

РЕЦЕНЗИЯ

във връзка с конкурс за професор по 5.11. Биотехнологии, специалност Нанотехнологии с приложение в биотехнологиите и опазване на околната среда, обявен в Държавен вестник (бр. 3 от 12.01.2021 г.).

Рецензент: д-р Милен Иванов Георгиев, професор в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, е-поща: milengeorgiev@gbg.bg, член на научното жури, назначено със заповед на Ректора на МГУ „Св. Иван Рилски“ (Заповед No P-71 от 01.02.2021 г.).

Кандидат(и): дн Александър Руменов Луканов, доцент в катедра Инженерна геоекология, Геологопроучвателен факултет, Минно-геоложки университет „Св. Иван Рилски“ – единствен кандидат.

За рецензиране ми бяха предоставени документите на доц. д-р Александър Р. Луканов, дн – допуснат за участие в конкурса – както и копие от необходимите административни документи. Нямам общи публикации с кандидата и не съм в конфликт на интереси, съгласно закона.

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

Доцент д-р Александър Р. Луканов е роден на 02.04.1981 г., в гр. Берковица. Дипломира се като бакалавър в СУ „Св. Климент Охридски“ през 2003 г. и като магистър в същия университет през 2005 г. със специалност органична химия. През 2009 г. успешно защитава дисертация за получаване на образователната и научна степен „доктор“, а през 2017 г. и за доктор на науките (дн) от МГУ. През 2009 г. е назначен за асистент в катедра Инженерна геоекология, МГУ „Св. Иван Рилски“, където преминава последователно през научните звания главен асистент и доцент понастоящем. Доц. Луканов е специализирал в Япония, САЩ и Унгария. Следва да се отбележи и дългосрочното му сътрудничество с Университета Сайтама в Япония, където също е доцент. От 2021 г. е професор в Националния институт по технологии на Япония.

2. Оценка на представените материали

За конкурса доц. д-р Луканов, дн представя 30 научни труда, 20 от които в издания реферирани/индексирани в световноизвестни бази данни (IV1-20); останалите 10 от публикациите (IV.21-30) са в нереперирани списания с научно рецензиране/в редактирани колективни томове. Представена е и рецензирана монография „Екотоксикология: акумулиране и влияние на замърсителите върху околната среда“ (Луканов А.Р., 2020).

Заслужава да се отбележи и факта, че доц. Луканов има публикации в престижни научни списания като *The Journal of Physical Chemistry C* (ACS; ИФ 4.772) и *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (Elsevier; ИФ 3.131) – 2 бр.

3. Основни научни и научно-приложни приноси

Основните приноси от научно-изследователската дейност на доц. Луканов могат да бъдат систематизирани в следните направления:

3.1. Метаболитно маркиране на новосинтезирана ДНК в генома на бактерии (Публикации IV.2 и IV.18)

Визуализирана е новосинтезирана ДНК в непокътнатия нуклеоид на *Escherichia coli* K-12, чрез метаболитно вграждане на флуоресцентни аналози на тимидиновия субстрат в бактериалния геном. Тази техника, известна като функционално изобразяване е доказана посредством корелативна (светлинно-електронна) микроскопия.

- Еритрозин-11-dUTP и бодипи-FL-14-dUTP са синтезирани и приложени като хранителни субстрати за ензимно *in vivo* инкорпорирани в генома на тимидин-изискващия мутант на *E. coli* K-12.

- Маркираните клетки са визуализирани чрез епифлуоресцентен микроскоп в типичен червен (еритрозин-11-dUTP) или зелен (бодипи- FL-14-dUTP) емисионен цвят.

- Установено е, че формираната флуоресцентна геномна ДНК по време на вътреклетъчната полимеразна реакция причинява минимална токсичност при *E. coli*.

- При наблюдение с диференциален трансмисионен електронен микроскоп на Хилберт, се разкрива ултраструктурата на маркирания нуклеоид, която е представена със значително по-висока електронна плътност (в случая на еритрозин-11-dUTP).

- Маркираните хромозомни области в цитоплазмата са визуализирани също чрез електронно-спектроскопско изобразяване (в случай на инкорпорирани на бодипи-FL-14-dUTP). Практическата граница на откриване на бор е изчислена на около 5-10 mmol/kg на площ от 0.1 μm^2 .

