

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. Димана Димитрова Георгиева,

за дисертационен труд на тема

„Синтезиране на пептидни молекули, аналози на лактоферицин, и изследване за антимикробно и противотуморно действие“

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

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

Със заповед № Р-109-235/11.04.2023 г. на Ректора на МУ-Варна съм избрана за член на Научното жури, а на основание Протокол №1/13.04.2023 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. Димана Димитрова Георгиева, с тема на дисертационния труд „Синтезиране на пептидни молекули, аналози на лактоферицин, и изследване за антимикробно и противотуморно действие“.

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

Димана Димитрова Георгиева завършва Медицински колеж – Варна като помощник-фармацевт през 2008 г., а през 2015 г. се дипломира като магистър-фармацевт в Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна. От 2015 г. е асистент в Медицински колеж, Медицински университет – Варна. През 2021 г. придобива специалност „Лечебни растения и фитотерапевтични продукти“. Член е на Българския фармацевтичен съюз и на Българското пептидно дружество.

Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 127 страници и е структуриран както следва: Въведение – 2 страници, Литературен обзор – 36 страници, Цел и задачи – 1 страница, Експериментална част – 55 страници, Резултати и дискусия – 33 страници, Изводи – 2 страници, Приноси – 1 страница,

Публикации и проекти – 2 страници, Библиография – 14 страници със 187 източника. Дисертационният труд е онагледен с 75 фигури и 21 таблици.

Оценка на актуалността на темата

Дисертационният труд е посветен на синтез на нови пептидни молекули, аналози на лактоферицин, и тяхното изследване за антимикубно и противотуморно действие. Изборът на темата е изключително актуален и отговаря на проблемите, свързани с терапията на значими за обществото патологии.

Нарастващият риск от развитие на бактериална резистентност налага търсенето на нови молекули с антимикубно действие. В този аспект антимикубните пептиди са много перспективни и привличат вниманието на изследователите както с ниската си токсичност спрямо животинските клетки, така и със своя уникален механизъм и широк спектър на действие. Едни от проучваните пептиди за техните антимикубни свойства са аналозите на лактоферицина, който се получава в стомаха от лактоферин под действието на пепсина.

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. Използването на пептиди, които могат директно да бъдат насочени към туморните клетки, се развива като нова алтернатива на конвенционалната химиотерапия.

Подробният литературен обзор разглежда съвременните възможности за антимикубна терапия и мястото на антимикубните пептиди в нея, като специално внимание е отделено на наличната до този момент информация за антибактериалната, противовирусна и противотуморна активност на лактоферицин и неговите аналози. Описани са и основните методи за синтез на пептидни молекули.

Оценка на целта, задачите и методите

Литературният обзор завършва с основни изводи. Като тяхно логично следствие е представена целта на дисертационния труд, а именно: синтез на линейни катионни пептидни аналози на LfcinB(20-30) и провеждане на *in vitro* скрининг за потенциално антибактериално и противотуморно действие.

За изпълнението на целта са формулирани 6 задачи на дисертационния труд, включващи синтез на пептидните молекули, изследване на тяхната времева и рН-зависима стабилност, проучване на тяхното антимикубно и цитотоксично действие, както и анализиране на връзката структура-активност.

Прави впечатление изключително богатата методология, която маг. фарм. Димана Димитрова Георгиева е усвоила и използвала в своя дисертационен труд. Материалите и методите са прецизно описани. Пептидите са синтезирани чрез твърдофазен метод на пептиден синтез. За пречистване на продуктите е използвана колонна гел хроматография, определянето на тяхната чистота става чрез тънкослойна хроматография, високоефективна течна хроматография и капиларна електрофореза. Структурата на синтезираните пептиди е потвърдена чрез електроспрей-йонизационна

масспектрометрия, а хидролитичната и химична стабилност е изследвана чрез UVE-VIS спектроскопия.

Антимикробната активност на новосинтезираните пептидни молекули е направена чрез дисководифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби. Цитотоксичната активност е изследвана чрез оценка на клетъчната жизнениост чрез Neural red uptake test и чрез оценка на виталността на клетките чрез МТТ-тест.

Оценка на резултатите

Извършена е обемна изследователска работа, която върви в логична последователност. Започва със синтез на защитени небелтъчни маинокиселини, необходими за пептидният синтез, след което са синтезирани 9 аналога на говеждия лактоферицин (LfcinB) чрез твърдофазен пептиден синтез. Изборът на говеждия лактоферицин е направен на базата на предварителни данни, че той е представителят на семейството на катионните антимикробни пептиди с най-висока активност.

Получените олигопептиди са пречистени и са изследвани за хидролитична стабилност. Това изследване е важно, за да се прецени какво би се случило с тези молекули в организма в среди с различно рН. Получен е важен резултат, че всички новосинтезирани аналози на лактоферицин имат висока хидролитична и химична стабилност.

