

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Данчо Любенов Даналев, професор

на дисертационен труд за присъждане на ОНС „доктор“

в област на висше образование *4. Природни науки, математика и информатика*
професионално направление *4.2. Химически науки*
докторска програма *Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества*

Автор: *Боряна Красиминова Якимова*

Тема: *Дизайн и синтез на биологично активни пептиди като потенциални инхибитори на ангиотензин превръщащия ензим (АСЕ I)*

Научен ръководител: *проф. дн Иванка Борисова Стойнева, ИОХЦФ на БАН*

1. Общо описание на представените материали

Представените за рецензия материали по дисертационния труд на ас. Боряна Красиминова Якимова с научен ръководител проф. дн Иванка Стойнева, включват дисертация, автореферат към нея на български и английски език, CV на кандидатката, диплома на докторантката за завършено висше образование ОКС „магистър“, доказателствен материал както за проведеното обучение на докторантката в първичното звено, в което е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка (Заповед №НО-05-06- 23/ 11.12.2015 г.), така и за нейните научни постижения, които включват:

- списък и копия на **4** броя публикации по темата на дисертационния труд в т.ч. една служебна бележка за приета за печат публикация в списание Pharmacia Journal;

- списък и сертификати за участия в научни конференции с разработки по дисертационния труд;

- списък с участия в проекти по темата на дисертацията и обучителни проекти за придобиване на допълнителни и надграждане на вече придобити знания и умения;

- списък със забелязани цитати на статиите по дисертационния труд.

Още тук бих искал да отбележа, че документите са изключително прилежно подредени, което веднага прави добро впечатление за отговорното отношение на докторантката към цялостната процедура по придобиване на научната степен, за която е кандидат.

Представен е пълен комплект на всички материали, съгласно изискванията на ЗРАС на РБългария, Правилника за неговото приложение и Правилника за развитие на академичния състав на БАН, от които е видно че кандидатката напълно отговаря на критериите на тези нормативни документи за придобиването на ОНС „доктор“.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Съгласно представените от кандидатката Боряна Красиминова Якимова документи тя е завършила през 2001 г. средно образование с профил биология в едно от най-елитните училища във Велико Търново ПМГ „Васил Друмев“, след което ОКС „Бакалавър“ и ОКС „Магистър“ в СУ „Св. Климент Охридски“ в специалност биотехнологии, съответно през 2005 и 2007г. Цялостното образование на ас. Якимова напълно отговарят на избория от нея профил за професионално развитие. Веднага след нейното дипломиране като бакалавър тя е назначена в ИОХЦФ на БАН като специалист биолог, а след придобиване на ОКС „магистър“, като асистент в лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими“, ръководена тогава от изключително уважавания проф. дн Божидар Чорбанов, на същия Институт. Там тя е продължила своето професионално израстване и до днес в областта на представената докторска дисертация, а именно биокатализ, биоорганичен синтез на пептиди и гликопептиди, изолиране на биоактивни продукти от природни източници за биомедицината и екологията.

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

Пептидите изпълняват различни функции в човешкия организъм. Те могат да бъдат невротрансмитери, невромодулатори, хормони и др. През последното десетилетие пептидни структури намериха приложение в медицинската практика като мощни биологичноактивни субстанции с разнообразна активност, вектори на биологично активни молекули и маркери за диагностика, както и в състава на полифармакофорни вещества с потенциално приложение във фармацевтичната практика при заболявания с многокомпонентна симптоматика напр. при невродегенеративни заболявания, третиране на тумори, лечение на симптоматична болка с различен произход и редица други. Широкото приложение на пептидните препарати се основава на факта, че те съдържат природни аминокиселини, които естествено присъстват в човешкия организъм като част от неговите метаболитни функции, което не предполага наличие на вторични, нежелани ефекти от тяхната употреба, поради съществуването на естествени пътища за елиминирането им.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд таргетира Ангиотензин превръщащият ензим (АСЕ I), чиято основна функция в човешкия организъм е свързана с контрол на артериалното кръвно налягане и на други свързани с това състояние сърдечно-съдови заболявания. Добре известно е, че поради изключително динамичния и напрегнат начин на живот в съвременния свят, високото кръвно налягане и хемостатичните нарушения, за които данни са представени на 18 и 19 стр. в настоящия дисертационен труд, заемат в световен мащаб почти равно място по разпространение с туморните заболявания, а в някои държави са на първо място. От тази гледна точка избраната от докторантката и нейния научен ръководител тематика е изключително актуална и пряко свързана с нуждите на фармацията и медицинската практика за превенция и контрол на заболяемостта и смъртността от подобен род заболявания, широко разпространени в съвременното общество.

