас *Crustacea*.

Проф. Долашка установява, че хемоцианините от молюски имат сходни третични и четвъртични структури, в изграждането на които участват осем функционални единици (от „а“ до „h“) с молекулна маса 45 - 60 кДа. Тоталните молекули показват някои структурни различия, като RvH и KLN са изградени от по две различни структурни субединици, а комплексните молекули на HaH и HlH - от три субединици (β_c -, α_D - и α_N -). С помощта на новите методи за амидиране, перметиране, титруване на гликопротеина с комплекса o-BBV и др. докторантката потвърждава, че хемоцианините RvH, HlH и HtH са гликопротеини. Тези методи са подходящи за изучаване на сложни структури на смеси от гликани в малки концентрации. Докторантката навлиза в дълбочина и установява, че потенциалните центрове за N-гликозилиране при хемоцианините са разположени предимно на повърхността на молекулата, като за трите изоформи на хемоцианин от *H. lucorum* те са: 13 в β_c -HlH, 14 в α_D -HlH и 7 в α_N -HlH. Разпределението на центровете във функционалните единици варира от един до три, докато в β_c -HlH-b, -c; α_D -HlH-b, -f; α_N -HlH-c и α_N -HlH--f такива центрове липсват.

От изследванията става ясно, че процесът на денатурация на молекулата на хемоцианините протича в два етапа: дисоциация на тоталната молекула на хемоцианина до изграждащите я

структурни субединици и денатурация на структурните субединици. Определените рН-Т интервали на обратимост чрез кръгов дихроизъм и термодинамичния подход са в много тесни граници за тоталната молекула RvH и структурните субединици. Различията в стабилността им отразяват влиянието на четвъртичната и въглехидратна структури, като резултат от силни заряд-диполни взаимодействия. Установеният по-широк интервал на обратимост и термодинамични характеристики на ФЕ RvH2-е не са свързани с въглехидратната структура, която се намира на повърхността на молекулата. Така сложните въглехидратни структури участват в изграждането на третичната структура на хемоцианина, което вероятно се дължи на взаимодействие на His остатъци от повърхността на ФЕ от RvH1 и гликаните от друга ФЕ при изграждане на субединицата.

Хемоцианините не са идентифицирани като ензими, но те проявяват **ОДФОА (о-дифенолоксидазна активност)**. След въздействие с различни ензимни и неензимни реагенти молекулата на ФЕ RvH1-а се превръща от протеин с «транспортна» функция в ензим с ОДФОА.

Голям практически интерес представляват биологичните активности на изследваните гликопротеини и техните въглехидратни вериги. Cu/Zn-HICOD 103 проявява антивирусен и антитуморен ефект, като подтиска развитието на грипния вирус A/Aichi (H3N2) и трансплантиран миелоиден тумор на Graffi в хамстери. Това се обяснява с неутрализация на супероксидните радикали, концентрацията на които е повишена в туморните клетки. Установен е инхибиращ ефект на RvH2-е върху репликацията на HSV тип 1 е свързан и е изяснен механизъмът - с Ван-дер-Ваалсови взаимодействия и образуване на водородни връзки между въглехидратната верига на RvH2-е и вируса. Предполага се също, че гликаните са причина и за по-силно изразения инхибиращ ефект на ФЕ RvH1-а (чието въглехидратното съдържание е по-високо в сравнение с RvH2-е) срещу репликацията на Epstein-Barr вируса.

Значими са резултатите относно инхибиращата активност на NaH и RvH спрямо растежа на някои бактериални щамове, което е указание за защитната им функция, която вероятно се дължи на присъствието на разположени пептиди с антибактериална активност на повърхността на молекулата. β_c -NaH ясно се откроява като най-обещаващ и ефективен инхибитор срещу развитието на Грам-положителни (*S. aureus* и *S. epidermidis*) и Грам-отрицателни бактерии (*E. coli*).

От терапевтична и приложна гледна точка високо оценявам резултатите според, които пречистените хемоцианини са високо ефективни имуностимулатори при имунотерапията на асцитен тумор на Guerin, но не и при солиден миелоиден тумор на Graffi. Доказаният инхибиращ ефект на H1H, β_c -H1-h и RvH2-c, спрямо T-24 и CAL-29 човешки клетъчни линии от рак на пикочния мехур е значително по-висок в сравнение с интактните молекули и субединици, което потвърждава предположението за участие на олигозахаридните структури в противотуморния ефект.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

В края на дисертационния труд са изведени 18 приноса, които са групирани в раздели – **Приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация, Приноси с потвърдителен характер, Приноси с методичен характер и Приноси с приложен характер.** Приносите са логически обвързани със съдържанието и изложените резултати и аз напълно ги приемам. Според моята оценка те са значими и убедено мога да кажа, че с тази си разработка, **както и с цялостната си методична, научно-изследователска и приложна самостоятелна и екипна работа проф. Долашка** е оставила значим отпечатък в науката, практиката и бизнес иновациите в национален и в световен мащаб. Тази моя оценка се потвърждава от силната съдържателна част на приносите и комплекса – **дисертационен труд + публикации**, върху които е конструиран.

