

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Емилия Димитрова Найденова, катедра „Органична химия“, ХТМУ

ОТНОСНО: Дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ от **Силвия Георгиева Михайлова**

По професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

Тема на дисертационния труд: **„Синтез и биологична оценка на пептидни конюгати SMAC-NT с комбинирано антинеопластично и аналгетично действие“**

Научни ръководители: доц. Тамара И. Пайпанова, дх
доц. Калоян Д. Георгиев, дх

Настоящата рецензия е изготвена на основание Заповед на Ректора на МУ-Варна, № Р-109-292/19.09.2019 г. и от решение на научното жури - Протокол №1/30.09.2019. То е съобразено с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение (ППЗРАСРБ), и Правилника на МУ-Варна по ЗРАСРБ.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е посветен на актуален проблем с научно и приложно значение отнасящ се до синтез и изследване на нови пептидни конюгати за таргетна терапия на онкологични заболявания. Онкологичните заболявания са водещ медицински проблем, както в света, така и у нас, поради непрекъснато нарастване на броя на пациентите. През последните години се синтезират, охарактеризират и изследват огромен брой съединения с цел потенциално приложение в медицината и фармацията за лечение на тези заболявания. Основните изисквания към тях са да проявяват висока активност и същевременно да са ниско токсични и без странични ефекти. Таргетната терапия е индивидуално лечение, което е насочено към онези протеини в туморните клетки, в които са настъпили генни мутации. Прилагането на такава терапия ще увеличава възможността за благоприятен изход от заболяването и ще доведе до намаляване на нежеланите лекарствени ефекти върху здравите клетки.

1. Кратки биографични данни

Силвия Михайлова е докторант – самостоятелна форма на обучение към катедра „Химия“ към факултета по Фармация при МУ-Варна. Тя е завършила висшето си образование във Фармацевтичен Факултет при МУ-София през 2003 г. До 2013 г. тя е работила като управител на склад, магистър фармацевт и управител на 2 аптеки. От 2013 г. тя е асистент в МУ- Варна. Като асистент тя е водила лекции, лабораторни и семинарни упражнения на студенти от УС „Помощник-фармацевт“ по дисциплините Фармацевтична химия, Хомеопатия, Учебна практика.

През 2015 г. и 2016 г. е провела две специализации в секция „Молекулен дизайн и биохимична фармакология“ към Институт по молекулярна биология, БАН, където е усвоила методите за синтез на неприродни аминокиселини и пептиди. Участвала е в разработването на научен проект на тема „Фармакобиохимични изследвания на моделни катионни пептиди с потенциално антимикробно действие“.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Изключително приятно впечатление прави прецизното написване и оформяне на дисертационния труд. Дисертацията е много добре структурирана, като включва три основни раздела (литературен обзор, експериментална част, резултати и дискусия), изводи, приноси, цитирана литература и приложения. Съдържа и списък на използваните съкращения, което значително улеснява четенето. Изложена е на 148 страници, от които 38 стр. литературен обзор, 29 стр. експериментална част, 31 стр. резултати и дискусия. Илюстрирана е с 40 фигури, 10 схеми, 17 таблици и 14 приложения. Използваната литература съдържа 177 източника, от които 4 на кирилица и 173 на латиница, като значителна част от тях са от последните години (само 22% са преди 2000 година).

Отделните части в собствените изследвания са представени в хронологична последователност, а изводите коректно отразяват получените резултати.

Проведена е голяма по обем научно изследователска работа, която е описана съгласно изискванията.

2.1 Актуалност на тематиката.

Изследванията в областта на дизайн и синтез на нови биологично активни съединения с потенциал за приложение в медицината са традиционно актуални. Постоянно се търсят нови лекарствени средства с по висока активност, с понижени

странични ефекти и токсичност. В научните среди все по-широко се прилага подход, при който се използва комбинация от два различни активни фрагмента в една молекула.

В литературата са описани синтезите и изследванията на голям брой пептиди и пептидни миметици, които повлияват основните апоптозни пътища. Такива са BH3-проапоптотични агенти, Bcl-2-пептидни инхибитори, IAP-инхибитори и SMAC-миметици, което ги прави подходящи за дизайн и получаване на нови лекарствени средства. При лечение на онкоболните от значение е контролирането на болката. В клиничната практика се използват опиоидните аналгетици, но те имат редица нежелани странични ефекти, включително развитие на толерантност и физическа зависимост. Ендогенните пептиди непрекъснато се изследват с надеждата да се намери мощен аналгетик, лишен от вторичните ефекти на алкалоидните опиоиди.

