

РЕЦЕНЗИЯ

от доцент, д-р Стоян Ангелов Шишков

Относно: дисертационния труд на Антон Веселинов Хинков

„ИЗСЛЕДВАНЕ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ СТИРИЛХИНОЛИНИ ЗА АНТИ-НIV-1 АКТИВНОСТ В КЛЕТЪЧНА КУЛТУРА“

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”,
по професионално направление 4.3. Биологични науки (Вирусология)
/Заповед РД19-659/16.11.2011 г. на Ректора на Софийския университет/

Дисертационният труд третира един от най-сложните проблеми на съвременното здравеопазване – овладяването на инфекцията с HIV и лечението на развилите СПИН лица. Независимо от постиженията при целенасоченото разработване на лекарствени средства и приложението им, продължава с пълна сила да стои въпроса за появата на лекарствено резистентни мутанти на HIV-1. Тези факти изискват интензивно търсене на нови анти-ретровирусни препарати от синтетичен и природен произход. Дисертацията на г-н Хинков в този смисъл е изключително актуална.

Дисертационният труд е представен на 195 стандартни страници и е онагледен с 41 фигури и 35 таблици. Оформен е съгласно общоприетата форма. Включва: заглавна страница; съдържание, списък на съкращенията и въведение - по 3 страници; обзор на литературата - 65 стр.; цел и задачи -1 стр.; материали и методи - 29 стр.; резултати и обсъждане - 52 стр.; обща дискусия - 5 стр.; резюме на получените резултати (изводи) и декларация за оригиналност (приноси) – по 1 стр.; резюме на дисертационния труд - 4 стр. Използваната литература е от 322 литературни източници (3 от които на кирилица, а останалите на латиница) и заема 30 стр.

Литературният обзор отразява първо накратко историческите факти за HIV и СПИН. Представена е съвременната класификация на ретровирусното семейство и филогенетичните връзки на двата типа човешки имунодефицитни вируси, както и трансмисията на HIV-1. Детайлно на молекулярно ниво са описани и онагледени структурата и репликационният цикъл на вируса. Разглеждайки всеки от етапите на реализиране на вируса, дисертантът представя механизма на действие на съответните инхибитори прилагани в момента. Акцентирано е на биологичните активности и в частност на инхибирането на интегразата от стирилхинолините.

В химичен аспект са изяснени разликите между тях и 8-стирилхинолините, използвани от автора.

Въз основа на данните за вирусната резистентност и токсичността на познатите инхибитори авторът аргументирано излага необходимостта от продължаващо търсене на нови съединения с анти-HIV активност.

Литературният обзор отразява в дълбочина огромно количество информация и е илюстрирана с 2 таблици и 25 фигури.

Цел и задачи. Отлично познавайки българската и световната литература по проблема, дисертантът и научният му ръководител са определили перспективна цел на тезата – изследване на нови 8-хидрокси-2-стирилхинолини. Конкретизираните задачи са амбициозни и носочени към:

- установяване на параметрите на цитотоксичност на новосинтезираните стирилхинолини;
- определяне на инхибиторната им активност спрямо репликацията на HIV-1;
- изясняване на мишените на действие и молекулярен анализ на механизма на действие;
- определяне на митохондриалната токсичност на веществата с анти-интегразно действие;
- изясняване на резистентността на вируса към активните съединения с неясна мишена на действие;
- разработване на алгоритъм за скрининг на новосинтезирани вещества за инхибиране на репликацията на HIV-1.

В раздела „**Материали и методи**” са представени необходимите химически характеристики на изследваните стирилхинолини, както и правилно подобреният вирусен щам HIV-1/ПВ и клетъчни линии MT-4, H9 и H9/HTLV ПВ. Веществата са разпределени в три групи. В първите две се включват единадесет първоначално синтезирани и изследвани стирил-хинолини, а в третата - шест новосинтезирани неизследвани стирилхинолини – 241, 105B, 242, 208, 300S и 303S.

Методите и необходимите за прилагането им материали са обстойно представени. Те дават възможност за детайлно проучване на въздействията на веществата върху клетките и върху съществени стъпки от вирусната репликация.

