

## РЕЦЕНЗИЯ

за дисертационния труд на Ваня Петрова Колева на тема: **Проучване върху генотоксичното и цитотоксично действие на структурния пентозен аналог *4-bromo-N, N-dirthwl-5,59dihwdro-1,2-oxaphosphpl-2-amine2-oxide*** върху митотични клетки

за присъждане на образователна и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология)

Рецензент: доц. д-р Маргарита Георгиева Пешева, Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

### 1. Биографични данни на кандидатката

Ваня Петрова Колева е родена през 1973 г. Висшето си образование завършва през 1998 г. по специалността „Биология и химия” на Шуменския университет ”Епископ Константин Преславски”. Научната си кариера започва от 2000 г. като специалист-биолог и хонорован асистент по „Генетика и теория на еволюционните учения” в БФ на Шуменския университет. От 2002 до 2005 г. работи като асистент по „Генетика и теория на еволюционните учения”, от 2005 до 2009 г. е избрана за старши асистент, а от 2009 г. до сега е главен асистент в същата висше учебно заведение.

По-голямата част от дисертационния труд е разработен в лабораториите на Шуменския университет. Ваня Колева е зачислена като свободен докторант към катедра Биохимия на Софийския университет.

Дисертационният труд на Ваня Колева е посветен на проучване върху генотоксичното и цитотоксично действие на структурния пентозен аналог *4-bromo-N, N-dirthwl-5,59dihwdro-1,2-oxaphosphpl-2-amine2-oxide (Br-oxph)* (синтезирано в Лабораторията по органична химия на Шуменския университет през 1987 г.) върху митотични клетки. Този пентозен аналог принадлежи към групата на хетероциклените оксафосфоли и се явява структурен аналог на фуранозините, към чиято група принадлежат пентозите рибоза и дезоксирибоза. Съобщенията в литературата за биологичното действие на вещества от групата на оксафосфоли са оскъдни, но са изказани предположения за генотоксично, антибактериално и антитуморно действие на изследвания препарат. С цел по-пълното му характеризизиране докторантката прилага комплексен подход за изучаване на биологичната активност на *Br-oxph* чрез използване на няколко еукариотни тест-системи, включващи растителни обекти (коренова система от *Allium sera* L. и семена от мека пшеница (*Triticum aestivum* L.)), животински обект (бели лабораторни мишки) и клетъчни тест-системи (човешки клетъчни линии). Резултатите от изследванията на генотоксичната активност на *Br-oxph* ще помогнат за изясняване на механизмите на действие на оксафосфоли върху митотични клетки от трите тест-системи и за практическото му приложение, което ще позволи да се направи оценка на риска за човешкото здраве и за опазване на околната среда. Това определя и актуалността на работата.

### 2. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд е с общ обем 138 стр. и съдържа 8 основни раздела, както следва: Въведение (3стр.), Литературен обзор (27 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (18 стр.), Резултати и обсъждане (53 стр.), Заключение (2 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (27 стр.). Резултатите от работата са представени в 17 таблици и 46 фигури.

### 3. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.

Списъкът на цитираната литература съдържа 308 заглавия, 6 от които на кирилица и 302 на латиница. Литературният обзор е подробен и добре подреден. В него е представена структурната формула на *Br-oxph* и негови структурни аналози, както и механизма на действие и биологичната активност на оксафосфолите. Коментирани са необходимостта от използване на различни тест-системи (*In vivo* и *In vitro*) за сравнителни изследвания на гено- и цитотоксично действие на *Br-oxph*. Вниманието се обръща на висшите растения, като модел за изследване на генотоксичност на различни вещества, на лабораторни животни за изследване на хромозомни аберации. Особено ценно в работата е прилагането на *In vitro* тестове за изследване на апоптоза (защитен механизъм на имунната система в клетки на бозайници), като подробно са описани основните механизми за индуцирането ѝ.

От Литературния обзор логично произтичат целите, формулирани лаконично и ясно, и задачите, поставени пред докторантката за разработване на дисертационния труд.

#### **4. Методичен подход.**

В дисертационният труд са използвани няколко тест-системи за анализ на ефектите от *Br-oxph* : за токсичност върху растежа на корен от семена на мека пшеница (*Triticum aestivum* L.), за гено- и цитотоксичност върху меристемни клетки от корен на лук (*Allium cepa* L.), за анализ на хромозомни аберации от костен мозък на бели мишки, тест за виталност и пролиферативна активност, и имунологичен тест за индуциране на апоптоза в човешки туморни клетъчни линии.

Използваните методики включват набор от класически и съвременни подходи, позволяващ получаване на достоверна информация, която да послужи за основа за анализи и сравнения. Данните от изследванията са обработени статистически чрез прилагане на подходящи тестове и анализи в програмни продукти.

