

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на **Светлана Цончева Стайкова** на тема **„ТВЪРДОФАЗЕН ПЕПТИДЕН СИНТЕЗ НА СОМАТОСТАТИНОВИ АНАЛОЗИ С ОЧАКВАНО ПРОТИВОТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ“**, представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „4.2-химически науки“ от доц. **Тамара Иванова Пайпанова, д-р**, Институт по молекулярна биология - БАН

1. Уводни бележки. Докторантката Светлана Стайкова е завършила висшето си образование като бакалавър - молекулярен биолог в Биологическия факултет на СУ „Климент Охридски“, а впоследствие като магистър – биотехнолог в ХТМУ – София. Със съответна заповед е зачислена за редовен докторант по специалността „Химически науки (Органична химия)“ към ХТМУ. Аprobацията на труда е проведена на разширен Катедрен съвет, на който участниците при своите изказвания, посочиха положителните страни на дисертационния труд и че докторантката може да се яви на защита.

Дисертационната работа на Светлана Стайкова представлява съвременно структурно-функционално изследване в един от най-важните и перспективни раздели на съвременната органична и биоорганична химия - синтеза на функционални и пептидни производни. Обект на изследването е получаване на скъсени соматостатинови аналози/миметици и тяхното биологично охарактеризиране.

Ракът е водещата причина за смъртта сред хората на възраст над 85 години в България. Към момента, много форми на рак се диагностицират късно, едва след развитие на туморна маса, въпреки значителните усилия в ранната диагностика. Дори и днес, различаването на злокачествените форми от доброкачествените в тялото е проблематично.

Класическият подход при лечението на онкологично болни включва оперативна интервенция, лъче- и химиотерапия, като отделните методи не се конкурират, а взаимно се допълват. Нито един от тези терапевтични подходи, нито тяхната комбинация дават сто процента успех при лечение на раковите заболявания. Нещо повече, при някои видове рак всички терапевтични методи засега са безпомощни. При съвременната терапия на раковите заболявания има два основни проблема:

- силно изразените токсични ефекти за целия организъм на използваните в момента антитуморни препарати и
- способността на туморните клетки да изработват устойчивост към действието на широк кръг антитуморни средства, различаващи се значително както структурно така и функционално.

Получаващото се в резултат увреждане на нормалните клетки води до тежки нежелани лекарствени реакции, като ограничава приложимата доза на противотуморните лекарства до най-високата поносима доза. Освен това, някои от химио-терапевтичните средства не са разтворими и е много трудно да бъдат въведени в клетката.

Това налага непрекъснатото търсене на нови химични съединения с висока противотуморна активност и добра биологична поносимост. Тези съединения трябва да бъдат изпитвани за токсичност и всякакви странични ефекти.

Една надеждна алтернатива на обичайно използваните противотуморни лекарствени средства представляват пептидите. Установено е, че редица пептиди, синтезирани на основата на природни компоненти проявяват противотуморна активност *in vitro* и/или *in vivo*, като основното им преимущество пред класическата лекарствена терапия е силно редуцираната токсичност.

През последните години соматостатинови аналози са обект на усилено изучаване като противотуморни средства. Някои от тях вече се използват в клиничната практика при терапията и диагностиката на ракови заболявания, а други са в процес на клинично изследване.

С други думи, **актуалността и значимостта** на представената ми за рецензиране дисертация не буди никакво съмнение.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на представените материали и резултати.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 96 страници, съдържа 38 фигури и 8 таблици и са цитирани 178 литературни източника.

Литературният обзор е написан компетентно и се чете с удоволствие. Могат да се очертаят два основни раздела свързани с темата на труда, намерили място в прегледа на литературата – детайлно проследяване на трудове отнасящи се до соматостатин, негови аналози и механизма на тяхното действие и подробен анализ на използваните методи за пептиден синтез – в разтвор и върху полимерен носител. Задълбочено се обсъждат възможностите на всеки един от подходите и информацията която дава. Обосновава се необходимостта от прилагането на твърдофазния метод за пептиден синтез. Като съдя по броя на използваните литературни източници и най-вече по тяхното свободно интерпретиране мога да направя уверено извода, че докторантката познава литературния материал по темата. Добро впечатление прави подробното разглеждане на противотуморната активност на соматостатин и на някои негови аналози.

От **Литературния обзор** логично произтичат **целите**, поставени при разработването на дисертационния труд и **задачите** за постигането им. Те са формулирани лаконично и ясно.

