

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Мая Христова Гунчева,
Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН

на дисертационния труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”, по област на висше образование „Природни науки”, шифър 4; професионално направление „Химически науки”, шифър 4.2; научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”

Автор: ас. Боряна Красимилова 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

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-09- 94/19.04.2021 год. на Директора на Институт по органична химия с Център по фитохимия (ИОХЦФ)-БАН съм определена за член на научното жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема „Дизайн и синтез на биологично активни пептиди като потенциални инхибитори на ангиотензин превръщащия ензим (АСЕ I)” за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление „Химически науки”, шифър 4.2, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”. Автор на дисертационния труд е ас. Боряна Красимилова Якимова – докторант на самостоятелна подготовка с научен ръководител проф. дн Иванка Стойнева. Представеният от ас. Боряна Якимова комплект документи е в съответствие с изискванията, описани в Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ-БАН и включва следните документи:

- молба до Директора на ИОХЦФ-БАН за разкриване на процедура за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- копие от дипломата за висше образование (ОКС „магистър”);
- заповеди за зачисляване и отчисляване в докторантура;
- протоколи от успешно положени изпити по индивидуален план на обучение;
- дисертационен труд;
- автореферат;

- списък и копия на научните публикации по темата на дисертацията;
- списък на забелязаните цитати;
- списък с участия в проекти.

Документите са подадени в срок и са добре оформени.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Ас. Боряна Якимова е завършила висше образование в Софийски университет „Св. Климент Охридски, Биологически факултет, София, където през 2005 год. придобива бакалавърска степен по „Биотехнологии”, а през 2007 год. се дипломира с отличен успех като магистър по специалността „Индустриални биотехнологии”. Още като студент ас. Боряна Якимова прави впечатление със своята прецизност в експерименталната работата и буден ум и е поканена да започне работа в лаборатория „Химия и биофизика на протеини и ензими” (ХБПЕ) на ИОХЦФ-БАН, където изработва и своята магистърска дипломна работа под ръководството на проф. дн Божидар Чорбанов. През периода 2005–2007 год. Боряна Якимова заема длъжността биолог-специалист в ИОХЦФ-БАН., а от края на 2007 год. е избрана за асистент. Ас. Боряна Якимова е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка в края на 2015 год. под ръководството на проф. дн Иванка Стойнева. Ас. Боряна Якимова участва в изпълнението на 11 научни проекта, от които 5 са текущи. Ас. Боряна Якимова е била научен консултант при изработването на 3 магистърски дипломни работи. Тя проявява подчертан интерес към изучаването на структурата и функцията на пепиди и ензими. Член е на Българското пептидно дружество.

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

Артериалната хипертония е най-разпространения рисков фактор за сериозни съдови събития като мозъчен инсулт и инфаркт. По данни от проучване на НСИ за 2019 г. състоянието засяга около 29,7 % от лицата в България на възраст над 15 години. АСЕ-инхибиторите са първа линия лекарства за хипертония. Те имат кардиопротективен, нефропротективен и съдовопротективен ефект. Това ги прави особено подходящи при пациенти със съпътстващи заболявания като диабет, нефропатия, застойна сърдечна недостатъчност както и след миокарден инфаркт. Известно е, че при продължително прилагане на АСЕ-инхибитори предимно при по-възрастните пациенти се наблюдава

привикване и намаляване на ефективността им. Намирането на нови активни и селективни АСЕ-инхибитори е обект на засилен интерес от фармацевтичната индустрия. В този ред на мисли целите и задачите, поставени в дисертацията са мотивирани и логични. Има литературни данни, че къси пептиди, получени при ферментацията на мляко имат антихипертензивни свойства. Те обаче се изолират на голям брой стъпки и в малки количества. Резултатите по оптимизирането на синтетичната процедура за получаването им както и получаването на други късоверижни пептиди, техни аналози, потенциални АСЕ-инхибитори имат научно-приложен характер. В настоящата дисертация посредством спектрални и квантово-химични подходи е направен задълбочен анализ на връзката между структурата на някои от синтезираните съединения и техния потенциал като АСЕ инхибитори като получените резултати имат фундаментален характер.

4. Обща характеристика и оценка на дисертационния труд

Изготвеният от ас Боряна Якимова дисертационен труд отговаря на изискванията на ППЗРАСРБ и съдържа: Въведение, Цели и задачи, Литературен обзор, Експериментална част, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси и Цитирана литература, Списък на публикациите по темата на дисертацията и забелязани цитати на тези работи. Дисертацията съдържа: 21 схеми, 39 фигури и 6 таблици. Някои от схемите не са номерирани. Цитирани са 124 литературни източника.

