



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
СОФИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ
1000 СОФИЯ, ул. Дунав № 2
Тел./Факс: +359 2 987 9874

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дхн **Ирини Дойчинова**,
Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София

ОТНОСНО: дисертационния труд на **Петко Иванов Петков**, докторант към Лаборатория по математична химия, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас, на тема: „Моделиране на токсични ефекти, основани на взаимодействие на химични съединения с ензими, хормони и ДНК” за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Дисертационният труд на инженер-химик Петко Петков е интердисциплинарен по съдържание – с методите на хеометриката се решават проблеми на токсикологията. Създаването на модели за *in silico* токсикологичен скрининг на химични съединения е изключително важна задача с оглед масовото навлизане на нови синтетични продукти в бита и практиката на хората през последните десетилетия. В тази връзка през 2006 г. е приет законът REACH от Европейския парламент, съгласно който за всяко съединение трябва да има информация относно потенциалната му способност да предизвиква токсични ефекти. Тъй като стандартните токсикологични тестове се провеждат върху животни, стратегията на Европейската комисия е да стимулира развитието на алтернативни, в т.ч. и компютърни методи, за оценка на токсичността. Така, темата на дисертационния труд на инж. Петков е изключително актуална и перспективна.

Дисертационният труд е написан на 157 страници и съдържа 8 глави: въведение, литературен обзор, експериментална част, изводи, литература, публикации, свързани с дисертационната работа, насоки за бъдещи изследвания и приложения. Онагледен е с 8 таблици и 43 фигури. Библиографията включва 185 заглавия. Използваните в дисертацията литературни данни са включени в 6 приложения, предоставени на електронен носител.

Основната цел на дисертационния труд, дефинирана още в края на въведението, е извеждането на модели за прогнозиране на биологични ефекти с различна специфичност на обуславящите ги биохимични взаимодействия. За постигането на тази цел са дефинирани три задачи, които звучат по-скоро като подцели, отколкото като задачи.

В литературния обзор инж. Петков последователно разглежда класификацията на токсичните ефекти, QSAR подходите за тяхното моделиране, механизмите на ендокринна и генна токсичност и моделирането им, експерименталните системи за мутагенност и генна токсичност, метаболизма и методите за неговото изследване и моделиране. Тази глава завършва с обобщение, в което отново са дефинирани задачите на дисертацията. Литературният обзор е написан интелигентно, с добри познания върху изследваните биологични обекти, чете се с лекота и към него имам дребни забележки като:

- Конформационният анализ и характеризирането на молекулната структура не са QSAR подходи за моделиране на токсични ефекти, а етапи в едно QSAR изследване (стр. 10 – 15).

- Твърдението, че „Тъй като тези центрове (в ароматазата) са наситени с хидрофобни алифатни аминокиселини, се очаква, че ефективните стероидни инхибитори ще образуват водородни връзки с ензима” звучи нелогично (стр. 31).

- ДНК не съдържа урацил, а захаридът ѝ е само дезоксирибоза. Урацил и рибоза се съдържат в РНК (стр. 33).

- Неправилно използвани термини (важи за цялата дисертация) – потентност на свързване вместо афинитет; прототип вместо субстрат; посредствена активност вместо умерена активност; конфигурация вместо конформация; адсорбция вместо абсорбция; детоксификация вместо екскреция; клетъчна стена вместо клетъчна мембрана; пренос на електронна плътност вместо пренос на електрони; и др.

В т.нар. **Експериментална част** са включени използваните в дисертацията методи, получените резултати и обсъждането им. Резултатите са разгледани в три отделни подглави, в зависимост от моделирания токсичен ефект.

В първата подглава е моделирано взаимодействието на ароматни въглеводороди с арилхидрокарбоновия рецептор (AhR). Използвани са две обучаващи и една тестова група. Афинитетът на съединенията е представен като относителна величина спрямо афинитета на радиолиганда тетрахлор-добензо-диоксин (TCDD). Установени са дескрипторите на химичната структура с най-силна дискриминираща способност

между силно активни, слабо активни и неактивни съединения за различните химични групи. Всеки един от тези дескриптори формира т.нар. общ реакционен образ за свързване с AhR. Йерархичната организация на дескрипторите създава модел за класификация на тестваните съединения по отношение на афинитета им към AhR. Включването на данни за генна експресия дава допълнителна опция за разграничаване между агонисти и антагонисти. Моделът е тестван върху външна тестова група от 51 съединения, предизвикващи различна по сила генна експресия. От тях 17 са разпознати като верни положителни (33% чувствителност), 11 – като грешни отрицателни (0% специфичност), а за останалите 23 не може да се даде оценка, тъй като попадат в т.нар. неинформативна област. Резултатите показват, че усъвършенстването на този модел трябва да продължи, както правилно е посочено в насоките за бъдещи изследвания в края на дисертацията.