Разделът **“Резултати и дискусия”** в научния труд на Стайкова очертава едно сериозно изследване. Последователността от експерименти е планирана логично. Всички получени резултати добре са документирани и обработени по начин, позволяващ извличане на цялата информация от тях. Искам да изразя своята положителна оценка, която заслужават представените фигури и таблици. Дискусията е задълбочена, като собствените резултати се обсъждат в светлината на наличните данни в литературата. Безспорно, изследванията й до голяма степен са предопределени от опита и постиженията на нейните научни ръководители проф. Л. Везенков и проф. Е. Найденова, които имат сериозен успех в разработването на биологично активни пептиди.

Както беше вече отбелязано, С. Стайкова си поставя за цел да разработи и оптимизира твърдофазния метод за пептиден синтез за получаване на скъсени циклични и линейни соматостатинови пептидни миметици.

Изследванията са съсредоточени най-напред върху получаване и изследване на цитотоксичната активност на модифицирани в **5-a** и **6-a** позиция циклични и ациклични октапептидни амидни аналози на соматостатиновия аналог Октреотид ($D\text{-Phe}^1\text{-c(Cys}^2\text{-Phe}^3\text{-D-Trp}^4\text{-Lys}^5\text{-Thr}^6\text{-Cys}^7\text{-Thr}^8\text{-ol)}$). За целта тя замества лизина в **5-a** позиция с **Orn** (орнитин) и неприродните диаминоалканови киселини **Dap** (диаминопропанова киселина) и **Dab** (диаминобутанова киселина). Целта е да се установи как посочените аминокиселини различаващи по броя на $-\text{CH}_2$ групите в страничните вериги, повлияват активността на новосинтезираните аналози. Следващата модификация е направена в позиция **6**, чрез замяна на **Thr** с пространствено запречената неприродна аминокиселина **трет. левцин**. Циклизирането е осъществено чрез образуване на дисулфидни мостове между **Cys-2** и **Cys-7** върху твърдофазния носител с помощта на **Tl(tfa)3**. Цистеиновите остатъци са защитени със S-ацетамидометилна (**Acm**) група, която се деблокира едновременно със създаването на дисулфидния мост. Използваният **Tl(tfa)3** е умерен окислител, водещ до по-добри добиви и чистота на желаните продукти в сравнение с останалите методи за създаване на дисулфидна връзка. Образоването на димери е сведено до минимум, тъй като реакцията се извършва върху твърдофазния носител при голямо разреждане. Наличието на образуваните дисулфидните мостове Стайкова доказва чрез редукция на цикличните пептиди с реагента **TCEP** (трис-(2-карбоксиетил)-фосфин) и последващ мас спектрометричен анализ на редуцираните пептиди.

От проведените **in vitro** изследвания за биологичната активност на синтезираните циклични аналози на Октреотида е установено, че те повлияват жизнеспособността на изследваните клетки по различен начин като цитотоксичността им зависи, както от прилаганата концентрация, така и от вида на клетъчните линии.

Пептидите **1-5** показват умерена *in vitro* противотуморна активност, най-силно изразена в MDA-MB-231, HeLa и Hep G-2 клетъчни линии. Най-висока цитотоксична активност (IC₅₀ 0.033 mM) е установена за пептид **2** (D-Phe-c(Cys-Phe-D-Trp-Dap-Tle-Cys)-Thr-NH₂) спрямо MDA-MB-231 клетъчна линия. Установено е, че дължината на страничната верига на аминокиселината, разположена в позиция **5** (Lys, Orn, Dap или Dap) не оказва голямо влияние върху *in vitro* противотуморната активност на пептидите. Аминокиселината Tle, разположена в позиция **6** не повишава активността, тъй като пептиди **3** (Lys5, Tle6) и референтния пептид **5** (Lys5, Thr6) имат сходна активност в чувствителните клетки - HeLa и Hep G-2. В тези два вида клетъчни линии антипролиферативна активност показват всички съединения (**1-5**) във всички прилагани концентрации.

По-нататък Стайкова синтезира серия от аналози на Октреотид, в които Thr, разположен в шеста позиция замества с пространствено задръжките неестествени аминокиселини Ac5c (аминоциклопентанова киселина), Ac6c (аминоциклохексанова киселина) и Aib (аминоизобутанова киселина). С тези новополучени пептидни предстои провеждане на биологични изследвания.

