

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Живко Асенов Велков, катедра „Химия“ на Югозападен университет „Неофит Рилски“

на материалите, представени за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ в катедра „Химия“ на Югозападен университет „Неофит Рилски“ по област на висше образование „Химически науки”, професионално направление – 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества)

В конкурса за „доцент“, обявен в Държавен вестник, бр. 57 от 04.07.2023 г. като кандидат участва гл. ас. д-р Радослав Людмилов Чайров от катедра „Химия“ на Югозападен университет „Неофит Рилски“.

1. Общо представяне на получените материали

За участие в обявения конкурс за заемане на академична длъжност „доцент“ по ПН 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества) обявен в „Държавен вестник“ бр. 57/04.07.2023 г. са подени документите на гл. ас. д-р Радослав Людмилов Чайров. Представеният от него комплект материали е в съответствие с Вътрешните правила за развитие на академичния състав в ЮЗУ „Неофит Рилски“ и покрива Минимални национални изисквания към научната и преподавателската дейност за заемане на академичната длъжност „доцент“. Приложена е справка за изпълнение на минималните изисквания, справка за научните приноси, списък и копия на научни трудове по конкурса, както и материали, удостоверяващи участието на кандидата в научни проекти, конференции и др. Представените материали представят ясно досегашната научна дейност и постижения на кандидата.

За участие в конкурса са избрани 13 публикации (от общо 24), публикувани в списания, индексирани в световните бази данни Web of Science, Scopus и SJR: 4 статии са в списания с Q1, 4 статии в списания с Q2, 3 с Q3 и 2 в Q4. Включени са и три патента. В конкурса за заемане на академична длъжност „доцент“ са предложени за участие 30 цитата от забелязаните 41 според SCOPUS (без автоцитати).

2. Кратки биографични данни на кандидата

Радослав Людмилов Чайров е роден на 07 май 1985 г. в гр. Перник. Завършил е ПГТС „арх. Йордан Миланов“ в родния си град. Между 2005 и 2009 година е студент в бакалавърския курс по „Химия“ в катедра „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“, а през 2011 г. завършва и магистърската програма „Биологичноактивни вещества и лекарствени средства“. Три години работи в Балканфарма-ДупницаАД (Активис) като химик-аналитик и провежда серия от физикохимични изпитвания и анализи, базирани на спектрални и хроматографски методи.

Зачислен е като редовен докторант в катедрата на 01.02.2014 и защитава дисертацията си на 26.10.2017 в научно направление 4.2. Химически науки.

През септември 2017 е назначен в катедра „Химия“ като асистент по биоорганична химия. Преподавателска му дейност включва практически упражнения и лекции по следните дисциплини: „Биологично-активни вещества като хранителни добавки“, „Хроматографски методи“, „Специализиран английски език“, „Допинг-средства и контрол“, „Съвременни хроматографски методи“, „Хроматография“.

Участва в разработване на учебни планове. Ръководи и консултира дипломанти. Участва в изпълнението и ръководенето на научно-изследователски проекти и разработването на специализирани учебни помагала за студенти.

3. Оценка на научната дейност на кандидата

Представените научни трудове за участие в конкурса показват, че изследователската дейност и научните интереси на гл. ас. д-р Радослав Чайров са в областта на синтеза на нови съединения с лекарствено действие и изпитване на техната активност.

Най-съществените научни приноси в работите на гл. ас. Чайров са свързани с получаване на нови органични съединения, тяхното изолиране, охарактеризира и изследване на биологична активност, както и извеждане на зависимости между структурата и биологичната активност.

В част от изследванията са проучени методите за получаване на различни производни на утвърдени лекарствени средства с оглед подобрене на тяхното лекарствено действие, увеличаване на бионаличността им или намаление на страничните им ефекти чрез подобряване на способността им да преминават през клетъчни бариери. Друга част от работите на гл. ас. Чайров са свързани с модифициране на противовирусни препарати и са насочени към химичната стабилност на новосинтезираните съединения във водна среда при различни важни от физиологична гледна точка стойности на рН.

Основните направления в работите на д-р Чайров могат да бъдат формулирани по следния начин.

A. Синтез на лекарствени препарати с противовирусна активност

A.1. Анти-HIV активност.

A.2. Антихерпесна активност.

A.3. Антигрипна активност.

B. Лекарствени средства, прилагани срещу Болестна Алцхаймер.

C. Изследване на химична стабилност на модифицирани лекарствени молекули.

D. Структурни изследвания на модифицирани лекарствени молекули.

A.1. Към първата група изследвания спада опита за минимизиране на страничните ефекти на едно от основните средства за лечение на HIV-инфекции, лекарството абакавир (Ziagen) като са синтезирани негови производни, съдържащи глицин, дипептида глицилглицин и трипептида глицилглицилглицин. Изследвана и оценена е тяхната активност върху репликацията на HIV-1 III В в МТ-4 клетки. Едно от новосинтезираните производни – Gly-абакавир показва ниска цитотоксичност и висока анти-HIV-1 активност в МТ-4 клетки, ниска митохондриална токсичност и висока генетична бариера за резистентност.

Ivanka G. Stankova, K. Stanoeva, A. Hinkov, I. Alexiev, P. Genova-Kalou, R. L. Chayrov, R. Argirova, Amino acid and peptide esters of abacavir: synthesis and activity against human immunodeficiency virus type 1 in cell culture, Medicinal Chemistry Research, 21, 12, 4053–4059, 2012.

A.2. Лекарствените средства, прилагани срещу херпес-симплекс вирусите (HSV-1 и HSV-2) са ацикловир, ганцикловир и пенцикловир. Ацикловирът се характеризира с ниска бионаличност, а жлъчните киселини се използват за подобряване на способността за преминаване през клетъчни бариери и повишаване на плазмената концентрация на някои

молекули. Ето защо са синтезирани три естера на ацикловира (ACV) с холева, хенодезоксихолева и дезоксихолева киселини и съединенията са изследвани *in vitro* за срещу срещу HSV-1 и HSV 2, както и срещу вируса на Epstein-Barr (EBV).