Първо. Приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация

Получени са нови природно-гликозилирани, реагиращи с кислорода протеини, с един меден йон в активния център - ензимите Cu/Zn-СОД-зи, от гъбични щамове и от дрожди. Предоставена е информация за структурата и физико-химичните им свойства. За първи път са представени въглехидратните структури на природно гликозилирани СОД-зи. Получени са нови природно-

гликозилирани кислород-свързващи протеини с два медни йона в активния център 'хемоцианини', изолирани от различни организми от типа *Arthropoda* и типа *Mollusca*. Представена е информация за първичните и сложни комплексни въглехидратни структури, както и физико-химични свойства на хемоцианините.

Разработена е високо ефективна методика за определяне и идентифициране на въглехидратната структура на хемоцианини с неизвестна или частично известна първична структура. За първи път е определена пълната въглехидратна структура на хемоцианини от *Mollusca*, която представен нов важен клас *N*-гликани за хемоцианините и обогатява базата данни за въглехидратни структури на гликопротеини.

За първи път се съобщава за участие на гликаните при сформирание на третичната структура на хемоцианина, като за изграждане на субединицата е изказано предположение за взаимодействие на His остатъци от повърхността на ФЕ от RvH1 и гликаните от друга ФЕ. Установено е влиянието на въглехидратната структура върху стабилитетните характеристики на интактната молекула, структурните субединици и една функционална единица от RvH след оценка чрез термодинамични подходи на стабилността на протеина. За първи път е представено участието на хемоцианини от тип *Mollusca* в защитната функция на организма, като осигуряват първоначална защита срещу инфекциозни патогени. Субединица β -NaN е доказана, като много перспективна за включване във фармацевтични препарати срещу по-устойчиви инфекции *Staphylococcus*.

Доказана е антитуморната активност на RvH, H1H, NaN и изоформите им върху клетъчни линии T-24 и CAL-29 от рак на пикочния мехур, който е изразен най-силно при ФЕ β -H1H-h. За първи път е предоставена протеомна карта за цитостатичното действие на хемоцианина от *H. lucorum* върху човешката клетъчна линия CAL-29. Изказано е предположение за специфичната роля на олигозахаридните структури на протеините и за тяхното биологично действие срещу рак на пикочния мехур.

Второ. Приноси с потвърдителен характер

Потвърдена е информацията за структурата и свойствата на Cu/Zn-СОД от различни източници. Потвърдена е информацията за сложна пространствена структура на хемоцианини от тип *Mollusca*, както и различното поведение на нативните молекули на хемоцианини и изоформите им при промяна на условията на средата.

Потвърдена е способността на организми от тип *Mollusca* да продуцират хемоцианини със сложни въглехидратни структури, предимно *N*-гликозилирани, за разлика от организми от тип *Arthropoda*. Потвърдено е участието на въглехидратната структура в стабилизирането на четвъртичната структура на тоталната молекула на хемоцианините, като е доказана взаимосвързаност между въглехидратната структура и формиране на четвъртичната структура на хемоцианини от тип *Mollusca*. Получени са потвърдителни данни относно значението на СОД-зи и хемоцианините при създаване на нови подходи в превенцията и лечението на вирусни, бактериални и туморни заболявания.

Трето. Значими приноси с методичен характер, описани по-горе в рецензията.

Четвърто. Приноси с приложен характер. Предложени са лабораторни технологии, както и пречистени Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини от различни източници, които могат да се използват в лечението на вирусни, бактериални и туморни заболявания. Създадена е гена банка (ДНК и РНК) и база от структури на гликани, които може да послужат за бъдещи изследвания по тези тематики.

8. Оценка на публикациите по дисертационния труд и на автореферата

Дисертационният труд е базиран на 50 научни статии – всички на английски език и публикувани в реферирани и индексирани по Thomson Reuters периодични издания с общ импакт фактор 98,359, както и 4 кратки съобщения в тематични сборници на престижни научни списания с висок ИФ. В 33 от публикациите и в 4 от патентите Долашка е водещ (първи или последен) автор. Тя има 1

самостоятелна публикация, 1 с един съавтор и 1 с 12 съавтори. Броят на авторите в останалите статии варира от 3 до 12. Трудовете свързани с дисертацията са цитирани досега 527 пъти. По темата на дисертацията е издаден 1 български патент за изобретение. Резултатите са докладвани и на 83 научни форуми, от които 23 в чужбина. Изследванията са финансирани от 40 национални и чуждестранни научни проекти.

Всичко това утвърждава, че проф. Долашка е **утвърден и получил популярност и научен престиж изследовател.**

Авторефератът е изготвен съобразно всички правила на научната публицистика и добрите научни практики. Той отразява накратко, но с всички основни елементи получените и обсъдени резултати в докторската дисертация.

Всички научни продукти - дисертационен труд, автореферат, научни статии, патенти са оформени прецизно, богато илюстрирани с черно-бели и цветни фигури, подредени със стил и класа, написани на изискан научен език, но разбираемо и с проследима логическа последователност. Самите те представляват модели и образци на добрите научни практики и могат да служат като материали за обучение на млади изследователи и преподаватели по биоорганична химия, биохимия, гликобиология и гликомика.

9. Критични забележки и препоръки

Към представените значими по обем материали имам някои технически бележки, които основно засягат прецизирането на биологичната терминология. Считаю, че за микробните щамове трябва да се използва терминът „подтискане, инхибиране на растежа, а не на развитието“. Добре би било при описанието на антибактериалната активност да се посочи показателят, който е отчитан преди да се изчисли процентът на инхибиране т. е. при контролата да се посочи по кой показател се отчита 100% растеж. При някои от снимките с Трансмисионна - електронна микроскопия не е посочено увеличението, при което са направени, а „ТЕМА“ липсва в съкращенията. Добре би било да се прецизира и таксономичната принадлежност на използваните като източник на гликопротеини организми - молюски и артроподи. При настоящите изследвания, тези детайли са прецизирани и антимикробната активност се отчита по точни количествени показатели.

