



## **Биографични данни на кандидата**

Цвета Димитрова Стоянова получава бакалавърска степен по биология в СУ “Св. Климент Охридски” през 2005 г. През 2008 придобива образователно-квалификационната степен магистър по Антропология в същия университет. През 2013 г. е назначена като специалист – биолог в Направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“, Институт по Невробиология, БАН. От 2014 г. зачислен за редовен докторант по научната специалност „Фармакология“ в Институт по невробиология на БАН. От 01.02.2018 работи като асистент в Направление „Поведенческа невробиология“ в същия институт.

## **Актуалност на дисертационния труд**

Темата, на която е посветен дисертационния труд, се разработва от години в Института по Невробиология на БАН и по този начин автора дава едно съвременно продължение на научните традиции в Направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“ в този институт. Обект на научния труд са някои нови биологични свойства на представители на дитиокарбоновите киселини – ксантогенати.

Актуалността на темата се определя широкото използване на ксантогенатите в химическата индустрия като:

- Базисни материали в производството на целофан и вискозни влакна
- Флотационни реагенти за извличане на олово, мед, цинк и желязо от рудна маса.
- Регулатори на процесите на полимеризация,
- Втечители на технически масла
- Ускорители при вулканизацията на каучук.
- Реагенти при пречистване на замърсени води от кадмий, сребро и др.
- Фунгициди, акарициди и инсектициди в селското стопанство.

Познаването на основните физични и химични свойства на ксантогенатите, хелаторната им активност спрямо различни метали, взаимодействието им с реактивните форми на кислорода, химическата им стабилност и характера на получените разградни продукти е важна основа за пълноценното разбиране на разнообразните им биологични свойства.

Резултатите от изследвания върху метаболизирането на ксантогенатите от различни ензими, участващи в метаболизма на ксенобиотиците, както и от различни реактивни

форми на кислорода представляват ценна информация за експериментатори и клиницисти за евентуалното терапевтично приложение на тези вещества.

Структурирането на дисертационния труд е съобразена с общоприетите съотношения между отделните раздели. Той съдържа 139 стандартни машинописни страници, от които, литературен обзор – 32, общи методи – 8 стр. Специфичните методи, използвани в отделните изследвания към дисертационния труд и получените резултатите са описани в глава „Експериментални постановки и резултати“ – 53 стр. Освен дискусиите към отделните изследвания е оформена и обобщаваща дискусия от 19 страници, озаглавена „Обща дискусия“. Изводите и справката за приносите са представени на 2 стр. Библиографията включва 238 литературни източника на английски език. Резултатите от изследванията са представени в 9 съобщения на научни форуми и са публикувани в 3 статии, като в 2 от тях Стоянова е водещ автор. Всички публикации са в списания с ИФ, като две от тях са с Импакт Фактор над 4.0. Изследването е онагледено с 13 таблици и 45 фигури.

**Литературният обзор** е написан стегнато, компетентно и диалогично. Посочени са изследвания в световната литература, които третират: синтеза, физичните и химичните свойства на ксантогенатите; методите за техния анализ; данните за стабилността на ксантогенатите; приложението на ксантогенатите в химията и индустрията; биологичните ефекти на ксантогенатите.

Освен множеството чуждестранни автори, литературният обзор представя адекватно и българския принос в изследването на ксантогенатите, което е едно от несъмнените достойнства на дисертационния труд.

**Цели и задачи** Целта на изследването е конкретно и ясно формулирана – да се изследва *in vitro* взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от биологични (монооксигеназни и пероксидазни ензими) и химични моделни системи, генериращи различни реактивни форми на кислорода за изясняване на механизма на антиоксидантното им действие.

Основните задачи, които си поставя докторантката, са изследване *in vitro* на метаболизма на някои ксантогенати в системата на СYP450, изясняване на значението на реактивните форми на кислорода при този процес и изследване на взаимодействието на ксантогенатите с различни свободни форми на кислорода - водороден пероксид,

хидроксилен радикал и супероксиден радикал, както и възможното GSH-миметично действие и NO-скавинджер ефект на ксантогенатите.

**Материали и методи** Експериментите са проведени с общо 19 различни ксантогената, синтезирани в лабораторията по Лекарствена Токсикология при Институт по Невробиология, БАН. Описани са и са използвани 5 методики за определяне на ензимна активност. Използвани са методи за генериране на реактивни форми на кислорода за изследване на взаимодействието им с метаболизма на ксантогенатите. Антиоксидантният ефект на ксантогенатите е изследван с три различни методики: взаимодействие със стабилния радикал DPPH, взаимодействие с реактива на Ellman за определяне на тиоловата групи и взаимодействие с NO при спонтанното му отделяне от натриев нитропрусид и тестване с реактива на Griess. За проследяване на метаболизма на ксантогенатите са използвани спектрални методи – абсорбционни спектри в ултравиолетовата област. Провеждано е разделяне на ксантогенатите и техните метаболити чрез високоефективна течна хроматография (HPLC). Важно достойнство на дисертационния труд е използването на MOE software, Docking и 3D protonate tool за анализ на ориентирането на молекулите на ксантогенати в активните центрове на CYP4A11 и CYP2E1, чрез молекулярно моделиране. Статистическата обработка е извършена с подходящ софтуер и освен често срещаните методи прави впечатление използването на нелинейни регресионни методи за оценка на взаимодействието на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи.

