

РЕЦЕНЗИЯ

от

ПРОФ. ИЛКО НИКОЛАЕВ ГЕТОВ, ДФ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ, МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОНС „ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.3 Фармация
Докторска програма (научна специалност): ФАРМАКОЛОГИЯ
(вкл. фармакокинетика и химиотерапия)

Автор: маг.-фарм. ДИМАНА ДИМИТРОВА ГЕОРГИЕВА
Форма на докторантурата: самостоятелна подготовка
Катедра: Фармакология, токсикология и фармакотерапия
Факултет „ФАРМАЦИЯ“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ гр. Варна

Тема:

СИНТЕЗИРАНЕ НА ПЕПТИДНИ МОЛЕКУЛИ, АНАЛОЗИ НА ЛАКТОФЕРИЦИН, И ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА АНТИМИКРОБНО И ПРОТИВОТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ

Научни ръководители: Доц. Тамара Пайпанова, дх
Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н.

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

По настоящата процедура ми е предоставен комплект материали на електронен носител в съответствие с чл.69 от Правилник за развитието на академичния състав на МУ-Варна, който включва изискваните документи:

- дисертационен труд
- автореферат
- списък на научните публикации
- автобиография, дипломи, заповеди, протоколи и др.

Докторантката е приложила 3 (три) пълно текстови публикации на български и английски езици, публикувани в български реферирани научни издания.

Маг.-фарм. Димана Димитрова Георгиева е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка със Заповед №Р-109-177/16.4.2018 г. на Ректора на МУ-Варна по докторска програма: ФАРМАКОЛОГИЯ (вкл. фармакокинетика и химиотерапия), Професионално направление 7.3 Фармация. На заседание на Катедрен съвет на катедра Фармакология, токсикология и фармакотерапия, с Решение на Факултетен съвет на ФФ и Заповед №Р-109-233/01.6.2022 г. на Ректора на МУ-Варна, докторантът е отчислен с право на защита.

Наборът от документи отговаря на изискванията и след като се запознах детайлно с процедурата по разработване, представяне и развитие на обучението по докторската програма, счи-

там че те отговарят на изискванията на нормативната база. Представените документи доказват законосъобразността и пълнотата на проведеното обучение и процедура.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Маг.-фарм. Димана Димитрова Георгиева има завършена ОКС „магистър“ в ПН 7.3 Фармация през 2015 г. във Факултет по фармация на МУ-Варна с отличен успех от държавните изпити. Придобила е специалност за СДО по Лечебни растения и фитофармацевтични продукти, считано от 01.6.2021 г. и има допълнителни курсове и специализации.

Професионалната реализация и опит на маг.-фарм. Георгиева започват като помощник-фармацевт през 2008 г. във фармацевтична фирма. От 2015 г. е избрана за асистент към Медицински колеж на МУ-Варна и има отговорности в обучението на студенти за ОКС „професионален бакалавър“ по специалността помощник-фармацевт в ПН 7.5 Здравни грижи.

Има отлична компютърна грамотност и умения за работа със специализирана лабораторна и фармацевтична апаратура, софтуер и оборудване за провеждането на експериментите. Член на Български фармацевтичен съюз и Българско пептидно дружество. Владее английски език.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Предложеният за обсъждане дисертационен труд, разработен като докторантура на самостоятелна подготовка за придобиване на образователната и научна степен “доктор” от маг.-фарм. Димана Димитрова Георгиева със заглавие “СИНТЕЗИРАНЕ НА ПЕПТИДНИ МОЛЕКУЛИ, АНАЛОЗИ НА ЛАКТОФЕРИЦИН, И ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА АНТИМИКРОБНО И ПРОТИВОТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ”, има характера на задълбочено експериментално изследване върху синтеза, антимикробните и пролиферативни ефекти на пептидните миметици по отношение на грам-положителните и грам-отрицателните бактерии и туморигенните и нетуморигенните човешки клетъчни линии.

Тематиката на дисертационния труд и фокуса на изследванията корелират със съдържанието, обхвата и образователните цели на докторската програма по фармакология. Проучванията в дисертационния труд са съвременни, актуални и фокусирани върху създаването на модификации в структурата на лактоферицин и извеждането на закономерности за взаимовръзката между химичната структура и биологичната активност на новосинтезираните пептидни миметици.

Направените изводи, заключения и приноси ще представляват интерес за специалистите и имат значение за обучението по фармация. Съдържанието, обемът, проведените собствени експериментални проучвания и направените изводи са изчерпателни, имат необходимия баланс между отделните елементи, както и приложимост на формулираните изводи и приноси.

4. Познаване на проблема

Докторантът показва с настоящата разработка много добро ниво на познаване и владене на изучаваната материя. Дисертационният труд се основава на разбирането за необходимостта и важността от създаването на нови антимикробни средства поради нарастването на резистентността и наличието на цитотоксичен потенциал на антимикробните пептиди. Проучени са възможностите за създаване и охарактеризиране на аналози с по-висока бионаличност, стабилност, ефикасност и селективност, спрямо нативните структури.