Посочените неточности, разбира се на фона **мащабното изследване и значимостта на големия обем научно-приложни резултати** са само потвърждение на това, че винаги акцентът трябва да се слага върху **главното и ключовото**. В конкретния случай то е, че са получени научни резултати с големи и неопровержими научно-приложни приноси.

Препоръката ми е професор Долашка да запази мотивацията си и да комерсиализира ценните приложни резултати, като увлече и научи още млади изследователи и предприемачи на добри изследователски и бизнес практики.

10. Съответствие на докторската дисертация и на придобитата компетентност с изискванията на ЗРАСПРБ и Правилника за неговото приложение и Правилника на БАН

При сравнение на приетите изисквания за наукометричните показатели за придобиване на научната степен „**доктор на науките**“ според правилника на за Приложение на ЗРАСПРБ и правилника на БАН става ясно, че представените от проф. Долашка научни продукти /описани в коректно изготвената справка/ **напълно отговарят и надхвърлят изискванията** по числови данни.

Що се отнася обаче за оценката и качествата на дисертационния труд, трябва да подчертая убедено, че **неговите достойнства са многобройни и далеч доминират над числовата информация.**

11. Лични впечатления за докторанта

Познавам Проф. Долашка повече от 5 години, когато екипите ни започнаха да изследват заедно биологичните свойства и активности на някои от изолираните протеини и пептиди и станахме партньори в ЦК „Чисти технологии за устойчива околна среда - води, опадъци, енергия за кръгова икономика“.

Огромната целенасоченост, дисциплинираност, силната мотивация, която тя притежава, в този труд са претворени във висока научна компетентност, изследователска зрялост, притежание и

многократна реализация на модерен комплексен методичен арсенал, добри научни лабораторни и организаторски практики, способност да ръководи екип, да го мотивира. И макар да рецензирам научния продукт, а не качествата на неговия автор, считам, че в този случай **те са неразривно свързани и еднакво ценни за бъдещата научна и изследователска практика в национален и в международен мащаб.**

12. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамките на многобройни научно-изследователски проекти са получени, обработени, публикувани, обобщени, критично преосмислени, фокусирани върху значима фундаментална и научно-приложна основа многобройни експериментални резултати. Те са обсъдени компетентно, с вещина и в сравнение с най-съвременни литературни източници. Предложена е научна стратегия, организация, добри лабораторни и добри изследователски практики, които са дали възможност да се изгради и предложи ценен за науката и практиката дисертационен труд. В хода на неговата изработка са обучени редица млади изследователи магистри и докторанти. Направени са **значими за науката и практиката приноси**. Още по-ценното е, че са получени **продукти и създадени лабораторни технологии изолиране и пречистване на ценните за практиката медни гликопротеини, свързващи кислородни форми**. Тези технологии са патентовани и са на различен етап от тяхната комерсиализация. Това е една от най-съвременните тенденции и изисквания при развитието на БИОИКОНОМИКАТА. Изследваните продукти са с потенциал за приложение като съвременни терапевтични средства във фармацевтиката, козметиката и персонализираната медицина, а за тяхното производство са разработени лабораторни технологии.

Алгоритъмът за изучаването на въглехидратните структури на гликопротеините може да се използва като ефективен **модел и да се мултиплицира** и е стабилна основа за адаптация към други подобни молекули и терапевтични агенти с природен произход.

Не мога да отмина и това, че трудът е написан на **изискан научен стил, дискусията и представянето на резултатите е убедително, подредено, с класа.**

На база на гореказаното и основно като взема под внимание качествата на дисертационния труд, съпътстващите го научни продукти и качествата на неговия автор предлагам на почитаемото Научно жури да присъди научната степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ на проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка в област 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“.

28.07.2019 г.

Рецензент:

Проф. дбн Яна Топалова



REVIEW

by

Prof. Yana Ilieva Topalova, PhD, DSc

(Member of SJ in execution of Order №RD 09-150/24.06.2019)

of a dissertation thesis for the degree of “Doctor of Science” in the higher education field: 4. „Natural sciences, mathematics and informatics”, professional field: 4.2. Chemical Sciences, scientific specialty “Organic chemistry, chemistry of natural and physiologically - active substances”

Author: Prof. Dr. Eng. Pavlinka Aleksandrova Dolashka, IOCCP, BAS

Subject: „Structure and function of copper glycoproteins, binding oxygen forms “

1. Subject of reviewing

The presented for reviewing materials for conferring the scientific degree “**Doctor of Science**” as **volume, content, and presentation completely correspond to the requirements of the LDABRB, the Regulations for its application and the internal regulations of IOCCP-BAS.**

Pack of documents for reviewing: 1/ Dissertation thesis, 2/ Autoreferate of the dissertation thesis, 3/ List of publications and patents /50 publications and 6 patents/ and an application with their full text on which is based the dissertation thesis, 4/ List of conferences on which is presented the dissertation thesis together with an evidentiary material - 89 abstracts, 5/ List of the citations which do not overlap these extended for the scientific and educational degree “Doctor”,

Pack of administrative documents: 1/ Autobiography of the candidate, 2/ Reference for the execution of the criteria for scientific degree “Doctor of Science”, 3/ Copy of the diploma for the educational and scientific degree “Doctor”, 4/ List of scientific-researching projects, awards, 5/ Protocol from 28.05.2019 by the extended meeting on a colloquium for the discussion of the draft dissertation thesis.

