

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Йордан Светославов Ханджийски
Институт по молекулярна биология “акад. Румен Цанев” (ИМБ-БАН),
на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор”
по: област висше на образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.2. Химически науки

Автор: Александра Иванова Тенчева

Тема: “Синтез на производни на мемантина с очаквано протективно действие срещу болестта на Алцхаймер”

Научен ръководител: проф. д-р. Иванка Станкова

1. Общо представяне на материалите по процедурата

Със заповед № 1109 на ректора на Югозападен университет “Неофит Рилски” съм определен за член на научното жури във връзка със защита на дисертационен труд за придобиване на научна и образователна степен “доктор” по професионално направление 4.2. Химически науки. Темата на дисертационния труд е “Синтез на производни на мемантина с очаквано протективно действие срещу болестта на Алцхаймер” на Александра Иванова Тенчева, докторант в редовна форма на обучение с научен ръководител проф. д-р. Иванка Станкова.

Представеният от Александра Тенчева комплект материали на електронен носител е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в република България и правилника за развитие на академичния състав на Югозападен университет “Неофит Рилски” и включва всички изискващи се за процедурата документи.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Александра Иванова Тенчева получава ОКС “бакалавър” през 2016 г. и ОКС “магистър” през 2017 г. получени от Югозападен университет “Неофит Рилски”. След получаването на тези степени тя започва работа в катедра “Химия” където през 2018 г. е зачислена като редовен докторант в същата катедра под ръководството на проф. д-р. Иванка Станкова. През 2023 г. е избрана за асистент в същата катедра, където работи и до днес.

3. Характеристика на дисертационния труд

3.1. Актуалност на дисертационната тема, целесъобразност на поставените задачи

Болестта на Паркинсон (PD) и Болестта на Алцхаймер (AD) са невродегенеративни заболяванията причиняващи нелечими и инвалидизирани състояния водещи до смърт на нервните клетки, деменция, дезорганизация и загуба на равновесието. Одобрените методи за лечение на болестта на Алцхаймер включват предимно лекарства които са холинестеразни инхибитори. Едно от лекарствата, което се използват за лечение на Болестта на Алцхаймер е мемантинът. Това съединение инхибира N-метил-D-аспартатните рецепторите, участващи в процеса на предаване на информация между невроните, предпазвайки ги от свръхактивиране като запазва глутаматергичното синаптичната им функция. За съжаление обаче мемантинът има само краткотраен върху Болестта на Алцхаймер. Това е причината през последните години се разработват т. нар. „многоцелевите лиганди“ от които се очаква да бъдат лекарства срещу болестта на Алцхаймер. Такива съединения включват в една молекула фрагмент с невропротективно действие като N-метил-D-аспартат рецепторните инхибитори и молекули с инхибиторна активност, по отношение на холинестеразите. Комбинирането на мемантин и ацетилхолинестеразен инхибитор води до получаването на

многоцелевите лиганди(Multi-Target-Directed-Ligands) от които се очаква да бъдат лекарства срещу болестта на Алцхаймер. Ето защо целта на дисертационния труд е дизайн и синтез на производни на мемантина с аминокиселини, пептиди и ноотропици. По конкретно целта е насочена към изследване на тези Multi-Target-Directed-Ligands на базата на мемантина за биологични активности – срещу Болестта на Алцхаймер, срещу Болестта на Паркинсон, както и за антимикробиална, антиоксидантна и противовирусна активност.

Предвид на гореизложеното, считам че определената цел и задачите на дисертацията са ясно формулирани и научно издържани. За изпълнение на целта са формулирани пет задачи. Те са дефинирани реалистично, постижими са при използване на предлаганите методи и съответстват на поставената цел.

3.2. Познаване на проблема

Литературният обзор разглежда подробно терапевтично използвани препарати за лечение на болестта на Алцхаймер. Тези препарати са разделени на пет групи: лекарства получени чрез химични модификации на лекарствения препарат донепезил, такива получени на базата на N-метил-D-аспартатните рецепторни (NMDA) антагонисти, лекарства получени на базата на съединието Memit- 48, лекарства получени чрез хибриди на адамантанови производни с инхибитори на холинестеразата и лекарствени препарати получени чрез химични модификации на тиазолови аналози действащи като холинестеразни инхибитори. Също така са обяснени механизмите на действие и ефективността на тези препарати при лечението на болестта на Алцхаймер. Начинът на оформяне на литературния обзор и аналитичното представяне на информацията, показват че Александра Тенчева познава отлично съвременното състояние на изследвания научен проблем.