4. Познание на проблема

Дисертационният труд е основан на преглед на 124 литературни източника, от които 44 разглеждат проблематиката в години преди 2000 г, 73 в периода 2000-2010 г. и 7 литературни източника са от периода след 2010 г. Докторантката много подробно и задълбочено е разгледала разработките на други научни групи по темата на дисертационния труд, като на места е направила анализ и сравнения със собствените резултати, получени по време на разработване на дисертационния труд. В допълнение са разгледани различни групи инхибитори на АСЕ I (стр. 21-26 от дисертационния труд), което е спомогнало за избора на посока за дизайн и синтез на нови АСЕ I инхибиторни молекули, които да бъдат синтезирани като част от настоящия дисертационен труд. В контекста на реализиране на задачите от стр. 26 до стр. 34 на дисертацията са разгледани достатъчно подробно и задълбочено двата основни метода за синтез на пептиди, а именно в разтвор и върху твърдофазен полимерен носител. Внимание е обърнато на някои от техните особености, предимства и недостатъци. Кратко място е отделено на стр. 35 на микровълново асистирания синтез на пептидна връзка, но в светлината на областта, в която докторантката се развива е могло да се добави и кратка информация за приложението на ензими при синтеза на пептидна връзка.

На основата на задълбочен анализ на данните от литературата много точно, ясно и конкретно са дефинирани целите и задачите на дисертационния труд на стр. 10. Това позволява изключително лесно да бъде проследено тяхното изпълнение в хода на разработката на дисертацията. Считаю обаче, че мястото на раздела Цел и задачи от дисертацията е след раздела Литературен обзор, тъй като експеримента заложен в дисертационния труд е резултат именно от направения анализ на актуалните данни в литературата.

5. Методика на изследването

Няколко са съвременните методи за синтез на биомолекули, като правилния подбор на начина на получаване на таргетните молекули и дизайна на подходящи схеми за техния синтез е резултат от ясно дефиниране на целта на изследването и възможностите на научния колектив. В този контекст докторантката е избрала и усвоила задълбочено и двата основни метода, а именно синтез в разтвор и синтез върху твърдофазен полимерен носител, ведно с техните особености и предизвикателства. В допълнение докторантката е изследвала и реакцията на трансестерификация на агликон аминокиселини с въглехидратни субстрати, като и в двата случая синтез на пептидни и на въглехидратни потенциални инхибитори на АСЕ I тя е работила с мултифункционални таргетни молекули, което е една изключително сложна в експериментално отношение задача, изискваща задълбочено познание на природата, реакционната способност на функционалните групи и особеностите в т.ч. конформационната свобода на таргетните субстрати. Това ми дава основание да твърдя, че по време на работата си по дисертационния труд докторантката е придобила ключови и задълбочени знания и компетентности в областта на пептидната и въглехидратна химия, както и пречистването и анализа на биомолекули. Докторантката е приложила съвременна HPLC техника за пречистване и реализиране на част от задачите в дисертационния труд. Структурите са

