

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дхн **Ирини Дойчинова**,

Фармацевтичен факултет, Медицински университет - София

ОТНОСНО: дисертационния труд на **Антония Георгиева Дюкенджиева-Тодорова**, докторант в Института по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН, на тема: „Изследвания на ADME/Tox свойства и молекулни взаимодействия на флавонолигнани от *Silybum marianum* L. чрез *in silico* и *in vitro* подходи” за присъждане на образователна и научна степен „доктор” в ОВО 4. Природни науки, математика и информатика, ПН 4.3 Биологически науки, ДП „Приложение на принципите и методите на кибернетиката в областта на зависимости структура-активност на биологично активни вещества“

Дисертационният труд на Антония Дюкенджиева е в областта на лекарствения дизайн и изследва фармакокинетичните свойства и механизмите на действие на флавонолигнани от *Silybum marianum* (бял трън) чрез *in silico* и *in vitro* методи. Белият трън е лечебно растение, познато от векове, основно с хепатопротективното си действие, дължащо се на силимарина. Силимаринът е тоталния извлек на растението и включва силибин (рацемат), изосилибин (рацемат), силикристин, силидианин и други флаволигнани и флавоноиди в по-малки количества. През последните години интересът към белия трън нараства поради доказани протективни свойства върху сърдечно-съдовата, нервната, ендокринната и имунната системи. Целта на дисертационния труд е да се изследват фармакокинетичните и токсикологични свойства на флавонолигнаните от *Silybum marianum* и да се изяснят молекулните механизми на действие, свързани с някои от фармакологичните им ефекти.

Дисертационният труд е написан на 146 страници. Съдържа 11 глави: литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане на резултатите, приноси, благодарности, декларация за оригиналност на резултатите, литература, трудове, свързани с дисертацията, участия в научни форуми и две приложения. Онагледен е с 16 таблици и 25 фигури. Библиографията включва 425 заглавия.

В литературния обзор докторант Дюкенджиева показва добро познаване както на изследваните обекти, така и на методите за *in silico* и *in vitro* анализи на техните свойства и механизми на действие. Разгледано е значението на природните продукти

като източници на лекарствени молекули от дълбока древност до наши дни и предимствата им пред синтетичните лекарства. Специално внимание е отделено на флавонолигнаните от *Silybum marianum*, на техните разнообразни терапевтични свойства, фармакокинетично поведение и токсични ефекти. Направен е общ обзор на *in silico* и *in vitro* подходите, използвани за изучаване на фармакологичните и фармакокинетичните свойства на природните продукти, и по-подробно са разгледани QSAR моделите в литературата, включващи пермеабилитет, определен чрез тест за пропускливост през изкуствена мембрана (PAMPA). Анализът на литературата показва, че флавонолигнаните са перспективна група природни съединения с потенциал в няколко терапевтични направления и са необходими по-задълбочени *in vitro* и *in silico* изследвания на чревния им пермеабилитет и конкретните им механизми на действие.

Целта произтича пряко от направените изводи от литературния обзор и определя седем ясно дефинирани задачи, групирани в две направления: изследване и моделиране на чревна резорбция и токсични ефекти и *in silico* идентифициране на нови таргетни протеини, взаимодействащи си с флавонолигнаните, последвано от *in vitro* доказване.

В главата „Материали и методи“ докторант Дюкенджиева подробно и с разбиране описва *in silico* и *in vitro* методите, софтуерните продукти и експертните системи, които е използвала в дисертационния си труд.

Резултатите са структурирани в две направления: ADME/Tox и нови таргети. Чревният пермеабилитет е измерен чрез PAMPA тест ($\log P_e$) и е намерена зависимост от рН. Като слаби киселини с рКа стойности около 7.4, резорбцията на флавонолигнаните е рН-зависима и се увеличава при стойности на рН, по-ниски от рКа, където преобладават нейонизираните молекули. Такава зависимост липсва при съединенията с допълнителна двойна връзка във флавоновия пръстен като 2,3-дехидросилибин и кверцетин, която допълнително поляризира връзката О-Н и понижава рКа стойностите. В измервания рН диапазон двете молекули са в депротонирано състояние и резорбцията им е рН-независима.

Изведен е QSAR модел за чревния пермеабилитет $\log P_e$ на 269 съединения и е установено, че коефициентът на разпределение при рН 7.4 $\log D_{7.4}$ и полярната повърхност на молекулите, съотнесена към единица молекулна маса, определят пермеабилитета на съединенията. Моделът е логичен, статистически значим и с добра предсказваща способност, валидирана с външна тестова група от 783 съединения. Използван е за оценка на пермеабилитета на тестваните флавонолигнани и са получени предсказани стойности близки до експерименталните, с изключение на силикристина и силидианина, при които хромоновия пръстен на лигнана е заменен с бензофуранов. Моделът е включен и свободно достъпен в базата данни на Референтната лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на опитите със животни.

Токсичността на съединенията е оценена чрез експертните системи Derek Nexus и Meteor Nexus и са намерени три токсични заплахи, свързани с увреждане на хромозоми, модулиране на естрогенния рецептор ER α и кожна сенсibiliзация.

Взаимодействието с ER α е моделирано *in silico* чрез молекулен докинг и е установено стереоселективно свързване на силибин В, подобно на агониста естрадиол. Това изследване е научна новост и хвърля светлина върху механизма на потенциална ксеноестрогенна токсичност на флавонолигнаните.