3.3 .Методи на изследването

За изпълнение на поставените задачи е подбрана комбинация от съвременни методи за синтез, както и аналитични и микробиогични методи. За анализ на новосинтезираните съединения са приложени ЯМР, електроспрей маспектрометрия и рентгеноструктурен анализ. За определяне на биологичната активност на синтезираните вещества са използвани UV-VIS спектрофотометричен метод, 1,1-дифенил- 2-пикрилхидразилов радикал (DPPH) тест, метод за определяне на невропротективния ефект чрез индуцирана Аβ-невротоксичност, метод за определяне на невропротективния ефект чрез хипоксия-индуцирана токсичност, метод за определяне на противовъзпалителни ефекти на мемантиновите производни чрез LPS-индуцирано възпаление в микроглиални клетки и др. За установяване на антимикробиална активност на изследваните вещества са използвани метод за измерване на зоната на инхибиране на растежа на Грам-положителни бактерии и Грам-отрицателни бактерии, а за инхибиране на растежа при дрожди е използван метода на дифузия на агар. Също така са използвани методи за определяне на минимална инхибиторна/бактерицидна концентрация (MIC/MBC) и Time-Kill тест за оценка на бактериостатично/бактерицидното действие. Използваните в дисертацията методи съответстват на задачите, гарантирайки тяхното изпълнение.

3.4 Оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд на Тенчева е написан на 107 страници, съдържа съдържа 25 таблици, 8 схеми и 37 фигури и 120 цитирани литературни източника. Структуриран е съгласно общоприетите изисквания за този вид трудове и съдържа разделите: Въведение (1 стр.); Литературен обзор (25 стр.); Цел и задачи (1 стр.); Експериментална част (13 стр.)

Резултати и Обсъждане (41 стр.) Изводи (1стр.) и Приноси (1 стр.) и Литература. Към дисертацията са приложени списък на научните публикации и участие в научни форуми на докторанта.

Авторефератът е написан на 56 страници и вярно отразява съдържанието на дисертацията и приносите на проведените изследвания. Целта на дисертацията е убедително аргументирана в съответствие с направения литературен обзор. За постигането на тази цел са формулирани пет задачи, които съответстват на целта. По всяка поставена задача е извършена експериментална работа, резултатите от която са представени ясно, много добре са илюстрирани и обсъдени в светлината на известното по съответните въпроси в научната литература. В края на дисертацията са изведени девет извода и са формулирани три приноса с научен и методичен характер, които вярно и точно отразяват основните резултати от проведените експериментални изследвания.

По-значими научни резултати и приноси от изследванията в дисертацията биха могли да се обобщят както следва:

Синтезирани са осем нови аналози на мемантин – с неприродните киселини H-Phe(4-F)-OH, H- -L- Ala-OH и с природните аминокиселини H-Gly- OH, H-Val-OH, H-Phe-OH, H-Ala-OH, H-Tyr-OH, 4 нови аналози на мемантин с ноотропици: кавинтон, пирацетам, модафинил и пикамилон, и 2 нови аналога на мемантин с тиазолови производни.

Направен е рентгеноструктурен анализ на β -Ala-Mem и (4-F)Phe-Mem. Получените резултати показват, че монокристали на β -Ala-Mem кристализира по центросиметричен начин, а съединението (4-F)Phe-Mem по нецентросиметричен начин.

Изследвана е *in vitro* антиоксидантната активност на серия от хибриди на мемантина с различни аминокиселини и е намерено е, че активността на съединенията е незначителна с изключение на Gly-Gly-MEM, (4-F)Phe-Mem и Phe- Mem. Определена е противовирусната активност срещу грипни вируси A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), както и срещу щамове A/Wuhan/359/1995 (H3N2) и A/Jinnan/15/2009 (H1N1) *in vitro* и е показано, че H-Val-Mem показва активност срещу чувствителния към оселтамивир щам A /FortMonmouth /1/1947.