доказвани чрез ЯМР и MS анализ. За определяне на конформацията на някои от таргетните молекули е използвана и ИЧ спектроскопия. Това показва, че по време на своята работа докторантката е работила и усвоила най-съвременните, съществуващи в практиката методи за пречистване и анализ на биомолекули с потенциална биологична активност. Всички получени данни са точно и коректно интерпретирани и описани в дисертационния труд. Проведени са и докинг симулации на някои от активните съединения, които да покажат начина на свързване на инхибитора в активния център на ензима, което е позволило на докторантката да придобие знания и в областта на математичното моделиране на биологични обекти. Проведените биологични изследвания *in vitro* и *ex vivo* придават пълна завършеност и изпълнение на поставените задачи в дисертационния труд.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационния труд е изграден върху 7 основно раздела – Въведение, Цели и задачи, Литературен обзор, Експериментална част, Резултати и дискусия, Изводи и Приноси. Разделите, които изискват това като Литературния обзор, Експерименталната част и Резултати и дискусия са задълбочени с голям брой подраздели, обхващащи и дискутиращи необходимите предпоставки за насочване на разработката в определена посока или представяне на използваните методики и получените резултати и дискусия върху тях.

Литературният обзор обхваща подразделите Описание на Ренин-ангиотензиновата система (RAS), Хипертония – актуално състояние у нас и в световен мащаб, Класификация на ACE инхибитори и механизъм на действие и Синтез на пептиди. Всеки от тях достатъчно задълбочено разглежда разработвания проблем на висок научен стил, което спомага ясна и точна дефиниция на целите и задачите за разработване в дисертационния труд.

Използваните синтетични методи, както и методиките за извършване на кинетичните изследвания, математическото моделиране и биологичните изпитания са описани в Експерименталната част достатъчно подробно, което несъмнено би позволило тяхното бъдещо използване при разработване на сходни проблеми.

Разделът Резултати и дискусия представя задълбочено и добре систематизирано под формата на таблици и фигури всички синтезирани от докторантката целеви биомолекули, тяхната *in vitro* инхибиторна активност, математическо моделиране и наблюдавана *ex vivo* биологична активност. Дискусията върху отделни моменти от работата е достатъчно задълбочена и насочва несъмнено към изведените в края на дисертационния труд изводи и приноси.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Основните приноси от дисертационния труд бих формулирал в три направления:

- Синтез, изолиране и охарактеризиране на нови инхибитори на ACE I на основата на пептиди и въглехидрати, показващи добра инхибиторна активност спрямо ACE I в μM диапазон

- Математическо моделиране на докинга на новосинтезирани инхибитори в активния център на таргетния ензим АСЕ I
- Определяна на *in vivo* инхибиторна активност и *ex vivo* биологична активност на новосинтезирани инхибитори на АСЕ I

В дисертационния труд са използвани съвременни методи за синтез и иновационни подходи с използване на активирани цианметилови естери на аминокиселини за постигане на поставените цели и задачи. От една страна постигнатите резултати имат научен принос, тъй като дават някои ключови зависимости структура-биологична активност чрез замяна на различни по свойства аминокиселини в целевите пептидни инхибитори на АСЕ I и разкриват някои ключови в структурно отношение фрагменти за свързване в активния център на таргетния ензим. В допълнение е изследвана ролята на конформационната свобода на пептидите върху ефективното свързването в активния център на АСЕ I. Поставените цели и задачи са постигнати чрез използване на най-съвременните подходи, методи за охарактеризиране и анализ на биомолекули. От друга страна получените нови биомолекули има възможност в бъдеще да бъдат приложени в практиката като хранителни добавки, тъй като някои от тях показват добра активност в μM диапазон.

Тук бих си позволил да отбележа, че добро впечатление би направило, ако в края на дисертационния труд бяха отбелязани виждания на докторантката за някои бъдещи перспективи за работа по тематиката на дисертационния труд, както и за научното й развитие.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Всички 4 представени публикации по темата на дисертационния труд са в списания с и.ф., което значително надхвърля изискванията на ЗРАС на РБългария и правилника към него за придобиване на ОНС „доктор“. Две от публикациите обхващат синтеза, охарактеризирането и изследване на биологичната активност на новосинтезираните инхибитори на АСЕ I. Една публикация е свързана с изследване на конформационната свобода на пептидите при различно рН и четвъртата публикация представя изследвания върху стабилността на таргетните пептиди.

Доказвателство за значимостта на публикуваните резултати са и забелязаните 11 цитата на две от публикациите. Това е допринесло за придобиване на h-фактор 2, който е много добър атестат за разпознаването на трудовете на докторантката в научната общност, работеща в същата или близки области.