- Разработената техника за маркиране разкрива структурните и динамичните промени в естествената репликация на хромозомите, включително и връзката между новосинтезирана *in vivo* ДНК в клетките и тяхното физиологично състояние.

- Маркирането, както и техниката на наблюдение чрез диференциален трансмисионен електронен микроскоп на Хилберт могат да се използват за фундаментално изучаване на биохимични процеси като генна регулация, ДНК пропускливост, инфекции и други.

3.2. Електрокаталитични въглеродни наноточки за подобряване на ефективността на микробна горивна клетка, посредством синергично взаимодействие с електроактивен биофилм от сулфат-редуциращи бактерии (Публикации IV.11, IV.23 и IV.24)

Разработено е устройство, базирано на синергичното взаимодействие между наноструктурен катод и електроактивен биофилм върху анода в микробна горивна клетка, което произвежда електрична енергия от отпадна вода.

- Разработени са ултрамалки азот-съдържащи въглеродни наноточки, които образуват diazometalна хелатна фаза върху графитен катод. Проектираните наночастици катализират реакцията на редукция на кислород върху електрода в неутрален буферен разтвор.

- Постигнато е подобро производство на електрически ток в двукамерна микробна горивна клетка, чрез синергично взаимодействие с електроактивен биофилм от сулфаторедуциращи бактерии (СРБ).

- Имобилизацията на биофилм от СРБ на анода улеснява директния трансфер на електрони към графитната повърхност на електрода, чрез мрежа от нишки (нано-пили), която осигурява връзка между отделните клетки.

- Плътността на мощността, получена от настъпилите синергичен ефект е увеличена почти двойно (от 33 на 59 mW/m²).

- Химичната устойчивост и експлоатационният живот на представените електроди създават възможност за развитие на нов клас конвенционални електрокаталитизатори.

- Подобрената кинетика на катодната реакция, както и възпроизводимостта на биоелектрохимичната система позволява практическото ѝ приложение в екологични биотехнологии за третиране на замърсявания в околната среда и производството на възобновяема електрична енергия.

3.3. Биосъвместими въглеродни квантови наноточки за функционално изобразяване на клетъчни процеси, терапия и като флуоресцентни хибридационни сонди за ДНК микрочипове (Публикации IV.5, IV.9 и IV.21)

Изследвани са въглеродните квантови точки (10-nm наночастици), като наносистеми за биосензорна детекция, био-визуализация и доставка на лекарства. Ниската им токсичност и стабилни химични свойства ги правят подходящи кандидати за нови видове флуоресцентни сонди, преодоляващи общите недостатъци на конвенционалните флуоресцентни сонди.

- Извършен е мониторинг и количествено определяне на флуоресцентни въглеродни нанодоти в еукариотни растителни клетки *Nicotiana tabacum* BY-2, чрез флуоресцентен и конфокален микроскоп.

- Въглеродните квантови точки навлизат в редица еукариотни клетки (тютюн, HeLa, HepG-2, човешки невронни стволони и ракови клетки) чрез ендоцитоза. Наночастиците демонстрират добра вътреклетъчна фотостабилност и липса на избледняващ ефект.

- Въглеродните нанодоти са идеални агенти за функционално изобразяване на вътреклетъчни процеси, поради ниската им токсичност и регулируемата емисия. Те са демонстрирани, като подходящи платформи за доставка на лекарства при фотодинамична терапия на меланомни кожни ракови заболявания. За тази цел наночастиците са химично конюгирани с хлорин еб-хиалуронат.

- Едноверижни олигонуклеотиди конюгирани към високо-флуоресцентни въглеродни квантови точки са демонстрирани като ефикасни хибридационни сонди за ДНК микрочипове. Повърхностното пасивиране на наночастиците с етилендиамин води до повишаване на квантовия им добив и респективно интензитета на фотолуминесценция, което позволява бързо откриване и количествено определяне на нуклеинови киселини.

- Докладваната микроскопска техника използва въглеродните наноточки като чувствителни флуоресцентни сонди за прецизно тестване и директно наблюдение на механизмите за навлизане на лекарства в клетките или проследяване на единични молекули в клетки или тъкани.

