

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд „Дизайн и синтез на пептиди и гликоконюгати с потенциално приложение в биомедицината и екологията“

за придобиване на научната степен „Доктор на науките“ по научна специалност: биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества

Автор: доц. д-р Иванка Борисова Стойнева

Институт по органична химия с Център по фитохимия,
лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими“

Изготвил: проф. д-р Райна Ботева, дхн,

Национален Център по радиобиология и радиационна защита, София,

член на научно жури със Заповед №НО-05-05-13/6.7.2015 г. на Директора на ИОХЦФ, БАН, София

1. Обща характеристика на дисертационния труд, профил и актуалност на разработената тематика.

Дисертационният труд обединява и представя дългогодишните научни изследвания и оригинални методични разработки на доц. Стойнева, фокусирани върху три основни научни проблема:

- Дизайн и синтез на биологично активни пептиди и специфични ензимни субстрати с потенциално практическо приложение предимно в медицината;
- Каталитичен механизъм и субстратната специфичност на човешка гликозиласпарагиназа и L-аспарагиназа, ензими с ключова роля в метаболизма на гликопротеини (гликозиласпарагин) и пептиди отново насочени основно към медицинско приложение;
- Изолиране и охарактеризиране на повърхностно-активни гликоконюгати – гликолипиди и гликопептиди, известни с общото название биосърфактанти, от различни микроорганизми, с цел практическото им използване предимно за медицински и екологични цели.

Трите основни направления в научните изследвания и методичните разработки са взаимно свързани и обединени от оригиналния подход, актуалността и значението за хората и околната среда на задачите, които решават, както и от иновативните методи, които доц. Стойнева прилага за решаване на конкретни задачи като:

- диензимен синтез на аспартам с използване на термолизин и пенициламидаза,

- молекулен дизайн и синтез на антисенсептидите на аспартама след извеждане на съответната РНК последователност,
- твърдофазен синтез на пролин-съдържащи пептиди,
- хистохимична локализация на ензима дипептидил-пептидаза IV с помощта на синтезиран от доц. Стойнева нов субстрат (Gly-L-Pro-1-хидрокси-4-нафтиламид).

Разработките обхващат един почти 20-годишен научно-изследователски период и в основната си част решават, прилагайки оригинални, нови подходи и методики, добре дефинирани, актуални от научно-изследователска, практическа и методична гледна точка проблеми, свързани с подобряване качеството на живот на хората. Връзката и хармонията между фундаменталните научни постижения и тези с научно-приложен характер, ясно изразени в дисертационния труд, са негова отличителна черта, която обособява профила му и го прави оригинална, актуална и полезна научна разработка.

2. Преценка на съдържанието на дисертационния труд и значение на изследванията

Формулирани са ясно три основни цели, от които произтичат седем конкретни задачи, подредени в хронологичен ред, съответстващ на периодите, по време на които са разработвани отделните части на дисертацията. Те от една страна прогресивно отразяват промените в научно-изследователските интереси и развитие на доц. Стойнева, а от друга, нейният непрекъснат стремеж да разработва тематика, свързани със социално значими проблеми, каквито са биологично активните синтетични пептиди и субстрати с медицинско приложение, както и биосърфактантите с потенциално медицинско или екологично приложение за изчистване на почви и води от нефт и други алифатни и ароматни въглеводороди.

Основната част на дисертацията „Резултати и дискусия“ се състои от три глави и тематично кореспондира отлично със съответните глави в литературния обзор. Това придава кохерентност и свързаност на изложения в дисертацията материал.

Глава I от обзора описва основите на химическия и ензимен синтези на пептидната връзка, както и формирането на тази връзка по време на синтеза на протеини с участието на рибозома, историята на развитието, приложението и усъвършенстването на тези методи в научно-техническо и апаратурно отношение. Той кореспондира отлично с първата глава на раздел „Резултати и дискусия“, която включва резултатите от извършените от доц. Стойнева синтези на различни биологично активни пептиди и ензимни субстрати.