Разделът „**Резултати и обсъждане**” е удачно структуриран. Резултатите от прилагането на веществата спрямо клетъчната линия МТ-4, получени чрез МТТ теста, са представени в първата част. Орделени са техните максимално нетоксични концентрации (МНК) и стойностите на IC_{50} при достатъчно количество вещество (табл. 10-12, фиг. 26). Изследваните 17 вещества са сравнени според техните МНК стойности. Шестте вещества от трета група проявяват сравнително по-висока цитотоксичност от останалите. Най-слабо токсични от тях са 300S и 303S.

Следват експерименталните данни, установяващи инхибиторната активност на шестте новосинтезирани вещества и съпоставянето им с вече изследваните вещества от другите две групи. Най-висока активност се установява за вещества 105B, 105 и 205 (табл. 13-15, фиг. 27-33).

Проведените експериментите за определяне на мишена и механизъм на действие в клетъчна линия МТ-4 показват, че вещества 100, 101 и 105 инхибират обратно-транскриптазната активност на вируса (табл. 16-18, фиг. 26-33).

Антон Хинков установява и въздействие върху протеазната активност на вируса при прилагане на 300S и 303S (табл. 19-26, фиг. 34). Впечатлява подходът за определяне на анти-протеазната активност. Използва се, при това успешно, нативна вирусна протеаза вместо рекомбинантен ензим. Този подход е потвърден чрез използването на референтен инхибитор пепстатин.

Чрез селектиране на резистентни вирусни мутанти спрямо веществата 105B и 241, с последваща репликативна кинетика, динамика на възникване и секвенционен анализ на *in* домена на *pol* гена, авторът доказва тяхното анти-интегразното действие (табл. 27-34, фиг. 35-39).

Доказаните интегразни инхибитори са изследвани и за митохондриална токсичност в МТ-4 клетки, с цел изясняване на токсичното влияние върху клетките при използване на *real-time* PCR. Стирилхинолинът 105B проявява токсичност както към митохондриална така и към ядрената ДНК, докато другият инхибитор 241 не показва такава. (табл. 35, фиг. 40 и-41). Тези резултати са получени чрез модифициране на метода, като се използва суспензионна култура МТ-4, а не както е прието монослойна такава.

Резултатите са съществен принос за изясняване механизма на действие на изследваните вещества. Едновременно с това прави впечатление умелото интерпретиране на резултатите. Установява се зависимостта между химическата структура на веществата и тяхното действие.

На базата на натрупания значителен експериментален и теоретичен опит Антон Хинков и научният му ръководител, разработват отворен „алгоритъм“ за скрининг на новосинтезирани вещества за инхибиране на репликацията на HIV-1 и набелязване на мишената на действие *in vitro*. Така предложеният алгоритъм се откроява с научно-приложния си характер.

Общата дискусия върху постигнатите значими резултати затвърждават впечатлението от дисертацията като научно задълбочен и обширен научен труд.

Изводите са правилно изведени и формулирани.

Отразените **научни приноси** са напълно обективни.

Авторефератът на дисертационния труд съответства на изискванията и отразява точно съдържанието и приносите на дисертацията. Заема 48 страници.

Забележки. Те не засягат същността на дисертацията и по-скоро се отнасят към техническите пропуски при оформянето ѝ. За фигури 7 и 10 от литературния обзор не е отразен използвания източник. На страница 50 от обзора са цитирани седем публикации на български автори, които не са отразени в списъка с използваните литературни източници. В този списък под номера 126, 127 и 310 фигурират линкове, които не са достатъчно прецизирани.

Науко-метрични показатели. По темата на дисертацията г-н Хинков е представил 4 научни публикации, от които една с импакт фактор. Докладвал е свои резултати на 12 научени форуми в чужбина и страната.

В заключение може да се каже, че дисертацията на г-н Антон Веселинов Хинков е свързана с актуална тема, отлично структурирана е и е издържана е в методологично отношение. Написана е прецизно и има важни приноси от научен и приложен характер. Трудът напълно удовлетворява критериите за получаване на образователната и научна степен "доктор", поради което му давам **положителна оценка**.

01.02.2012 г.

Подпис:

/Доцент, д-р С. Шишков/