**Резултатите** са групирани в пет раздела.

В първия раздел са показани резултатите от изследването на взаимодействието на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи образувачи супероксиден радикал. При експериментите с метаболизиране на ксантогенатите от пречистен CYP2B1 се направи извода, че степента на метаболизъм на ксантогената от CYP2B1 зависи в много по-голяма степен от концентрацията на реактивни форми на кислорода отколкото от тази на редуциращите еквиваленти. Образуваните реактивни метаболити не са идентифицирани със сигурност, но е изказано предположението, че най-вероятно са метаболити, които се получават след отделяне на двата водородни атома при  $\alpha$ -въглеродния атом на страничната алкилна или арилна верига на ксантогената. При изследването на метаболизирането на ксантогенати от CYP2E1 и CYP4A11 е приложен и методът на молекулярно моделиране (Docking). Резултати показват, че

ксантогенатите с дълга алкилна верига са относително добри субстрати на двете СУР изоформи, осъществяващи LA-хидроксилиране. Метаболизмът на ксантогенатите от двете СУР изоформи предизвиква различни конформационни промени в молекулата на ксантогенатите, което от своя страна води до различни промени в ензимната молекула. Взаимодействие на ксантогенати със супероксидни радикали е изследвано във система генерираща супероксидни радикали при фотохимична реакция на рибофлавина. В условията на проведените експерименти, взаимодействието на ксантогената със супероксиден радикал не води до окисление на единия серен атом до перксантат, както се получава след прибавянето на водороден пероксид.

Във вторият раздел е изследвано взаимодействието на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи, използващи водороден пероксид. При изследването на кинетиката на инхибиране на катализираната от пероксидаза от хрян реакция, както с о-анизидин, така и с  $H_2O_2$ , С8 показва подобен ефект на дитиокарбамата (DDC), който инхибира по конкурентен начин активността на пероксидаза от хрян по отношение и на двата субстрата. Разликата между С8 и DDC е, че ксантогенатът показва по-силен инхибиторен ефект върху пероксидазната реакция по отношение на  $H_2O_2$ , отколкото към о-анизидина. Ефектът на С8 е по-силен от инхибиращия ефект на пропил галат, използван като моделен пероксидазен инхибитор. Резултатите от изследването на антимикобактериалната активност на ксантогенатите, сравнена с тази на етионамида показват, че ксантогенатите с къси до средно дълги алкилни заместители имат стойности на минималната инхибиторна концентрация десет пъти по-малка от тази на етионамида, докато тази на D609, с цикличен заместител, е сравнима с тази на етионамид. Като цяло, някои от тестираните ксантогенати в това изследване показват умерена степен на бактериостатична антимикобактериална активност, в повечето случаи сравнима или по-висока от тази на референтния лекарствен препарат Етамбутол. Изследването на взаимодействието на ксантогенати с водороден пероксид показва, че скоростта на окисление на ксантогенатите до перксантат зависи от структурата на ксантогента и концентрацията на водородния пероксид. Изчислените скоростни константи за окислението на ксантогените, чрез проследяване намаляването на абсорбцията при 301 nm, са значително по-големи при ксантогенатите с ароматна структура (цикло, холин) или с по-дълга алкилна верига (C10 - C18).

В третия раздел са разгледани резултатите от изследването на взаимодействието на ксантогенатите с неензимни системи генериращи хидроксилен радикал. Заклучава се,

че конкуренцията от страна на ксантогенатите за взаимодействие с  $\cdot\text{OH}$  радикали преобладава над способността им за хелиране на желязото.

Четвъртия раздел разглежда резултатите от изследването на механизма на антиоксидантното действие на ксантогенатите. Установено е, че антиоксидантното действие на ксантогенатите спрямо DPPH радикала е придружено с промени в техните абсорбционни характеристики. Анализът на резултатите показва, че изследваните ксантогенати са съединения с висока антиоксидантна ефективност, сравнена с тази на Trolox. Тази антиоксидантна ефективност е от типа „скавенджери“ на радикали. Разкъсването на дисулфидната връзка в DTNB от различните ксантогенати е значително по-неефективно от това на монотиоловите съединения (GSH и Penicillamine). Това се обяснява с факта, че сулфхидрилната група в монотиоловите съединения значително се отличава в своите химически отнасяния от дитиоловата група в дитиокарбонатите и дитиокарбаматите, доказано в редица сравнителни експерименти.

В петия раздел са представени резултатите от взаимодействието на ксантогенатите със системи, генериращи азотен оксид (NO). При модела на спонтанно отделяне на NO при разтваряне на натриев нитропрусид се установява, че ксантогенатите влияят количествено на този процес. Заключва се, че само на базата на този експеримент не може да се определи по какъв механизъм става това. За разлика от антиоксидантното действие на ксантогенатите при теста с DPPH, където се наблюдаваше промяна в структурата на ксантогената, при взаимодействието на ксантогенатите с NO не се регистрира такава промяна.

Отлично впечатление оставя задълбоченото **обсъждане на резултатите в глава „Обща дискусия“**. Обсъждането ясно представя основните пунктове от анализа на резултатите, въпреки тяхната сложност и многото дискуссионни проблеми. Общия анализ е подробен и изчерпателен. Докторантката се е постарала да представи проблемите в пълнота и съпоставя логично своите резултати и изводи с тези и на други автори.

Шестте извода са прецизно формулирани и отразяват **основните резултати от проучването** и достиженията на разработката.

