

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд на тема:

„БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ПРОИЗВОДНИ НА ДИТИОКАРБОНОВАТА КИСЕЛИНА /КСАНТОГЕНАТИ/“

представен за придобиване на образователната и научна степен „ДОКТОР“ по научна специалност „Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)“, шифър 03.01.24

с автор **асистент Цвета Димитрова Стоянова**

РЕЦЕНЗЕНТ: доц. Милка Милева, дф

Лаборатория „Модификатори на биологичния отговор и патогенеза на вирусните инфекции“, Департамент по вирусология, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ Българска Академия на Науките, тел. +359 979 3117;
e-mail; milkamileva@gmail.com

Рецензията е изготвена въз основа на Заповед № 721/25.10.2019 г. на директора на Институт по невробиология – Българска Академия на Науките

Цвета Димитрова Стоянова е родена на 17.12.1982 г. През 2005 г. придобива образователна степен Бакалавър по биология, а през 2008 г. – Магистър по антропология в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“. През 2013 г. постъпва в Институт по невробиология – БАН като специалист в Направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“. От 2018 г. досега е на длъжност асистент в Направление „Поведенческа невробиология“.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД е посветен на изследване на някои биологични активности на производни на дитиокарбосиловата киселина /ксантогенати/. Със своите изследвания докторантката продължава богатата традиция, създадена в института от Лабораторията по лекарствена токсикология, в областта на лекарствения метаболизъм и методите на неговото изследване и повлияване.

Ксантогенатите са синтетични производни на дитиокарбосиловата киселина, които са станали интерес на научни изследвания още от втората половина на миналия век. Подобни вещества, имащи богата химична структура, проявяващи способността да улавят метални йони, които катализират

патологични за живата клетка процеси, поставят началото на едно модерно направление във фармакологията, наречено хелаторната терапия. Хелатотерапията днес се използва широко за лечение на атеросклероза и редица дегенеративни заболявания на кръвоносната система.

В този смисъл познаването на основните физични и химични свойства на ксантогенатите, хелаторната им активност спрямо някои метални йони при различни условия на средата, техния метаболизъм, отношенията им към активните форми на кислорода, химическата им стабилност и характера на получените разградни продукти е важна основа за пълноценното разбиране на разнообразните им биологични ефекти.

Оригинален и интересен е подходът в настоящата дисертация да се изследва метаболизма на набор от ксантогенати от монооксигеназни и пероксидазни ензими в моделни системи, да се проследи тяхното взаимодействие с различни активни форми на кислорода чрез използване на богат панел от подходи за доказване и изясняване на механизмите на биологичното им действие, като се търси връзката молекулен дизайн – биологична активност.

ДИСЕРТАЦИЯТА е написана на 139 стандартни страници, съдържа 45 фигури, 13 таблици. Библиографията обхваща 234 литературни източника.

Трудът е структуриран съобразно изискванията и включва: Въведение – 2 стр.; Литературен обзор – 33 стр.; Цели и задачи – 1 стр.; Общи методи – 8 стр.; Експериментални постановки и резултати – 53 страници; Обща дискусия – 19 страници;

ЛИТЕРАТУРНИЯТ ОБЗОР започва с данни за синтез, физични и химични свойства на ксантогенатите. Изброени са методите за анализ, стабилност в различни условия на ксантогенатите, както и областите от науката и практиката, в които те намират приложение.

Данните включват и широк спектър от биологични активности на ксантатите - остра и субхронична токсичност, инхибиране на метал-съдържащи ензими в растенията; инхибитори и активатори на тирозиназите; ксантогенатите като антивирали - неспецифични инхибитори на вируси от различни таксономични групи; антигъбични, антибактериални, като антитуморни агенти и др.

Отделено е внимание и на станалата модерната в края на миналия век теория за оксидативния стрес и т. нар. свободно-радикалови болести, свързани с нарушена микроциркулация, мутагенеза и карциногенеза, възпаление и невродегенерация. В последните десетина години тази теория се обогати и доразви в посока, доказваща, че активните форми на кислорода са важен елемент от клетъчния редокс-статус и редокс-сигнализация, те са и сигнални молекули, и медиатори на защитния отговор и не би следвало да се разглеждат само като увреждащ фактор. В литературния обзор този факт е компетентно дискутиран, свързан е и със системата на CYP450, чиито ензими участват в осъществяването на различни химични трансформации в молекулата на субстрата. Тези трансформации стават възможни след активиране на молекулния кислород. Описани са изоформите на CYP450 в зависимост от субстратната специфичност, както и каталитичния цикъл на лекарствения метаболизъм. Отбелязани са някои особености при тестване на ензимната активност на CYP450 в условия *in vitro* - мембранната локализация, качеството и количеството на фосфолипидите и свойствата на средата около него – температура, ниво на АФК и др. Разгледан е метаболизмът на ксантогенатите от различни изоформи на CYP450 и механизма на формирането на „субстрати – самоубийци“.

Главата, посветена на лекарствения метаболизъм, е написана изключително компетентно, с разбиране и тълкуване на най-фини механизми, като се започне от каталитичния цикъл на CYP450, включващ селективност и специфичност на субстратите и се стигне до индивидуалните различия в лекарствения метаболизъм при хората. Тази част от обзора има стойност на монография и бих препоръчала да се публикува, за да стане достояние на научната общност. Тъй като илюстрациите, с които са онагледени тези факти, са много информативни, но не е посочен източникът, от който са използвани, редно е да се посочи от къде е взета тази информация.

Литературният обзор обаче поражда и следните въпроси:

1. Не става ясно на какъв принцип са подбрани изследваните ксантогенати.
2. Надписът под Фигура 2: Какво се има предвид под "М е метал със свободна чифтна електронна двойка"? Електроните или са единични, или са в чифт, т.е. в електронна двойка.