Всичко това определя целта на настоящия дисертационен труд, която е получаване на нови пептидни конюгати SMAC-NT, прилагане на подходящи аналитични методи за тяхното охарактеризиране и първоначален скрининг за потенциално антинеопластично и аналгетично действие.

2.2 Познаване на проблема.

Направена е солидна библиографска справка и е обработена голяма по обем информация. Представен е доста подробен литературен обзор, който е написан компетентно и показва, че докторант Силвия Михайлова добре познава състоянието на проблема.

Описани са видовете лекарствени средства използвани в таргетните терапии на неопластични заболявания. Изтъкнати са техните предимства, които ще определят водещата им роля в бъдеще при лечението на тези заболявания. Показано е, че прилагането им в терапията ще доведе до намаляване на нежеланите странични ефекти върху здравите клетки и до постигане на по-добър клиничен ефект.

Докторантката задълбочено е разгледала проблемите с контрола на онкологичната болка и изборът на подходящ лекарствен продукт. В тази връзка тя се е спряла на ролята на Невротензина (NT) и неговите аналози.

Дадени са възможностите за разработване на нови антинеопластични лекарства, чрез преодоляване на основните механизми на резистентност на туморните клетки, както и индуциране на клетъчна смърт чрез апоптоза. Разгледани са механизмите на апоптоза и SMAC – миметици, като таргетни лекарства, индуциращи апоптоза. От

представената схема става ясен подходът при дизайн на SMAC – миметиците, като подробно е описано влиянието на всеки един аминокиселинен остатък от AVPI последователността към афинитета на свързване с N-терминални домейни (BIR-Vaculovirus IAP Repeat –домейни) на протеини, инхибитори на апоптозата (IAPs). Миметиците имитират AVPI тетрапептидния терминал на SMAC, потискат действието на IAPs, активират апоптозните пътища и блокират сигналите за оцеляване в неопластичните клетки.

За получаването на пептидните миметици се използват методите на пептидния синтез, ето защо докторантката е направила общ преглед на различните методи за пептиден синтез, както и на методите за пречистване и охарактеризиране на нови пептиди.

Направеното обобщение на литературния обзор позволява на докторант Силвия Михайлова да формулира точно и ясно целта на дисертацията и удачно да подбере задачите за нейното реализиране.

2.3 Методика на изследването.

В експерименталната част са разгледани методичните подходи, използвани за постигане на поставените цели. Всички избрани методи позволяват постигане на поставените цели и получаване на адекватен отговор на задачите, поставени за решаване в дисертационния труд. Многото и разнообразни методи за синтез и анализ на получените продукти усвоени от докторанта показва, че тя се е изградил като много добър изследовател в областта на пептидния синтез.

3. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Основните приноси на настоящия дисертационен труд са в синтеза и определянето на биологичната активност на нови неописани в литературата AVPI-аналози, нови аналози на NT(8-13), както и на нови хибридни пептиди. Безспорно, изследванията на докторант Силвия Михайлова до голяма степен са предопределени от опита и постиженията на научните ръководители, които имат сериозни успехи в изследваната област. Научното изследване е с фундаментален характер и с насоченост за потенциално приложение в медицината за създаване на препарати за таргетна терапия на злокачествени заболявания. Получените резултати разширяват познанието за ефектите, свързани с определени модификации в структурата на късоверижните пептиди и допринасят за изясняване на връзката структура-биологична активност.

Намерени са най-подходящите условия за синтез на небелтъчните АК пара-флуорофенилаланин (H-Phe(p-F)-OH) и канаванин (H-Cav-OH) и са синтезирани 10 техни функционални производни.

Чрез комбиниране на ензимна и алкална хидролиза са разделени рацемичните смеси и са получени оптичните изомери на Z-защитен в аминокрупата и свободен пара-флуорофенилаланин.

Получени са защитените аминокиселинни производни, които са използвани за синтез на нови пептидни аналози.

Синтезирани са нативния AVPI фрагмент и 3 нови неописани в литературата негови аналози, както и нативния NT (8-13) фрагмент и 6 нови NT (8-13) аналози чрез прилагане на твърдофазан пептиден синтез върху подходящо подбран носител. Всички новосинтезирани пептидни аналози са получени с високи добиви и чистота и са коректно охарактеризирани чрез ESI-MS и специфичен ъгъл на оптично въртене.