- Флуоресцентно резонансния енергиен трансфер на въглеродни квантови наноточки, модифицирани с фотосенсибилизатор, може да се приложи успешно за третиране на ракови клетки при фотодинамична инфрачервена терапия.

- Линейният диапазон на откриване на нуклеинова киселина е установен между 0.45-500 nM. Той е постигнат чрез ДНК микрочипове с въглеродни нанодоти. Представената техника има потенциал да бъде използвана за флуоресцентно откриване на други важни биомолекули с биотехнологично значение.

3.4. Двухотонна микроскопска оценка на цялостната промяна на енергийния метаболизъм (Публикация IV.13)

Авторът демонстрира двухотонната флуоресцентна микроскопична образна техника като метод за оценка на ефекта на динамичната хипертонична среда върху цялостната промяна на енергийния метаболизъм и адаптацията на амеба *Dictyostelium discoideum*, живееща в почвата.

- Флуоресцентната интензивност на митохондриално редуцирания никотинамид аденин динуклеотид (NADH) се проследява и определя количествено, за да се оцени съответстващото метаболитно състояние на еднослойно култивирани клетки.
- Ползите от докладваната неинвазивна микроскопска техника са значително по-малкото клетъчно увреждане и избягване на възбуждането на други биомолекули с изключение на NADH.
- Методът позволява получаване на данни за клетъчните нива на NADH в хипертонично състояние с добра чувствителност и възпроизводимост.
- Докладваната микроскопска техника позволява да се наблюдават различни важни биологични процеси в хипертонични условия с минимални възможности за поява на артефакти, индуцирани от фото избелване или увреждане на клетките.

3.5. Светлинно и ултразвуково активирани наномашини и нанороботи (Публикации IV.4, IV.10, IV.14, IV.15, IV.19, IV.28, IV.29 и IV.30)

Предложен е нов систематичен подход за дизайн и конструиране на наноустройства и наномашини от индивидуални наночастици, органични молекули (лиганди), полимери и биомолекули (нуклеинови киселини, рецептори, антитела и полизахариди). Наноустройствата са с размери по-малки от 100 nm и техните функции са проектирани въз основа на квантовите ефекти, каталитичните, магнитни и оптични свойства на отделните наночастици, способността на лигандите да се имобилизират (конюгираат) върху твърдата повърхност на наноматериалите, както свойства на биоматериалите да участва в разпознавателни реакции с целеви антигени.

- Наномоторът Janus, задействан от светлина, е проектиран да се насочва и унищожава патогенни микроорганизми при облъчване с инфрачервена светлина.
- Дизайн на светлинно-активиран наноконвертор от въглеродни нанодоти, ковалентно конюгирани върху хематитни квантови точки за причиняване на цитотоксичност при неоплазии на млечната жлеза. Функцията на наноконвертора е да трансформира абсорбираното инфрачервено лъчение в реактивни кислород-съдържащи радикали, които индуцират хромозомна фрагментация и програмирана клетъчна смърт на третираните неоплазии (документирана чрез TUNEL анализ).
- Наноконверторът е свързан с ДНК аптамери, които регулират работата му при контакт с свръхекспресирани рецептори на ракови клетки и осветяване с инфрачервено лъчение. При модифициране на наноконвертора с ДНК аптамери той може да се използва успешно във фотодинамична инфрачервена терапия на рак на млечната жлеза (клиничните изследвания са в ход).
- Проектиране на защитени ДНК линкери в изкуствени наномашини, които свързват две или повече отделни наночастици по отношение на тяхната функционална стабилност в присъствието на DNases.
- Демонстриране на биомиметичен наноробот, задвижван чрез ултразвук за насочване и изолиране на патогенни микроорганизми. Роботът се отличава със способност за бърза детекция и продължително акустично задвижване във воден разтвор.
- Наномасщабни хибридни материали са демонстрирани като сензори за бърза детекция на агенти, които представляват биологична заплаха (например стафилококов ентеротоксин В). Тези хибридни наноматериали са модифицирани с антитела или ДНК аптамери и се характеризират с висок афинитет и селективност към определени инфекциозни агенти.