По второто направление в изследванията на докторанта са идентифицирани два нови таргета на флавонолигнаните, свързани с противотуморната им активност, а именно протеините BRAF киназа и SMO. BRAF киназата с мутация V600E е протоонкоген, който се среща при редица злокачествени заболявания като колоректален рак и злокачествен меланом, а SMO протеинът е част от сигналния път Hedgehog и инхибирането му намира приложение в терапията на базалноклетъчен карцином на кожата. Таргетите са идентифицирани чрез виртуален скрининг на база данни от лекарства с антинеопластично действие за структурно подобие с изследваните флавонолигнани. Открити са две молекули – vemurafenib и vismodegib – структурно подобни на силибин А и В и дехидросилибин А и В. Vemurafenib е инхибитор на BRAF киназата, а vismodegib – на SMO рецептора. Последвалите докинг симулации върху двата протеина са показали, че свързването е стереоселективно и обусловено от няколко водородни връзки и π - π взаимодействия с аминокиселини от мястото на свързване. Дехидросилибините са показали по-силен афинитет и към двата протеина, в сравнение със силибините. Получените *in silico* резултати са доказани експериментално, което е много съществен принос на работата. Тествани са инхибиторните ефекти на съединенията върху самите протеини, както и противотуморното им действие върху туморни и здрави клетъчни линии. За съжаление, в *in vitro* изследванията не са използвани като референтни структури vemurafenib и/или vismodegib, което би ни дало информация за значимостта на намерените активности. Въпреки ниските индексите на селективност (не са дадени в дисертационния труд), вариращи между 1.2 и 2.8, изследваните съединения могат да се разглеждат като хитови молекули, чиято структура по-нататък може да бъде оптимизирана до лидерска молекула и дори до кандидат-лекарство.

Докторант Дюкенджиева формулира четири приноса на дисертационния си труд: QSAR модела за чревен пермеабилитет, експериментално определените пермеабилитетни коефициенти logP_e на петте най-често срещани флавонолигнана на *Silybum marianum*, *in silico* хипотезата за взаимодействие с естрогенния рецептор ER α и новоидентифицираните и доказани тергетни протеини на съединенията, свързани с противотуморното им действие. Приемам напълно тези приноси и считам, че те са солидно доказателство за дисертационността на рецензирания труд. Докторантката е усвоила широк набор от *in silico* методи за анализ на природни съединения и ги е приложила на практика, формулирайки научни хипотези, които доказва експериментално.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в четири статии, три от които в списания с IF, една в списание със SJR и две съобщения на научни конференции. Две от статиите са в списания от Q1, другите две – в списания от Q2. Цитирани са 49 пъти (Scopus, 25.10.2023 г.). И в шестте публикации Антония

Дюкенджиева е първи автор. Резултатите са докладвани на пет международни и три национални научни форума. Финансирани са от проекти за млади учени от БАН, ФНИ и COST акция. Съгласно ППЗРАСРБ на БАН, кандидатът трябва да има 30 точки в група показатели Г, формирани от 3 публикации по дисертационния труд, от които поне 1 в международно списание с импакт фактор по WoS и поне 1 статия като първи автор. И трите изисквания са преизпълнени. Четирите публикации носят на докторантката общо 80 точки (2 по 25 т. за Q1 + 20 т. за Q2 + 10 т. за SJR без IF). Първата ѝ позиция в авторския списък на публикациите е доказателство, че дисертационният труд е лично дело на докторантката.

Проверката за плагиатство в дисертационния труд и публикациите към него чрез одобреното от МОН приложение StrikePlagiarism (strikeplagiarism.com) показва, че плагиатство липсва. Трудовете са оригинални и продукт на собствени научни изследвания, както декларира и самата докторантка в дисертационния си труд.

Давам **положителна оценка** на дисертационния труд на Антония Дюкенджиева и като член на научното жури убедено предлагам на Научния съвет на Института по биофизика и биомедицинско инженерство към Българска академия на науките да ѝ бъде присъдена образователната и научна степен „Доктор“ в ОВО 4. Природни науки, математика и информатика, ПН 4.3 Биологически науки, ДП „Приложение на принципите и методите на кибернетиката в областта на зависимости структура-активност на биологично активни вещества“.

Мотивите ми за тази оценка са следните:

1. По време на обучението си в ДП докторант Дюкенджиева е придобила нови знания и практически умения за провеждане на обстойни научни изследвания в областта на лекарствения дизайн.
2. Докторантката е приложила придобитите знания и умения в изучаването на фармакокинетичните свойства и механизми на действие на природни продукти от вида *Silybum marianum*. Получените резултати са публикувани в две престижни научни списания *Phytomedicine* и *Antioxidants*, което е признание за високата им научна стойност.
3. Докторантката покрива и надвишава минималните изисквания към научната дейност на кандидатите за придобиване на ОНС „Доктор“ в ОВО 4. Природни науки, математика и информатика, съгласно Приложение 1 от Правилника за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България на БАН и националния Правилник за прилагане на Закона за развитието на академичния състав в Република България. Общият брой точки на докторанта в група показатели Г е 80 при изисквани 30 точки.

26.10.2023 г.
София

Изготвил рецензията:

(проф. Ирини Дойчинова)