

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на:

образователна и научна степен "доктор"	X
научна степен "доктор на науките"	
	вярното се отбелязва със знака "X"

Автор на дисертационния труд:

асистент		Диляна	Василева	Димитрова	ХТМУ
акад. дл.	научна степен	име	презиме	фамилия	месторабота

Тема на дисертационния труд:

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА АНАЛОЗИ НА ТЕМПОРИН

Научна област:

5.	Технически науки
шифър	наименование

Професионално направление:

5.11.	Биотехнологии
шифър	наименование

Научна специалност:

Технология на биологично активните вещества

Изготвил рецензията:

Доц.	Д-р	Златка	Милчева	Алексиева	Институт по Микробиология, БАН пенсионер
акад. дл.	научна степен	име	презиме	фамилия	месторабота

1. Окомплектоване на предоставените документи:

А) Дисертационният труд и документите по конкурса съответстват напълно на Правилника	4 точки	X
Б) Документите са окомплектовани, но не съответстват напълно на изискванията на Правилника	2 точки	
В) Документите не са окомплектовани съгласно изискванията на Правилника	0 точки	
		с със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се описват липсващите документи и нарушените стандарти, ако е отбелязан отг. В

2. Удовлетворяване на минималните изисквания, съгласно Правилника:

А) Кандидатът удовлетворява минималните изисквания	20 точки	X
Б) Кандидатът не удовлетворява минималните изисквания	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се попълва, ако е отбелязан отг. Б. Анализира се публикационната активност на кандидата. Анализира се отзвукът на постигнатите резултати (цитирания)

Авторката е представила 3 научни публикации, пряко свързани с темата на дисертацията. Две от публикациите са в списание *Pharmaceutics*, което е с ИФ 5.5 и е с Q1 в областта на фармацевтичната наука, а третата публикация е обзорна и публикувана в списанието *Journal of Chemical technology and metallurgy*, с Q3 в областта на химическото инженерство и промишленото производство, фокусирано върху химични технологии, металургия, биотехнологии и опазване на околната среда и SJR – 0.205. И в трите публикации ас. Димитрова е първи автор. При необходим брой от 30 точки за удовлетворяване на минималните изисквания на Правилника, с представените статии докторантката е натрупала 33 точки.

3. Актуалност на темата на дисертационния труд:

А) Темата е актуална и нова (не са известни резултати по темата от други автори)	8 точки	X
Б) Темата е актуална и са известни резултати по темата от други автори	6 точки	
В) Темата не е актуална, но са известни резултати на други автори	2 точки	
Г) Темата не е актуална и не са известни резултати на други автори по темата	1 точка	
Д) Темата не отговаря на нивото на дисертационен труд	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Оценката за актуалността на дисертационния труд се аргументира задължително

Решаването на проблема с резистентността на микроорганизмите към антибиотици е глобален съвременен проблем, който занимава учените от различни професионални области. Важен аспект от разработките е търсенето на алтернативи на антибиотичните препарати, които могат да решат проблемите с лечението на инфекции, причинени от антибиотикорезистентни микроорганизми. Създаването на ефективни антимикробни пептиди е едно от важните направления в тази област. В този контекст темпорините са едни от широко изследваните и модифицирани късоверижни пептиди, показали значителна активност срещу грам-позитивни

бактерии, дори многолекарствено резистентни щамове и гъбички. Синтезирането на нови структурни аналози на антимикробни пептиди, като темпорини, е една от най-новите тенденции в опитите за създаване на терапевтични препарати с повишена антибактериална активност. Поради високия си потенциал един от най-изследваните и перспективни темпорини е Темпорин А, който е и основен обект на дисертацията. Получените данни са оригинални и със значим принос в разработваната тематика. Важен и актуален аспект на дисертационната разработка е изследването на противотуморна активност на новосинтезирани антимикробни пептиди. През последните години е предпочитан и прилаган синтез на целеви пептиди върху твърд полимерен носител – подход, който е използван в настоящата разработка. Актуалността на представената разработка се подчертава и от процента на цитирани литературни източници от последните 5 години, който е почти 18% от целия списък.