- Janus наномоторите могат да бъдат разработени като бъдещи платформи за задвижване на наномашини, както и да се комбинират с други терапевтични подходи за третиране и инхибиране на устойчиви на антибиотици патогенни микроорганизми.
- Представеният дизайн на биомиметичен наноробот предлага нови възможности за създаване на широкоспектърни работизирани платформи за детоксикация и ремедиация на замърсени среди.
- Използването на два типа биоматериал - стрептавидин и ДНК аптамер позволява да се открие количеството SEB в по-голям диапазон на концентрация между 3-600 ng/ml. Разработените хибридни наноматериали могат да осигурят решения на проблеми, свързани с разпространението на агенти представляващи биологична заплаха.

3.6. Наноматериали за детекция, мониторинг и извличане на замърсители в околната среда (Публикации IV.1, IV.3, IV.6, IV.16, IV.17, IV.20 и IV.27)

Изследвани са еколого-целесъобразни методи със сензорни наночастици за наблюдение и извличане на тежки метали от повърхностни и подземни води. Процесът на откриване е основан на уникалните оптични свойства на наночастиците.

- Магнитни наночастици, покрити с въглеродни наноточки, са синтезирани за едновременно мониторинг и ефективно извличане на уран (VI) от замърсени киселинно-руднични води. Малкият диаметър на наночастиците позволява добра водна дисперсия, висока подвижност в суспензия и мощна сорбентна активност към уран (VI) в присъствието на сулфати, бикарбонати и рН 4.3-4.8.
- Въглеродни квантови точки, легирани със сяра, действат като флуоресцентни наносензори за чувствително определяне на концентрациите на разтворени калциеви йони и твърдостта на водата в естествената природна среда. Процесът на откриване се основава на загасване на фотолуминесценция на наночастици и линейна връзка между концентрацията на калциеви йони и интензивността на флуоресценцията.
- Реагираща на рН ентропийно-контролирана трансформация на наночастици (самостоятелно сглобени от анионни производни на пирен с катионни повърхностноактивни вещества) се постига, когато катионът на 1-метил-3-тетрадецил-имидазолиум има повече от 19-кратен моларен излишък.
- Цитратно покрити сребърни наночастици могат да бъдат използвани, като колориметричен сензор за откриване на следи от арсен в подпочвени води.
- Откриване и мониторинг на манган в питейна вода и подземни води, чрез фотоокислителна сензорна реакция с ултра малки въглеродни квантови точки.
- Полупромишлено отстраняване на колоидни замърсители съдържащи хром, чрез оптимизирана биполярна електрокоагулация с по-ниска консумация на енергия и алуминиеви жертвени електроди.
- Регенерацията на наночастици, евтините производствени разходи и възможността за многократно употреба позволяват практическото им приложение в пречиствателни съоръжения за третиране и възстановяване на замърсени минни води.
- Предложеният колориметричен метод за откриване на арсен е прост, чувствителен и рентабилен.
- След оптимизиране на различните приложени параметри в дизайна на електрохимичния реактор са постигнати задоволителни разходи за ефективност на процеса на пречистване, което позволява прилагането на метода като алтернатива на конвенционалния.

3.7. Асоциация между идиопатичната сколиоза и гените LBX1 и TGFB1 (Публикации IV.7, IV.8 и IV.12)

Изяснена е връзката на позитивна асоциация между прогресията на идиопатичната сколиоза и често срещаните варианти на гените LBX1 и TGFB1. Въз основа на експерименти в животински модели и наблюдения върху пациенти с идиопатична сколиоза със соматосензорна дисфункция се доказва, че съществува генетична корелация между гена LBX1 и етиопатогенезата на идиопатичната сколиоза. Резултатите предполагат, че съществува асоциация на полиморфизма TGFB1 (-509C/T) с чувствителност към идиопатична сколиоза при женската популация със спорадична или фамилна идиопатична сколиоза. Молекулярно-генетична идентификация на диагностични/прогностични маркери би направила възможно ранното лечение, включващо минимално инвазивни процедури.