2. Short biographical data

Pavlinka Dolashka graduated HCTI “Asen Zlatarov”, Bourgas (today University “Prof. Dr Asen Zlatarov, Bourgas). She graduated as a master in the specialty “Organic chemistry” in 1980. In 1993 she defended a candidate (now PhD) dissertation in the scientific specialty “*Bio-organic chemistry and chemistry of the natural and physiologically active compounds*” (code 01.05.10).

Her professional carrier, Eng. Dolashka, develops in IOCCP where consistently grows from a chemist to a professor. After the defense of the PhD thesis she manages a scientific team on scientific-applicable cosmetic, nutritive. She is one of the founders of preparations for personalized medicine and till today she actively works in these fields as a researcher, a team inspirer, a partner and a business-lady.

Prof. Dr Dolashka is an author of 137 scientific articles, 105 of which are in international journals of repute with a total IF 178,042. Her papers are cited 750 times for now. She is a co-author of 3 university educational tools, 1 of which is published abroad. She is a co-author of 6 patents and utility models in the field of the pharmaceutical biotechnology. She participated in the development of 21 scientific projects with a national financing and 23 scientific projects with an international financing as well as in 3 contracted subject with biotechnological enterprises. She is a scientific advisor of 6 successfully defended PhD students and 10 master students. She is a member of USB and of the European peptide society.

3. Actuality of the subject and expedience of the set aims and tasks

The dissertation thesis is focused on a **strong combination** of actual for the contemporary science and practice problems: 1/ isolation, characterization of new, copper glycoproteins, binding different oxygen forms, the definition of the structure of glycans and their impact on the biological properties of

glycoproteins such as Cu/Zn-SOD by moulds and yeasts strains and hemocyanins from type *Arthropoda* and type *Mollusca*; 2/ Analysis of the structure and physicochemical properties of the new glycoproteins; 3/ Determination of the carbohydrate structures of the new Cu/Zn-SODs, hemocyanins from type *Arthropoda* and type *Mollusca*. Researching the relation between the carbohydrate structure with the purified glycoproteins; 4/ Research of the therapeutic potential of the new glycoproteins and the significance of their glycosylated character.

The presented in this way combination of problems, research approaches and results is **exceptionally contemporary and on time** - exactly in a moment when it is required an accelerated development of the bioeconomy based on the contemporary biotechnologies and a **stimulation of the innovations in the white technologies** /EU strategy for Innovations and Bioeconomy from 2013/, an execution of the complexed aims in front of OP SESG and the national scientific programs for the development of new biologically active compounds and their application for personalized medicine. Although the elaboration has a serious history - nearly 20 years of examinations, its value is that **it is ready and appears on time** to meet the newest priorities of the European science, economy and **Bioeconomy**.

By this point of view, the author manifested **foresightedness, a scientific scent** and of course, I found that it has its big chance **to be implemented in the practice and the obtained results to be commercialized**. As I have in mind the sharp need of biologically active preparations with a natural and an eco-origin, the dissertation thesis has a **large applicable economic, social and ecological potential and a potential for intelligent application in the personalized medicine and cosmetics**.

This is exactly how I imagine the role of a Doctor of Science dissertation, not as an end in itself **innovative but responding to the economic priorities of the contemporaneity**.

4. Problem knowledge and characterization of the literary survey

In the last years the foundation, isolation, characterization and application of biologically active compounds for therapeutic purposes against the most significant, by a social point of view, diseases require a detailed knowledge of the literary sources in a theoretical, methodological and implementable plan. The launching of such preparations passes through a **long, multilayered, interdisciplinary scientific examinations** that could be executed by teams managed by competent, foreseeing, complexed, sustainable, motivated and talented researchers as prof. Dolashka. If we judge by the first publications, subject of the summary in this dissertation thesis, the first studies are made in 1999. Almost 20 years purposefully have being elaborated scientific questions related to the mentioned theme.

The literary survey immediately indicates that its author understands the problem in details, in its development through the years. In it the accents mark the critical scientific and applicable problems and their elaboration is facing the **setting and solving of key and critical problems**. In the literary survey are summered and rethought creatively more than 400 literary sources, more of which in English.

Regarding the structure, the author has presented the huge literary material in three well-proportioned sections: 1/ the first one describes the classification and the structural organization of the copper-containing, oxygen-binding glycoproteins from the types *Arthropoda* and *Mollusca*. 2/ the second section is focused on the structure of the carbohydrate component of Cu/Zn-superoxide dismutases and the hemocyanins from Mollusks and Arthropods. 3/ the third section set a strong and concluding accent on the biological functions of the glycoproteins. 4/ an important place is assigned on the therapeutic potential of the SODs and the hemocyanins.

As a general assessment of the literary survey and of the knowledge and competence of the author it could be taken out of the brackets the following features: 1/ It has been **critically** rethought a large pack of literary sources; 2/ It has been derived the essential and the perspective by them that **point the future studies to high scientific and applicable achievements**; 3/ It has been written **intelligently, competently**, formed with a style and a class with multiple colored pictures, figures and illustrations of molecules and models of activity mechanisms of the studied biological molecules; 4/ The literary survey, itself, represents a valuable scientific reading that could **serve for the education of many specialists in the field of proteomics and glycobiology**. These conclusions found their support not only in the presented written materials but also in the actions of the multiple students and followers of the author - PhD students, master students, partners, adherents, co-authors and others.

