

Рецензия

от доц. Илиян Николов Колев, д.х.,

член от състава на научно жури по процедура за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ с кандидат ас. маг.-фарм. Силвия Георгиева Михайлова – докторант в самостоятелна форма на обучение (зачислена със Заповед №. Р-109-209/09.06.2017 г.) по акредитираната за МУ-Варна докторска програма „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“, област на висше образование „4. Природни науки, математика и информатика“, професионално направление „4.2. Химически науки“.

Официалното ми назначение като научен рецензент е основано на предложение от членовете на Факултетния съвет при Факултет „Фармация“ към МУ-Варна - протокол № 27/16.09.2019 г. и Заповед № Р-109-292/19.09.2019 г. от ректора на МУ-Варна.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е на тема „СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА ОЦЕНКА НА ПЕПТИДНИ КОНЮГАТИ SMAC-NT С КОМБИНИРАНО АНТИНЕОПЛАСТИЧНО И АНАЛГЕТИЧНО ДЕЙСТВИЕ“ с автор маг.-фарм. Силвия Георгиева Михайлова; изпълнен под научното ръководство на доц. Тамара Пайпанова д.х. и доц. Калоян Георгиев, д.х.

Представеният ми комплект материали, касаещи предвидената процедура по защита, както на електронен, така и на хартиен носител, е изцяло съобразен с изискванията на ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на МУ-Варна.

Докторантът предоставя също и списък с официални документи, с които декларира по законов ред оригиналността и достоверността на представените в дисертацията резултати, данни, материали.

Биографични сведения:

Ас. Силвия Г. Михайлова завършва висшето си образование през 2003 г. във Факултета по „Фармация“ на МУ-София.

Професионалната си кариера като „Магистър Фармацевт“ Силвия Г. Михайлова започва като управител на фармацевтичен склад и няколко аптеки в градовете София и Варна.

През 2013 година маг.-фарм. Силвия Г. Михайлова участва в конкурс за заемане на академичната позиция „Асистент“ в МУ-Варна. Конкурсът кандидатката печели, а с това и академичното си назначение под званието „Асистент“. През 2017 г., със заповед на Ректора на МУ-Варна №. Р-109-209/09.06.2017 г., ас. маг.-фарм. Силвия Г. Михайлова се зачислява в докторантура (самостоятелна форма) по научната и акредитирана за МУ-Варна докторска програма „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“. С решение на ФС за научни ръководители на докторанта са определени доц. Тамара Пайпанова д.х. и доц. Калоян Георгиев, д.х.

Докторантката полага в срок и с отличие всички специализирани и общопрофилни изпити, предвидени в докторската ѝ програма.

Дисертационният си труд тя представя пред членовете на научното жури в обем от 143 страници; структуриран съобразно установените национални норми. Ръкописа съдържа 40 фигури и 17 таблици. Цитирани са общо 177 научни източника. В 14 приложения докторантът предоставя и допълваща истинността и оригиналността на представените данни информация.

В 38 страници от общия дисертационен свитък, аспирантът предоставя информация, касаеща оформлението на т. нар. **литературен обзор**.

С касателство литературния обзор: Добре очертано и оформено е съдържанието на литературния обзор. Разглежданото е разпределено по тематичност в няколко точки и подточки, на всяка от които е поставено коректно заглавие, респ., подзаглавие. Специално внимание е отделено на онкологичните заболявания и лекарствените вещества използвани в антинеопластичната терапия; контролът на онкологичната болка и ролята на невротенина (NT) в контрола на тази болка; разгледана в детайли е и активността (вкл. и механизма на молекулно действие) на втория митохондриален каспазен активатор (SMAC) в процеса апоптоза. Представен е и механизма на програмираната клетъчна смърт, във всички нейни молекулни аспекти. Представени и класифицирани са познатите ни терапевтични SMAC пептидомиметици. В допълнение са посочени и основните стратегии за пептиден синтез и методите за пептиден анализ.