3.8. Анализ на политиките и нормативната уредба за развитие на нанотехнологиите (Публикации IV.22, IV.25 и IV.26)

Институциите в различни страни (напр. Русия, Япония и др.) продължават да прилагат съществуващи, но не напълно адаптирани нормативни правни актове към нанотехнологиите, които са разработени без да вземат предвид специфичните характеристики на наноматериалите. Правната уредба за разработване и въвеждане на наноматериали в индустриални нанотехнологии все още не е добре известна за голяма част от научното общество. Транснационалните корпорации в областта на наноиновациите се превръщат в основната институционална форма на нова глобална координатна система и оказват все по-значително въздействие върху световната икономика.

3.9. Екотоксикология: акумулиране и влияние на замърсителите върху околната среда (Монография)

Представената монография разглежда подробно основните принципи, свързани с екологичните ефекти на токсичните молекули в природата. Оценката на риска и влиянието на химичните вещества в екосистемите/естествените системи предлага решения на множество предизвикателства, на които класическата токсикология не може да отговори.

- Разработване на въглеродни квантови точки и други наноматериали за анализ на стрес-индуцирани летални ефекти в биоиндикаторни организми.

- Екотоксикологични тестове с микроорганизми за определяне на качеството и категориите на повърхностните и подземни води.

- Разработените методи за екотоксикологичен анализ са приложими при изготвяне на оценка за екологичния риск и оценка за въздействието върху околната среда (ОВОС).

4. Отражение на научните публикации на кандидата в българската и чуждестранната литература, научни награди и признание

Научната продукция на доц. Луканов е публикувана в реномирани научни списания, някои от които с висок импакт фактор. Трудовете на доц. Луканов са цитирани над 400 пъти. Тази цифра, обаче, не бива да се абсолютизира, тъй като голяма част от публикациите са от последните няколко години, т.е. тепърва ще бъдат цитирани и оценени по достойнство от научната общност.

Доц. Луканов е ръководител на четири проекта и е рецензент за *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (Springer). Член е на Съюза на учените в България и

Американското химично дружество (ACS). Има две награди от международни конференции.

5. Преподавателска дейност

Надлежно е представена справка за учебната дейност на доц. Луканов, която намирам за солидна. Той е водещ лектор по дисциплините 1) генетика, 2) биосензори и биоиндикатори, 3) химия на околната среда и 4) екотоксикология. Следва да се отбележи и ръководенето на дипломанти и докторанти, един от които успешно защитил (Полина П. Младенова, 2018).

6. Изпълнение на минималните национални и институционални изисквания за заемане на академичната длъжност „професор“

Комплекта с документа за участие в конкурса съдържа справка за изпълнение на минималните национални и институционални изисквания за заемане на академичната длъжност професор. При изискуеми 680 т. (съгласно Приложение 1 от Правила за заемане на академични длъжности при МГУ „Св. Иван Рилски“), кандидатът е покрил 1087.2 т. Представена е и справка по показател Ж (хорариум на лекционна заетост за последните три години в МГУ), даваща допълнителни 261 т.

7. Критични бележки и препоръки

Към доц. Луканов нямам съществени критични бележки. Бих му препоръчал да обмисли възможността за трансфер на придобитите знания от дългосрочните специализации в чужбина за създаване на школа по нанобиотехнологии в МГУ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на научно-изследователската дейност на доц. Луканов показва, че тя е изцяло в областта на обявения конкурс, като приносите му имат сериозен фундаментален характер, а също и ясно очертана практическа насоченост. Научно-изследователската и преподавателска дейност надвишават минималните изисквания на ЗРАСРБ и допълнителните изисквания и критерии за заемане на академичната длъжност „професор“, съгласно Правила за заемане на академични длъжности при МГУ „Св. Иван Рилски“. С оглед на всичко изложено по-горе смятам, че доц. Луканов е вече изграден и компетентен изследовател в областта на био- и нано-технологиите с ясно очертан научно-изследователски профил.

Като член на Научното жури по обявения конкурс давам положителна оценка и убедено препоръчвам на членовете на почитаемия Факултетен съвет на Геологопроучвателен Факултет, МГУ „Св. Иван Рилски“, да гласуват положително за избирането на доц. д-р Александър Руменов Луканов, дн на академичната длъжност „професор“.

12.05.2021 г.
гр. Пловдив

Рецензент:
/Проф. д-р Милен И. Георгиев/