С помощта на различни спектрални методи е изследвана плазмената наличност и стабилност. Изследвана е и цитотоксичността на получените производни на ацикловира и антивирусната им активност.

Намерено е, че ацикловирхолатът има подобрена антивирусна активност срещу HSV-1 и осем пъти по-висока активност срещу HSV-2, отколкото ацикловира, а ацикловир-хенодезоксихолатът има шест пъти по-висока антивирусна активност срещу HSV-2. Най-висока активност срещу вируса на Epstein-Barr проявява ацикловир-хенодезоксихолат. В човешка кръвна плазма най-висока стабилност проявява ACV-дезоксихолатът.

Резултатите от изследването показват, че модифицирането на ацикловир с жлъчни киселини е успешна модификация за създаване на предлекарства с повишена противовирусна активност.

R. Chayrov, E. Stylos, M. Chatziathanasiadou, K. Chuchkov, A. Tencheva, A. Kostagianni, T. Milkova, A. Angelova, A. Galabov, S. Shishkov, D. Todorov, A. Tzakos, I. Stankova. Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation, Amino acids, vol. 50,1131, 2018.

Модификации, сходни с тези на молекулата на ацикловира с жлъчни киселини, с ганцикловир и пенцикловир не са показали подобряване на фармакокинетиката. Синтезирани и изследвани *in vitro* са техни производни с жлъчни кселини, но модифицираните аналози са по-малко активни срещу HSV-1 и HSV-2 в сравнение с основните съединения.

K. Chuchkov, R. Chayrov, A. Hinkov, D. Todorov, K. Shishkova, I. Stankova, Modifications on the heterocyclic base of ganciclovir, penciclovir, acyclovir -syntheses and antiviral properties, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 20 Apr 2020, tps://doi.org/10.1080/15257770.2020.1725043

А.3. През последното столетие три са грипните вируси, които предизвикват пандемии – H1N1 (1918-19 г., „Испански грип“), H2N2, който предизвиква епидемия през 1957 г. и H3N2 вируса, който предизвиква епидемия през 1968 г. Трите епидемии са причина за загуба на приблизително 50 млн. души.

Понастоящем в клиничната практика се прилагат два основни типа препарати с антивирусна активност: M2 блокери и невраминидазни инхибитори. Амантадин и римантадин са противовирусни лекарствени средства от групата на M2 блокери, прилагани при лечение на грипни вируси. Амантадинът в същото време се прилага и при лечение на болеста на Parkinsons.

Синтезирани са 19 аминокиселинни аналози на амантадин (Am) и римантадин (Rim) и е изследвана тяхната противовирусна активност *in vitro* срещу грипен вирус А, щам H3N2. Най-висока противовирусна активност, съчетана с ниска цитотоксичност, показва аминокиселинното производно на римантадин с глицин. Същото производното показва и изключително висока стабилност в човешка кръвна плазма в продължение на 24 часа. Термичната му стабилност е установена с помощта на диференциален и гравиметричен термичен анализ. Установена е връзка между структурата и активност в тази група съединения с помощта на CoMFA (сравнителен анализ на молекулното електростатично

поле) анализ. Проведена е и докинг-оптимизационна процедура, разкриваща структурните изисквания за създаване на активни молекули от тази група съединения.

Въпреки ограниченията, породени от използването на приближени методи за пресмятането на електростатичното поле на молекулите и оптимизираните структури на лиганд-рецепторните комплекси при докинга този вид теоретични изследвания намират приложение при търсене на нови съединения с висока биологична активност. Получените от тези теоретични методи резултати не могат да бъдат екстраполирани върху всякакви аналози на изследваните водещи съединения амантадин и римантадин и имат смисъл само когато са потвърдени от експериментални резултати.

Radoslav Chayrov, Spaska Rizova, Vasilka Markova, Angel Galabov, Ivanka Stankova, Synthesis and antiviral activity of the arginine derivatives of influenza virus drugs, Proceeding of the 33rdEPS, ISBN 978-619-90427-2-4, 102-103, 2014.

R. Chayrov, V. Veselinova, V. Markova, L. Mukova, A. Galabov, I. Stankova, Synthesis and Antiviral Activity of Some Amino Acids Derivatives of Influenza Virus Drugs, Chemistry, Bulgarian Journal of Science Education, 24, 3, 348-354, 2015

R. Chayrov, L. Mukova, A. Galabov, Y. Mitrev, I. Stankova, Amantadine analogues – synthesis and biological activity, Bulgarian Chemical Communications, 49, 61-63, 2017

R. Chayrov, N. Parisis, M. Chatziathanasiadou, E. Vrontaki, K. Moschovou, G. Melagraki, H. Sbirikova-Dimitrova, B. Shivachev, M. Schmidtke, Y. Mitrev, M. Sticha, T. Mavromoustakos, A. G. Tzakos, I. Stankova, Synthetic Analogues of Amino adamantane as Influenza Viral Inhibitors - in vitro, In Silico and QSAR Studies, Molecules, 25, 17, 3989, 2020, doi:10.3390/molecules25173989

Синтезирани са аналози на амантадин и римантадин, съдържащи тиазолов пръстен. Изследвана е тяхната противовирусна активност спрямо грипен щам H1N1 и антибактериална активност спрямо моделни щамове грам-положителни (*Bacillus cereus*) и грам-отрицателни (*Escherichia coli*) бактерии и гъбичен щам *Yarrowia lipolytica* 3344.