Въз основа на извършеният солиден литературен обзор по темата на дисертацията, докторанката Георгиева е представила изчерпателно състоянието на проблемите в избраната предметна област. Показана е важността на търсенето на решения и предприемането на мерки за оптимално съчетаване на наличните знания и възможностите на пептидната химия за преодоляване

на проблемите при използването на терапевтичните протеини като антимикробни и антинеопластични агенти, чрез въвеждане на структурни и функционални модификации.

5. Методика на изследването

Разделът от дисертацията с описание на експерименталната част е детайлен и изчерпателен. Коректно са описани: използваната апаратура, реактиви, методи за синтез и пречистване на синтезираните пептиди, оценка на химичната чистота, методите за потвърждаване на структурата, определянето на хидролитична и химична стабилност и биологичната активност. В описанието на синтетичните процедури се включва – синтез на защитени небелтъчни аминокиселини, необходими за пептидният синтез и твърдофазен пептиден синтез на LfcinB(20-25) пептидни аналози. Самостоятелна глава е посветена на пречистването и охарактеризирането на синтезираните пептиди. Представени са в детайли стъпките и методите за: пречистване; HPLC-MS анализ и определянето на хидролитичната и химична стабилност на новосинтезираните олигопептидни аналози на LfcinB(20-25).

Последната глава на този раздел е посветена на биологичния скрининг. Микробиологичните методи са определяне на антимикробната активност са чрез дисково-дифузионен метод с напоени стерилни дискове на Бауер-Кърби и метод на серийните разреждания. Изпитването за цитотоксичен/антипролиферативен ефект включва култивиране на клетките, оценка на клетъчната жизнелост и виталност чрез МТТ-тест.

Използваните изследователски методи, лабораторно оборудване, опитни постановки, материали, химикали и статистически техники, където това е подходящо, според главите на дисертацията са правилно подбрани и изчерпателно описани. Детайлно са описани също всички стъпки и етапи на провеждане на експериментите, изследователската информация и периодите на създаването ѝ, като това обосновава представителност и значимост на резултатите и направените изводи. Посочени са местата на извършване на експерименталната работа и основните дейности, като се касае за мултипрофилен екип от изследователи и научни организации от страната и чужбина, което е съществено предимство на дисертационния труд.

Считам, че използваната методика за провеждане на експериментите е достатъчно изчерпателна, позволява достигането на поставената цел и реализиране на задачите на изследванията. За постигането на завършеност на дисертационния труд категорично са изпълнени целта и задачите. В резултат на извършените изследвания, приемам че маг.-фарм. Георгиева е усвоила основни научни методи и техники за провеждане на високопродуктивни и значими експериментални проучвания.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

В работата е представен литературен обзор с обем 36 страници върху отделните елементи по темата, като са ползвани 187 съвременни български и предимно чуждестранни източници. Изчерпателно са разгледани и коментирани антимикробната терапия и микробна резистентност, пептидите с фармакологично действие, основните методи за синтез на пептидни молекули в разтвор и твърдофазния синтез. Направени са изводи, които дават основания за необходимостта от разработването на нови аналози/пептидни миметици на известни природни молекули с насочено антибактериално и/или потенциално противотуморно действие.

Разгледаните публикации са представени тематично и систематично, като е направен критичен прочит и анализ на данните, подходите и препоръките на различни автори, фактори и гледни точки. Всички съвременни чуждестранни и български автори са цитирани, защото темата е многообразна, проучвана в различни аспекти и в продължителен период от време.

В самостоятелен раздел са представени целта и ШЕСТ изследователски задачи, изпълнени в рамките на дисертационния труд. Липсва работна хипотеза, като в тази част дисертацията стриктно спазва възприетият стандартен подход.

Собствените проучвания са представени в две самостоятелни глави „Експериментална част“ с четири раздела, които умело са организирани на база на избрания подход и специфики на изследванията и глава „Резултати и дискусия“ където са коментирани данните от лабораторните експерименти.

Детайлно са представени резултатите от проучването на:

- Моделиране на пептидни аналози/миметици на LfcinB(20-30)

- Синтез и анализ на пептидни аналози/миметици на LfcinB(20-25)

- Определяне на хидролитична и химична стабилност на новосинтезираните олигопептидни аналози

- Микробиологично изследване на потенциалната антимикробна активност

- Изпитване за цитотоксичност, антипролиферативен и противотуморен ефект на LfcinB аналозите

- Връзката структура-активност.

Прави отлично впечатление извършеният задълбочен експериментален труд и анализ на събраните данни, като дискусията е изчерпателна, компетентна и многостранна.