Глава II от литературния обзор е посветена на структурата, свойствата и метаболизма на гликопротеините във връзка с ензима гликозиласпарагиназа, който играе ключова роля в техния метаболизъм и е обект за изследване в дисертационния труд. Разгледани са изолирането, структурното и функционално охарактеризиране, както и клетъчната и тъканна локализация на ензима. Разделът завършва с охарактеризиране на заболяването аспартил-глюкозаминурия, което може да възникне при нарушения в разграждането на гликопротеините. Този раздел кореспондира отлично с резултатите върху каталитичния механизъм и субстратна специфичност на

гликозиласпарагиназа, описани във втората глава на раздел „РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ“.

Последната глава III от обзора е посветена на биосърфактантите – видове, микробиален произход, изолиране и приложението им за отстраняване на органични замърсители, тежки метали, алифатни и ароматни въглеводороди и нефт от почви и води. Той също кореспондира отлично с третата глава на следващия раздел „Резултати и дискусия“, която включва резултатите от най-новите научно-изследователски постижения на доц. Стойнева, фокусирани върху пречистването, охарактеризирането, приложението и химичния синтез на моделни биосърфактанти.

Раздел „Материали и методи“ препраща към оригиналните научни трудове, включени в дисертацията. Съгласна съм, че работните процедури, използваните методи и апаратура са описани в съответните научни трудове, но може би било уместно включването в настоящия дисертационен труд на схематичен, по-обобщен интегрален обзор на разнообразния методологичен инструментариум, специално подбран за решаване на заложените в дисертацията специфични задачи. Това, според мен, би допринесло за повишаване качеството и стойността на настоящия труд, от една страна, а от друга би илюстрирало добре широкия набор от методики и експериментални подходи, които доц. Стойнева отлично владее и прилага за решаването на широкия кръг от специфични задачи, свързани със синтеза на биологично активни съединения с медицинско и екологично значение.

Раздел „Резултати и дискусия“ съдържа, подредени в логичен и хронологичен ред, три глави, които, както вече беше споменато, отразяват периодите в професионалното развитие и научно-изследователска кариера на доц. Стойнева.

Първата глава обхваща експерименталните резултати и научно-изследователски постижения върху ензимния синтез на пептиди и субстрати. Това са:

- къси аналози на енкафалина;
- аспартам и четири антисенс пептиди на аспартама, означени като „вкусови“ пептиди;
- десет пролин-съдържащи инхибитори на ангиотензин I превръщащия ензим, известни като ACE – инхибитори, с антихипертензивен ефект;
- дипептидни естери на ацикловира с пролинови пептиди.

Изследвана и определена е биологичната активност на всички синтезирани пептиди. За аналозите на енкефалина е доказан опиоиден ефект, а органолептичният тест, проведен с антисенс пептидите на аспартама е идентифицирал пептиди със солен, кисел и умами вкус. Успешно е осъществен твърдофазен синтез на ACE – инхибиторите с прилагане на Fmoc стратегия за защита на α -аминогрупата, което е позволило получаване на чисти пептиди с висок добив, в граници 65-77%. Освен при синтеза на енкафалиновите аналози, термолизин, в комбинация с пеницилинамидаза (биензимен синтез), е използван и при синтеза на пептидния подсладител аспартам. Цел на тази разработка е промишленото производство на аспартам. Практическото изпълнение на задачата е предшествано от задълбочен и компетентен анализ на молекулно ниво на ензим-субстратните взаимодействия на двата, използвани в синтетичната схема ензима, термолизин и пеницилинамидаза, с междинните продукти от синтетичната реакция, предшественици на аспартама, както и с дизайн на структурата, удовлетворяваща

конформационните рестрикции и на двата ензима за ефективен биокатализ. Това позволява на авторите да предложат модификация на фенилацетиласпартама след въвеждане на хидрофобни заместители на р-място и улеснява удачния избор на реакционна и технологична схема, която да доведе до продукт с висока чистота и добив, подходяща за промишлено приложение. Друго важно нововъведение, свързано със синтеза на аспартам, е разработването на метод за получаване на ефективен имобилизиран термолизин върху полиетиленов окис за целите на биокатализа на синтеза на Z-аспартам, един от предшествениците на аспартама, който позволява висок добив на съединението – 86% и поне 5-кратно използване на ензимния катализатор.