I. Stankova, K. Chuchkov, R. Chayrov, L. Mukova, A. Galabov, D. Marinkova, D. Danalev, Adamantane derivatives containing thiazole moiety: synthesis, antiviral and antibacterial activity, Int. Journal of Peptide Research Ther., DOI 10.1007/s10989-019-09983-4, 2019.

Синтезирани са три нови производни на амантадин с ароматни аминокиселини и са изследвани за антиоксидантна активност чрез използване на химични системи, които генерират супероксид-анион радикали и хидроксилни радикали, както и чрез DPPH тест.

I. Stankova, R. Chayrov, E. Tzvetanova, A. Georgieva, A. Alexandrova, Comparative study of the antioxidant capacity of some amantadine derivatives, Current Topics in Peptide & Protein Research, 20, 67-72, 2019.

В. Лекарствени средства, прилагани срещу болеста на Алцхаймер

Много невродегенеративни заболявания са резултат от прогресивна загуба на структура или функция на невроните, включително умъртвяването им. Понастоящем се счита, че прогресивното влошаване на когнитивните възможности, обозначено като болест на Алцхаймер, е нелечимо дегенеративно и терминално заболяване. Лечението обикновено е симптоматично – използват се антидепресанти, анксиолитици, невролептици, инхибитори на холинестеразата и други симптоматици. Когато заболяването е в резултат на нарушено изпращане на сигнали в мозъка, важна роля в което играят така наречените N-метил-D-

аспартатни рецептори (NMDA-рецептори), се използват средства за свързването им в мозъка и блокиране активността на невротрансмитера глутамат. Такова средство е мемантинът – адамантаново производно, което е единственото одобрено от американската Food and Drug Administration лекарство за лечение на болестта на Алцхаймер. От друга страна е показано, че мемантинът може ефективно да блокира бактериемия и менингит, причинен от *E. coli* при модел на мишки.

При първото изследване от тази група са синтезирани производни на мемантин, предназначени за лечение на бактериални и гъбични инфекции при пациенти, страдащи от болестта на Alzheimer. Синтезирана е серия от шест мемантинови хибридни молекули, охарактеризирани с ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS, рентгенов анализ и са тествани за активност при болестта на Alzheimer, както и като и антимицробен агент. Изследваните мемантинови аналози с аминокиселини проявяват инхибиторен ефект върху отделни микроорганизми. Val-мемантинът показва по-голяма активност срещу грам-отрицателни и грам-положителни бактерии (*Bacillus megaterium*). β -Ala-мемантинът има висок ефект спрямо *Salmonella enterica*, а Gly-Thiazole има добър инхибиторен ефект срещу грам-положителни бактерии. 4-F-Phe-мемантинът е ефективен при всички изследвани щамове микроорганизми. Инхибиторният ефект е съизмерим с този на тетрациклин и нистатин. 4-F-Phe-мемантинът е най-обещаващият като нов антиинфекциозен терапевтичен агент, срещу клинично значими, условно патогенни бактерии при пациенти, страдащи от умерена до тежка деменция от типа на Alzheimer.

R. Chayrov, Al. Tencheva, H. Sbirikova-Dimitrova, B. Shivachev, A. Kujumdzieva, Tr. Nedeva, I. Stankova, Antibacterial, and Antifungal Activities of Hybrid Molecules Based on Alzheimer Disease Drugs and Bearing an Amino Acid Fragment, November 2019, Conference: The 23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, DOI: 10.3390/ecsoc-23-06602

Синтезирани са поредица от производни на мемантин, включващи аминокиселинни остатъци и е изследвана *in vitro* тяхната невропротективна активност при болни от болестта на Алцхаймер, включваща ефектите върху устойчивостта срещу токсичност, оксидативен стрес, хипоксия и невровъзпаление.

Намерено е, че потискат невровъзпалителните процеси, две от най-обещаващите съединения – H-4-F-Phe-мемантин и H-Тур-мемантин показват активност сравнима с мемантина, имат висока разтворимост във фосфатен буфер и коефициентите им на разпределение показват оптимална липофилност.

Получените резултати създават възможност за нов клас мемантинови производни като потенциални лекарствени препарати. Въз основа на експерименталните резултати са получени корелации между биологичните активности и физикохимичните и структурните дескриптори от друга страна. Предложени са корелационни уравнения, които предсказват свойствата на нови производни на мемантин.

Aleksandra Tencheva, Rui Liu, Tatyana V. Volkova, Radoslav Chayrov, Yavor Mitrev, Martin Štícha, YuhuanLi, Hailun Jiang, Zhuorong Li, Ivanka Stankova, German L. Perlovich, Synthetic analogues of memantine as neuroprotective and influenza viral inhibitors: invitro and physicochemical studies, Aminoacids, 52,1559–1580, 2020 –<https://doi.org/10.1007/s00726-020-02914-4>.

Тъй като оксидативният стрес е определящо условие за възникването на AD, може да се приеме, че модификации на лекарствени средства чрез свързването им с молекули, които притежават антиоксидантни свойства може да доведе до благоприятен ефект. Ето защо е изследвана антиоксидантната активност на 7 аналога на мемантин (Mem) с Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe(4-F) и Gly-Gly; Антиоксидантният капацитет на мемантиновите аналози е тестван в химични системи, генериращи супероксид анион-радикали ($O_2^{\bullet-}$) и хидроксилни радикали ($\bullet OH$), и чрез прилагане на DPPH теста. Резултатите показват незначителен ефект на веществата върху намаляването на DPPH \bullet . Съдържащите Phe производни оказват защитен ефект върху индуцираното от $\bullet OH$ разграждане на дезоксирибозата и имат способността да хелират желязни йони. Сред изследваните съединения Phe-мемантинът проявява най-добра антиоксидантна активност и обещаващ ефект при лечение на AD.