Изведен е успешният подход при създаването на нови структурни аналози-агонисти, респ. антагонисти на известни биологично-активни вещества, който включва няколко етапи:

- Откриване на малки, активни фрагменти от пептидите, които съдържат информацията на големия пептид;
- Увеличаване на стабилността, което се постига чрез откриване на първоначалната степен и място на деградация, като впоследствие местата на отцепване на пептида се заместват с неприродни АК-остатъци (напр. D-АК, N- или С-алкилирани АК) или чрез замяна на пептидната връзка в тези позиции с псевдопептидна връзка (-CH₂NH- ; -CSNH- ; -CH₂S- и др.). Доказано е, че включването на непротеиногенни АК може да подобри стабилността, потентността, пропускливостта и бионаличността на пептидните терапии. Различните стратегии са гликозилиране, метилиране, амидиране, модификации на терминалните АК остатъци, въвеждане на вътрешно молекулни водородни връзки или хидрофобни остатъци, и др. Включените пептидни градивни елементи могат да бъдат допълнително модифицирани с различни пост-транслационни реакции (фосфорилиране, гликозилиране, естерифициране и др.).
- Усилване на потентността – тези подобрения могат да се постигнат или чрез въвеждането на такива химични групи, главно в страничните вериги на изграждащите ги АК, които се оказват по-удобни при взаимодействието лиганд-рецептор или чрез промяна в цялостната конформация на пептида, така че да се осигури възможно най-добро свързване с рецептора;
- Подобряване на селективността – този ефект вероятно е свързан със наличието на специфични геометрични и функционални изисквания на молекулите-рецептори. Тук се използват два подхода:

1) Аминокиселинни замени в различни позиции на пептидната молекула или създаване на конформационно затруднени аналози (пептиди с вътрешномолекулен мост с α -спираловидна структура), като се излиза от предположението, че пептидът-лиганд, приемайки различна конформация, може да взаимодейства с различен рецепторен подтип.

2) Създаване на структурно ограничени пептиди, генерирани чрез циклизирането им с цел да се подобри селективното свързване, поглъщането, потентността и стабилността на линейните прекурсори.

Представеният дисертационен труд съдържа 21 таблици, 75 фигури, изводи, приноси и библиография.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Считам, че така разработеният и представен за оценка дисертационен труд е значим с постигнатите резултати в изключително важна област на търсенето на нови молекули и възможности за модификация на известни такива с антимикробна и/или противотуморна активност. За изключително важно постижение на дисертацията приемам получените три производни на небелтъчните аминокиселини, нативната молекула **RRWQWR** и осем аналога на говеждия лактоферицин(20-25) и доказаната инхибиторна активност, което потвърждава потенциала им за бъдещи проучвания.

Приносите, дефинирани от докторантката са ЧЕТИРИ. Считам за най-значим приноса за идентифицираните три съединения (LfcinB3, LfcinB5 и LfcinB6), като водещи за бъдещо разработване на по-ефективни LfcinB(20-30)-миметици, които могат да послужат като основа за последваща оптимизация при разработването на биологично активни пептиди.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Представените пълнотекстови публикации по темата на дисертацията в реферирани научни издания са ТРИ, като докторантката е първи автор във всички. Публикациите са на български и английски езици, отразяват проведените проучвания, резултати и анализи на дисертационния труд в значима степен.

Представени са данни за участия в научни форуми – ЧЕТИРИ, от които един в чужбина, останалите са проведени в страната, като ЕДИН е с международно участие.

Участието в научни проекти е на ниво МУ-Варна – ДВА гранта, през 2015-2016 и 2017 г.

Анализът на представените документи показва, че маг.-фарм. Георгиева има изискваната научна активност. Приемам и оценявам по достойнство научната продукция, препоръчвам публикации и в списания с импакт фактор и импакт ранг, като предпоставка за видимост и цитируемост на резултатите от научната общност.

9. Лично участие на докторанта

Личното участие на докторантката в проведените изследвания, формулирането на цел, задачи, получените резултати, изведените препоръки и приноси, е налице. Приемам като лична заслуга и постижение цялостната научна продукция и декларацията за оригиналност. Очевиден факт са задълбоченото разбиране на специфичната материя на дисертационния труд, умението да се представят и описват научни резултати, както и подкрепата на високо ерудирани научни ръководители със значими постижения в фармакологията, пептидната химия и обучението на докторанти.

10. Критични забележки и препоръки

Към рецензията дисертационен труд нямам съществени критични бележки и препоръки. Мога да отбележа дребни терминологични пропуски, правописни и пунктуационни грешки, разминаване в техническото оформление на таблиците и повторения, които разбира се не намаляват научната стойност, значимост и наукометричност на дисертацията.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа оригинални резултати, изводи и приноси, като той напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на развитие на академичния състав на МУ-Варна.

Предвид гореизложеното, давам своята **положителна** оценка за проведените изследвания, представени като дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати, изводи, приноси и публикации и предлагам на почитаемото Научно жури **ДА ПРИСЪДИ** образователната и научна степен „доктор“ на маг.-фарм. ДИМАНА ДИМИТРОВА ГЕОРГИЕВА по докторската програма „ФАРМАКОЛОГИЯ (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“ за разработка на тема: „СИНТЕЗИРАНЕ НА ПЕПТИДНИ МОЛЕКУЛИ, АНАЛОЗИ НА ЛАКТОФЕРИЦИН, И ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА АНТИМИКРОБНО И ПРОТИВОТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ“.

Рецензент:
Проф. Илко Николаев Гетов, дф

София, 01.06.2023