

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на **Ваня Петрова Колева** на тема: „ **Проучване върху генотоксичното и цитотоксично действие на структурния пентозен аналог 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide върху митотични клетки**” за присъждане на образователната и научна степен **”Доктор”** по професионално направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология)

Рецензет: доц. д-р Тренка Аргирова Гетова

Представеният за рецензия дисертационен труд третира актуален и съществен проблем. Нестихващият интерес към откриването, синтезата и характеризирането на нови биологично активни вещества може да се обясни със значението им както от теоретична, така и от практическа гледна точка. Изучаването на активността и механизма на действие на такива вещества разширява знанията за процесите в клетката и е необходима предпоставка за евентуалното им приложение в медицината и селското стопанство. Изследванията в настоящия дисертационен труд целят изучаване биологичното действие на съединението 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide, синтезирано в Лабораторията по органична химия на Шуменския университет през 1987 г. Съединението е дефинирано, установена е неговата структура и е добре характеризирано от химична гледна точка – представлява органофосфорно съединение от групата на оксафосфолите. То е структурен аналог на фуранозините, за които е известно, че участват в изграждането на важни за клетката съединения – нуклеотоди, нуклеинови киселини и др. Оскъдните данни в литературата за биологичното действие на вещества от групата на оксафосфолите индикират вероятност за генотоксично, антимикубно и антитуморно действие на изследваното съединение. Макар, че няма данни в литературата за практическо приложение на оксафосфолите, някои техни структурни аналози като ламивудин, телбивудин, клевудин и др. са активни съставки на лекарства с антивирусно и антитуморно действие. Всички тези данни дават основание да се предположи, че съединението 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide би могло да влияе върху делението на клетката и да проявява цитотоксична и генотоксична биологична активност.

В голямата си част дисертационния труд е разработен в лабораториите на Шуменския университет. Ваня Колева е зачислена като свободен докторант към катедра Биохимия на Софийския университет. Тя е представила по процедурата всички необходими документи, изисквани от Закона за присъждане на научни звания и степени и Правилника за приложението му.

Дисертационният труд е структуриран по класическия модел с добре балансирани помежду си дялове: Увод – 3 стр.; Литературен обзор - 27 стр.;

Цел и задачи - 1 стр.; Материали иметоди - 18 стр; Резултати и обсъждане - 53 стр.; Заключение - 2 стр.; Изводи - 1 стр. и Приноси - 1 стр.

Цитирани са 308 литературни източници, като голяма част са от последните години. Работата е илюстрирана с 46 фиг. и 17 таблици.

Литературният обзор е задълбочен и аналитичен, умело представящ съвременното състояние на проблема. В началото са разгледани структурата и данните за биологичното действие на редица подобни по структура на 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine-2-oxide съединения. Особено внимание се отделя на връзката между структура и функция. Посочва се механизма на действие и приложението на някои от разглежданите вещества, което се основава на биологичното им действие. Въз основа на тези данни се изказва хипотеза за евентуално гено- и цитотоксично действие на изследвания Br-оксафосфол. Следва подробен критичен анализ на използваните от други автори методи за доказване на подобно действие. Задълбочено се обсъждат възможностите на всеки от подходите, информацията, която дава и недостатъците, които има. Обосновава се необходимостта от прилагане на комбинация от *in vivo* и *in vitro* цито- и молекулярно биологични тестове и използването на различни организми, за да се отчетат особеностите на използваните обекти.

От Литературния обзор логично произтичат целите, поставени при разработването на дисертационния труд и задачите за постигането им. Те са формулирани лаконично и ясно.

Главата „**Материали и методи**” включва подробно описание на всички методи, използвани от докторанта. Използвани са както класически техники, така и модерни такива. Става ясно, че докторантката владее арсенал от техники и може да ги комбинира и прилага творчески, за да получи пълна и максимално достоверна информация. Методите са описани твърде детайлно, което позволява успешното им възпроизвеждане.

В раздела „**Резултати и дискусия**,” се привеждат експериментални резултати, които недвусмислено показват, че изследваното съединение 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine 2-oxide притежава цитотоксично и генотоксично действие. Последователността от експерименти е планирана логично. Избрани са подходящи показатели за оценка на тези свойства. Дозовите граници на токсичност са подбрани чрез предварителни опити за проследяване инхибирането на кореновия растеж на мека пшеница под въздействие на концентрации в много широк диапазон. Въз основа на тези експерименти са подбрани условията за цитологичните изследвания на цитотоксичните и генотоксичните ефекти на Br-oxph върху различни експериментални обекти: меристемни клетки от лук, клетки от костен мозък на плъх, туморни клетки. Експерименталните резултати са съпроводени с