Изследвано е действието на мемантиновия хибрид (Tyr-Mem) срещу Болестта на Паркинсон. Установено е, че този мемантинов хибрид – Tyr-Mem, подобрява паметовите функции на изследваните животни, като ефектът е съизмерим с този на мемантина, но с много по-малка токсичност. От друга страна ефекта на това съединение върху паметта на изследваните мишки е съизмерим с тези на веществата кавинтон и тирозин, при значително намалена остра токсичност. Проведени са биологични и хистологични изследвания на мемантиновия хибрид (Tyr-Mem), които показват, че той има положителен ефект само върху нарушената от скополамина краткосрочна памет, като ефектът му е съизмерим с този на съединението H-Tyr-OH.

In vitro е изследвано невропротективното действие на новосинтезираните съединения срещу Болестта на Алцхаймер и е показано, че аминокиселинните мемантинови хибриди показват невропротективни ефекти срещу индуцирани от медни йони A β токсичност, индуцирана от глутамат екситотоксичност, оксидативен стрес и хипоксия.

Изследвана е антимикробиалната активност на новосинтезираните аналози срещу – Грам-положителни бактерии: *Staphylococcus aureus* NBIMCC (6538), *Bacillus megaterium*, Грам-отрицателни бактерии: *Escherichia coli* (NBIMCC 3397), *Salmonella enterica* (NBIMCC 869) и дрожди: *Rhodotorula* sp. (BF 16-25), *Candida lusitaniae* (BF 74-4). Резултатите показват, че H-(4-F)Phe-Mem действа ефективно срещу всички изследвани щамове. Инхибиторният ефект е съизмерим с този на антибиотиците тетрациклин и нистатин.

По темата на дисертацията Александра Тенчева е представила две научни публикации в списания, индексирани в база данни на Web of Science, с квартали Q1 и Q2. Общият брой точки от показател Г е 45 (при изискващи се 30 т.), съгласно минималните национални изисквания за ОНС „доктор“. В двете публикации Александра Тенчева е първи автор, което показва водещото и участие и принос в извършените изследвания и тяхното оформяне. Докторантът е представил своите резултати с участие 3 национални и 1 международен научни форуми.

Заклучение:

Дисертационният труд на Александра Тенчева представя резултати, които допринасят за разработването на нови препарати за лечение на болестта на Паркинсон и на болестта на Алцхаймер на основата на нови аналози на мемантин. В изследването са приложени подходящи методи за синтез и охарактеризиране на биологично активните съединения. Докторантът е овладял широк спектър от експериментални методи и демонстрира способността си да представя научните си изследвания пред академичната общност, което го утвърждава като високо квалифициран млад учен. Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на правилниците за неговото приложение, в т.ч. на вътрешния правилник на Югозападен университет “Неофит Рилски”. Всичко това ми дава основание да дам положителна оценка на проведеното изследване, чиито резултати са подробно представени в дисертационния труд. Убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на образователната и научна степен „Доктор“ на Александра Иванова Тенчева в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.2. Химически науки

27.05.2025 г.

Подпис:

/Йордан Светославов Ханджийски/

Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета от 27 .04.2016 г.

OPINION

By Assoc. prof. Yordan Handzhiyski
of PhD thesis of Aleksandra Ivanova Tencheva for the award of the educational and scientific degree "Doctor" (PhD) in the field of Higher education 4. Natural Sciences, Mathematics and Informatics, professional area 4.2 Chemical Sciences (Organic Chemistry)

Author: Aleksandra Ivanova Tencheva

Title: 'Synthesis of memantine derivatives with expected protective effects against Alzheimer's disease'

Scientific supervisor: Prof. Ivanka Stankova

1. General presentation of the materials under the procedure

By order No. 1109 of the rector of the Southwestern University "Neofit Rilski" I have been appointed as a member of the scientific jury in connection with the defense of a dissertation for the acquisition of the scientific and educational degree "doctor" in professional field 4.2. Chemical Sciences. The dissertation titled "Synthesis of memantine derivatives with expected protective effect against Alzheimer's disease" by Alexandra Ivanova Tencheva, a full-time doctoral student with scientific supervisor Prof. Dr. Ivanka Stankova.