В структурата на дисертационния труд изследванията за синтез и хидролитична стабилност са описани в раздела Експериментална част, а това са собствени резултати, чието място е в раздел Резултати и дискусия.

Направено е микробиологично изследване за антимикробна активност на новосинтезираните аналози на лактоферицин по отношение на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, както и противогъбичкова активност спрямо *Candida albicans*. Антимикробна активност срещу *Staphylococcus aureus* е демонстрирана за 4 от аналозите (LfcinB1, LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6), докато спрямо *Escherichia coli* пептидите са неактивни. Фунгицидна активност спрямо *Candida albicans* показва само LfcinB1.

Интересни са резултатите, получени при нетуморогенни и туморни клетки. При нетуморогенни клетъчни линии BALB/с3Т3 и MCF-10A тестваните олигопептиди не показват цитотоксичен и значим антипролиферативен ефект, докато спрямо клетъчните линии MCF-7 (луминален А тип, хормон зависим рак на гърдата) и MDA-MB-231 (базален тип рак на гърдата) показват известна антипролиферативна активност, която е най-изразена за пептида LfcinB3 при клетъчна линия MCF-7.

При опита за извеждане на зависимостта химична структура – свойства е установено, че пептидни аналози LfcinB3 и LfcinB6 проявяват максимална структурна стабилност в среди с различно рН. По отношение на връзката структура – антимикробна активност е установено, че запазването на Arg в 20-та позиция (LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6) е важно за проявата на антимикробния ефект, а замяната в 21-ва позиция не нарушава антимикробния ефект на нативния пептид. Активността спрямо

тестваните антибактериални щамове е в следната последователност: LfcinB3 > LfcinB1 > LfcinB6 > LfcinB5.

В проведените изследвания за цитотоксични/антипролиферативни ефекти върху ракови и неракови клетъчни линии е доказано, че само LfcinB3 демонстрира повишен антипролиферативен ефект срещу луминален аденокарцином на млечна жлеза тип A (клетъчна линия MCF-7).

Оценка на изводите

Въз основа на проучванията са направени 5 важни извода, които синтезират собствените резултати. Така те подчертават ясно извършената работа за синтез на аналозите на говеждия лактоферицин (LfcinB), както и изследванията на тяхната стабилност, на антимикробните, противогъбичковите и противотуморните им ефекти.

Оценка на приносите

Включените в дисертационния труд опити с новосинтезирани пептиди са проведени за пръв път и това придава на резултатите оригинален характер. Проучванията, проведени в логична последователност, дават възможност на маг. фарм. Димана Димитрова Георгиева ясно да формулира следните оригинални приноси приносите на дисертационния труд:

- Синтезирани са 9 аналога на говеждия лактоферицин, от които 8 са нови, неописани в литературата;
- За първи път е изследвана антибактериална и противотуморна активност на новосинтезираните аналози;
- За първи път е потърсена връзка структура-активност на новосинтезираните аналози, като са открити аналозите с най-висока активност, които биха могли да се изследват в бъдеще с цел разработване на лекарствени продукти.

Наукометричен анализ на дисертационния труд

Маг. фарм. Димана Димитрова Георгиева е представила списък от 3 публикации, свързани с дисертационния труд, на които е първи автор, което свидетелства за нейната висока лична ангажираност. Публикациите са с обзорен характер, което показва, че експерименталните данни, включени в дисертацията, предстои да бъдат публикувани. Участията в научни форуми във връзка с дисертационния труд са 4 на брой, на които Димана Георгиева също е първи автор. Три от участията са в национални научни форуми и едно е в международен форум в чужбина.

Оценка на автореферата

Авторефератът е написан на 115 страници и отразява напълно съдържанието на дисертационния труд.

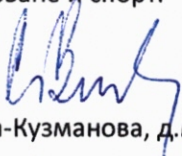
Заклучение

Дисертационният труд е едно съвременно проучване на новосинтезирани аналози на говеждия лактоферицин за антибактериална и противотуморна активност. То е базирано на разнообразни

методи, които позволяват да се направят адекватни изводи с научно-приложен характер. Проучванията са направени в логична последователност, резултатите са адекватно анализирани. Маг. фарм. Димана Димитрова Георгиева е усвоила множество методи на експериментална работа. Тя е енергичен, трудолюбив, целеустремен, организиран млад учен. Дисертационният труд показва, че маг. фарм. Димана Димитрова Георгиева притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по фармакология, които са предпоставка за бъдещо самостоятелно планиране и провеждане на научни изследвания, както и за интерпретиране на резултатите от тях.

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 убедено да дам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено в дисертационния труд и автореферата, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен '**доктор**' на **маг. фарм. Димана Димитрова Георгиева** в докторска програма по Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия), професионално направление 7.3 Фармация, област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт.

Гр. Варна
29.05.2023 г.

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