4. Познаване на проблемите, обект на изследване в дисертационния труд:

А) Докторантът познава детайлно постигнатото от други автори по темата на дисертацията	8 точки	X
Б) Докторантът познава частично постигнатите резултати по темата на дисертацията	4 точки	
В) Докторантът няма предварителни знания за състоянието на проблемите в дисертацията	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се аргументира оценката, ако е отбелязан отг. В

Ас. Димитрова е представила литературен обзор, който съдържа детайлна информация относно всички аспекти на разработената тема. Съществено внимание е отделено на причините, механизмите и следствията от възникването на микроорганизми, резистентни към антимикробни вещества и особено сулфонамиди и антибиотици. Подробно е описана историята на откриване и използване на различни групи антибиотици. Като алтернатива е дадена подробна информация за друга група съединения, каквито са природните антимикробни пептиди, като отделно внимание е отделено на темпорините и особено Темпорин А. Тези раздели са подкрепени с голям брой научни трудове от авторитетни автори и научни издания. Те убедително доказват необходимостта от нови разработки в областта на синтеза и модифицирането на антимикробни пептиди като Темпорин А, който е основен обект на интерес в дисертацията. Представената литературна справка обхваща 110 литературни източника, значителна част от които са публикувани през последните 5 години. 3 от тях цитират публикации с участието на авторката на дисертационния труд, което не е необходимо, тъй като резултатите са част от представения материал. В следващите части на литературния обзор авторката е показала задълбочени познания относно подходите за пептиден синтез и съществуващите стратегии за осъществяване на твърдофазен пептиден синтез, както и за модифициране на природни пептиди. Както представената информация в литературния обзор и описанието на експерименталните методи и подходи за постигане на целите, така и обсъждането на получените резултати убедително показват, че докторантката познава детайлно постигнатото от други автори по темата на дисертацията.

5. Тип на изследванията:

А) Теоретични	4 точки	X
Б) Приложни	4 точки	
В) Теоретични с елементи на приложения	4 точки	

Г) Не отговарят на нивото на дисертационен труд	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се аргументира нивото на изследванията, ако е отбелязан отг. Г

Всички проведени изследвания носят фундаментален характер, но създават стабилна основа и за бъдещо приложение в медицината и фармацевцията.

6.Цели на изследванията:

А) Реалистични и представляват научен и/или приложен интерес	8 точки	X
Б) Реалистични, но не представляват научен и/или приложен интерес	3 точки	
В) Недостижими (нереалистични)	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се отбелязват целите. Аргументира се типа на поставените цели

Целта на настоящия дисертационен труд е да се синтезират нови структурни аналози на антимикробния пептид темпорин А и да се изследват техните основни биологични свойства, свързани с антибактериална и антипролиферативна активност, цито- и фототоксичност. Целта е реалистична и дефинира изследвания с научен характер, които имат и приложно значение. За изпълнение на целта са ясно формулирани 6 основни задачи, които определят логиката и взаимоотношаваността на предвидените изследвания.

7.Методи на изследванията:

А) Адекватни на изследванията и поставените цели	8 точки	X
Б) Частично подходящи, даващи възможност за постигане на част от научните цели и/или приложения	4 точки	
В) Неподходящи методи	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се отбелязват методите. Аргументира се типа на използваните методи

В експерименталната част на дисертацията са използвани класически и съвременни подходи. За синтез на антимикробни пептиди, аналози на темпорин, е използван подходът за твърдофазен пептиден синтез по Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)/Ot-Bu стратегия върху полимерен носител Fmoc-Rink-Amide-MBHA смола. За доказване на структурите и чистотата на новосинтезираните таргетни пептиди са приложени HPLC/MS анализи. Определени са важни характеристики на получените продукти, като точка на кипене, оптична активност, кръгов дихроизъм и хидролитична активност.

Втората част от експериментите е посветена на изследване на биологичната активност на

новосинтезираните съединения: антибактериална и антимикотична активност, цитотоксичност, фототоксичност и антипролиферативна активност. Работата, извършена в процеса, включва култивиране на моделни щамове *Escherichia coli* NBIMCC 8785, *Bacillus subtilis* NBIMCC 3562, *Arthrobacter oxydans* NBIMCC 9333, *Pseudomonas aeruginosa* NBIMCC 3700 и *Candida albicans* NBIMCC 74 върху подходящи хранителни среди. За определяне на инхибиращото въздействие на синтезираните вещества, сравнено с това на специфични антибиотици, използвани за подтискане на растежа и развитието на микроорганизмите, са използвани класическите методи - дисково-дифузионен и микроразреждане в бульон. Използваните концентрации на пептиди са в широк диапазон от 0 до 320 µg/mL. Определяни са минималните им инхибиращи бактерицидна и/или фунгицидна концентрации.

