

СТАНОВИЩЕ

От проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, д.м.н.

*Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия
при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна*

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

на докторант в самостоятелна форма на обучение маг. фарм. Момчил Константинов Ламбев,
за дисертационен труд на тема „Нови RGD/полиамини – синтез и проучване за противотуморна
активност“

**по област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.3
Фармация, по докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“**

Научни ръководители: доц. Тамара Пайпанова, д.х. и проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н.

Със заповед № Р-109-203/05.05.2022 г. на Ректора на МУ-Варна съм избрана за член на Научното жури, а на основание Протокол №1/13.05.2022 г. от проведено първо заседание на НЖ съм определена за председател на НЖ и да изготвя становище по процедура за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ с кандидат маг. фарм. Момчил Константинов Ламбев, с тема на дисертационния труд „Нови RGD/полиамини – синтез и проучване за противотуморна активност“.

Предоставените за конкурса документи са в съответствие със Закона за развитието на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет – Варна.

Кратки биографични данни

Момчил Константинов Ламбев е роден на 19.06.1990 г. Завършва Средно образователно училище "Васил Левски" - природо-математически профил в гр. Нови пазар през 2009 г., а през 2014 г. се дипломира като магистър-фармацевт в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна. От 2015 г. е асистент в Медицински университет – Варна, като едновременно с това работи като магистър-фармацевт в аптеки "Манолова" до 2017 г. и в "БИСК - 2012" ЕООД от 2017 г. Владее английски език.

Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 127 страници и е добре структуриран както следва: Въведение – 2 страници, Литературен обзор – 39 страници, Цел и задачи – 1 страница, Материали и методи – 13 страници, Резултати и дискусия – 38 страници, Изводи – 2 страници, Приноси – 1 страница, Литература – 19 страници. Дисертационният труд е онагледен с 33 фигури и 6 таблици. В библиографията са включени 263 източника.

Оценка на актуалността на темата

Представеният дисертационен труд е посветен на синтез на нови RGD/полиамини и проучването им за противотуморна активност. Търсенето на нови възможности за терапия на рака е важно направление в съвременната медицина, тъй като злокачествените новообразувания са широко разпространени и заемат висок относителен дял в човешката патология. Според статистическите данни на Световната здравна организация в икономически развитите страни туморите заемат II място в общата структура на смъртността, като отстъпват на само сърдечносъдовите заболявания.

Използването на пептиди, които могат директно да бъдат насочени към туморните клетки, се развива като нова алтернатива на конвенционалната химиотерапия. Сред късоверижните пептиди аналозите на RGD представляват атрактивни средства за селективно доставяне на цитостатици до ракови клетки. Те притежават силен афинитет и селективност към интегрини, свърхекспресирани на клетъчната мембрана на някои туморни и ангиогенни ендотелни клетки. Линейни и циклични пептиди, съдържащи RGD (Arg-Gly-Asp) аминокиселинна последователност, се използват като агенти-доставчици за нискомолекулни лекарствени средства, пептиди и белтъци до ендотелни и туморни клетки.

Полиамините има важна роля в голям брой биохимични процеси и техните нива са повишени при пролифериращи клетки. Понастоящем синтетични аналози на полиамините се проучват като инхибитори на туморния растеж поради невъзможността им да изпълняват функцията на природните полиамини в клетъчните процеси.

През последните години се използва нов подход за лекарствен дизайн – комбиниране на два или повече фармакологични ефекта в един лиганд. Бивалентният лиганд запазва силата на ефектите на отделните лекарствени молекули (синергичен ефект, по-ниски дози и по-малко странични ефекти), а в същото време при едновременното им прилагане се преодоляват някои ограничения, характерни за индивидуалните молекули.

Оценка на целта, задачите и методите

Литературният обзор завършва с основни изводи. Като тяхно логично следствие са представени целта и произтичащите от нея 7 задачи на дисертационния труд, които са ясно формулирани.

Материалите и методите са прецизно са описани. Използвани са методи на пептиден синтез: пептиден синтез в разтвор, както и твърдофазен пептиден синтез.

За пречистване и оценка на продуктите са използвани хроматографски методи: колонна гел-течна хроматография, тънкослойна хроматография, високоефективна течна хроматография и капиларна електрофореза. Структурен анализ на синтезираните пептиди е направен чрез електроспрей-йонизационна маспектрометрия.

Цитотоксичността на новосинтезираните молекули е определяна върху клетъчни линии: MDA-MB-231 (монослойна, инвазивна човешка клетъчна линия от аденокарцином на гърдата); HepG2 (монослойна клетъчна линия от човешки хепатоцелуларен карцином); MCF-7 (човешка монослойна

неинвазивна клетъчна линия от аденокарцином на млечната жлеза); PC-3 (монослойна клетъчна линия от човешки аденокарцином на простата); HT-29 (монослойна клетъчна линия от човешки карцином на дебелото черво); A-549 (аденокарциномни човешки алвеоларни базални епителни клетки); MCF-10A (човешка, нетуморогенна клетъчна линия от епител на млечна жлеза); 3T3 – миша, ембрионална, фибробласна клетъчна линия. Използвани са тест за жизненост с трипаново синьо и МТТ-тест за определяне на виталността на клетките.

Използван е *in silico* метод за изчисляване на молекулни дескриптори от “Правилото 5 на Липински” (Ro5)

Статистическият анализ на данните е извършен чрез *one-way ANOVA* с помощта компютърна програма GraphPad 6.0.