IG Stankova, AI Stoilkova, RL Chayrov, ER Tsvetanova, AP Georgieva, AV Alexandrova, In vitro antioxidant activity of memantine derivatives containing amino acids, Pharmaceutical Chemistry Journal, 54,268–272, 2020.

Изследван е антиоксидантният потенциал на 7 аналога на мемантина (MEM) с Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe (4-F), and Gly-Gly. Този антиоксидантен потенциал е проверен в химични системи, в които се генерират супероксиданиони ($O_2^{\bullet-}$) и хидроксидни радикали ($\bullet OH$), както и спрямо DPPH-радикал. Повечето съединения имат незначителен ефект. Само съдържащите Phe производни на MEM показват добра антиоксидантна активност и обещаващ ефект при третиране на пациенти с AD.

Stankova, I. G., Stoilkova, A. I., Chayrov, R. L., Tsvetanova, E. R., Georgieva, A. P., & Alexandrova, A. V. (2020). In Vitro Antioxidant Activity of Memantine Derivatives Containing Amino Acids. Pharmaceutical Chemistry Journal, 54, 268-272.

С. Изследване на химична стабилност на модифицирани лекарствени молекули

Хидролитичната стабилност на естери на ацикловир: 4-F-фенилаланил-ацикловир (R,S), ацикловирдезоксихолат и ацикловирхенодезоксихолат са изследвани моделни системи, имитиращи човешкия организъм при рН 1, рН 7.4 и температура 37 °С. Разработен е HPLC метод за количествено определяне на концентрацията на изследваните вещества.

От всички изследвани естери, ацикловирхенодезоксихолатът е най-обещаващият кандидат за предлекарство с висока активност и химична стабилност.

I. Stankova, K. Chuchkov, R. Chayov, Chemical stability of esters of acyclovir with amino acid and cholic acids, Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium, 490-491, 2012.

Изследвана е хидролитичната стабилност на нови аналози на мемантин, модифицирани с аминокиселини, при различно рН, съответстващо на човешките биологични течности и органи.

Изследваните съединения включват модифициран мемантин със следните аминокиселини: аланин, β -аланин, глицин, фенилаланин и валин. Всички изследвани съединения имат относително подходяща хидролитична стабилност – повече от 10 часа в неутрална и в кисела среда. Това е напълно достатъчно за да преминат в кръвообращението и да се използват като потенциални предлекарства.

A. Tencheva, R. Chayrov, P. Mandjukov, D. Danalev, I. Stankova, Hydrolytic Stability of New Amino Acids Analogues of Memantine, Sci. Pharm. 88, 38, 3-11, 2020, doi:10.3390/scipharm88030038

D. Структурни анализи на модифицирани лекарствени молекули чрез използване на спектрални методи

Синтезираните аминокислотни производни на аминокислотите амантадин и римантадин и са изследвани за противовирусна активност. Не е известен обаче начина, по който се фрагментират тези съединения при MS-спектрометрия с висока разделителна способност. Наблюдават се два основни пътя на фрагментация. За производни на римантадин това е римантадин и N-(1-адамантил) етилформамаид. По същия начин, при производните на амантадин е амантадин и N-(1-адамантил) формамаид. Фрагментацията на аминокислотната група е обща за всички изследвани съединения. Изследването на механизма на фрагментация може да облекчи охарактеризирането на тези съединения в бъдеще.

M Štícha, RL Chayrov, IG Stankova. Understanding the Fragmentation Pathways of Carbocyclic Derivatives of Amino Acids by Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, Analytical Letters 52 (13), 2069-2076, 2019.

С помощта на ядрено-магнитен резонанс са изследвани 12 биологично-активни амидоадаманти. Присвояването на протонни и въглерод-13 химични отмествания показват сходно поведение, заедно с някои специфични структурни промени в случаите на ароматни заместители. Тези изследвания осигуряват добра основа за бъдещи изследвания, било като инструмент за разширяване на базата от данни с нови съединения, било като отправна точка за структурен анализ на предпочетени конфигурации и конформации.

Y. Mitrev, R. Chayrov, I. Stankova, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Adamantane Derivatives: Interpretation of Proton and Carbon Chemical Shifts, Spectroscopy Letters, 53, 7, 489-493, 2020.

4. Оценка на личния принос на кандидата

Приносът на кандидата гл. ас. д-р Радослав Чайров в проведените изследвания е значителен, а в някои и водещ. Свидетелство за това е първата позиция сред авторите в 5 от статиите, с които участва в конкурса, а в 3 от тях е втори автор.

Кандидатът несъмнено притежава необходимата научните умения и компетенции в областта на органичния синтез и спектралния анализа на органични вещества. Освен това той е участвал в изследване на свойствата на синтезираните вещества с цел подобряване на преноса им през клетъчни мембрани, устойчивост в различни физиологични среди и намаляване на нежелани странични ефекти.

Тези придобити компетенции определят и насоките за развитие на кандидата като преподавател по дисциплини, свързани с химия на лекарствените средства, биоорганична химия и биохимия.

5. Критични забележки и препоръки

В последните работи на Чайров, включени в списъка с публикации за участието му в този конкурс, се появяват теоретични разработки и корелации структура/активност, които повишават значително качеството на публикациите. Като човек интересуващ се от

теоретични методи бих искал да видя повече теоретично изведени аргументи за синтеза на различни нови молекули в работи на господин Чайров.

Нямам други забележки към материалите, представени от него в конкурса.

6. Лични впечатления

Имам отлични впечатления от Радослав Чайров още от студентските му години. Той е интелигентен млад човек с безспорен афинитет към научни занимания. Наблюдавам с интерес превръщането му в добър специалист и ще се радвам да видя, че научното му любопитство се засилва с хабилитацията, а тя ще разшири възможностите му за самостоятелни изяви.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

След направените допълнения, документите и материалите, представени от гл. ас. д-р Радослав Чайров отговарят на всички изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на Югозападен университет „Неофит Рилски“.