5. Methodologies, methodological approaches of the studies

In the dissertation thesis has been used a **rich, interdisciplinary and most contemporary methodological arsenal** - one of the most valuable methods of the genomics, proteomics, and in it have been created, approved, verified unique and innovative methods and methodological approaches in the glycobiology and glycomics.

In the list of the most contemporary and complicated methods could be mentioned the following: As main I would notice the mass spectrometric methods (MALDI-TOF-TOF, LC/ESI-MS, LC-Q-trap-MS/MS, nano-ESI-MS and others) applied for the determination of the amino acids sequence and the structure of new proteins, enzymes and glycoproteins. The purified glycans and glycopeptides have been analyzed with a Q-trap system Absciex 4000 of Q-trap mass spectrometer, equipped with a nanoprocessor source and a tandem mass spectrometer (Q-TOF) equipped with a nano-ESI, with a hybrid quadrupole analyzer.

The primary structure of the new Cu/Zn-SODs and hemocyanins has been studied by hydrolysis with chymotrypsin or trypsin and analysis of fragments by Edman degradation and MALDI-MS/MS and the quaternary structure of proteins by PAGE, TEMA with microscope Philips CM10 and a tandem mass spectrometry and others. For the determination of the primary structure of some hemocyanin subunits has been applied DNA-sequencing of their gens isolated by cDNA-libraries.

Here, I specially would like to underline **the developed by the author new methods and approaches for the determination of carbohydrate structures** of SODs and hemocyanins - **a new approach for determination of glycolysed centers** after labelling with ^{18}O and genetic fragmentation; a new method for analysis of oligosaccharide structures of hemocyanin – an identification of the carbohydrate structures after titration of N,N'-bis-(benzyl-2-boronic acid)-[4,4'] bipyridine dibromide (o-BBV) complex. These and other innovative modifications of the applied methods approve a circle of methodological contributions that I highly appreciate.

To the mentioned large methodological package I could add as well the convenient combination of methods for determination of the glycans function in the copper proteins. Monitoring of pH-dependent thermal denaturation - by ellipticity $[\Theta]_{222}$ as a function of temperature at different pH values;

Monitoring of T-dependent pH-denaturation - by ellipticity $[\Theta]_{222}$, as a function of pH, at different temperature values; Determination of the thermodynamic parameters of Cu/Zn-SODs and hemocyanins, methods for transformation of hemocyanin in enzymes with phenol-oxidized activity and others.

To the methodological contributions I could not pass to mention as well the purposely selected complex of methods and approaches for clarification of the potential therapeutic effect of the studied BAC and **the participation of the glycans of Cu/Zn-SODs and hemocyanins**: these are contemporary methods for determination of antitumor, antiviral, antibacterial effect, the opportunity of the studied glycoproteins to be used as immunostimulants, detoxification agents and arising the antioxidant protection of the cells. With this group of methods is made the **relation between the contemporary scientific studies with their potential application for a solution of critical and hardly solved problems connected to the most serious diseases** such as tumors, viral and bacterial diseases and infections. In the group of the studied heavy factors of the pathogenesis could be mentioned: Graffi tumor in hamsters, Guerin ascites tumor, bladder tumor, antiviral effect on Polio Virus - Type 1 (LSc-2ab), CV-B1, RSV and HSV-type 1, antibacterial effect on pathogens by the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*.

There is one more thing that although it is not directly described in the section M&M, it perceives from all the components of the dissertation thesis. The author has been mastered and has applied key approaches from the strategic and operative scientific management - she correctly has set and followed aims, nearly 20 years has planned the studies, the results and the publication activity by the factors - time, resources, material-technical basis, team, incorporation in a team, inclusion and education of young researchers, building, overbuilding and improving of the good laboratory practices in IOCCP-BAS and in other foreign institutions. All that very clearly appears by the author teams of the scientific publications on which this dissertation thesis is built.

6. Characteristics and assessment of the dissertation thesis

At first sight, the design, the general structure and composition of the dissertation thesis correspond to the traditional requirements for this kind of papers. However, in a detailed reading it is seen specially and masterfully implicated scientific-researching and debatable lines that discover consecutively the results obtained with a **rich arsenal of methods**, all of them grouped in several levels:

- 1/ Selection of biological sources for glycoproteins isolation;
- 2/ Isolation and purification of SODs and hemocyanins through specially developed for this schemes and approaches;
- 3/ Determination of the physicochemical properties of BAC – primary structure, M_w , active and glycosylated centers, isoforms /I afford to call them like this from now because I already know their final effect/;
- 4/ Characterization of the carbohydrate structures themselves with two developed, applied and verified approaches for this and a new method for an analysis of mixture of oligosaccharide structures;
- 5/ Characterization of the functions of the oligosaccharide structures in the copper glycoproteins binding oxygen forms – their role in the building of the tertiary and quaternary structure and the stability of the glycoproteins molecules;
- 6/ Decoding the mechanisms of the participation of the glycans in the overcoming the pathogenic factors in a wide circle of agents of dangerous diseases – manifesting purposeful antitumor, antiviral, antibacterial effect and through a stimulation of the immune and antioxidant protection of the microorganisms.