Във втората подглава е моделирано взаимодействието на стероидни и нестероидни съединения с ензима цитохром P-450 ароматаза. Използвани са литературни данни за IC₅₀ на 222 структурно разнородни инхибитори на ензима. За целта на изследването активността на съединенията е представена като log(1/IC₅₀), т.е. -log(IC₅₀). Идентифицирани са структурните характеристики на инхибиторите и са подредени в дърво на решенията. Моделът, интегриран в софтуерна платформа TIMES, дава възможност за бърз *in silico* скрининг за антиароматазна активност. Моделът не е тестван върху външна тестова група. Цитираната чувствителност от 87% вероятно се отнася за обучаващата група. Въпросът ми тук е свързан с използването на функцията -log(IC₅₀). Едно от предназначенията на тази функция е да се премахне знакът минус, получен при логаритмуването на числа, по-малки от единица, както е в случая със стойностите за IC₅₀. Изненадващо, стойностите за -logIC₅₀, цитирани в тази подглава, са отрицателни, което означава, че са логаритмувани числа, по-големи от единица. Това се случва, когато не е отчетена мерната единица на измерената концентрация (nM, μM, или mM). Тъй като данни за IC₅₀ на изследваните съединения липсват както в дисертацията, така и в приложенията към нея, моля дисертантът да обясни как при използването на функцията -logIC₅₀ са се получили отрицателни стойности.

В третата подглава се моделира генотоксичност, измерена на *in vitro* и *in vivo* ниво. Изследвани са над 1000 структурно разнородни съединения, за които са намерени данни в литературата за *in vitro* мутагенност, *in vivo* генотоксичност в черен дроб и/или в костен мозък на гризачи. Само за 162 съединения има данни и от трите теста. Моделирани са и трите ефекта и е потърсена корелация между *in vitro* и *in vivo* даните. Липсата на такава се обяснява с ефектите на активиране или деактивиране на

родителските съединения в *in vivo* среда. В тази връзка е създаден метаболитен симулатор, базиращ се на няколкостотин биотрансформации, описани в литературата. Включването на симулатора в моделите за генотоксичност значително повишава чувствителността им до 85 – 87%, но специфичността остава ниска – около 50%. Тези модели също не са тествани с независими външни тестови групи. Позволявам си да изкажа предположение, че липсата на *in vivo* генотоксичност в костен мозък за съединения, които са позитивни *in vitro*, по-вероятно се дължи на липсата на костна пенетрация, отколкото на „изчерпване на биологичната наличност на съединенията по пътя им към костния мозък” (стр. 117). Биологичната наличност не може да се „изчерпва”, защото по дефиниция представлява частта от екстраваскуларно приложената доза, достигнала до централното кръвообръщение. Може би докторантът е имал предвид, че плазмената концентрация на съединенията намалява с времето в резултат на процеси на елиминиране (метаболизъм и екскреция).

В края на дисертацията са формулирани **четири извода**, обобщаващи извършената работа и получените резултати. Резултатите са отразени в **4 публикации** и са докладвани на **6 научни форума**. Три от публикациите са в *SAR and QSAR in Environmental Research* с 5-годишен **IF = 1.702**, а четвъртата е публикувана в *Chemical Research in Toxicology* с 5-годишен **IF = 3.969**. В две от публикациите Петко Петков е първи автор, в една е втори. Работите са **цитирани 7 пъти**. Докторантът е участвал в **3 проекта** с водещи световни компании като Dow Chemical и DuPont и с Националния институт по здравни науки на Япония. Изискването за „най-малко 2 публикувани или приети за публикуване научни публикации по темата на дисертацията, като поне една от публикациите е в специализирано международно реферирано списание”, залегнало в чл. 44(1), т. 4 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в университет „Проф. Д-р Асен Златаров” – Бургас, е преизпълнено двукратно по количество и четикратно по качество.

Въпреки направените забележки, считам, че дисертационният труд на инж. Петков е изключително задълбочен и аналитичен. Обърнато е внимание на всеки получен резултат и са анализирани в детайли зависимостите структура/активност за всяка конкретна химична група. Прави впечатление внушителното количество литературни данни (по мои сметки, около 1500 структури и биологични активности), на които се базират анализите. Още повече, тези данни са събирани „на ръка” и са експертно оценявани за всяко конкретно научно изследване. Включването на моделите в софтуерни платформи улеснява тяхното използване за *in silico* токсикологичен скрининг, което е и целта на дисертацията. Високото научно ниво на рецензирания

труд за мен не беше изненада, познавайки постиженията на световноизвестната школа по хеометрика на проф. Мекенян.

Към докторанта имам следните по-обща въпроси:

1. Обяснете разликата между въведения от Вас термин „общ реакционен образ” и общоприетия термин „биофор”, дефиниран като тримерен ансамбъл от функционални групи, необходим за взаимодействие с дадена таргетна биомакромолекула.
2. Предвиждате ли в бъдеще разработване на online версии на вашите софтуерни платформи, безплатно достъпни в интернет, каквато е тенденцията в биоинформатиката през последните години?

В заключение мога да кажа, че дисертационният труд на Петко Петков напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България. По наукометрични показатели той надхвърля изискванията, заложиени в Правилника на Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас. На това основание давам **положителна оценка** и препоръчвам на уважаемите членове на научното жури да присъдят на инж. Петко Петков научната и образователна степен „Доктор”.

24.07.2013 г.

София

Рецензент:



(проф. Ирини Дойчинова)