Синтезирани са 3 нови, неописани в литературата пептидни конюгата чрез комбиниране структурата на AVPI и NT (8-13). В един от конюгатите двата Agg остатъка са заместени с Cav, а в другия структурата на NT (8-13) е заменена с поли аргинин.

Изследвана е хидролитичната стабилност при физиологични условия (наподобяващи стомах, кръвна плазма, дуоденум и тънки черва) на NT (8-13) и неговите аналози. Установено е, че аналози, в които Agg е заместен с Cav показват по-добра стабилност и са подходящи за понататъшни изследвания.

Определени са молекулни дескриптори от "Правилото 5 на Липински" (Ro5) на синтезираните пептиди и са направени съответните заключения относно бионаличност след *per os* прием.

Проведените скрининг изследвания за аналгетична активност на NT (8-13) аналозите (T0-T5), чрез използване на модел на периферна болка, потвърждават ролята на Agg в 8 и 9 позиция и неговото удачно заместване с Cav.

Проучен е ефекта на T3 аналога (Cav-Cav-Pro-Tyr-Ile-Leu) при модел на централна болка (Hot plate test) и е установено реализиране на аналгетичен ефект и по централен механизъм.

Проведен е първоначален скрининг за цитотоксична активност на NT (8-13) върху две клетъчни линии – MCF-7 и 3T3. Доказан е пролиферативен потенциал върху MCF-7 клетъчната линия.

4. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Авторефератът, който е 70 страници, съответства на съдържанието на дисертацията и представлява съкратен вариант на нейната същност. Отражава напълно и достоверно получените резултати, както и техния анализ. Темата съответства на научната специалност.

5. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд

Без съмнение проведените синтези и получените резултати са лично дело на докторанта. Резултатите са отразени в 3 научна публикация, от които 1 в специализираното научно списание *Bulg. Chem. Commun.* с импакт фактор - 0.238, 1 публикация в сборник от *Варненски медицински форум* и 1 в *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*.

Части от резултатите са докладвани на 3 научни форуми у нас и в чужбина. Докторантката е участвала в национални научни форуми с международно участие и с 3 постерни съобщения по темата на дисертацията.

Публикациите отразяват напълно получените в дисертационния труд резултати и са достатъчни за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“.

6. Лични впечатления

Непознавам докторант Силвия Михайлова, но впечатленията ми от представения ми за рецензия дисертационен труд са отлични.

7. Критични бележки и въпроси.

Нямам критични забележки по-същество. Имам следните въпроси:

- В приложения 1-14 не е пояснено какво е означено със знак + и какво с -.
- Ако приемем, че + е добавяне на реагентите посочени в началото на таблицата, то защо има + при Вос защитна група в колонката с 20% пиперидин/ ДМФ?
- С какъв реагент се деблокира Вос-групата? Защо в последната редица при деблокиране на смолата навсякъде има +? Не става ясно какво се има в предвид.
- Какви са предимствата на твърдофазния пептиден синтез в сравнение със синтеза в разтвор?

Препоръчвам в бъдещи изследвания да се направи скрининг за цититоксичност и на хибридните молекули.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

В заключение считам, че представеният ми за рецензия дисертационен труд напълно отговаря по обем, научно-приложни приноси и публикации в научната литература на изискванията за дисертационен труд и на Правилника за придобиване на научни степени. Дисертационният труд на Силвия Михайлова е посветен на актуален проблем с научно и приложно значение.

Разработени са методи за синтез, изолиране, пречистване и разделяне на чисти енантиомери на небелтъчни АК. Получени са биологично активни молекули, включващи в структурата си комбинация от два различни активни фрагмента с цел повишаване на активността и намаляване на страничните ефекти. Подборът на AVPI фрагмент и NT (8-13) фрагмент е удачен, тъй като те притежават широк спектър на биологична активност и биха довели до желания резултат.

При изпълнението на задачите докторанта показва много добро познаване на литературата по проблема, на методичните подходи и специализираните тестове за изследване на биологичното действие. Всички синтезирани съединения са охарактеризирани със съвременни методи, а резултатите са представени коректно според възприетите изисквания. Ясно се виждат възможностите му за самостоятелна научно-изследователска работа и компетентността при представяне и интерпретиране на получените резултати.

Въз основа на изложеното по-горе и като изхождам преди всичко от приносите на дисертационния труд и получените резултати, препоръчвам на почитаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждането на образователната и научна степен „Доктор“ по 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ на **Силвия Георгиева Михайлова**.

22. 11. 2019 г.


.....
Проф.д-р инж.Емилия Д. Найденова