The dissertation thesis of P. Dolashka has 319 pages and contains 156 black and white and colored figures, 28 tables and more than 450 literary sources. It is written on a clear and accurate scientific language and contains the traditional sections – Introduction, Literary survey, Aims and tasks, Materials and methods, Results and discussion, Conclusions, Contributions, Bibliography of the published papers and List of their citations.

The most significant section of the dissertation is Results and discussion which enfolds 145 pages. It is well visualized with graphs, tables and schemes built on the basis of personal experimental data. **The logic, the clearness and the readability of their exposure** make an impression that indicates that the author is exclusively experienced in the exposing and explanation of scientific facts and summary of the scientific results.

The section Results and discussion contains 6 parts. The first one is about the isolation, purification and the molecular characterization of Cu/Zn-superoxide dismutases by the fungi strains *Humicola lutea* 110, *Humicola lutea* 103, *Aspergillus niger* 26 and an yeast strain *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984. After that it is defined their primary structure. The obtained amino acid sequences are compared to other presented in the database aiming to be defined their functional domains as well as to be thrown light on their phylogenesis. The study of the spatial structure of the glycoproteins shows that the carbohydrate chains of the SODs are distributed on the surface of the molecule and do not impact significantly on their enzymatic activity.

In parts 2 and 3 of Section Results and discussion are analyzed the results from the isolation and molecular characterization of hemocyanins from different representatives of the types *Arthropoda* and *Mollusca*. For the study of the structure of hemocyanins the author applies absolutely different genomic approach.

In part 4 through the results are presented and analyzed the data form the study of the structure of the carbohydrate components of the SODs and the hemocyanins. These data include information for the type and location of glycosylation as well as the way of binding of the monomeric carbohydrate structures in the molecule of the glycan.

The last two parts from section Results and discussion are focused on the physiological functions (part 5) and the biological effects (part 6) of the carbohydrate components of the copper-containing glycoproteins.

By a full of matter point of view and as key for the section Results and discussion could be mentioned the following significant by a scientific and implementable point of view results. The developed laboratory technologies allow a purification with a high yield and with a high level of purity of new Cu-containing

superoxide dismutases by fungi strains *Humicola lutea* 110 (Cu/Zn-HISOD 110), *Humicola lutea* 103 (Cu/Zn-HISOD 103), *Aspergillus niger* 26 (Cu/Zn-AnSOD 26) and by the yeast strain *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984 (Cu/Zn-KmSOD NBIMCC 1984), as well as of hemocyanins by *Carcinus aestuarii* (CaeH), *Eriphia verrucosa* (EvH), *Buthus indicus* (BsH), *Rapana venosa* (RvH), *Helix aspersa* (HaH) and *Helix lucorum* (HIH), with similar physicochemical properties of the obtained related proteins by other sources. It is established that the new SODs possess different carbohydrate structures as Cu/Zn-HISOD 103 binds only one GlcNAc residue and Cu/Zn-KmSOD NBIMCC 1984 has a complex oligosaccharide structure. The carbohydrate chains are located on the surface of the molecule and do not impact essentially on the structure and the properties of the enzymes. The established fact that the phylogenetic analyses based on the primary structures of the subunits CaeSS2, EvH5 and Bsin1 and of the N-terminal AAS of subunits of HaH, MsH, PvH, CaeH, EvH, LpH and BsH from type *Arthropoda* confirm the hypothesis of a common arthropodic primate of hemocyanins from class *Crustacea* is significant.

Prof. Dolashka establishes that the molluscan hemocyanins have similar tertiary and quaternary structures in which eight functional units (from "a" to "h") with a molecular mass of 45-60 kDa are involved. The native state molecules show some structural differences, such as RvH, and KLH made up of two different structural subunits, and the complex molecules of HaH and HIH form three subunits β_c -, α_D - , α_N -. With the help of the new methods of amidation, permethylation and titration of the glycoproteins with the o-BBV complex the author confirms that RvH, HIH, and HtH are glycoproteins. These methods allow to study complex structures of glycans at low concentrations. The author is getting deeply and establishes that the potential N-glycosylated sites in hemocyanins are located predominantly on the surface of the molecule as for the three hemocyanin isoforms of *H. lucorum* : 13 in β_c -HIH, 14 in α_D -HIH and 7 in α_N -HIH. The distribution of the sites ranges from one to three, whereas in β_c -HIH-b, -c; α_D -HIH-b, -f; α_N -HIH-c и α_N -HIH--f such sites are absent.

By the studies it becomes clear that the process of denaturation of hemocyanins occurs in two steps: dissociation of the total hemocyanin molecule into its structural subunits followed by denaturation of the structural subunits. The pH-T intervals of reversibility determined by circular dichroism and thermodynamic approach are within very narrow limits for the total molecule RvH as well as the structural subunits. Differences in their stability reflect the influence of quaternary and carbohydrate structures as a result of strong charge-dipole interactions. The established wider reversibility and thermodynamic characteristics for FU RvH2-e are not related to the carbohydrate structure present on the surface of the molecule. Complex carbohydrate structures are involved in constructing the tertiary structure of hemocyanins, which is probably due to the interaction of His residues on the surface of FU of RvH1 and the glycans from another FU from the subunit.

Hemocyanins are not classified as enzymes, but they **exhibit o-diphenol oxidase activity**. **After exposure to various enzymes and non-enzyme reagents**, the RvH1-a molecule is transformed from an oxygen transport protein into an enzyme with enzyme activity.

