

482/07.10.14

## **РЕЦЕНЗИЯ**

на дисертационния труд  
на ЕЛИНА РУМЕНОВА ЦВЕТАНОВА

на тема: **„ВЛИЯНИЕ НА НОЦИЦЕПТИН И НЕГОВИ СТРУКТУРНИ АНАЛОЗИ  
ВЪРХУ КЛЕТЪЧНИЯ АНТИОКСИДАНТЕН СТАТУС”**

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”  
по научната специалност: „Фармакология”, шифър 03.01.24

**Рецензент: доц. Д-р Любка Танчева, Институт по Невробиология на БАН**

Главен асистент Елина Руменова Цветанова работи от 15 години в лаборатория Свободно-радикални процеси, към ИНБ на БАН, в направление: "Биологични ефекти на природни и синтетични вещества". Представения за защита труд за присъждане на образователна и научна степен "Доктор" по научна специалност „Фармакология» се отнася до експериментални изследвания върху антиоксидантния капацитет на ноцицептина и някои негови новосинтезирани структурни аналози.

През последните години все-повече нараства интересът и изследванията върху връзката на оксидативния стрес, който се наблюдава при различни заболявания и ноцицепцията, което би могло да доведе и до разкриване на механизмите на лечение на много заболявания. Като се имат предвид установените регулаторни и модулаторни функции на ноцицептина в редица органи и системи, би могло да се прогнозира че някои от аналозите му, високо потенциални NOP рецепторни агонисти, могат да са полезни при лечението на различни състояния, свързани с повишена продукция на АФК и интензифициране на свободно-радикалните процеси в организма като: болка, грип, възпаление, наркотична зависимост, анорексия причинена от стрес. Антагонистите на NOP рецептора от своя страна биха могли да се използват за третиране при стрес, деменция, паркинсонизъм и др. Високата ефикасност, високия афинитет и селективност на действие на новосинтезирани пептидни аналози ги прави потенциално важни като тест-съединения за бъдещи изследвания в областта на действие на N/OFQ и неговия NOP рецептор, а в по-далечно бъдеще дори и като средства за диагностициране и за терапевтично приложение.

Прегледът на обзора на научната литература показва, че авторът е добре запознат с изследователския проблем. Систематизирани са съществуващите данни за наличие на връзка между оксидативния стрес в ЦНС и ноцицептина- N/OFQ- неuropeпид, с 17 аминокиселини, ендогенен лиганд на ноцицептиновите рецептори и регулиращ различни централни функции (възприятие за болка, обучение и памет, страх и безпокойство, глад и двигателна активност), както и много други. Въпреки установената връзка обаче, досегашните публикувани данни отразяват това взаимодействие само частично, а данните за про/антиоксидантните свойства на ноцицептина са сравнително оскъдни. Това именно е мотивирало и интереса на автора за по-пълното изследване способността на ноцицептина, както и на негови нови структурни аналози, да променят нивата на клетъчните антиоксиданти, както в норма, така и при патология. Заедно с това докторанката си поставя и въпроса дали част от ефектите на ноцицептина не се реализират чрез промяна на антиоксидантния статус на клетките, имайки предвид неговия модулиращ ефект при някои патологични състояния, съпътствани от повишена продукция на активни форми на кислорода.

Направеният анализ на научната литература е позволил на докторанката да формулира добре **целта на дисертационния си труд**, а именно: Да се изследва антиоксидантния капацитет на ноцицептина и аналозите му в чисти системи, *in vitro* системи и *in vivo* (както в норма, така и при патология) в отделни органи и тъкани (мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа от плъх).

Обект са ноцицептин- N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и аналози, в които аминокиселината лизин на позиция 9 от молекулата на ноцицептина е заменена съответно с орнитин, диаминопропанова киселина, диаминобутанова киселина и канаваин. Тези модификации са направени с цел получаване на по-устойчиви на протеолитичното разграждане съединения, които да имат висока активност и селективност по отношение на ноцицептиновите рецептори, а това са необходими характеристики за фармакологичните им ефекти. Изясняване свойствата на тези нови аналози и техния потенциален антиоксидантен капацитет прави работата актуална и съвременна.