За определяне на цитотоксичността на получените пептиди са провеждани *in vitro* тестове с клетъчни линии миши ембрионални фибробласти (BALB 3T3), човешки гръдни епителни клетки (MCF-12F), както и *in vitro* модели за луминален А (MCF-7) и базален В (MDA-MB-231) тип рак на гърдата. Проведени са и тестове за фототоксичност чрез симулатор на изкуствена слънчева светлина Helios-iO с доза 2.4 J/cm². Абсорбцията е измерена при дължина на вълната 540 nm. Определени са CC50 концентрациите за цито- и фототоксичност на изпитваните пептиди.

За определяне на антипролиферативната активност е приложен колориметричен анализ, който включва редуция на жълта, водоразтворима тетразолиева сол (MTT) от митохондриална сукцинат дехидрогеназа в живи клетки до неразтворим, лилав формазанов продукт, чиято концентрация е определяна спектрофотометрично. В експериментите са използвани клетъчни линии (MCF-12F, MCF-7 и MDA-MB-231). Абсорбцията на формазан е определяна при λ=540 nm. Определени са IC50 стойности за антипролиферативната активност на изследваните пептиди. Резултатите са подложени на статистически анализ чрез еднофакторен ANOVA, последван от *post hoc* тест на Bonferroni.

Приложените методи са много добре подбрани и напълно съответстват на поставените научни цели.

8. Приноси на дисертационния труд:

А) С траен научен и/или приложен отзвук, представляват основа за нови направления на изследвания и приложения	20 точки	X
Б) Представляват значим научен и/или приложен интерес, завършват и/или обобщават предходни изследвания	16 точки	
В) Представляват научен и/или приложен интерес	12 точки	
Г) Липса на съществени приноси	8 точки	
Д) Липса на приноси	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се отбелязват приносите. Аргументира се типа на постигнатите резултати

Формулираните 9 изводи и 4 приноси на дисертационния труд са ясно формулирани и реално отразяват получените резултати от експерименталната работа. Като водещо постижение бих отразила разкриването на важни корелации относно структурата и биологичната активност на всички новосинтезирани аналози на темпорин А относно антимикробните свойства, антипролиферативния ефект, цитотоксичността и хидролитичната стабилност. Важен принос са резултатите от изследванията на връзката структура-активност, в зависимост от вида и позицията на включената аминокиселина.

Бих изтъкнала направеното заключение, че получените двойно и тройно заместени аналози (DT4FCi и DT4FCiY) са стабилни и при трите рН системи (условията на стомаха (рН 2.0), кръвната плазма (рН 7.4) и тънкото черво (рН 9.0) в човешкото тяло). Установена е тяхната безопасност за употреба и наличието на значима селективност към базалния тип рак на гърдата MDA-MB-231, както и обещаваща антибактериална активност.

Пептидът DTDab (с 2,4-диаминобутанова киселина) показва най-силната антимикробна

активност от новосинтезираните аналози срещу двата Грам-положителни бактериални щама, *B. subtilis* 3562 и *A. oxydans* 9333, както и срещу Грам-отрицателната *P. aeruginosa* 3700, което се дължи на скъсяването на страничната верига до две метиленови групи. Този пептид показва и пълна стабилност в трите рН стойности.

Интересен е изводът, че ароматната странична верига на позиция 10 усилва антипролиферативната активност, както и понижава цитотоксичността към здравите клетки.

Научните приноси на докторант Дилиана Димитрова са оригинални и в висока научна значимост. Изследванията са обединени с умелото прилагане и логично комбиниране на редица най-съвременни изследователски методологични подходи.