A large practical interest represent the biological activities in the studied glycoproteins and their carbohydrate chains. Cu/Zn-HISOD 103 exhibits an antiviral and anti-tumor effect by suppressing the development of influenza virus A/Aichi (H3N2) and Graffi myeloid tumor transplanted in hamsters. This is explained by the neutralization of superoxide radicals, the concentration of which is increased in tumor cells. The first indicated inhibitory effect of RvH2-e on HSV type 1 replication is associated with Van-der-Vaals interactions and hydrogen bonding between the carbohydrate chain of RvH2-e and the virus. It is also suggested that glycans are responsible for the more expressed inhibitory effect of FU RvH1-a (with a higher carbohydrate content compared to RvH2-e) against the replication of the Epstein-Barr virus.

Significant are the results about the inhibitory activity of HaH and RvH against the development of certain bacterial strains is indicative for their protective function, probably due to the presence of peptides with antibacterial activity on the surface of the molecule. The β_c -HaH clearly stands out as the most promising and effective inhibitor against the development of Gram-positive (*S. aureus* and *S. epidermidis*) and Gram-negative bacteria (*E. coli*).

By a therapeutic and applicable point of view I highly appreciate the results according to which the purified hemocyanins are highly effective immunostimulators in Guerin ascites tumor immunotherapy, but not against the solid Graffi myeloid tumor. The proven inhibitory effect of HIH, β_c -HIH-h and RvH2-c on T-24 and CAL-29 human bladder cancer cell lines is significantly higher compared to intact molecules

and subunits, confirming the assumption of participation of the oligosaccharide structures in the antitumor effect.

7. Contributions and significance of the elaboration for the science and the practice

At the end of the dissertation thesis are extracted 18 contributions which are grouped in sections – **Contributions containing new and original science information, Contributions with a confirmatory character, Contributions of a methodical nature** and **Contributions with attached character**. The contributions are logically related to the content and the exposed results and I completely accept them. According to my assessment they are significant and I forcibly can say that with this elaboration **with the whole methodological, scientific-researching and applicable self-dependent and team work prof. Dolashka** left a significant imprint in the science, practice and business innovation in a national and a worldwide scale. This assessment of mine is confirmed by the strong full of matter part of the contributions and the complex – **dissertation thesis + publications** on which it is constructed.

Firstly. Contributions containing new and original science information

New natural glycosylated oxygen-reactive proteins with one copper ion in the active site were obtained - Cu/Zn-SOD enzymes from fungal strains and yeast. Information on structure and physicochemical properties is provided. The carbohydrate structures of naturally occurring glycosylated SODs are presented for the first time. New naturally-glycosylated oxygen-binding proteins with two copper ions in the active site the 'hemocyanins' were isolated and thereby obtained from various organisms of the type *Arthropoda* and type *Mollusca*. Information on primary and complex carbohydrate structures as well as physicochemical properties of hemocyanins is presented.

A highly effective methodology for determination and identification of carbohydrate structures of hemocyanins with an unknown or partially known primary structure has been developed. For the first time, the full carbohydrate structure of molluscan hemocyanins was introduced with a new important class of N-glycans for glycoproteins enriching the carbohydrate structure database of glycoproteins

For the first time the involvement of glycans in tertiary structure formation of hemocyanin was reported, suggesting a hypothesis for the interaction of his residues on the surface of FU from RvH1 and glycans from FUs. The effect of the carbohydrate structure on the stability of the intact molecule, its structural subunits and one functional unit of RvH was determined after evaluation of thermodynamic approaches to the stability of the protein. For the first time the participation of hemocyanins from type *Mollusca* in the protective function of the organism is represented, providing initial protection against infectious pathogens. The β c-HaH subunit has been shown to be very promising for inclusion in pharmaceutical products against more resistant *Staphylococcus* infections.

The antitumor activity of RvH, HIH, HaH and their isoforms on bladder cancer T-24 and CAL-29 cell lines, most pronounced in FU β c-HIH-h, is demonstrated. A proteomic map for the cytostatic action of hemocyanin from *H. lucorum* on the human CAL-29 cell line is provided for the first time. It suggested that the oligosaccharide structures of proteins have a specific role in their biological action against bladder cancer

Secondly. Contributions with a confirmatory character

The information about the structure and properties of Cu/Zn-SOD from different sources has been confirmed. Information on the complex spatial structure of hemocyanins from type *Mollusca* as well as the different behavior of native hemocyanins and their isoforms under changing environmental conditions is confirmed.

The ability of organisms from type *Mollusca* to produce hemocyanins with complex carbohydrate structures, predominantly N-glycosylated, in contrast to organisms from type *Arthropoda*, has been confirmed. The involvement of carbohydrate structures in stabilization of the quaternary structure of the native hemocyanins has been confirmed as it is proved the interconnection between the carbohydrate structure and the formation of the quaternary structure of hemocyanins from type *Mollusca*. Confirmatory data on the importance of SODs and hemocyanins has been obtained in developing new approaches for the prevention and treatment of viral, bacterial and tumor diseases.

Thirdly. Significant contributions of a methodological nature, described upper in the review.

Fourthly. Contributions with attached character. Laboratory technologies, as well as purified Cu/Zn-SODs and hemocyanins from various sources, can be used to treat viral, bacterial, and tumor diseases have been proposed. A gene bank (DNA and RNA) and a data base of glycan structures has been set up that will serve future research on these topics.