Синтезът на антисенс пептидите на аспартама също е предшестван от задълбочен и компетентен молекулен дизайн, а аминокиселинния им състав е изведен от ДНК последователността на участъка, кодиращ аспартама или генетичния му код, и по-точно, от нуклеотидната последователност на антисмисловата ДНК верига на този участък. По конвенционален метод са синтезирани четири антисенс ди-пептиди и техните метилови естери и е проведен органолептичен тест за вкусовите им качества. Те се оказват отлични вкусови добавки, които се препоръчват за диабетици и хипертонично болни защото могат да заместят успешно вредните за тях натриев хлорид и глутамат.

Синтетични инхибитори на ангиотензин I превръщащия ензим (АСЕ) намират широко приложение в клиничната практика за лечение на хипертония, заболяване с огромно социално значение не само в национален, но и световен мащаб. Доц. Стойнева, в съавторство с други колеги от ИОХЦФ, участва в разработването на методика и стратегия за синтеза на общо десет трипептида с анти-хипертензивно действие и потенциално медицинско приложение като лекарства или хранителни добавки. Синтезът им отново се предхожда от задълбочен и компетентен анализ на активния център на ензима и на ензим-субстратните взаимодействия. Това помага на авторите да получат детайлна информация за конформацията и аминокиселинната последователност на пептидни инхибитори, за които може да се очаква максимална активност, както и да изберат най-удачния метод за синтез – твърдофазния. Синтезираните пептиди са охарактеризирани спектрално, а с три от Pro-съдържащите пептиди са проведени „докинг симулации“, които са позволили детайлно изследване на ензим-субстратните взаимодействия. По този начин е потвърдена високата инхибиторна активност на един от пептидите (H-Val-Pro-Pro-OH), установена от авторите и са идентифицирани аминокиселините от активния център на ензима, които осъществяват хидрофобни взаимодействия с пептидните Pro-остатъци.

С помощта на цианметилови естери на N-защитени аминокиселини е осъществена транс-естерификация на захароза и глюкоза. Целта е получаването на аминокиселини захари, за които е показано, че също проявяват анти-хипертензивно действие и могат да намерят медицинско приложение като лекарства или хранителни добавки. С ЯМР анализ са идентифицирани местата на ацилиране в моно- и ди-захари.

Пролинови пептиди са използвани за модификация на ацикловир с цел повишаване на антивирусната му активност. Изследвани са също така и като инхибитори на ендопептидази. Авторите предлагат използването на тези пептиди като

лиганди за афинитетно пречистване на ендопептидази, нова област за приложение на синтезираните от тях Pro-съдържащи пептиди.

Втората глава от раздела „Резултати и дискусия“ обхваща научни изследвания върху синтеза на специфични субстрати за гликозиласпарагинази и L-аспарагинази, които да позволят субклетъчно локализиране на ензимите. Избран и синтезиран е β -1-(3-метил-4-хидрокси-нафтил)-аспартат след задълбочен и компетентен анализ на субстратната специфичност на ензимите. С този субстрат е установена лизозомална локализация на гликозиласпарагиназата, а придобитият опит е използван за хистохимична локализация на дипептидилпептидаза IV с помощта на нов, синтезиран за целта субстрат Gly-L-Pro-1-хидрокси-4-нафтиламид. След проведени детайлни и задълбочени изследвания върху реакционния механизъм на гликозиласпарагиназа и на базата на тридименсионалната ѝ структура е установено, че ензимът може да хидролизира L-аспарагин, което пък от своя страна доказва участието му в патогенезата на заболяването аспартилглюкозаминурия. Определени са основните кинетични параметри на хидролизната реакция с участието на този субстрат и аспартилглюкозамин, които идентифицират L-аспарагина като конкурентен инхибитор на аспартилглюкозамина.

Сравнителното изследване на кинетичните свойства на човешка гликозиласпарагиназа и две бактериални L-аспарагинази е показало, че първият ензим катализира по-ефективно хидролизата на β -аспартил пептиди. Направен е изводът, че способността на L-аспарагиназите, които се прилагат при лечението на акутна лимфобластна левкемия да хидролизират, макар и с по-лоши кинетични показатели тези съединения, е полезна за редуциране на нежеланите странични ефекти на β -аспартил пептидите.