Използваната научна литература, макар и да е цитирана по един твърде нетрадиционен (непоследователен) начин, е сведена в приблизителен обем от около 155 източника¹. Отлично впечатление прави, че по-голяма част от използваната литература е съвременна и публикувана в периода след 2000 г. Правилно отразена е на места и по-ранно излязла от печат научна литература, с която се цели да се посочат основите и плана за развитие на разглежданите теми.

От изготвения литературен обзор ясно личи, че докторантката се е запознала в детайли с публикуваните литературни сведения по заложената дисертационна тема. Изготвеният литературен обзор намирам като адекватна основа за формулирането на положените седем основни извода и определянето на три основни цели на дисертацията.

„Получаване на нови пептидни конюгати SMAC-NT, прилагане на подходящи аналитични методи за тяхното охарактеризиране и

първоначален скрининг за потенциално антинеопластично и аналгетично действие.“

В тази връзка - Правилно самозададени са и съответните задачи за изпълнение - осем на брой. В допълнение бих заявил, че поставените синтетични и аналитични цели изцяло попадат в постоянно разрастващият се научно-изследователски и интердисциплинарен обхват на избраната докторска програма. Освен това, изборът на тема правилно

¹ Изброени от рецензента.

преориентира докторанта в следното - да задълбочи и развие своите познания, а също и да насочи своя научен потенциал в полето на многообещаващата пептидна медицинска химия.

В почти еквивалентен на литературния обзор обем, от 30 страници, дисертантът излага данни по експерименталното изпълнение на своя дисертационен труд (или т. нар. **експериментална част**).

В 10 страници от него, ас. Михайлова представя в детайли всички ползвани от нея експериментални процедури (методики на работа) и особеностите на използваните от нея аналитични инструменти и лабораторни консумативи (разтворители, среди, реагенти и пр.).

Умело, без ноти на отвличане или двусмислие, са обяснени и методологиите по използваните хроматографски техники. Професионално и в изчерпателен обем са представени методите за биологично тестване на синтезираните олигопептиди.

В обем от 20 страници са представени, последователно и съвсем коректно, методите за синтез на защитени аминокиселини; описанието на използваната процедура за твърдофазен пептиден синтез и методологиите за синтез на всички тетра-, хекса- и декапептиди. В сбит и ясен план са представени всички аналитични характеристики, които еднозначно доказват състава („структурата“) и автентичността на така получените нови ниско- (α -аминокиселини) и високомолекулни съединения (олигопептиди). Посочени коректно са също и стратегиите за отделяне на новосинтезираните олигомери от използвани смоли и методите за „сваляне на тяхната защита“. Правилно подбрана е и стратегията за биологично тестване на синтезираните олигопептиди – от клетъчни култури към опитни животни.

В заключение, по този дисертационен дял, бих изказал следното: Положените действия по изпълнението на възложените научни и образователни програмни елементи и в частност – дисертационна тема, ясно и категорично засвидетелстват за цялостната отработка и покритие на заложените законови изисквания към докторанта. Нещо повече, преобладаваща част от дейностите на докторанта са свързани с придобиването на познания по едно твърде сложно и комплексно (природно) научно направление, касаещо химията на пептидните съединения и техния синтез. Адмирации изказвам и по отношение представената самостоятелна публикация от дисертанта на тема „ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ“.

С касателство точка резултати и дискусия:

Описанието на резултатите от проведените синтези е представено коректно. Правилно изтъкнати са предимствата на използваната ензимно-хидролитична обработка (обработка, наложена в пречистването на флуорозаместената аминокиселина). Добро впечатление прави и опита за схематично изразяване на по-сложно устроените препаративни процедури. Коректно представени и илюстрирани са повечето HPLC и електрофоретични резултати.