В допълнение е изследвана антиоксидантната активност на синтезираните пептиди по два метода – HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) и ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Всички изследвани съединения проявяват значително по-висока антиоксидантна активност в сравнение със стандартите галова киселина и тролокс, като и при двата метода най-висока активност е установена за пептид **1**. Намерените стойности за антиоксидантна активност са близки и не би следвало те да повлияват съществено на противотуморната активност на пептидите.

Във втората част от изследователската работа на Стайкова подробно са представени резултатите свързани със синтеза на октапептидни аналози на Вапреотид (**RC-160**) и **RC-121**. За разлика от предходните аналози на Октреотид, които включват Phe в позиция **3**, пептидите от тази серия съдържат **Tyr**. В новосинтезираните аналози на RC-160 и RC-121 са извършени модификации аналогични, на предходните аналози на Октреотид.

От направените *in vitro* биологични изследвания е установено е, че цикличните аналози **1T-4T** показват по-ниска цитотоксичност спрямо клетъчните линии Hep G-2, MDA-MB-231 и HeLa в сравнение с пептидните аналози на Октреотид **1-5**. Най-висока цитотоксична активност показва аналог **4T** (D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Tle-Cys)-Thr-NH₂) спрямо HeLa с IC₅₀ 0.033 mM. Установено е също така, че те не повлияват HT-29 клетъчна линия.

От направените изследвания за определяне на антиоксидантната активност пептиди **1T-4T** е намерено, че те показват значително по-висока активност в сравнение с използваните стандарти. Пептидите **1T-4T** показват около три пъти по-висока антиоксидантна активност в сравнение с пептиди **1-5** от предходната група (аналози на Октретид). Стайкова предполага, че този ефект най-вероятно се дължи на наличието на аминокиселината **Tyr**, в позиция **3** вместо Phe. Стайкова удачно посочва, че за изясняване на връзката между противотуморната и антиоксидантната активност на пептидите са необходими допълнителни изследвания.

След това Стайкова изследва влиянието на някои модификации в **линейни** соматостатинови аналози на **BIM 23052**. Синтезирани са пептиди в които Thr, в позиция **6** е заместен с конформационно задръжките Tle, Aib, Ac5c и Ac6c; включени са D-аминокиселини във втора, трета или седма позиция; с оглед оптимизиране хидрофобността на пептидите и улесняване проникването им в клетъчната мембрана са заместени Phe-остатъци с последователността PFVYLI.

От проведените биологични експерименти с тези аналози на **BIM 23052** е установено, че виталността на Hep G-2 клетките не се променя значително след третиране с пептидите **1L-4L**. Пептидите **1L-4L** не показват цитотоксично действие спрямо HT-29 клетъчна линия – дори и в най-високите прилагани концентрации. Пептид **1L** оказва стимулиращо клетките действие в най-висока степен. И в този случай HeLa клетките проявяват по-висока чувствителност спрямо изследваните вещества. Установено е, че **D-Trp** е от съществено значение за биологичната активност на тези аналози. Показано е, че пептиди **3L** (Pro-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH₂) и **4L** (Pro-D-Phe-Val-Tyr-Leu-Ile-D-Trp-Lys-Tle-Thr-NH₂), които включват D-Trp в позиция **7** инхибират в умерена степен клетъчния растеж на HeLa и Hep G-2 туморни клетъчни линии.

В резултат на направените изследвания Стайкова предполага, че установената ниската цитотоксична активност на пептиди **1L-4L** най-вероятно се дължи на липсата на дисулфиден мост.

В процеса на изработване на дисертационния си труд Светлана Стайкова е синтезирала 33 неописани в литературата пептидни миметици. Тя използва и развива известни методи за временно блокиране/деблокиране на функционални групи, синтез на пептидна връзка върху полимерен носител, изолиране, пречистване и структурен анализ на пептидния продукт. Оптимизирани са условията за свързване на някои аминокиселини при твърдофазния пептиден синтез.

Синтезният дизайн или избор на стратегия и тактика в пептидната химия, е ключов творчески елемент на пептидния синтез. Един и същ набор защитни групи, кондензационни агенти или методи за синтез могат да бъдат така комбинирани, че да доведат до оригинален синтетичен резултат.

Дисертантката и нейните ръководители удачно избират умерения окислител $\text{Ti}(\text{tfa})_3$ за изграждането на дисулфидните мостове. Предимството на предлагания метод е по-високия добив на целевото съединение в сравнение с досега използваните методи. Реакцията протича с по-висока скорост и крайния продукт е с по-висока чистота.