След задълбочен теоретичен анализ на механизма на хидролиза на аспартил-глюкозамин с участието на гликозиласпарагиназа, за първи път успешно е осъществен ензимно катализиран синтез на N-гликозидна връзка с участието на същия ензим и е синтезиран гликозиласпарагин, важно съединение за синтеза на N-гликопротеини.

Третата част от раздела „Резултати и дискусия“ представя резултатите от най-новите научни изследвания на доц. Стойнева, свързани с хроматографското пречистване на биосърфактанти от четири бактериални щама, идентифицирането им като рамно- и трехалозо-липиди, както и тяхното структурно охарактеризиране с помощта на мас-спектрални и ЯМР анализи. Изследванията върху биологичната активност на биосърфактантите, с цел приложението им в медицината, са показали, че рамнолипидите от *Pseudomonas aeruginosa* BN10 проявяват силно антибактериално действие и подтискат растежа на грам-положителни бактерии от *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Bacillus*.

В широкия спектър на интересни и полезни активности, установени за гликолипидните биосърфактанти, особено място заема цитотоксичното и антитуморно действие, доказани за пръв път за монорамнолипидната фракция на *Pseudomonas* и трехалозолипидния сърфактант от *Nocardia farcinica* BN60. Експериментално е установено, че биосърфактантите, в сравнително ниска концентрация, имат про-апоптична активност и могат да индуцират фрагментация на ДНК, на което се дължи цитотоксичното и антитуморното им въздействие на молекулно и клетъчно ниво.

Физикохимичното охарактеризиране на новополучените трехалозо-, рамно- и софоро-липиди показва, че те проявява изключително добри повърхностно активни и емулгиращи свойства. Установено е, че независимо от близките си структури, отделните съединения показват различно поведение, както в обем, така и на фазовите граници разтвор/въздух и разтвор/твърда повърхност. С екологична цел – пречистване на замърсени с нефт води и почви, са изследвани три бактериални щамове: *Rhodococcus* (щам BN38), *Nocardia* (BN60) и *Micrococcus* (BN56) за едновременно разграждане на алифатни и ароматни въглеводороди и са постигнати отлични резултати с имобилизирани върху различни носители клетки на *Rhodococcus*. Имобилизираните бактериални клетки са показали значително по-висока катаболитна активност и издръжливост, което ги прави удобни за практически екологични цели.

Като опитен синтетик, с много богат опит в синтеза на различни биологично активни съединения, доц. Стойнева разработва метод за естерифициране на моно- и ди-захариди с естери на наситени мастни киселини като моделни биосърфактанти. Получените по химичен път сърфактанти са охарактеризирани с ЯМР и са показали отлично съответствие с повърхностните свойства на изолираните от бактерии биосърфактанти.

3. Анализ и оценка на изводите и приносите

Дисертационният труд завършва с 18 извода, по 6 за всеки от трите раздела и със справка за приносите. Изводите кореспондират отлично с представените и обсъдени резултати и се възприемат като добре селектиран синтез и екстракт на най-важните научни и научно-приложни постижения в дисертационния труд. Стилистично са оформени добре, формулирани са ясно, достатъчно категорично и прецизно и показват, че поставените задачи и цели са изпълнени успешно. Повечето от изводите са с констативен характер, но значителна част от тях (№2, 3, 5, 6, 18) отразяват технологични постижения и оригинални методологични решения, които биха представлявали интерес за производство на медикаменти, хранителни добавки или пречистващи води и почва препарати.

Приносите са разделени в две групи: с фундаментален и научно-приложен характер. Тези с фундаментален, научно-теоретичен характер, засягат предимно постижения, свързани със синтез на нови пептиди и субстрати и използването на ензимни и твърдофазни катализатори и подходящи реакционни среди, както и нови аспекти в каталитичните механизми на гликозиласпарагиназа и бактериални L-аспарагинази, доказани за пръв път в изследванията на доц. Стойнева. Последният принос от този раздел коректно е разделен на две части, едната от които с фундаментален, а втората, с потвърдителен характер. Приносите с научно-приложен характер визират ясно биотехнологични схеми и технологични решения за производство на пептиди и биосърфактанти с медицинско значение, както и приложения на ензими при лечение на заболявания или на бактерии за пречистване на замърсени с нефт води и почви.