Литературен обзор

Литературният обзор е написан на 24 страници и разглежда три основни направления. В началото му е описана структурата и функцията на по-голяма част от елементите (ензими и рецептори), съставляващи ренин-ангиотензин системата като е акцентирано на структурата, функцията и механизма на действие на ангиотензин-превръщащия ензим I (АСЕ 1). Подчертана е ролята и значението на инхибиторите на този ензим при лечението на артериалната хипертония. Показани са примери за различни групи синтетични и природни съединения с антихипертензивно действие, повечето от които са утвърдени лекарствени препарати. Литературният обзор завършва с преглед на методите и подходите за синтез на пептиди. Подчертани са предимствата и недостатъците на течено-фазния, твърдо-фазния и микровълновия пептиден синтез. Литературният обзор е базиран на 98 литературни източника и е написан стегнато и с разбиране.

Експериментална част

В експерименталната част (41 стр.) са описани подробно синтетичните процедури и са показани реакционните схеми на течно-фазния синтез на дипептидите: H-Val-Pro-OH и H-Ile-Pro-OH и трипептидите: H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH; твърдо-фазния пептиден синтез на осем трипептида, съдържащи пролин, два трипептида несъдържащи пролин; цианметиловите естери на аминокиселини, процедурите за въвеждане на аминокиселини остатъци при глюкоза и захароза. Съединенията са надлежно пречистени посредством високоефективна течна хроматография и са охарактеризирани с ^1H -, ^{13}C - или мас-спектрален анализ (Micromass® Q-ToF MICRO™ с единичен квадруполен детектор). Влиянието на средата върху цис/транс изомеризацията при два от трипептидите (H-Val-Pro-Pro-OH и H-Ile-Pro-Pro-OH) е изследвана подробно посредством линейно-поляризирана ИЧ-спектроскопия и ^1H -ЯМР техники. С молекулен докинг са анализирани взаимодействията трипептидите H-Val-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-OH и H-Val-Pro-Pro-Pro-OH с аминокиселините от подцентровете на ангиотензин-превърщащия ензим 1. Подробно са описани трите използвани „*in vitro*” метода за оценка на ACE 1 инхибиторния потенциал на получените съединения, както и “*ex-vivo*” метода за оценка на ефектите на новосинтезираните съединения върху базалния тонус и тяхното влияние върху индуцираните от ангиотензин I контракции на илеум от плъх. Докторантката е подбрала адекватна методика за постигане на поставените цели и задачи на дисертацията.

Резултати и дискусия

В раздела са обобщени реакционните схеми на получените чрез течно-фазов твърдо-фазов синтез целеви пептиди, показани са техните добиви, както и данни за структурното охарактеризиране (ЯМР и/или мас-спектрометрия) на съединенията. Подробно посредством ЯМР техники и квантово-химични изчисления са разгледани възможностите за цис-/транс- изомеризация при дипептида H-Val-Pro-OH в зависимост от киселинността на средата. Посредством прилагане на линейно-поляризирана ИЧ спектроскопия в твърдо състояние са охарактеризирани детайно конформационната стабилност и възможностите за образуване на вътрешномолекулни водородни връзки за трипептидите: H-Val-Pro-Pro-OH H-Ile-Pro-Pro-OH. За пептидите с различен брой пролинови остатъци, а именно H-Val-Pro-OH, H-Val-Pro-Pro-OH и H-Val-Pro-Pro-Pro-OH, посредством докинг симулации, са предсказани взаимодействията им с аминокиселини от

активния център на ACE 1 и е потърсено обяснение за разликите в активността им. Разработена е схема за селективно получаване на естери на аминокиселини с глюкоза и захароза. Определена е инхибиторната активност на синтезираните целеви пептиди и модифицирани с аминокиселини захароза и глюкоза спрямо ACE 1 като резултатите са сравнени с тези получени за лизиноприл. От проведените “ex-vivo” експерименти е установено, че и петте трипептида H-Val-Ala-Pro-OH, H-Val-Ala-Trp-OH, H-Leu-Lys-Pro-OH, H-Leu-Ala-Pro-OH и H-Ile-Ala-Lys- намаляват дозо-зависимо превръщането на ангиотензин I в ангиотензин II и имат еднакъв инхибиращ потенциал спрямо тъканен ACE 1 в илеум на плъх. Изводите в дисертацията са формулирани ясно и логично следват от получените резултатите.

5. Принос и значимост на разработката за науката и практиката

Проведените в дисертацията изследвания имат научен и научно-приложен характер и обогатяват съществуващите знания в областта на пептидният синтез и ензимологията. Докторантката е предложила нов подход за синтез на късоверижни пептиди и по синтетичен път са получени за пръв път и надлежно охарактеризирани някои от докладваните целеви съединения. Оптимизирана е процедура за разделяне и пречистване на позиционни изомери на естери на аминокиселини и захароза и глюкоза. Изяснена е ролята на състава и конформационната стабилност на късоверижните пептиди за тяхното антихипертензивно действие и стабилност от протеолитична деградация. Получените резултати от изследванията на взаимодействията и начина на свързване на късоверижните пептиди в активния център на ACE 1 могат да дадат насоки за подбора и синтеза на структури с по-висока ACE 1 инхибиторна активност.

6. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от дисертацията са публикувани в четири научни статии, публикувани в: *Journal of Molecular Structure (Q2)*, *Farmacia Journal (Q2)*, *Protein and Peptide letters (Q3)* и *Bulgarian Chemical Communications (Q4)*. В две от публикациите, ас. Боряна Якимова е първи автор, а в една от статиите е втори автор, което е показателно за значителния личен принос в проведените изследвания. Забелязани са 11 цитата на две от публикациите по дисертацията. Части от материала по дисертацията са представени на 14 научни форума и конференции.

7. Автореферат

Авторефератът съдържа 43 страници, от които: 2 страници кратко въведение, 1 страница с използваните съкращения, 1 страница с формулираните цели и задачи, 32 страници с резултати и дискусия, 1 страница изводи, 1 страница приноси и приложения (списъци на публикации по дисертацията, цитати, участия в конференции, защитили дипломанти с консултант ас. Якимова). Авторефератът е изготвен според изискванията на ЗРАСРБ и отразява основните резултати и приноси на дисертацията.

8. Критични забележки и препоръки

Имам критични забележки относно неточности в изказа и забелязани технически грешки. Например на стр. 15 в абзаца, където е дискутирана температурната стабилност на N-домейна на ACE 1 е използван термина „точка на топене” вместо възприетия за биополимерите термин – „температура на топене”. На стр. 20 относно групирането на ACE 1 инхибиторите е посочено, че то е направено „...в зависимост от групата, свързана с Zn атом от молекулата им...” не става ясно, че Zn атом е от активния център на ензима, а по-скоро читателят остава с впечатлението че съединенията са под формата на цинкови комплекси. На стр. 31 под „Академия Синика Шанхай” следва да се разбира Китайска Академия на Науките. На стр. 41 единият от реагентите е изписан като „N,O-бистриметилсилилпролин”, а по късно в текста се среща като „O, N - бистриметилсилилпролин”. На няколко места в текста се среща понятието „хлорни йони” вместо „хлоридни йони”. Молекулното тегло на изходните съединения и получените продукти са дадени с различна точност – в някои случаи до цели числа, а в други с точност до десети или до стотни от десетичната запетая. При изписването на десетичните дробни числа в някои случаи е използвана точка, а в други – запетая. По-правилно е вместо „ОН гр.” да се изпише „хидроксилна група”. На стр. 75 вместо „хипурил-хистидил-лейцин” наименованието на съединението трябва да се изпише „хипурил-хистидил-левцин”. Част от стойностите на IC₅₀ са дадени в μM, а други в μg/mL, което затруднява сравняването им. При форматирането на литературата в някои случаи имената на списанията са изписани изцяло, а в други са съкратени. Съкращението „et al.” се среща и с точки и без точки. На

места в текста се срещат неточности в употребата на малко и голямо тире, пълен член, препинателни знаци.

Считам, че техническите грешки се дължат на невнимание и искам да отбележа, че те не намаляват качествата и приноса на дисертацията, както и не влияят на отличното ми впечатление от качествата и високото научно ниво на изследванията на докторантката.

Към докторантката имам следния въпрос. По какъв критерий е направен избора кои съединения по коя синтетична процедура да бъдат синтезирани? В кои случаи е за предпочитане течна-фазния синтез и в кои твърдо-фазния?

9. Лични впечатления

Познавам лично ас. Боряна Якимова още от постъпването ѝ на работа в лаб. „Химия и биофизика на протеини и ензими” на ИОХЦФ-БАН. Тя е отговорен, дипломатичен и лоялен колега. В хода на работата ѝ по различни проекти, както и по дисертацията ѝ ас. Якимова усвои различни експериментални техники и подходи за синтез на пептиди, изолиране и структурно охарактеризиране на протеини и ензими от различни микробиални и растителни източници както и методи за *in vitro* оценка на активността на различни хидролитични ензими (протеази, галактозидази и др.). Ас. Якимова умее да борави с научна литература, да се фокусира върху решаването на научни проблеми и критично да анализира получените резултати. Тя е изграден учен и желан член на колективите в много проекти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИОХЦФ-БАН за приложение на ЗРАСРБ. Дисертационният труд

показва, че докторантката Боряна Якимова притежава задълбочени теоретични познания и експериментални умения в областта на синтеза, изолирането, структурното охарактеризиране и оценка на активността на късоверижни пептиди в различни *in vitro* моделни системи. Считаю, че ас. Якимова има безспорен принос в извършените изследвания, обобщаването и тълкуването на резултатите и формулирането на приносите в дисертацията.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури **да присъди** образователната и научна степен 'Доктор' на Боряна Красимилова Якимова в област на висше образование: „Природни науки”, шифър 4; професионално направление „Химически науки”, шифър 4.2; научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”.

18.05.2021 г.

Рецензент:

гр. София

(доц. д-р Мая Гунчева)