По своя обем и качество всички наукометрични показатели на гл. ас. д-р Чайров отговарят на препоръчителните изисквания за заемане на академичната длъжност “доцент”. В работите на кандидата има оригинални научни и научно-приложни приноси, които са получили международно признание – научните трудове са публикувани в научни списания, издадени от международни академични издателства и цитирани от други автори. Получените научни резултати имат добра перспектива за практическа приложимост, а собственият му принос в изследванията са несъмнени.

След запознаване с представените в конкурса материали и съдържащи се в тях научни и научно-приложни приноси, убедено давам положителна оценка на кандидата и препоръчам на членовете на Научното жури да подкрепи избора на гл. ас. д-р Радослав Чайров на академичната длъжност “доцент” в област на висшето образование „Химически науки”, професионално направление – 4.2, научна специалност „Органична химия”.

08.10.2023 г.

Рецензент:

доц. д-р Живко Велков,

кат. „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“

REVIEW

On a competition for an academic position "Associate Professor" at the South-West University "Neofit Rilski" in Blagoevgrad, in the scientific specialty 4.2. Chemical Sciences (Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances), announced in the State Gazette, № 57/04.07.2023

Candidate: Chief Assistant Professor Dr. Radoslav Lyudmilov Chairov from the Department of Chemistry at the South-West University "Neofit Rilski" in Blagoevgrad.

Reviewer: Assoc. Prof. Dr. Zhivko Velkov, Department of Chemistry at the South-West University "Neofit Rilski" in Blagoevgrad.

1. General description of the materials submitted

The only documents of Ch. Assistant Dr. Radoslav Ludmilov Chairov have been submitted for the participation in the announced competition for the academic position of "Associate Professor" in the specialty 4.2. Chemical sciences (Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances) announced in the "State Gazette" no. 57/04.07.2023.

The materials provided by him align with the Internal Regulations for the professional development of academic staff at the South-West University "Neofit Rilski" and meet the Minimum National Requirements for both scientific research and teaching activities required for the position of 'associate professor'. Enclosed are a report detailing the satisfaction of minimum requirements, a dossier highlighting scientific contributions, a comprehensive list along with copies of scholarly works relevant to the competition, along with documentation substantiating the candidate's involvement in scientific projects, conferences, etc. These materials distinctly showcase the applicant's scientific endeavors and accomplishments.

Out of a total of 24 publications, 13 have been chosen for participation in the competition, and they are all indexed in global databases such as Web of Science, Scopus, and SJR: 4 articles are in journals with Q1, 4 articles in journals with Q2, 3 with Q3 and 2 in Q4. Three patents are also included. 30 citations out of the observed 41 according to SCOPUS (without self-citations) are offered for participation in the competition.

2. Brief biographical data about the candidate

Radoslav Ludmilov Chairov, born on May 7, 1985 in Pernik, is an alumnus of PGTS "arch. Yordan Milanov" in his hometown. He pursued his Bachelor's degree in "Chemistry" at the "Chemistry" department of "Neophyt Rilski" State University from 2005 to 2009, and in 2011, he successfully completed the master's program in "Biologically Active Substances and Medicinals". Over the course of three years, he contributed his expertise as an analytical chemist at Balkanpharma-Dupnitsa AD (Aktavis), where he conducted a series of physicochemical tests and analyses utilizing spectral and chromatographic methods.

He was enrolled as a full-time doctoral student in the department on 01.02.2014 and defended his dissertation on 26.10.2017 in scientific direction 4.2. Chemical Sciences.

In September 2017, he was appointed to the Department of Chemistry as an assistant professor in bioorganic chemistry. His teaching activities include practical exercises and lectures on the disciplines: "Biologically active substances as food additives", "Chromatographic methods", "Specialized English", "Doping substances and control", "Modern chromatographic methods", "Chromatography".

Engages in curriculum development, offers guidance and counsel for diploma thesis preparation, and actively contributes to the execution and oversight of research projects. Additionally, plays a key role in crafting specialized teaching materials for students.

3. Evaluation of the candidate's scientific activity

The submitted research papers for participation in the competition demonstrate that the research activities and scientific interests of Assoc. Prof. Dr. Radoslav Chairrov lie in the field of synthesizing new compounds with medicinal properties and assessing their effectiveness.

The most substantial scientific contributions in Dr. Chairrov's works are linked to the production of novel organic compounds, their isolation, characterization, and the investigation of their biological activity. Furthermore, he establishes correlations between structure and biological activity.

In some of the studies, methods for obtaining various derivatives of established pharmaceuticals have been investigated with the aim of improving their therapeutic effects, enhancing their bioavailability, or reducing their side effects by improving their ability to traverse cellular barriers. Another part of Dr. Chairrov's work is related to the modification of antiviral drugs, focusing on the chemical stability of newly synthesized compounds in an aqueous environment at various physiologically relevant pH values.

Dr. Chairrov's primary areas of focus can be summarized as follows:

A. Synthesis of drugs with antiviral activity

A.1. Anti-HIV activity.

A.2. Antiherpetic activity.

A.3. Anti-influenza activity.

B. Drugs Used Against Alzheimer's Disease.

C. Chemical stability study of modified drug molecules.

D. Structural Studies of Modified Drug Molecules.

A.1. The first group of studies includes the attempt to minimize the side effects of the main drug for the treatment of HIV infections - abacavir (Ziagen). Its derivatives containing glycine, the dipeptide glycylglycine and the tripeptide glycylglycylglycine have been synthesized. Their

activity on HIV-1 III B replication in MT-4 cells was investigated. One of the newly synthesized derivatives – Gly-abacavir shows low cytotoxicity and high anti-HIV-1 activity in MT-4 cells, low mitochondrial toxicity and high genetic barrier for resistance.