9. Оценка на съответствието на автореферата с дисертационния труд:

А) Пълно съответствие	4 точки	X
Б) Съответствие в основните части	2 точки	
В) Липса на съответствие в основните части	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се обосновава оценката, ако е отбелязан отг. В

Авторефератът отговаря на изискванията на закона и отразява вярно и пълно съдържанието на дисертационния труд.

10. Участие на докторанта при постигане на резултатите в дисертационния труд:

А) Докторантът има поне равностойно участие	8 точки	X
Б) Докторантът има второстепенно участие	5 точки	
В) Участието на докторанта е незабележимо	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се представят критичните бележки, ако е отбелязан един от отг. Б или отг. В

В резултат на получените резултати в хода на разработка на настоящата дисертация са излезли от печат 3 публикации в авторитетни индексирани научни издания, в които докторантката е първи автор. Две от статиите са в списание с ранг Q1 в областта на Фармакология и Фармация и с ИФ 5.5. Третата статия е с ранг Q3 в областта на Химичното инженерство и SJR 2025 – 0.21.

Трябва да се подчертае, че за развитието на докторантката като учен е допринесла стабилната ѝ образователна подготовка в областта на биотехнологията: бакалавърска степен в Университет по природни ресурси и науки за живота във Виена и магистърска степен в ХТМУ София. Стажът ѝ в няколко фирми с биотехнологични производства и като изследовател (проект BG-RRP-2.004 „BiOrgaMCT“) в ХТМУ София, несъмнено е подпомогнал методологичната ѝ подготовка. Докторантката е участвала в 3 научни проекта, а резултатите от изследванията е представила на 12 научни форума и международни конференции с доклади и постерни участия. Тези данни са доказателство за изграждането ѝ като утвърден млад учен в областта на биотехнологиите и ми дават основание да оценя нейното участие като равностойно с останалите колеги.

11. Критични бележки:

А) Липса на критични бележки	8 точки	X
Б) Критични бележки, които имат технически характер	7 точки	
В) Критични бележки, които частично биха подобрили постигнатите резултати	4 точки	
Г) Съществени критични бележки	0 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Задължително се представят критичните бележки, ако е отбелязан един от отг. В или отг. Г

Нямам критични бележки

12. Заключение

А) Оценката за дисертационния труд е ПОЛОЖИТЕЛНА	Оценката се поставя при общ точков актив от най-малко 65 точки	X 100 точки
Б) Оценката за дисертационния труд е ОТРИЦАТЕЛНА	Оценката се поставя при общ точков актив под 65 точки	
		със знака "X" се отбелязва един от посочените отговори

Попълва се при желание на рецензента

Предложената за рецензия докторска дисертация е с актуална научна тематика, изпълнена е с прилагането на съвременни методологични подходи. Получените резултати са с оригинален характер и имат значим научен принос в областта на изследванията на биологично активните вещества. Изпълнението на поставените цели разкрива сложна схема за разкриване на ключови характеристики на новосинтезираните антимикробни пептиди, аналози на антимикробния пептид темпорин А. Дисертационната разработка е богато илюстрирана с 33 фигури, 2 графики, както и 2 приложения с графични панели и богат снимков материал. Данните са обобщени и демонстрирани в 22 таблици. Експериментите съчетават сложни структурни и биологични анализи, които убедително показват предимствата и недостатъци на всяка от различните серии аналози и на всеки изследван индивидуален пептид. Съчетанието и сравнението на получените данни извежда най-перспективните за бъдещи разработки и приложение продукти. Получените резултати разкриват големи възможности и перспектива за нови изследвания по актуални проблеми, насочени към откриване на алтернативи на лечението с антибиотици, както и с потребностите от създаване на нови и селективни противотуморни средства.

Представените научни публикации изцяло съответстват на научната област и научно направление на дисертационната разработка. Наукометричните данни на Дилияна Димитрова надвишават минималните национални изисквания на ЗРАС РБ и допълнителните критерии от съответния Правилник на ХТМУ. Общият точков актив в рецензията е 100. На основата на всичко заявено по-горе в рецензията убедено ще гласувам „ЗА“ присъждане на ОНС „Доктор“ на асистент Дилияна Димитрова в ПН 5.11 Биотехнологии, научна специалност Технология на биологично активните вещества.

23.05.2006	Изготвил рецензията:	
дата		подпис