Пречистването на продуктите в повечето случаи е извършвано чрез стандартни процедури а охарактеризирането на чистотата им – чрез аналитична ВЕТХ. Структурният анализ е проведен с използване на масспектрален анализ. Високата разрешителна способност на този метод гарантира достоверността на установените структури при адекватно приписване на спектралните сигнали.

Биологичната активност на синтезираните аналози е определяна с конвенционални експериментални методи *in vitro*. Тези експерименти са провеждани от фармаколози, съавтори на Стайкова.

За съжаление не се съобщава за изследване стабилността на тестираните за биологичната активност съединения в условията на провеждането на тестовете.

Традиционният път за търсене на нови биологично активни вещества, подходящ за разработване на пазарни лекарствени средства, е отсяването им измежду голям брой синтезирани или природни съединения. Един от подходите, интензифициращ синтетичната работа е използването на компютърни програмни продукти. В дисертационния труд на Стайкова, такъв подход не е дискутиран.

3. Приноси

Като цяло дисертационният труд съдържа оригинални приноси, които могат да се характеризират като новост за науката и разширяване на съществуващите знания.

Основният принос в дисертацията е, че в резултат на проведените целенасочени научни дирения, са синтезирани на 33 соматостатинови пептидни миметици с доказана специфичност на действие, повлияващи туморните клетки без да засягат нормалните.

Тези резултати разкриват широко поле за по-нататъшни разширени фармако-биохимични изследвания.

Потвърдителните приноси са точно отчетени в текста на дисертационния труд. Обсъжданията потвърждават мнението ми, че Светлана Стайкова познава добре литературните данни и коректно ги сравнява със своите резултати.

Заслужава висока оценка намирането на важни зависимости между химическа структура и биологично действие в реда на изследваните съединения.

Дисертацията е разработена на основата на 5 публикации, а основните научни и практически резултати са докладвани на 7 национални и международни форума.

Прегледът на научните трудове показва, че както в публикациите така, и в представените доклади и постери от научни форуми Стайкова е първи автор. Въз основа на това, без да се отрича водещата роля на нейните научни ръководители проф. Л. Везенков и проф. Е. Найденова, приемам основното място на С. Стайкова в разработване на задачите на дисертацията и нейното авторство.

Съответствие между автореферата и дисертацията: Светлана Стайкова е представила автореферат, написан съгласно изискванията. Последният адекватно и достатъчно пълно отразява структурата, съдържанието и изводите от дисертацията.

Критични бележки и въпроси

Нямам забележки по същество към работата. Допуснати са някои незначителни технически и стилови грешки.

Така например: Изразът не е точен «Пептидите **1T-4T** притежават около три пъти по-висока антиоксидантна активност». Би трябвало да се каже «..... показват, проявяват ...активност».

Към дисертантката имам и следните въпроси:

1. При определяне на антиоксидантната активност на модифицираните соматостатинови миметици, като контрола е използван съответния соматостатинов аналог. Определяна ли е активността и на самите небелтъчни аминокиселини използвани за съответните модификации?
2. Вие предполагате, че определената ниска цитотоксична активност на синтезираните от Вас пептиди (**1L-4L**) се дължи на липсата на дисулфидни мостове. Правени ли са изследвания за цитотоксичност на линейните пептиди аналози (където са синтезирани)?

Заклучение: Познавам Светлана Стайкова от работата и в ръководената от мен секция в ИМБ, а настоящият труд затвърди отличните ми впечатления. Убедена съм, че резултатите са лично нейно дело. Тя е извършила значителна по обем експериментална работа, изложила е коректно получените резултати и ги е дискутирала компетентно. Усвоила е разнообразни съвременни методи за синтез и анализ на сложни органични молекули и е овладяла до съвършенство методологията на съвременната пептидна химия. Работата я характеризира като отлично подготвен млад специалист и изследовател. Това показва, че и образователната цел на дисертационния труд без съмнение е успешно изпълнена.

Наукометричните показатели са покрити, две публикации с общ **ИФ – 2.220**. Придобитият опит е подсилен със заслужено самочувствие на професионално изграден специалист, представил своите резултати на международни и национални форуми. Със своите научни знания и постижения, Светлана Стайкова удовлетворява напълно изискванията на Закона за развитие на академичния състав на РБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните критерии на ХТМУ за образователната и научна степен „Доктор“ и аз убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури да ѝ я присъди.

19.03.2013 г.

София

Рецензент:

/доц. Тамара Пайпанова/