Правилно илюстрирани са и уравненията на заложените реакции. Изтъкнати са основните преимущества на някои защитни групи. Правилно наведена е и тяхната

селекция. Изборът на таблично представяне на повечето резултати предоставя на читателя по-лесен ориентир в разказното и шанса да изготви дори и свои заключения.

Рационално представен е изборът на стратегия за откриване на нови SMAC аналози с подобрен фармакотерапевтичен профил; правилният маршрут в избора на биоизостер на Н-атом и ефектът от неговото присъствие в олигопептидния гръбнак.

По аналогия, с добра научна аргументация, е представен и изборът на канаванин като градивен блок в изграждането на NT пептидомиметици. В научно-популярен стил е представена и кратка информация за присъствието му в природата. Безпогрешно сведена е и информацията за хидролитичната лабилност на терминални Arg-Arg остатъци на олигопептиди и стратегиите за нейното преодоляване.

Коректно представен е и изборът на изоморфно аминокиселинно заместване.

На база представените резултати се отчита и коректността в избора на стратегия за кръстосано куплиране на така получените тетра- с хексапептиди.

В експерименталната част на дисертацията са описани достатъчно подробно и точно спектралните (MS), хроматографски и електрофоретични характеристики на целевите молекули.

Коректно установени и правилно отразени са резултатите от изследвания относно хидролитичната стабилност на така получените пептидомиметици. Правилно съпоставени са и кинетиките на пептиден хидролиз, снети в рамките на различни експериментални условия.

В резюме е представена и информация, касаеща цитотоксичността на невротензина.

Оценена, по два коренно различни метода, е аналгетичната активност на всички невротензинови „имитатори“. Добро впечатление прави и проведения сравнителен аналгетичен анализ между действията на нативния невротензин и синтезираните нови негови аналози.

В заключителната част на дисертационния труд (точки IV и V), в рамките на 10 основни извода и 7 приноса, са правилно обобщени и съобщени всички получени от докторанта експериментални и теоретични резултати.

Приносите на дисертационния труд са формулирани точно и отразяват напълно новите и оригинални постижения в него. Правилно маркирана е фундаменталността на изследването, свързана с разработването, синтеза и определянето на биологичния ефект на нови хибридни олигопептиди – NT-SMAC миметици. Правилно представена е и възможността за разширяване на познанията ни за връзката пептидна структура-биологично действие и възможността за повишаване на хидролитичната стабилност на олигопептиди.

В работата, за съжаление, се забелязват и някои неточности.

По отношение на **литературния обзор** към докторанта бих насочил следните критични забележки:

Редно е, да се представят по-ясни и информативни подфигурни заглавия, като напр.: на стр. 33 „Фигура 16: Получаване на анхидриди и последващо амидиране“.

Не става ясна връзката между изказното в подзаглавието и значението на описаното в посочената фигура. Читателят едва ли би еднозначно подразбрал дали представеното е в касателство с получаването на анхидриди или амиди, или то представя реакционен маршрут, по който се осъществява получаването на амиди в присъствието на дициклохексилкарбодиимид (както е илюстрирано на въпросната фигура)!?

По-горе в текста, на стр. 32, се натъквам и на друга синтактична неуредица.: „Образуването на пептидна връзка е реакция на нуклеофилно заместване, където атаката се осъществява от нуклеофилен агент – аминокомпонента (фиг. 15).“.

Алогично е, „Образуването на ...“ да „е реакция на ...“. По-коректно би било изказването, че формирането (образуването) на пептидни връзки се осъществява по общия, характерен за карбоксилни киселини и карбоксилни производни механизъм на нуклеофилно заместване; където –ОН съставна на карбоксилни киселини се заменя с аминокгрупа. Неясно е и значението на думата *аминокомпонента*. Ако се цели да бъде изтъкнато участието на аминокгрупата от състава на аминокиселини, то тогава е редно да се окаже този факт.

Неправилната употреба на думата „аминокомпонента“ продължава и по-натат в текста.