Ivanka G. Stankova, K. Stanoeva, A. Hinkov, I. Alexiev, P. Genova-Kalou, R. L. Chayrov, R. Argirova, Amino acid and peptide esters of abacavir: synthesis and activity against human immunodeficiency virus type 1 in cell culture, Medicinal Chemistry Research, 21, 12, 4053–4059, 2012.

A.2. The drugs used against the herpes simplex viruses (HSV-1 and HSV-2) are acyclovir, ganciclovir and penciclovir. Acyclovir is characterized by low bioavailability. On the other hand, bile acids are used to improve the ability to pass through cellular barriers and increase the plasma concentration of some molecules. Therefore, three esters of acyclovir (ACV) with cholic, chenodeoxycholic and deoxycholic acids are synthesized and the compounds were tested *in vitro* against HSV-1 and HSV 2 as well as against Epstein-Barr virus (EBV).

Plasma availability and stability are investigated using various spectral methods. The cytotoxicity of the obtained acyclovir derivatives and their antiviral activity are also investigated.

Acyclovircholate is found to have improved antiviral activity against HSV-1, eight times higher activity against HSV-2 than acyclovir, and acyclovir-chenodeoxycholate had six times higher antiviral activity against HSV-2. Acyclovir-chenodeoxycholate exhibits the highest activity against the Epstein-Barr virus. ACV-deoxycholate exhibits the highest stability in human blood plasma.

The study results indicate that the modification of acyclovir with bile acids is a highly effective strategy for producing prodrugs with enhanced antiviral activity.

R. Chayrov, E. Stylos, M. Chatziathanasiadou, K. Chuchkov, A. Tencheva, A. Kostagianni, T. Milkova, A. Angelova, A. Galabov, S. Shishkov, D. Todorov, A. Tzakos, I. Stankova. Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation, Amino acids, vol. 50, 1131, 2018.

Modifications akin to those applied to the acyclovir molecule with bile acids for ganciclovir and penciclovir did not yield improvements in pharmacokinetics. While derivatives with bile xelins are synthesized and subjected to *in vitro* studies, the modified analogs exhibited lower activity against HSV-1 and HSV-2 compared to the original compounds.

K. Chuchkov, R. Chayrov, A. Hinkov, D. Todorov, K. Shishkova, I. Stankova, Modifications on the heterocyclic base of ganciclovir, penciclovir, acyclovir -syntheses and antiviral properties, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 20 Apr 2020, <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1725043>

A.3. During the last century, three influenza viruses triggered pandemics: H1N1 (1918-1919, known as the "Spanish flu"), H2N2, responsible for the 1957 epidemic, and the H3N2 virus, which led to the 1968 epidemic. These three outbreaks resulted in an estimated loss of around 50 million lives.

Presently, clinical practice employs two primary categories of antiviral agents: M2 blockers and neuraminidase inhibitors. Within the M2 blocker group, antiviral medications like amantadine and rimantadine are utilized for treating influenza viruses. Additionally, amantadine finds application in the treatment of Parkinson's disease.

19 amino acid analogues of amantadine (Am) and rimantadine (Rim) are synthesized and their *in vitro* antiviral activity against influenza A virus H3N2 strain is investigated. The amino acid derivative of rimantadine with glycine showed the highest antiviral activity combined with low cytotoxicity. The same derivative also shows extremely high stability in human blood plasma for 24 hours. Its thermal stability is established using differential and gravimetric thermal analysis. A structure-activity relationship is established in this group of compounds using CoMFA (comparative molecular electrostatic field analysis) analysis. A docking optimization procedure is also carried out, revealing the structural requirements for creating active molecules from this group of compounds.

Despite the constraints posed by the utilization of approximate methods for computing the electrostatic field of molecules and optimizing ligand-receptor complex structures in docking, this form of theoretical research remains valuable in the quest for novel compounds with potent biological activity. It is important to note that outcomes derived from these theoretical approaches cannot be generalized to analogues of the benchmark compounds, amantadine and rimantadine, without empirical validation. Experimental confirmation is crucial for the meaningful interpretation of these results.

Radoslav Chayrov, Spaska Rizova, Vasilka Markova, Angel Galabov, Ivanka Stankova, Synthesis and antiviral activity of the arginine derivatives of influenza virus drugs, Proceeding of the 33rdEPS, ISBN 978-619-90427-2-4, 102-103, 2014.

R. Chayrov, V. Veselinova, V. Markova, L. Mukova, A. Galabov, I. Stankova, Synthesis and Antiviral Activity of Some Amino Acids Derivatives of Influenza Virus Drugs, Chemistry, Bulgarian Journal of Science Education, 24, 3, 348-354, 2015

R. Chayrov, L. Mukova, A. Galabov, Y. Mitrev, I. Stankova, Amantadine analogues – synthesis and biological activity, Bulgarian Chemical Communications, 49, 61-63, 2017

R. Chayrov, N. Parisi, M. Chatziathanasiadou, E. Vrontaki, K. Moschovou, G. Melagraki, H. Sbirikova-Dimitrova, B. Shivachev, M. Schmidtke, Y. Mitrev, M. Sticha, T. Mavromoustakos, A. G. Tzakos, I. Stankova, Synthetic Analogues of Amino adamantane as Influenza Viral Inhibitors - in vitro, In Silico and QSAR Studies, Molecules, 25, 17, 3989, 2020, doi:10.3390/molecules25173989

Analogues of amantadine and rimantadine containing a thiazole ring have been synthesized. Their antiviral activity against influenza strain H1N1 and antibacterial activity against model strains of gram-positive (*Bacillus cereus*) and gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria and fungal strain *Yarrowia lipolytica* 3344 were investigated.