9. Лично участие на докторанта(ката)

Докторантката е участвала по време на разработване на дисертационния труд с 14 работи в голям брой Национални и Международни научни форуми, което показва много добро популяризиране на получените от нея резултати сред научната общност.

В две от представените публикации, свързани със синтеза и изследване на биологичната активност на новосинтезираните биомолекули докторантката е на първо място, в една свързана с изследване на конформационната свобода на пептидите при

различно рН е на второ и в една, касаеща стабилността на таргетните пептиди на четвърто място, което несъмнено доказва основното ѝ участие в разработката на дисертационния труд, систематизирането и описването на получените резултати и постигнатите приноси.

10. Автореферат

Авторефератът представен от докторантката напълно покрива пет от основните раздели Въведение, Цел и задачи, Резултати и дискусия, Изводи и Приноси от основния дисертационен труд. Той съдържа и научните публикации по темата на дисертацията, забелязаните цитати, участията в научни форуми с резултати от дисертационния труд, както и участие в проекти и учебна дейност като научен консултант на няколко дипломни работи. Авторефератът е изготвен в съответствие с изискванията на ЗРАС, Правилника за неговото приложение и Правилника на БАН за приложение на ЗРАС, като отразява всички необходими резултати и приноси от дисертационния труд.

11. Критични забележки и препоръки

Към дисертационния труд имам някои технически бележки:

- използваната литература е на места нееднородно цитирана;
- на места са използвани чуждици като куплиране (кондензация), лейцин (левцин), аминокиселините са изписвани с цели наименования на латиница и др. които препоръчвам за в бъдеще да бъдат избягвани;
- на някои места в дисертацията се говори за концентрация, като е посочена стойност, количество активно вещество в mmol. Бих искал да обърна внимание на докторантката, че концентрацията се представя като количество вещество в определен обем разтворител (смес от разтворители). Единиците mmol показват количество вещество, но те не отразяват концентрация при липса на количеството разтворител, в което се намират.

Препоръчвам на докторантката в бъдеще да се пристраши и да изнася и доклади на Национални и Международни конференции, тъй като считам, че постигнатите от нея научни резултати са достойни за това.

12. Лични впечатления

Познавам ас. Боряна Якимова от нейното участие в Българските Пептидни Симпозиуми и други научни и социални мероприятия, организирани от Българското Пептидно Дружество. Личните ми впечатления са, че представените от нея разработки са задълбочени, тя притежава отлична научна мисъл и умело, на добро научно ниво умее да защити своите научни наблюдения и постижения, което ми дава основание за изразеното отлично цялостно впечатление и формулираното по-долу крайното заключение от рецензирането на нейния дисертационен труд.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръчвам на ас. Якимова да разшири своето сътрудничество и с други групи и учени извън институтите на БАН в т.ч. в други научни и образователни организации у нас и в чужбина, което убедено считам, че ще допринесе за бъдещото ѝ развитие в избраната от нея научна област.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният ми за рецензия дисертационен труд **съдържа** научни и научно-приложни приноси, представляващи оригинален принос към науката в конкретната и близки научни области, към която докторантката кандидатства за придобиване на ОНС „доктор“. Разработената дисертация **напълно отговаря** и **надхвърля** наукометричните изисквания на ЗРАС на РБългария, правилника за неговото приложение, както и Правилника на ЗРАС на БАН за придобиване на ОНС „доктор“. Дисертационния труд показва, че кандидатката за придобиване на ОНС „доктор“ е придобила значителни теоретични и практически знания и умения по претендираната научна специалност Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества, като несъмнено е показала по време на своята работа качества и умения за самостоятелна научна работа.

Отчитайки всичко гореизложено убедено давам своята **положителна** оценка на представения дисертационен труд и предлагам на уважаемото научно жури **да присъди** ОНС „доктор“ на кандидата ас. Боряна Красиминова Якимова в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества.

10.05.2021г.

Рецензент:

проф. д-р инж. Данчо Даналев