Неинформативно е и следното изречение (стр. 32): „Реакцията протича бързо и завършва с отделяне на желания продукт и енолната форма на *N,N*-дициклохексилкарбамида, която е много по-добра напускаща група от *OH*⁺ йон, който би трябвало да се отдели при протичане на реакцията без активиране.“.

1. Не става ясно кой е желания продукт.;
2. Говори се и за отделянето на „енолната форма на *N,N*-дициклохексилкарбамида“, - която също е желана форма или това е реактивен интермедиат?
3. Изречението приема твърде сложен смисъл, като едновременно с това то преплита в себе си и още няколко мотива – активиране, напускаща група, „която би трябвало да се отдели“ и т.н.

На стр. 33 „DCC-методът осигурява високи добиви на пептиди, но кондензацията е съпроводена със значителна рацемизация и образуване на *N*-ацилурея в хода на реакцията.“.

Не става ясно защо „кондензацията е съпроводена със значителна рацемизация“. Кой от реакционните участници (коя от двете аминокиселини, участници в акта на взаимодействие) променя своята конфигурация? Ако димеризираме глицин, ще е ли вярно това съждение? Отделно, образуването на *N*-ацилурея в хода на реакцията би следвало да намали общия „пептиден“ добив, както е и отразено в текста (съвсем коректно), но не става ясно защо се подчита присъствието му в състава на крайния продукт и то в негатив.

В допълнение: Редно е, там където е необходимо, да се допълва разказното от текста с фигури и схеми, а тяхното присъствие в него да става непосредствено след белега в скоби: Напр. на стр. 33 – „*За да се избегнат тези недостатъци, в реакционната среда могат да се добавят подходящи активатори (фиг. 18).*“

Въпросната фигура 18 е поместена на страница 34 (следваща по ред), като е изпусната възможността тя да бъде поставена в предшестващата (33-та) страница, непосредствено след посочения маркер – „(фиг. 18)“.

Ако се спазва този принцип, то следва и посоченото в дисертацията изречение на стр. 33 – „*Друг подход за активиране на СООН – група е чрез формиране на смесени анхидриди с различни производни на фосфорната киселина (фиг. 19).*“ - да попадне на следващата страница, където се открива и касаещата го фигура.

Неправдоподобно бих посочил и съждението разписано на стр. 34 - „*В зависимост от начина на получаване на пептида, се използват два основни метода за синтез: пептиден синтез в разтвор и твърдофазен пептиден синтез (SPPS).*“ – би следвало да бъде по-коректен запис: Два са основните метода (техники) за осъществяване на пептиден синтез.

Препоръчително, от „чисто“ информативно или пептидо-синтетично гледище, е да се посочат също, дори и в курсив, някои от елементите (хронологични, авторски) на посочените синтетични методи. Както за разработването на подхода за теченофазния, така и за твърдофазния пептиден синтез са присъдени Нобелови премии. В този смисъл представеното съждение на стр. 34, параграф 1 - „*Пептидният синтез в разтвор е най-старият метод за синтез на пептиди.*“ – би могло да придобие много „по-богат“ и информативен смисъл ако се изтъкнат, в допълнение, и няколко химико-енциклопедични елемента в него.

Бих посочил и думите „висока Mw“ като излишни (плеонастични) от състава на последния израз в първи параграф на стр. 35, а именно: „*Първоначално SPPS е описан като метод за получаване на къси пептиди с потенциално приложение в получаването на полипептиди с висока Mw [115, 117].*“.

Необходимо е да се избягва и използването на някои ненужни чужди думи, освен в случаите, когато не могат да бъдат открити съответни техни понятия в собствения ни език.

Напр.: стр. 39 „*хирални селектори*“, стр. 12 „*чекпойнт*“ – „контролна точка“, стр. 11 „*таргетните*“ – „целеви“ и т.н.

Други думи биват неправилно разделени: стр. 39 „*реактивно способни*“.

Аналогични на указаните тук несъответствия се забелязват и в останалите раздели и подраздели на дисертационния труд.