Дисертационният труд е написан на 131 стандартни машинописни страници и е добре структуриран. Съдържа следните основни раздели: увод, обзор на научната литература, цел и задачи, материал и методи, резултати и обсъждане, изводи, приноси и указател на използваната научна литература. **Обзорът** на научната литература е представен на 33 страници, прави задълбочен анализ на актуалната информация и показва познаване на проблемната област. Той е разработен на базата на 309 литературни източника, като част от цитираните публикации са от последните 5 години. Основните направления в него са:

свободни радикали- образуването им в клетката, активни форми на кислорода, антиоксидантна защитна система- ензимна и неензимна защита на клетките, оксидативен стрес и патологични състояния, оксидативен стрес и невродегенеративни заболявания, АФК и възпаление, ноцицептин, рецептори и номенклатура, синтез и метаболизъм, клетъчен механизъм на действието му, рецептори и негови по-важни биологични ефекти Тъй като ноцицептинът N/OFQ и неговия NOP рецептор модулират различни биологични функции в централната и периферна нервна система, по-доброто разбиране на тяхната роля зависи от създаването на селективни и високо потенциални пептидни и непептидни агонисти и антагонисти. Поради това особено внимание е отделено на структурните аналози на ноцицептина.

В обзорната част особено добро впечатление прави главата за ОС и невродегенеративните заболявания. Известно е, че оксидативният стрес играе важна роля в патогенезата и на невродегенеративните заболявания, които се характеризират със селективна невронална загуба, глиална активация, възпалителни процеси и нарушен окислителен метаболизъм. Мозъкът е изключително уязвим по отношение на оксидативни увреждания от една страна поради голямото съдържание на липиди в него и от друга страна - заради повишената консумация на кислород и сравнително ниски нива на антиоксиданти. Важно е в случая да се определи дали оксидативният стрес, наблюдаван при невродегенеративните заболявания е причина, следствие или феномен при патологичните процеси. А по-доброто разбиране на молекулярната и клетъчна биология на различни рецептори при нормално функциониране и патологични състояния на нервната система би довело до значително подобряване и превенция на различни невродегенеративни заболявания. В този смисъл изследванията в тази област, в която е и настоящата работа са особено актуални- както за науката, така и за медицинската практика.

От друга страна продукцията на активни форми на кислорода е основен показател при развитието на много възпалителни заболявания. В настоящата работа вместо ноцицептин (1-17) е използван такъв със скъсена полипептидна верига, състоящ се само от 13 аминокиселинни остатъка, тъй като N-крайната 13 аминокиселинна последователност на ноцицептиновата молекула е достатъчна за проявяването на пълната му биологична активност (Guerrini et al., 2003). Изследвания върху връзката структура-активност показват значението на аминокиселинната последователност в ноцицептиновата молекула за свързването с рецептора. Въз основата на тези данни са синтезирани нови аналози на ноцицептина, с цел да установи значението на Lys и отстоянието на amino групата от

страничната верига от гръбнака на пептидната верига върху биологичната активност на N/OFG(1–13)NH<sub>2</sub>. Такива структурни аналози на ноцицептина са използвани в настоящата работа, както и негови новосинтезирани структурни аналози, при които основната аминокиселина лизин (Lys), която се намира на позиция 9 в структурната верига на ноцицептина е заменена съответно с орнитин (Orn), диаминобутанова киселина (Dab), диаминопропанова киселина (Dap) и канаванин (Cav).

