

Вх. № 602 / 31.10.2019г.

СТАНОВИЩЕ

на дисертационен труд на Цвета Димитрова Стоянова

на тема: Биологична активност на производни на дитиокарбоновата киселина
/ксантогенати/,

за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ в Професионално направление 7.1. Медицина по научна специалност „Фармакология /вкл. фармакокинетика и физиотерапия/ с научен ръководител доц. Албена Александрова и научен консултант: д-р Станислав Янев.

Рецензент: Проф. д-р Румяна Цонева

Секция „Липид-белтъчни взаимодействия“, ИБФБМИ-БАН

Актуалност и значимост на темата

Настоящата дисертация проследява анализирането на някои нови биологични свойства на представители на дитиокарбоновите киселини – ксантогенатите, които са били обект на дългогодишно изследване в Лабораторията по лекарствена токсикология в Института по невробиология на БАН. Актуалността на темата се определя от факта, че ксантогенатите проявяват голяма палитра от биологични ефекти като токсичност, антидот ефект при отравяне с тежки метали, анти-вирусна, анти-туморна и анти-бактериална активност, както и ефект върху ЦНС. Поради тази причина ксантогенатите намират приложение в аналитичната химия, промишлеността, селското стопанство, и не на последно място в медицинската практика като лекарствени агенти. Липсата на експериментални данни за взаимодействието на ксантогенатите с оксидо-редуктазни ензими като монооксигенази и пероксидази, а така също и изясняване ролята на реактивните форми на кислорода в метаболизма на ксантогенатите прави настоящата докторска дисертация много актуална. **Научната значимост** на дисертацията е безспорна и е свързана с изследванията за изясняване на специфичния метаболизъм на ксантогенатите при участието на различни изоформи на СYP450, както и на флавинова монооксигеназа и пероксидаза. Намерената взаимовръзка между метаболизма на ксантогенатите с този на мастните киселини и потенциалната им роля като анти-вирусни и анти-туморни агенти, както анти-бактериална активност на метаболитите им, би имало и **приложно значение** при използването на ксантогенатите в медицинската практика. За изясняване на биологичните ефекти на ксантогенатите, в дисертацията умело са използвани различни химични биомиметични модели на окислението им и

получаването на различни метаболити. Чрез този подход се определя и тяхното специфично действие: като „ловители“ на супероксидни радикали, взаимодействат с хидроксилните радикали и се окисляват от водородния пероксид.

Структура на дисертационния труд

Дисертационния труд е написан на 139 страници. Основните раздели са: Въведение – 2 стр., Литературен обзор – 32 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 8 стр., Експериментални постановки и резултати – 53 стр., Обща дискусия – 19 стр., Изводи, Приноси и Цитирана литература – 234 източника. Горните раздели се предшестват със Съдържание и Използвани съкращения. Съотношението между отделните раздели отговаря на общоприетите стандарти. Дисертацията е богато илюстрирана с общо 71 фигури и 18 таблици.

Литературен обзор

Анализирането на информацията от актуални литературни източници разкрива умението на докторанта да опише постигнатото от други автори и да набележи нерешени проблеми, както и да определи необходимостта от планираните от нея проучвания и по-късно да съпостави и анализира данните така, че убедително да навлезе в същността на важен за практиката проблем и да приложи научен подход при неговото експериментално изучаване. Направено е целенасочено представяне на проблема, като Литературния обзор е разделен на две части, като по този начин в първа част са разгледани синтез, физични и химични свойства на ксантогенатите, и във втора част - метаболизъм на ксенобиотиците, вкл. основни метаболизиращи системи и метаболиз на ксантогенатите. Литературният обзор е написан компетентно, като затова спомагат адекватно включените научни трудове свързани с темата на дисертацията. Метаболизмът на ксантогенатите, което се явява основната задача в дисертацията, е детайлно описан като са включени данни за различни пречистени изоформи на СYP450, както и участието на активните форми на кислород, което отличава автора с умело боравене с научната литература и проблемите свързани с темата.

Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е 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.

На базата на основната цел са формулирани **пет задачи**, включващи:

1. Да се изследва *in vitro* метаболизма на някои ксантогенати в системата на CYP450 (пречистени изоформи CYP2B1/2B6, CYP 2E1 и CYP 4A) и да се изясни значението на реактивните форми на кислорода при този процес.
2. Да се изследва *in vitro* взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от флавин монооксигенази и пероксидази.
3. Да се изследва взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите с реактивни форми на кислорода (водороден пероксид, хидроксилен радикал и супероксиден радикал) в моделни химически системи.
4. Да се изследва антиоксидантната активност на ксантогенатите по отношение на свободния радикал DPPH.
5. Да се изследва възможното GSH-миметично действие и NO-скавинджер ефекта на ксантогенатите.

Целта на работата е правилно формулирана и определя ясно областите, в които ще бъде проведено изследването. Така поставените задачи съответстват с общата цел на дисертацията и са предпоставка за нейното постигане.

Експериментални методи

Разделът включва описание на добре подбрани и адекватни методи и експериментални модели, както и на използваната статистическа програма за анализ на резултатите. За пълнотата на описаните методики допринася включването на една таблица и четири фигури. Описанието на раздела е достатъчно пълно и изчерпателно, за да могат да бъдат възпроизведени предвидените експерименти.