8. Estimation of the publications on the dissertation thesis and the autoreferate

The dissertation thesis is based on 50 scientific articles - all in English and published in referred and indexed by Thomson Reuters periodical issues with a total impact factor of 98,359, as well as 4 short messages in thematic medleys of prestigious scientific journals with a high impact factor. In 33 of the publications and 4 of the patents Dolashka is a leading (first or last) author. She has 1 independent publication, 1 with 1 co-author and 1 with 12 co-authors. The number of the authors in the other articles varies between 3 and 12. The papers related to the dissertation are cited until now 527 times. There is 1 Bulgarian patent for invention on the dissertation subject. The results are reported as well on 83 scientific forums 23 of which abroad. The studies are financed by 40 national and international scientific projects.

All of this confirms that prof. Dolashka is an **approved and received a popularity and a scientific image researcher.**

The autoreferate is prepared according to all of the rules of scientific publicist and the good scientific practices. It affects shortly but with all main elements the obtained and discussed results in the Doctor of Science dissertation.

All scientific products - dissertation thesis, autoreferate, scientific articles, patents are formed precisely, richly illustrated with black and white and colored figures, organized with a style and class, written on an elegant scientific language but understandable and with a traceable logic sequence. They themselves represent models and patterns and could serve as educational materials for teaching young researchers and teachers in bio organic chemistry, biochemistry, glycobiology and glycomics.

9. Critical notes and recommendations

To the represented significant by volume materials I have some technical notes that mainly concern the specifying of the biological terminology. I consider that for the microbial strains should be used the term "suppression, inhibition of the growth, not of the development". It would be good in the description of the antibacterial activity to be indicated the parameter that has been read before the calculation of the inhibition per cent, to the control to be indicated by which parameter is reported 100% growth. Some of the pictures with transmission-electronic microscopy has no indicated magnification on which they have been observed and "TEMA" is missing in the abbreviation list. It would be good to be precise as well the taxonomic belonging go used as sources of glycoproteins organisms - mollusks and arthropods. In the present studies these details are specified and the antimicrobial activity is measured by exact quantitative parameters.

Of course, on the background of **the large study and the significance of the large volume of scientific-applicable results**, the mentioned inaccuracies are just a confirmation of the fact that always the accent should be put on the main and the key one. In the specific case, it is that there are obtained scientific results with large and irrefutable scientific-applicable contributions.

My recommendation is prof. Dolashka to keep her motivations and to commercialize the valuable implementable results engaging and teaching more young researchers and entrepreneurs on good researching and business practices.

10. Compliance of the dissertation thesis and of the acquired competence to the requirements of LDACRB and the Regulations for its application and the Regulations of BAS

Comparing the accepted requirements for the scientifically measuring parameters for acquiring the scientific degree "Doctor of Science" to the regulation for application of pLDABRB and the BAS regulations it becomes clear that the represented by prof. Dolashka scientific products /described correctly in the presented information/ completely correspond and exceed the requirements on quantitative data.

Regarding the assessment and the qualities of the dissertation thesis I have to underline with a conviction that **its dignities are multiple and far dominate over the quantitative information.**

11. Personal impressions of the candidate

I have known prof. Dolashka for more than 5 years when our teams started to study together the biological properties and activities of some of the isolated proteins and peptides and we become partners in CC "Clean technologies for sustainable environment - waters, waste, energy for circular economy".

The huge purposefulness, discipline, strong motivation that she possess in this paper are recreated in a high scientific competence, researching maturity, possession and many times realization of a modern complex methodological arsenal, good scientific laboratory and organizational practices, ability to manage a team and to motivate it. And although I am reviewing the scientific product but not the qualities of its author, in this case I consider that **they are related and as valuable for the future science and researching practice on a national and international scale.**

12. CONCLUSION

In the frame of multiple scientific-researching projects are obtained, analyzed, published, summarized, critically rethought, focused on a significant fundamental and scientific-applicable basis multiple experimental results. They are competently discussed with a proficiency and compared to the most contemporary literary sources. A scientific strategy, an organization, good laboratory and good researching practices were proposed that have been given the opportunity to be built and proposed a valuable for the science and the practice dissertation thesis. During its elaboration have been educated many young researchers master and PhD students. **Significant for the science and practice contributions have been made. More valuable is that have been received products and have been created laboratory technologies for isolation and purification of the valuable for the practice copper glycoproteins binding oxygen forms.** These technologies have been patented and are on a different stage of their commercialization. This is one of the most contemporary tendencies and requirements for the development of the BIOECONOMY. The studied products are with a potential for application as modern therapeutic tools in the pharmacy, cosmetics and personalized medicine and for their production are developed laboratory technologies.

The algorithm for studying the carbohydrate structures of the glycoproteins could be used as an effective **model and to be multiplied** and this is a stable basis for an adaptation to other similar molecules and therapeutic agents with a natural origin.

I could not pass away also that the paper has been written in an elegant scientific style, the discussion and the presentation of the results are convincing, organized, with a class.

Based on the above mentioned and mainly taking into account the qualities of the dissertation thesis, its attendant scientific products and the qualities of its author I propose to the honored Scientific jury to confer the scientific degree "DOCTOR OF SCIENCE" on Prof. Dr. Eng. Pavlinka Alkesandrova Dolashka in field 4. "Natural sciences, mathematics and informatics", Professional Field 4.2. "Chemical Sciences", scientific specialty "Organic chemistry, chemistry of natural and physiologically - active substances".

28.07.2019

Reviewer:

Prof. Yana Topalova, DSc