#### **5. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретации и изводи**

При проведеното от докторантката изследване на генотоксичното и цитотоксично действие на структурния пентозен аналог *4-bromo-N, N-dithiwl-5,59dihydro-1,2-oxaphosphor-2-amine-oxide (Br-oxph)* върху митотични клетки са получените резултати и изводи в следните основни направления:

а) *Оценка на токсичността върху растежа на корен от семена на мека пшеница (Triticum aestivum L.) и гено- и цитотоксичност върху коренова система от Allium cepa L.* В това изследване авторката установява, че концентрации над  $2 \times 10^{-3} \text{M}$  *Br-oxph* имат токсичен ефект спрямо растежа на корен от семена на мека пшеница (*Triticum aestivum*) (50%-но инхибиране на растежа се постига от  $2,3 \times 10^{-3} \text{M}$  *Br-oxph*). Докторантката наблюдава аномални митотични клетки, като най-честите нарушения са в анафаза (наблюдават се странстващи хромозоми и анафазен мост от хроматиден тип, което е показателно, че са формирани след S-фаза на интерфазата) и телофаза; нарушения в интерфазни клетки от коренова система на *Allium cepa* L след 24 и 48 часа третиране и прави извода, че наличието на двуядрени клетки е признак за цитотоксичност (възникват, когато е нарушена цитокинезата).

При сравнително изследване на продължителността на действие на  $10^{-3} \text{M}$  *Br-oxph* за време от 3, 24 и 48 часа е установено, че с нарастване на времето на третиране стойността на митотичния индекс (МИ-честота на митотични фази) намалява. Темпът на клетъчното делене след 3 часа въздействие, последвано от 24- и 48- часово възстановяване спада. Според авторката съществуват достоверни различия между трите изследвани концентрации на *Br-oxph* -  $10^{-3} \text{M}$  до  $10^{-9} \text{M}$ , като съществено значение има периода 24 ч. и 48 часа възстановяване след третиране с *Br-oxph* за 3 часа, което води до инхибиране на клетъчната пролиферация. б) *Определяне на гено- и цитотоксичните ефекти на Br-oxph върху митотични клетки от костен мозък на бели мишки.* Докторантката изследва 5 нарастващи концентрации и отчита 4 цитогенетични показатели. Авторката установява, че най-голямо влияние на *Br-oxph* върху пролиферацията на костно-мозъчни клетки от мишки имат два фактора-

времето на въздействие и концентрацията на препарата. Наблюденията показват, че ефекта е най-слаб след 3 ч въздействие, като само част от изолираните след въздействие ядра са фрагментирани и кондензирани, след 24 ч и 2, 82x10<sup>-6</sup>M, МИ е с 48% по-нисък от контролата, а при 2, 82x10<sup>-3</sup>M с 25%. При увеличаване времето на третиране до 48 часа и увеличаване концентрацията на препарата, процента на делящите се клетки намалява.

Съществени резултати са получени при изследване способността на *Br-oxph* да индуцира хромозомни аберации (метафазни пластинки с хроматиде геп или с хроматидно разкъсване) в метафазни клетки от костен мозък на мишки. Подобен анализ е направен след различни времена на третиране и след различни времена на възстановяване. Докторантката установява, че с увеличаване времето на третиране се увеличава достоверно честотата на клетките с хромозомни аберации, като след 3 часа въздействие преобладават хроматидните разкъсвания, след 24 ч - хроматидни и хромозомни разкъсвания, центромерни и теломерни сливания, а след 48 часа най-голям е броя на разкъсванията в едната хроматида, следвани от разкъсвания и в двете хроматиди на отделни хромозоми (в отделни клетки са наблюдавани центромерни и теломерни сливания, както и хромозомни фрагменти).

в) *Провеждане на сравнителен анализ на наблюдаваните със светлинен микроскоп и установените с атомно-силов микроскоп хромозомни аберации и гепове, индуцирани от Br-oxph.*

Различните типове хромозомни аберации могат да бъдат наблюдавани със светлинен микроскоп. Въпросът за това дали т. н. хромозомен геп да бъде определен като хромозомна аберация или не все още остава неясен. Отговор на този въпрос дисертантката дава чрез използване на атомно-силов микроскоп (АСМ). Той дава възможност за създаване на изображения с висока резолюция, които по-детайлно информират за природата на хромозомните увреждания. Чрез сравнителен анализ на резултатите от светлинен микроскоп и АСМ авторката прави няколко извода: включва геповете в групата на хромозомните аберации; потвърждава генотоксичната активност на ниска доза от *Br-oxph*; доказва, че резултатите за хромозомни аберации, наблюдавани със СМ се потвърждават с АСМ (наблюдаваните разлики са незначителни).