иллюстративен материал с високо качество. Изследвани са различни показатели: митотичен индекс, индекс на всяка фаза от митотичното деление, честота на делящи се клетки с хромозомни аберации, интерфазни клетки с нарушения и др. Диференцирани са различните видове хромозомни аберации като хромозомите са анализирани за хроматидно разкъсване, извънхроматидно разкъсване, хроматиден геп, извънхроматиден геп, центромерно сливане, теломерно сливане, наличие на фрагменти. Подобен анализ е направен след различни времена на третиране и след различни времена на възстановяване. Особеностите, свързани с използването на растителни и животински клетки са отчетени чрез сравнителен анализ на резултатите по различните показатели. Чрез допълнителния ултраструктурен анализ на хромозомните аберации предизвикани от Vg-oxph в клетките от костен мозък с помощта на атомно силов микроскоп е постигнато прецизиране на вида им и е доказан кластогенния ефект, проявяващ се даже и при третиране с ниски концентрации. Използването на различни обекти и алгоритъмът, който е следван позволяват да се твърди, че Vg-oxph оказва цитотоксично и генотоксично действие, макар и с някои специфичните особености, произлизащи от използваните организми и кинетиката на метаболиране му в тях. Заключениеите изследвания на цитотоксичния ефект на Vg-oxph върху човешка туморна клетъчна линия и апоптотичната му активност в система *in vitro* са много интересни и поставят много въпроси за бъдещи изследвания. Особено внимание заслужават индикациите, получени от предварителните експерименти за селективното цито- и генотоксично действие на Vg-oxph върху различни туморни линии. Разликите в чувствителността на нормални и неопластично трансформирани клетки от различни органи биха могли да се използват за насочено атакуване на някои тумори. Тези изследвания би следвало да бъдат продължени и задълбочени. Всички експериментални резултати са много добре документирани, обработени са по начин, позволяващ извличане на цялата информация от тях. Където е възможно резултатите са обработени статистически, което гарантира тяхната достоверност. Финансирането на дисертационния труд чрез участие на докторанта в научни проекта е позволило реализирането на експериментите, в условията на скромните университетски лаборатории. Търсени са и са използвани и възможностите за използване на външни лаборатории за прецизирането и допълването на резултатите - напр. Атомно-силовия микроскоп на Физическия факултет при Софийския университет.

Дискусията е задълбочена, като собствените резултати се обсъждат в светлината на наличните данни в литературата. Обосновават се евентуалните причини за различията в собствените резултати и данните на други автори. Трудът е написан на добър език, лесно се чете и възприема. Допуснати са минимален брой печатни грешки.

Приемам направените изводи и формулираните приноси на труда. Като най-съществени приноси на дисертационния труд бих открила следните:

Фундаментални приноси:

1. Доказано е генотоксичното и цитотоксично влияние на съединение от групата на хетероциклените оксафосфоли (Br-oxph) *in vivo* върху растителни и животински обекти.
2. Доказана е в система *in vitro* апоптотичната активност на съединение от групата на хетероциклените оксафосфоли върху туморни клетки.
3. Особено важен принос на дисертационния труд е алгоритъмът, който е създаден за изследване предполагаема цито- и генотоксичност на даден химичен агент

Научно- приложни приноси:

1. Чрез допълнителен анализ с помощта на атомно-силов микроскоп е доказана валидността на рутинно провеждания със светлинен микроскоп тест за хромозомни аберации.

Авторефератът отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд.

Препоръки:

1. Много интересно би било, при материална възможност в бъдеще, изследванията за промяната във виталността и апоптотичната активност на туморни клетки под действие на Br-oxph да се повторят при използване на сравними концентрации. Това ще позволи резултатите да се обработят с подхода на Анализа на метаболитния контрол (Metabolic Control Analysis-MCA), чрез който може да се провери предполагаемия механизъм за индуциране на апоптоза от Br-oxph.
2. Заслужава си да се провери действието на изследвания Br-oxph върху други туморни линии .
3. Би следвало да се използва термина „домен” вместо „домейн”, който е по-широко възприет на български език.

Заключение: Дисертационният труд съдържа оригинални резултати и отговаря на всички изисквания на Закона за присъждане на научни звания и степени и Правилника за приложението му. Той отразява едно оригинално научно изследване, което дава насоки за бъдещи изследвания. Резултатите са публикувани в 4 научни статии, две от които в списания с импакт фактор и са докладвани на 1 научен форум. Във всички Колева е първи автор. Те са цитирани вече 6 пъти, което отразява отзвука им в научната общност. Всичко това показва добрата теоретична и методична подготовка на докторантката, личният ѝ принос, нейната мотивираност и последователност. Като прибавим и

дългогодишната преподавателска дейност на Колева можем да твърдим, че тя един изграден изследовател и преподавател.

Познавам лично докторантката и съм убедена, че тя има значителен личен принос в изследванията. Тя работи целенасочено и упорито. За няколко години, благодарение на последователността и всеотдайността си, тя е успяла да допринесе много активно за създаване и оборудване на една съвременна лаборатория в Шуменския университет. В кратки срокове тя е изпълнила препоръките, дадени ѝ при зачисляването. Проведените експерименти за изследване апоптотичната активност на съединението 4-bromo-N,N-diethyl-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1,2-oxaphosphol-2-amine2-oxide са ценно допълнение към работата. Резултатите от тези експерименти успешно се комбинират с резултатите от цито-генетичните изследвания и придават на дисертационния труд молекулярно - биологина насоченост.

Преподавателската дейност на Колева също е дала отпечатък и е допринесла за цялостната ѝ биологична подготовка и оформянето ѝ като изграден научен работник и преподавател.

Всичко това ми дава основание да препоръчам убедено на уважаемото Научно жури да гласува положително за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Ваня Петрова Колева

Рецензент:

(Т.Аргирова Гетова)