3. Глава 1.1.5.2. – Използване на ксантогенатите като антидоти при отравяне с тежки метали. Данните за какви модели се отнасят? Животински, или са прилагани при хора?

4. Как се дефинира понятието "спектрална константа на дисоциация"?

5. Глава 1.1.1. От къде са използвани данните за абсорбционните максимуми и екстинкционните коефициенти на ксантогенатите?

5. Фигура 3. Абсорбционен спектър на етилксантогенат в нарастващи концентрации – в какъв концентрационен диапазон са извършени измерванията?

6. Таблица 2. Токсичност на различни ксантогенати при мишки – кои ксантогенати?

7. Не на последно място, употребеният термин карбонова киселина е от старата номенклатура на UPAC, според съвременната се използва терминът карбоксилова киселина.

8. Глава 1.2.2.3. При планирането на експерименти в докторската работа за участието на различни активни форми на кислорода при метаболизма на ксантогенатите от изоформи на СУР, би трябвало да се имат предвид следните факти, следва да се замени "имахме предвид" със "се позовахме на".;

Сентенцията "Би било важно да се провери дали същите промени биха се наблюдавали в биологични среди при участието на водороден пероксид" има смисъл на задача в хода на експерименталната дейност.

ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ на работата би било добре да са формулирани по-ясно.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИЯТ МАТЕРИАЛ включва 19 ксантогената.

Използвани са богат набор от различни аналитични и биохимични методи, детайлно и подробно описани. Методологията е богата, модерна и актуална, включва и добре подбран статистическия анализ.

РЕЗУЛТАТИ И АНАЛИЗ. Тази глава е много трудна за рецензиране. Форматът, в който са представени резултатите, се различава от този на стандартно приетия за една дисертация. Всяко изследване е само за себе си, със съответните въведения,

цел, методология, резултати и дискусия. Много обръква за читателя е номерацията на фигурите и таблиците.

Обсъждането на резултатите съдържа някои неизбежни повторения от обзора и методологията, даже в стремежа си да покаже информираност и познаване на литературата, докторантката е поместила цели параграфи, подходящи за обзора, в главата Резултати и анализ (Стр. 113-114).

Анализът на резултатите от процесите в моделни системи изисква сериозни познания, при това в голяма дълбочина, относно принципите и спецификата на кинетика на ензимните реакции. Добро впечатление правят използваните адекватни кинетични методи за определяне на антиоксидантната активност на изследваните субстанции. Статистическата обработка на резултатите позволява формулираето на достоверни концепции относно CYP-катализираното окисление на ксантогенатите. Експерименталните данни, получени в настоящата дисертация, допълват и обогатяват познанията за механизма и мястото на промяна на структурата на ксантогенатите от два изоензима на CYP450. Резултатите са потвърдени и чрез QSAR анализ.

Липсва раздел "Заключение". Направо следва глава "Изводи".

Изводите, 6 на брой, са направени ясно и акцентират върху връзката между скоростта на метаболизъм на ксантогенатите и концентрацията на активните форми на кислорода. Взаимодействието и метаболизмът на CYP4A11 и CYP2E1 и зависят от ориентацията на алкилната верига и съответно на дитиокарбосиловата функция към хема на активния център. Би било по-коректно да се отбележи, че антиоксидантната активност, но в система *in vitro*, се реализира в по-голяма степен чрез „гасене“ на NO радикали, в сравнение с метал-хелиращото действие. Живият организъм е доста по-сложна система и реакции от първи порядък, наблюдавани тук в експерименталната част, трудно се случват.

В раздел "Приноси", трябва да се избягват изразът "вероятно". Щом е принос, не може да се дефинира с "вероятно".

АВТОРЕФЕРАТЪТ (70 стр.) съдържа всички основни данни на дисертацията, добре е онагледен и дава добра представа за извършената работа.

ОЦЕНКА НА КРИТЕРИИТЕ В СЪОТВЕТСТВИЕ СЪС ЗРАСРБ И ПРАВИЛНИК ЗА ОБУЧЕНИЕ НА ДОКТОРАНТИ НА ИНБ – БАН.

По настоящата процедура за защита на дисертационния труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, гл. асистент Стоянова е покрила всички критерии в съответствие със ЗРАСРБ и Правилник за обучение на докторанти на ИНБ – БАН. По точка I от правилника - образователната програма, от необходим минимум от 130 точки, асистент Стоянова има 150; По точка II (участие в научни мероприятия), при необходим минимум от 40 точки, тя има 240 (9 участия в научни мероприятия в страната); по точка III, касаеща публикационната активност, при необходим минимум от 80 точки, тя е събрала 180.

Резултатите от дисертационния труд са отразени в 3 научни статии с общ импакт фактор 8.87. В две от приложените публикации докторантката е първи автор. Забелязани са 1 цитиране.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният ми за рецензия дисертационен труд представлява интересно и задълбочено изследване на някои биологични активности на производни на дитиокарбоксилната киселина /ксантогенати/, с акцент върху лекарствения метаболизъм и антиоксидантната активност. Като всяка дисертация и тази има някои слабости, които вече отбелязах, но те в никакъв случай не омаловажават и не обезценяват този труд.

Процедурата отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилник за обучение на докторанти на ИНБ – БАН, достатъчната научна продуктивност на докторантката ми дават основание да препоръчам на почитаемите членове на Научното жури да присъдят на асистент Цвета Димитрова Стоянова образователната и научна степен “Доктор”.

31.10.2019 г.

София


/Доц. Милка Милева, дф/