Забелязани пропуски:

В допълнение, в съдържанието на т. нар. химична част от литературния обзор, отчитам и отсъствието на няколко по-значими елемента относно пептидния (структурен) анализ и препаративна хроматография.

1. В частта, перифразирам, „HPLC анализ“ не се отчита описанието на отделните видове детектори; детектори, които обикновено се използват и прилагат в пептидния анализ, пептидното разделяне.
2. В електрофоретичния текст е посочена най-обща информация за метода, без да се подчертава значимостта му в пептидния анализ.

Дискутирани са механизмите на биологично действие на някои по-значими природни и синтетични представители про- и антиапоптози с пептидна и смесена, пептидоимитираща структура. Съразмерно внимание е обърнато и на опиоидните пептиди и техните синтетични аналози – съвсем уместно! Отсъства обаче адекватна дефиниция на посоченото основно (аббревиатурно) означение „SMAC-NT“. Появата му, в този вид, се открива в няколко, основни за представения дисертационен труд позиции (изречения) – заглавие, цел и задачи, в една от страниците на раздел „Резултати и дискусия“ и изложеното заключение.

Ако понятието съчетава желаните прояви на така получените векторни пептиди, то разумно е заглавието да се представи във вида:

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА ОЦЕНКА НА ПЕПТИДНИ КОНЮГАТИ С КОМБИНИРАНО АНТИНЕОПЛАСТИЧНО (SMAC) И АНАЛГЕТИЧНО (NT) ДЕЙСТВИЕ

Не е ясно и значението на думата „КОНЮГАТИ“. В изложението не се открива определение за тази първостепенно значима дума, която често пъти влиза в „спрежение“ с думата пептид/и („пептидни конюгати“ и пр.). Според мен, думата ПРОПЕПТИД следва да се има предвид при изготвянето на последващи монографии и статии.

Отправените забележки в никакъв случай не следва да се възприемат като елементи, понижаващи високата научна стойност на представения дисертационен труд.

Наукометрия

Научните публикации свързани с докторската работа са 3; две от които са с международен, а една от тях с национален характер. Депозирания от докторанта статията в списанието *Bulgarian Chemical Communications* покрива заложените национални и международни изисквания за публикуване на частични дисертационни резултати в списания с *Impact factor*.

Докторантът депозира също 3 участия в научни форуми и 3 доклада под формата на постерни съобщения. За изпълнението на поставените й задачи, докторантката взема участие в научен проект, финансиран от МУ-Варна.

Авторефератът изцяло покрива съдържанието в дисертационния труд.

Заклучение

Депозираният дисертационен труд, наедно със съпътстващите го публикации, ни предоставят една сериозна разработка в областта на пептидния синтез. В съдържимото на дисертационния труд е представен успешният синтез и коректният анализ (масспектрален, поляриметричен, хроматографски и пр.) на няколко нови функционални производни на небелтъчни аминокиселини и техни олигопептидни форми. Осъществен успешно е и хода на синтез на три нови олигопептида с *SMAC-NT* активност.

Анализирана в детайли е и хидролитичната стабилност на така получените вещества. Определени теоретично са и някои от показателите (физични и химични) на получените макромолекули. От биологично гледище, коректно анализирана е и активността (аналгитична) на някои от получените съединения.

Актуалността на тематиката и целесъобразността на поставените цели и задачи е несъмнена. Натрупаният опит и знания от докторанта са ясно очертани и депозирани в дисертационния ѝ труд и съпътстващите го статии. Характерът на научните приноси бих посочил като амбидентен – фундаментален и научно-приложен.

На основание гореизложените факти, убедено предлагам на уважаемото научно жури да гласува „За“ присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ на маг.-фарм. Силвия Георгиева Михайлова.

Оценка: ПОЛОЖИТЕЛНА.

25.XI.2019 г.

гр. Варна


доц. Илиян Н. Колев, д.х.