I. Stankova, K. Chuchkov, R. Chayrov, L. Mukova, A. Galabov, D. Marinkova, D. Danalev, Adamantane derivatives containing thiazole moiety: synthesis, antiviral and antibacterial activity, Int. Journal of Peptide Research Ther., DOI 10.1007/s10989-019-09983-4, 2019.

Three new derivatives of amantadine with aromatic amino acids have been synthesized and investigated for antioxidant activity using chemical systems that generate superoxide anion radicals and hydroxyl radicals as well as by DPPH assay.

Stankova, R. Chayrov, E. Tzvetanova, A. Georgieva, A. Alexandrova, Comparative study of the antioxidant capacity of some amantadine derivatives, Current Topics in Peptide & Protein Research, 20, 67-72, 2019.

B. Drugs used against Alzheimer's disease

Many neurodegenerative diseases stem from the gradual loss of neuronal structure and function, culminating in their eventual demise. Alzheimer's disease, characterized by the progressive decline in cognitive abilities, is presently considered an incurable, degenerative, and terminal ailment. Treatment primarily focuses on managing symptoms, employing various drugs such as antidepressants, anxiolytics, neuroleptics, cholinesterase inhibitors, and other symptomatic interventions. In cases where the disease arises from disrupted signal transmission in the brain, N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-receptors) play a pivotal role. Agents that target these receptors in the brain to inhibit the activity of the neurotransmitter glutamate are employed. Memantine, an adamantane derivative, is one such agent and is the only drug approved by the US Food and Drug Administration for Alzheimer's treatment. Interestingly, studies have demonstrated memantine's effectiveness in blocking bacteremia and meningitis caused by *E. coli* in a mouse model.

In the first study by this group, memantine derivatives were synthesized to treat bacterial and fungal infections in patients suffering from Alzheimer's disease. A series of six memantine hybrid molecules were synthesized and characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, MS, X-ray analysis. All of them have been tested for activity in Alzheimer's disease, as well as as an antimicrobial agent. The investigated memantine analogues with amino acids exhibit an inhibitory effect on individual microorganisms. Val-memantine shows greater activity against gram-negative and gram-positive bacteria (*Bacillus megaterium*). β-Ala-memantine has a high effect against *Salmonella enterica*, and Gly-Thiazole has a good inhibitory effect against Gram-positive bacteria. 4-F-Phe-memantine was effective against all tested strains of microorganisms. The inhibitory effect is comparable to that of tetracycline and nystatin. 4-F-Phe-memantine is the most promising as a new anti-infective therapeutic agent against clinically relevant, opportunistic bacteria in patients suffering from moderate to severe dementia of the Alzheimer type.

R. Chayrov, Al. Tencheva, H. Sbirikova-Dimitrova, B. Shivachev, A. Kujumdzieva, Tr. Nedeva, I. Stankova, Antibacterial, and Antifungal Activities of Hybrid Molecules Based on Alzheimer Disease Drugs and Bearing an Amino Acid Fragment, November 2019, Conference: The 23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, DOI: 10.3390/ecsoc-23-0660

A series of memantine derivatives comprising amino acid residues are synthesized and their neuroprotective activity in Alzheimer's disease patients is investigated *in vitro*, including the effects on resistance against toxicity, oxidative stress, hypoxia and neuroinflammation.

A range of memantine derivatives incorporating amino acid residues is synthesized, and their neuroprotective potential in Alzheimer's disease patients is assessed *in vitro*. This evaluation encompassed their impact on resistance against toxicity, oxidative stress, hypoxia, and neuroinflammation.

The findings suggest the potential for a novel class of memantine derivatives with potential therapeutic applications. Through experimental data, correlations were established between biological activities and physicochemical as well as structural descriptors. This has led to the proposal of correlation equations to anticipate the properties of these new memantine derivatives.

Aleksandra Tencheva, Rui Liu, Tatyana V. Volkova, Radoslav Chayrov, Yavor Mitrev, Martin Štícha, YuhuanLi, Hailun Jiang, Zhuorong Li, Ivanka Stankova, German L. Perlovich, *Synthetic analogues of memantine as neuroprotective and influenza viral inhibitors: invitro and physicochemical studies, Aminoacids*, 52,1559–1580, 2020 –<https://doi.org/10.1007/s00726-020-02914-4>.

Given that oxidative stress is a pivotal factor in the onset of Alzheimer's Disease (AD), it is conceivable that modifying drugs by incorporating molecules with antioxidant properties may yield beneficial effects. Consequently, the antioxidant capabilities of seven analogues of memantine (Mem) coupled with Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe(4-F), and Gly-Gly were investigated.

The assessment of memantine analogues' antioxidant capacity involved evaluating their performance in chemical systems that generate superoxide anion radicals ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radicals ($\bullet OH$), along with employing the DPPH test. The findings indicated a minimal impact of the substances on reducing DPPH \bullet . Derivatives containing Phe demonstrated a shielding effect against $\bullet OH$ -induced degradation of deoxyribose and exhibited the capacity to chelate iron ions. Among the compounds under scrutiny, Phe-memantine displayed the most robust antioxidant activity, showing promise in the context of AD treatment.

IG Stankova, AI Stoilkova, RL Chayrov, ER Tsvetanova, AP Georgieva, AV Alexandrova, In vitro antioxidant activity of memantine derivatives containing amino acids, Pharmaceutical Chemistry Journal, 54,268–272, 2020.

The antioxidant capacity of seven memantine analogues (MEM) with Gly, Ala, β -Ala, Val, Phe, Phe (4-F), and Gly-Gly is examined. This potential is validated in chemical systems producing superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radicals ($\bullet OH$), as well as against DPPH radicals. The majority of compounds exhibited a minimal impact. Notably, only the Phe-containing derivatives of MEM displayed substantial antioxidant activity, indicating promise for the treatment of AD patients.