4. Публикации, тематично свързани с дисертацията и цитирания

Приложен е списък на 31 научни труда, включени в дисертационния труд:

- 18 научни труда, публикувани в международни списания, с общ импакт фактор 40,
- една публикация в списание без импакт фактор,
- четири авторски свидетелства,
- шест научни съобщения в сборници от Европейски пептидни симпозиуми, едно в том LX – Хранителна наука, техника и технологии -2013, Пловдив,
- една глава – осма, озаглавена „Трехалозни биосърфактанти“ от книга „Биосърфактанти – тенденции в изследванията и приложения“.

Конференциите и симпозиумите, на които са докладвани части от дисертацията са 22. Приложен е и подробен списък на автори и публикации, цитирали научни трудове, включени в дисертацията, чийто общ брой е 180.

5. Оценка на автореферата

Авторефератът е с обем 65 страници и отразява точно съдържанието на дисертационния труд, изводите, приносите и публикациите, свързани с него. Включва и списък на цитатите.

6. Заключение

Доц. Стойнева е утвърден специалист с висока ерудиция и авторитет в пептидният синтез и ензимния катализ, и има решаващ принос за разработването на представената дисертация. Тя работи повече от три десетилетия в тази област, познава задълбочено и прилага всички методи за синтез на amidна връзка в биологично активни пептиди и протеини. Практическият синтез е предшестван от задълбочен анализ на структурата и свойствата на пептидите, които ще бъдат синтезирани и дизайн на молекулите. Това позволява удачен избор на подходящи условия, катализатори и последователност на синтетичните реакции, в резултат на което се постига висока чистота и добив на желаните продукти. Всеки изолиран или синтезиран пептид, субстрат или биосърфактант е охарактеризиран структурно, най-често с помощта на ЯМР и други високочувствителни спектрални и хроматографски техники. Изследвана е биологичната активност на пептидите и биосърфактантите, а субстратите са надлежно охарактеризирани след определяне на съответните кинетични параметри. Всички синтезирани от доц. Стойнева пептиди и субстрати имат потенциално практическо значение и предимно медицинско приложение – като лекарства или хранителни добавки. Важно практическо приложение имат и гликолипидните биосърфактанти като антимикробни и антитуморни агенти или за екологични цели.

Дисертационният труд отговаря по обем и качество на изискванията за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Той представя и обобщава разработки с убедителен научно-изследователски и научно-приложен характер, чиято крайна цел е високохуманна, а именно - повишаване качеството на живот на хората. Дисертацията ясно демонстрира неразривна връзка на задълбочените теоретични познания с професионалните умения и научно-изследователски интереси на доц. Стойнева в редица специфични области на биоорганичната химия като пептиден синтез, ензимен катализ, структура, функция и физиологична роля на гликолипиди и

други гликоконюгати. Основните научно-изследователски постижения са публикувани в реномирани списания с висок импакт фактор като FEBS Letters, Journal of Biological Chemistry, ChemBioChem и др.

Дисертационният труд на тема: „**Дизайн и синтез на пептиди и гликоконюгати с потенциално приложение в биомедицината и екологията**“ с автор доц. д-р Иванка Стойнева, съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на същия закон. Публикациите, включени в дисертацията и представените други материали напълно съответстват на специфичните изисквания, определени от Научния съвет на Института по органична химия с Център по фитохимия, приети във връзка със ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на същия закон. Считам, че представените в дисертационния труд резултати са съществен научно-изследователски, научно-приложен и методологичен принос и това ми дава основание за положителна оценка на дисертационния труд, постигнатите резултати и приноси.

Предлагам на почитаемото научно жури да гласува положително за присъждане на доц. д-р Иванка Стойнева научната степен „доктор на науките“.

3.09.2015 г.

Рецензент:

/проф. д-р Райна Ботева, дн/