г) *Определяне на цитотоксичната и апоптотична активност на Br-oxph върху туморни клетки*

От резултатите, получени в теста за анализ на хромозомни аберации Ваня Колева прави извода, че *Br-oxph* има способността да индуцира двойноверижни разкъсвания в ДНК-молекулата и фрагментирани, и кондензирани ядра. Това е предпоставка докторантката да изследва потенциала на *Br-oxph* да предизвиква апоптоза. Чрез използване на тест с WST-1 (тетразолиева сол) тя оценява виталната и пролиферативна активност на белодробни туморни клетки от SK-MES-1 клетъчна линия след третиране с *Br-oxph* и установява, че процента на жизнеспособните клетки намалява достоверно с увеличаване концентрацията на препарата. Резултатите от изследване на апоптотичната активност на *Br-oxph* с Cellrlar DNA Fragmentation ELISA kit показват, че с увеличаване концентрацията на препарата нараства количеството на ДНК-фрагментите в цитоплазмата на клетките. Въз основа на получените резултати докторантката изказва предположение за вероятния механизъм за индукция на апоптоза след третиране с *Br-oxph* (туморосупресорния ген p53-транскрипционен фактор и киназата АТМ).

Резултатите от *In vitro* теста за антипролиферативния ефект на *Br-oxph* върху белодробни туморни клетки и способността му да индуцира апоптоза в същата линия дават основание на докторантката да насочи вниманието си върху изучаване на антипролиферативната и апоптотична активност на препарата върху нормални и жизнеспособни чернодробни туморни клетки SK-HEP-1. Получените резултати

позволяват на докторантката да направи заключението, че *Br-oxph* притежава цитотоксична и апоптична активност и спрямо белодробни туморни клетки от SK-MES-1 клетъчна линия.

В дискусиата докторантката задълбочено обсъжда получените резултати в сравнение с наличните данни в литературата.

Изводите (10 на брой) са направени логично от резултатите, получени в настоящото изследване.

## **6. Критични бележки към дисертационния труд**

### **6.1. Бележки по заглавието на дисертационния труд.**

Въпреки, че на сегашния етап заглавието не може да бъде променено искам да отбележа, че в него „върху митотични клетки” би могло да се замени „ с различни тест-системи”.

### **6.2. Бележки по раздела „Материал и методи”**

Считам, че отделните тестове са описани с излишни подробности, което само увеличава обема на тази глава до 18 страници.

### **6.3. Бележки по точките "Изводи"**

1. Считам, че броя на изводите е голям (10) и част от тях могат да се обобщят (например 1 и 2; 9 и 10).

## **7. Приноси**

### **7.1. с фундаментален характер:**

1. Доказано е система *in vivo* върху растителни и животински обекти генотоксичното и цитотоксично влияние на съединение от групата на хетероциклените оксафосфоли (*Br-oxph*), а в система *in vitro*- апоптотичната активност върху туморни клетъчни линии.

2. Създаден е алгоритъм за изследване предполагаема цито- и генотоксичност на даден химичен агент

### **7.2 с научно- приложен характер:**

1. Чрез атомно-силов микроскоп е доказана валидността на теста за хромозомни аберации, отчитани със светлинен микроскоп .

**Авторефератът** отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд.

Резултатите, получени в дисертационния труд са представени в 4 научни публикации, 2 от които са в списание с импакт фактор и 1 участие на научен форум в Сърбия. Във всички публикации Ваня Петрова Колева е първи автор. Забелязани са 6 цитата, което отразява отзвук на им в научната общност. Всичко това е показател за добрата теоретична и методична подготовка на докторантката.

### **Заключение:**

Дисертационният труд е посветен на една важна област в биологичната наука. Работата има сериозен принос в областта на Молекулярната биология, в за изясняване на механизмите на действие на оксафосфолите върху клетки от различни тест-системи, което ще позволи да се направи оценка на риска за човешкото здраве от използването му за борба с вредители (като активна съставка на препарати, използвани в селското стопанство), за опазване на околната среда и за борба с някои туморни заболявания при човек.

Докторантката има водеща роля и творческо, лично участие в научните разработки. Преподавателската дейност на Колева също е допринесла за биологична й подготовка, за изграждането на добър научен работник и преподавател.

Като имам предвид качеството и обема на извършената работа, отличното оформяне на дисертационния труд, стила на написване и качествата на научните трудове имам основание да препоръчам на Научното жури да присъди образователната и научна

степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология) на Ваня Петрова Колева.

02.01.2013 г.  
София

Рецензент:  
(доц. д-р Маргарита Пешева)