Stankova, I. G., Stoilkova, A. I., Chayrov, R. L., Tsvetanova, E. R., Georgieva, A. P., & Alexandrova, A. V. (2020). In Vitro Antioxidant Activity of Memantine Derivatives Containing Amino Acids. Pharmaceutical Chemistry Journal, 54, 268-272.

C. Study on the Chemical Stability of Modified Drug Molecules

The hydrolytic stability of esters of acyclovir: 4-F-phenylalanyl-acyclovir (R,S), acyclovir deoxycholate, and acyclovir chenodeoxycholate are investigated as model systems simulating the human body at pH 1, pH 7.4, and a temperature of 37°C. An HPLC method is developed for the quantitative determination of the concentrations of the substances under study.

Among all the investigated esters, acyclovir chenodeoxycholate emerges as the most promising prodrug candidate due to its high activity and chemical stability.

I. Stankova, K. Chuchkov, R. Chayov, Chemical stability of esters of acyclovir with amino acid and cholic acids, Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium,490-491, 2012.

The hydrolytic stability of new analogues of memantine, modified with amino acids, has been investigated at different pH levels corresponding to human biological fluids and organs.

The examined compounds include modified memantine with the following amino acids: alanine, β -alanine, glycine, phenylalanine, and valine. All the investigated compounds exhibit relatively suitable hydrolytic stability – more than 10 hours in both neutral and acidic environments. This is entirely sufficient for them to enter the bloodstream and be potentially used as prodrugs.

D. Structural analyses of modified drug molecules using spectral methods

Aminoacyl derivatives of the aminoadamantans, amantadine, and rimantadine, are synthesized and assessed for their antiviral activity. However, the specific fragmentation patterns of these compounds in high-resolution MS-spectrometry remain unknown. Two primary fragmentation pathways are identified: one leading to rimantadine and N-(1-adamantyl)ethylformamide for rimantadine derivatives, and another yielding amantadine and N-(1-adamantyl)formamide for amantadine derivatives. Notably, the fragmentation of the aminoacyl group is a common characteristic across all compounds investigated. Further exploration of the fragmentation mechanism may facilitate the future characterization of these compounds.

M Šticha, RL Chayrov, IG Stankova. Understanding the Fragmentation Pathways of Carbocyclic Derivatives of Amino Acids by Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, Analytical Letters 52 (13), 2069-2076, 2019.

Using nuclear magnetic resonance, 12 biologically active amidoadamantanes are investigated. The assignment of proton and carbon-13 chemical shifts revealed similar behavior, along with some specific structural changes in cases of aromatic substitutions. These studies provide a solid foundation for future research, whether as a tool for expanding the database with new compounds or as a starting point for structural analysis of preferred configurations and conformations.

Y. Mitrev, R. Chayrov, I. Stankova, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Adamantane Derivatives: Interpretation of Proton and Carbon Chemical Shifts, Spectroscopy Letters, 53, 7, 489-493, 2020.

4. Assessment of the candidate's individual contribution

The contribution of Assistant Professor Dr. Radoslav Chairov in the conducted research is substantial, and in some cases, he played a leading role. This is evident from his first-author position in five of the articles in the list for the competition, and in three of them, he held the second authorship.

The candidate undeniably demonstrates proficiency in the domain of organic synthesis and spectral analysis of organic substances. Furthermore, their involvement in scrutinizing the properties of synthesized compounds, aimed at enhancing their cell membrane permeability, stability in diverse physiological conditions, and mitigating undesirable side effects, underscores their comprehensive expertise.

These acquired competencies position the candidate as an exceptional lecturer in the fields of medicinal chemistry, bioorganic chemistry, and biochemistry.

5. Critical remarks and recommendations

In Chairov's recent works, featured in the list of publications for his participation in this competition, there is a notable presence of theoretical advancements and structure/activity correlations. These elements significantly elevate the overall quality of the publications.

Being keenly interested in theoretical methodologies, I would appreciate encountering more theoretically grounded syntheses of diverse novel molecules in Mr. Chairov's works.

I have no further reservations regarding the materials submitted by him for the competition.

6. Personal impressions

I hold Radoslav Chairov in high regard since his student years. He is a bright individual with a genuine passion for scientific endeavors. I am eager to witness his continued growth as a proficient specialist, and I look forward to seeing his scientific inquisitiveness flourish even further with the habilitation, which will broaden his prospects for independent contributions.

CONCLUSION

Following the incorporated revision, the documents and materials submitted by Chief Assistant Dr. Radoslav Chairov align with all the stipulations outlined in the Law on the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ZRASRB) and the Regulations for its Implementation at Southwestern University "Neofit Rilski".

In terms of volume and quality, all of Assoc. Prof. Dr. Chairov's bibliometric indicators meet the recommended criteria for attaining the academic position of "Associate Professor". The candidate's works encompass original scientific contributions and applied research, which have gained international recognition - these scholarly endeavors have been published in scientific journals issued by international academic publishers and cited by other authors. The attained scientific results hold promising prospects for practical applicability, and Dr. Chairov's individual contribution to the research is indisputable.

Having thoroughly reviewed the materials submitted for the competition, including the scientific and scientifically-applied contributions therein, I wholeheartedly provide a positive evaluation of the candidate. I strongly recommend to the members of the Scientific Jury to endorse the appointment of Chief Assistant Professor Dr. Radoslav Chairov to the academic position of "Associate Professor" in the specifically in "Chemical Sciences", within the professional domain of 4.2, and the scientific specialty of "Organic Chemistry".

08 October 2023

Reviewer:

Assoc. Prof. Dr. Zhivko Velkov