В дисертационния труд са поставени **пет основни задачи**, които покриват поставената цел, а именно:

1. Използвайки химични системи за генериране на свободни радикали (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) и (HO<sup>•</sup>) да се изследва антиоксидантният капацитет на ноцицептина и аналозите му.
2. Да се изследват *in vitro* ефектите на ноцицептина и аналозите му върху клетъчния оксидативен статус и по-точно: нива на LP, нива на общ GSH и активност на антиоксидантни ензими: SOD, GSSG-Red, GSH-Px, и свързаната с тях Glu-6-P-DH в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.
3. Да се изследват *in vivo* ефектите на ноцицептина и аналозите му върху ензимната и неензимна антиоксидантна защитна система при нормални (физиологични условия) в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.
4. Да се изследват *in vivo* ефектите на ноцицептина и аналозите му върху клетъчните ензимни и неензимни антиоксиданти при патологични състояния, свързани с оксидативен стрес (при каинов и кагаренанов модел на възпаление) в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.
5. Да се направи сравнителна оценка на ефекта на ноцицептина и аналозите върху про- и антиоксидантния статус в норма и патология в мозък, черен дроб, кръв и тъкан от лапа на плъх.

**Подбраните методични подходи** са съвременни и съответстват на поставените цел и задачи.

**Материалът и методите** на собствените изследвания са представени на 12 страници, описани са съгласно изискванията и дават възможност за възпроизвеждане на получените резултати. Основните използвани методи са добре подбрани и са информативни, а именно: Определяне на тотален глутатион, белтък, хемоглобин, прекисно окисление на липидите в хомогенати от мозък, черен дроб и тъкан от лапа, прекисно окисление на липиди в кръв, ензимната активност на супероксиддисмутаза (SOD), Каталаза, Глутатион пероксидаза, Глутатион редуктаза, Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, измерване продукцията на хидроксилни радикали (TBA-тест) и на супероксидни радикали. В работата са използвани *in vitro* и *in vivo*

подходи, както и два експериментални модела- Каинов и Карагенанов модели. Статистическите анализи са извършени с ANOVA и теста на Dunnet.

**Резултатите** от собствените изследвания обхващат както следва:

- Ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози в химически системи, генериращи  $O_2^-$  и  $HO^{\cdot}$  радикали
- *In vitro* ефекти на ноцицептина и на неговите структурните аналози върху антиоксидантен статус на мозък на плъх.
- *In vitro* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус на черен дроб на плъх
- *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в мозък на плъх
- *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в черен дроб на плъх
- *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в кръв от плъх
- *In vivo* ефекти на ноцицептина и неговите структурни аналози върху антиоксидантния статус в тъкан от лапа на плъх.

Въз основа на направените собствени изследвания и тяхното обсъждане е направен обоснован извод, че промяната в структурата на ноцицептина може да доведе до промяна в антиоксидантните му свойства. Скъсяването на веригата (при Dap и Dab-аналозите) води до проява на прооксидантни свойства. Cav-аналог, в сравнение с другите пептиди, променя клетъчния оксидантен статус, което се дължи най-вероятно на антиоксидантните свойства на самия канаванин.

**Обобщените резултати** и направените изводи биха могли да допълнят характеристиката за ноцицептина и новосинтезираните аналози и предоставят нови оригинални данни за клетъчните им механизми на действие. На базата на получените резултати са **формулирани 5 основни извода и 4 приноса**, които приемам. Изводите обобщават добре получените резултати и дискусията. Направените приноси са с теоретичен характер, но могат да се приложат при бъдещи химични синтези на подобни вещества. От получените резултати и направеното обсъждане проличават следните **по-съществени приноси** от дисертационния труд, с които съм съгласна, а именно:

1. За първи път е изследван про/антиоксидантният потенциал на ноцицептина при нормални и патологични условия, съпътствани от повишена продукция на АФК (в химически системи, в условия *in vitro* и *in vivo* след третиране на животните с каинова киселина или карагенан). Установено е, че ноцицептинът не променя антиоксидантния статус нито при нормално, нито при повишено съдържание на АФК в клетките.

2. За първи път е изследван про/антиоксидантният потенциал на ноцицептиновите аналози [O<sup>m</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Dab<sup>9</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, [Dap<sup>9</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Cav<sup>9</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> при нормални и патологични условия, съпътствани от повишена продукция на АФК (в химически системи, в условия *in vitro* и *in vivo* след третиране на животните с каинова киселина или карагенан). Установено е, че скъсяването на страничната верига в позиция 9 на ноцицептина с една или две -CH<sub>2</sub>- групи - [Dab<sup>9</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> и [Dap<sup>9</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> води до поява на прооксидантни свойства от новосинтезираните съединения *in vitro* и *in vivo* в мозък.