Резултати и дискусия

Разделът е структуриран в пет части и е онагледен с 13 таблици и 45 фигури, които отговарят на съвременните научни стандарти. Всяка част завършва с кратка дискусия и анализ на данните. *In vitro* изследванията свързани с взаимодействието на ксантогенатите с ензимни и неензимни системи са представени в първа, втора и трета

част както следва: ензимни и неензимни системи образуващи супероксиден радикал (O_2^-), с ензимни и неензимни системи, използващи водороден пероксид и с неензимни системи генериращи хидроксиден радикал. Резултатите свързани с изясняване на механизма на антиоксидантното действие на ксантогенатите са описани в четвърта и пета част. Дискусиата в края на всяка част допринася за лекото възприемане на огромните по обем данни. Оформлението на раздела е на високо ниво. Стилът на писане е стегнат, добре обоснован и структуриран. Графично представяните данни са добре организирани и са с достатъчно описание към тях. Показани са резултати от всички изследвания, коментирани в текста на раздела. Данните са правилно интерпретирани. Обсъждането в дискуссионната част на раздела е на високо ниво и е подплатено с използването на множество цитати. Получените данни и направените изводи са разглеждани в светлината на съвременните изследвания в областта, за което свидетелства големият брой цитирани публикации в хода на обсъждането.

Изводи

На базата на извършените изследвания са направени 6 извода, които са на базата на получените резултати:

1. Метаболизирането на ксантогенатите от CYP2B1/CYP2B6 се осъществява от супероксидни радикали чрез отделяне на два протона при αC атом. Скоростта на метаболизиране зависи от структурата на различните ксантогенати и в много по-голяма степен от концентрацията на реактивни форми на кислорода, отколкото от тази на редуциращите еквиваленти.
2. Взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от CYP4A11 и CYP 2E1 е различно: а. LA- ω -хидроксилирането от CYP4A11 се инхибира конкурентно поради ориентиране на алкилната верига към хема на активния център;
- б. Активността на CYP2E1 се инактивира след образуване на реактивни метаболити поради ориентиране на дитиокарбоновата глава на ксантогенатите към хема на активния център.
3. Взаимодействието и метаболизма на ксантогенатите от хем съдържащи пероксидази (HRP) води до конкурентно инхибиране на пероксидазната реакция и образуване на различни метаболити в сравнение с тези получени под действието на CYP2B1.
4. Взаимодействието на ксантогенатите с водороден пероксид и флавин монооксигенази води до образуване на S-O--окислени метаболити, перксантати.

5. В среда на генериране на хидроксилни радикали ксантогенатите най-вероятно се метаболизират чрез пиролитична реакция на разкъсване на С-О връзката до съответните въглеродороди и серни продукти.
6. Ксантогенатите са специфични антиоксиданти (*scavengers*, ловители). Взаимодействието им с различни реактивните форми на кислорода и различни радикали води до различни промени в структурата им. Това се реализира: а. чрез отдаване на един електрон;
б. чрез отдаване на един до два протона от α С на ксантогенатната молекула;
в. чрез протектиране на сулфхидрилната група на глутатион от окисление;
г. чрез „гасене” на NO радикали;
д. метал-хелиращото свойство на ксантогенатите играе незначителна роля за тяхната антиоксидантна активност.

Приноси

На основата на получените данни в дисертацията са **изведени четири основни приноса** свързани с изясняване на механизма на действие на ксантогенатите върху различни биологични системи. Според мен те са правилно формулирани, отговарят на получените експериментални данни и напълно потвърждават работните хипотези. Лично за мен основните приноси на работата са свързани с разкриване на потенциращия ефект на мастните киселини за разгръщането на антивирусното и антибактериалното действие на ксантогенатите и деминстрирания антиоксидантен (*scavenger*) механизъм на действие, който предполага невропротективния ефект на ксантогенатите.

Литература

Цитирани са 234 литературни източника, основната част от които е публикувана след 2000 г. Литературните източници са правилно цитирани и оформени. Дисертациата е написана граматически правилно и е пунктуационно издържана. В дисертацията са допуснати дребни технически грешки, но по-съществени забележки нямам.

Публикации във връзка с дисертацията

Публикуваните 3 статии с импакт-фактор, в две от които докторантът е водещ автор, отразяват най-важните резултати от дисертационния труд. Две от предствените

публикации са в много престижни списания, като напр. *Frontiers Pharmacology*, с висок импакт фактор (над 4), което е потвърждение за значимостта на дисертационния труд. Забелязан е един цитат на една от публикациите. Докторантът има и осем участия в научни форуми. Сборът от точки от участие в тези публикации е общо 42, с което са надхвърлени минималните законови изисквания за присъждане на научна и образователна степен „доктор“ от 30 точки по група „Г“ от показатели

Автореферат

Авторефератът съдържа 70 страници и включва 36 фигури и 12 схема и съответства по съдържание на дисертацията. Той е правилно структуриран и дава ясна представа за съществените моменти в дисертацията. Посочени са всички основни резултати, получени в хода на изследванията. Направено е много добро обобщение на данните.

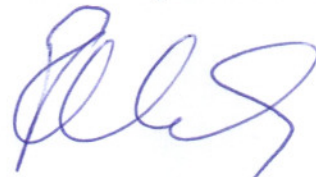
Заклучение:

Считам, че дисертационният труд на Цвета Стоянова е едно задълбочено и съвременно изследване на метаболизма на ксантогенатите, свързан с противовирусното, бактерицидното и антиоксидантното им действие и дава възможност за бъдещо използване на ксантогенатите в адювантна терапия на социално-значими заболявания.

Въз основа на гореизложеното считам, че настоящият дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България, както и на Правилника на Институт по невробиология - БАН и уверено препоръчвам на Научното жури да присъди на **Цвета Димитрова Стоянова** образователната и научна степен „доктор“ в Професионално направление 7.1. Медицина по научна специалност „Фармакология“.

31.10.2019

София



/проф. д-р Румяна Цонева/