Оценка на резултатите

Изследвани са 3 небелтъчни аминокиселини и техни производни, 2 биогенни диамина и 13 пептидни аналога на RGD. Получени са 4 подходящо защитени производни на небелтъчната аминокиселина канаванин, които са използвани за синтеза на аналози и конюгати на RGD. Получени са защитени производни на биогенните диамини (1,2-етилендиамин и 1,3-пропилендиамин) с N-третична бутилоксикарбонилна група (Boc), които са използвани за получаване на целеви конюгати с RGD. Получени са необходимите референтни пептиди: RGD, R(NO₂)GD, RGD-OMe и CavGD. Синтезирани са два нови RGD аналога (AgpGD, AgbGD), модифицирани с аргининови миметици. Синтезирани са 8 нови неописани в литературата конюгати на RGD и негови миметици с биогенни диамини: RGDDAE, AgpGDDAE, AgbGDDAE, CavGDDAE, RGDDAP, AgpGDDAP, AgbGDDAP, CavGDDAP.

Определено е цитотоксичното и антипролиферативно действие *in vitro* на новосинтезирани пептидни аналози на RGD и на конюгати на RGD с биогенни диамини (RGD, AgbGD, AgpGD, CavGD, R(NO₂)GD, RGDDAP и AgbGDDAP). Проведените изследвания показват, че активността на новосинтезираните пептиди е доза-зависима и клетъчно-специфична. При изследване на цитотоксичната активност *in vitro* на RGD и неговите аналози върху шест човешки туморни клетъчни линии (MCF-7, MDA-MB231, HT-29, HepG2, PC-3 и A-549), както и върху три нетуморогенни клетъчни линии (3T3, MCF-10A), най-висок инхибиторен ефект показва пептидът AgpGD върху PC-3 клетки. Тестваните пептиди не показват значим ефект върху нетуморогенните MCF-10A клетки. При *in vitro* определяне на цитотоксичната активност на избрани конюгати на RGD и AgbGD с пропилендиамин върху HepG2 и MDA-MB-231 клетъчни линии, новополучените молекули не показват антипролиферативни ефекти.

Приложеният *in silico* метод за определяне на стойностите на молекулните дескриптори на новосинтезираните пептидни аналози и техните конюгати показва, че всички новосинтезирани молекули не се резорбират след перорален прием, което води до ниска бионаличност.

При опита за извеждане на зависимостта химична структура – биологично действие за новосинтезираните RGD аналози е установено, че съксяването на дължината на страничната верига на аминокиселината Arg в RGD пептида повишава цитотоксичния ефект.

RGD аналозите, модифицирани в първа позиция на RGD като CavGD и R(NO₂)GD, не проявяват повишен цитотоксичен ефект. RGD пептиди, модифицирани в С-края с пропилендиамин, не показват повишени инхибиторни ефекти в сравнение с изходните пептиди.

Оценка на изводите

Въз основа на проучванията са направени 8 важни извода, които синтезират собствените резултати. Така се подчертават ясно цитотоксичното и антипролиферативно действие *in vitro* на новосинтезирани пептидни аналози на RGD и на конюгати на RGD с биогенни диамини.

Оценка на приносите

Включените в дисертационния труд опити с новосинтезирани пептидни аналози на RGD и на конюгати на RGD с биогенни диамини са проведени за пръв път и това придава на резултатите оригинален характер. Проучванията, проведени в логична последователност, дават възможност на Момчил Константинов Ламбев ясно да формулира приносите на дисертационния труд. Получени са оригинални приноси в следните аспекти:

- За първи път са синтезирани нови аналози на нативния RGD пептид и са получени данни за значима антипролиферативна активност на новосинтезираните аналози AgpGD и AgbGD;
- За първи път са синтезирани нови хибридни структури – RGD\полиаминови конюгати и са изследвани за антипролиферативен ефект;
- За първи път е установена ниска перорална бионаличност на новополучени молекули, основа за последващи проучвания с цел разработване на подходяща лекарствена форма за перорален прием.

Наукометричен анализ на дисертационния труд

Момчил Константинов Ламбев е представил списък от 5 публикации, свързани с дисертационния труд, на 2 които е първи автор. Една от публикациите е в списание с импакт фактор. Участията в научни форуми във връзка с дисертационния труд са 6 на брой.

Оценка на автореферата

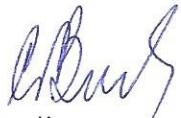
Авторефератът е написан на 69 страници и отразява напълно съдържанието на дисертационния труд.

Заклучение

Дисертационният труд е едно съвременно проучване на новосинтезирани RGD аналози, както и на RGD/полиамини за противотуморна активност. То е базирано на разнообразни методи, които позволяват да се направят адекватни изводи с научно-приложен характер. Под ръководство на своите научни ръководители Момчил Константинов Ламбев усвоява множество методи на експериментална работа, провежда проучвания в логична последователност и адекватно анализира получените резултати. Работи систематично и постига добра публикационна активност.

Считам, че дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, на Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав и на Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет – Варна. Обективните данни и личните ми впечатления от работата на кандидата ми дават основание да гласувам положително за присъждането на образователна и научна степен „Доктор“ по област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.3 Фармация, по докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“ на Момчил Константинов Ламбев.

Гр. Варна
21.06.2022 г.

Изготвил становището: 
/Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н./