3. Въвеждането на канаванин в позиция 9 на ноцицептина придава на новото съединение свойства различни от тези на изходния пептид. [Cav<sup>9</sup>]<sup>9</sup>N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> демонстрира добра антиоксидантна активност, която най-вероятно се дължи на наличието на гуанидиновата група в молекулата на канаванина. Получените оригинални данни потвърждават, че въвеждането само на една различна аминокиселина може да промени антиоксидантните свойства на цялата пептидна молекула.

4. Доказано е, че ноцицептинът не осъществява антиинфламаторните си ефекти си посредством свободно-радикален механизъм.

Представеният за обсъждане дисертационен труд е **оформен добре** в рамките на общо приетите правила и е богато **илюстриран** с 13 схеми, 24 фигури и 9 таблици, някои от които са цветни. Авторефератът също е оформен според изискванията.

Към дисертационния труд имам някои **дребни забележки**, печатни грешки, чуждици и неточности, които не променят по същество приносите на дисертационния труд.

Основната ми забележка е свързана с колаборативния характер на дисертационния труд. Съавторството с колегите-химици, синтезирали новите съединения, обект на настоящата работа, както и техния съществен принос в осъществяването на химичния синтез, би следвало да бъдат по-ясно подчертани и отбелязани. Прави впечатление, че са цитирани доста чуждестранни автори, извършили подобни синтези, но са спестени имената, респ. библиографските данни на българските синтетици осъществили синтеза и предоставили за изследване на докторанта настоящите нови вещества. В дисертационния труд подробно са

обяснени философията на химическия дизайн въз основа на структура-активност  
взаимовръзките, както и работните хипотези за тези синтези, но като че ли трудно и между  
редовете могат да се открият имената на колегите, осъществили тези синтези.

Имената им липсват също и в авторския колектив на четирите представени от докторантката  
обща публикации.

Считам, че направените теоретични приноси на експерименталната работа могат да бъдат  
много ценни практически при бъдещи химични синтези на подобни вещества, затова  
сътрудничеството между синтетици и биохимици е взаимно изгодно и има бъдещи хоризонти.  
Към дисертационния труд са представени **четири публикации** всички от които са в списания  
с ИФ и са в съавторство, като в двете от тях докторантката е първи автор. Докторантът има 8  
научни съобщения, забелязани са до момента 4 цитирания в литературата.

#### **Имам следните два въпроса към докторанта:**

1. Предвид публикуваните съвместни статии, какъв е процента на нейното лично участие в  
колектива и представена ли е декларация от другите съавтори, че те нямат претенции към  
изложените тук резултати?

2. Последната статия на докторантката е от 2011 г. Към днешна дата- октомври 2014, има ли  
тя други публикации от тогава, които да са приети или поне да са дадени за печат след  
зачисляването ѝ до настоящия момент?

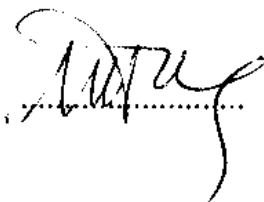
#### **Заключение:**

Извършена е голяма по обем работа с разнообразни биохимични методи. Обобщените  
резултати и направените изводи допълват характеристиката за ноцицептина и  
новосинтезираните аналози и дават нови познания относно клетъчните им механизми на  
действие. Направените приноси са оригинални и значими, те имат както фундаментално, така  
и практично значение за бъдещи насочени синтези.

Представеният материал е достатъчен по обем и съдържание и отговаря на изискванията за  
защита на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по  
научна специалност “ Фармакология”. Поради това предлагам на уважаемото научно жури да  
присъди образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност “ Фармакология”  
на докторант Елина Руменова Цветанова.

07.10.2014

Гр. София



доц. д-р Любка Танчева