The set of materials submitted by Aleksandra Tencheva on an electronic media complies with the requirements of the Academic Staff Development Act of the Republic of Bulgaria (ASDA) and the Regulations for the Development of the Academic Staff the Southwestern University "Neofit Rilski". It includes all documents required for the procedure.

2. Brief Biographical Data for the Doctoral Candidate

Alexandra Ivanova Tencheva received her Bachelor's degree in 2016 and her Master's degree in 2017 from the Southwestern University "Neofit Rilski". After receiving these degrees, she began working in the Department of Chemistry, where in 2018 she was enrolled as a full-time doctoral student in the same department under the supervision of Prof. Dr. Ivanka Stankova. In 2023, she was elected as an assistant in the same department, where she still works today.

3. Characteristics of the dissertation work

3.1. Relevance of the Dissertation Topic and Feasibility of the Set Tasks

Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) are neurodegenerative diseases that cause incurable and debilitating conditions leading to nerve cell death, dementia, disorganization, and loss of balance. Approved treatments for Alzheimer's disease include primarily drugs called cholinesterase inhibitors. One of the drugs used to treat Alzheimer's disease is memantine. This compound inhibits N-methyl-D-aspartate receptors, which are involved in the process of transmitting information between neurons, preventing them from over-activation while preserving their glutamatergic synaptic function. Unfortunately, however, memantine has only a short-term effect on Alzheimer's disease. That is reason in recent years, so-called "multi-target ligands" have been developed, which are expected to be drugs against Alzheimer's disease. Such compounds include in one molecule a fragment with neuroprotective activity such as N-methyl-D-aspartate receptor inhibitors and molecules with inhibitory activity against cholinesterases. The combination of memantine and an acetylcholinesterase inhibitor leads to the preparation of Multi-Target-Directed-Ligands which are expected to be drugs against Alzheimer's disease. Therefore, the aim of the dissertation is the design and synthesis of memantine derivatives with amino acids, peptides and nootropics. Specifically, the aim is to study these Multi-Target-Directed-Ligands based on memantine for biological activities - against Alzheimer's Disease, against Parkinson's Disease, as well as for antimicrobial, antioxidant and antiviral activity. In view of the above, I believe that the defined goal and tasks of the dissertation are clearly formulated and scientifically sound. To

achieve the goal, five tasks have been formulated. They are realistically defined, achievable using the proposed methods and correspond to the set goal.

3.2. Knowing the problem

The literature review examines in detail therapeutically used drugs for the treatment of Alzheimer's disease. These drugs are divided into five groups: drugs obtained by chemical modifications of the drug donepezil, those obtained on the basis of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) antagonists, drugs obtained on the basis of the compound Memit-48, drugs obtained by hybrids of adamantane derivatives with cholinesterase inhibitors and drugs obtained by chemical modifications of thiazole analogues acting as cholinesterase inhibitors. The mechanisms of action and the effectiveness of these drugs in the treatment of Alzheimer's disease are also explained. The manner of forming the literature review and the analytical presentation of the information show that Alexandra Tencheva knows the current state of research scientific problem.

3.3. Research methods

To accomplish the tasks set, a combination of modern synthesis methods, as well as analytical and microbiological methods, was selected. For the analysis of the newly synthesized compounds, NMR, electrospray mass spectrometry and X-ray structural analysis were applied. To determine the biological activity of the synthesized substances, UV-VIS spectrophotometric method, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) test, method for determining the neuroprotective effect through induced A β -neurotoxicity, method for determining the neuroprotective effect through hypoxia-induced toxicity, method for determining the anti-inflammatory effects of memantine derivatives through LPS-induced inflammation in microglial cells, etc. were used. To establish the antimicrobial activity of the studied substances, a method for measuring the zone of inhibition of the growth of Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria was used, and for inhibition of growth in yeast, the agar diffusion method was used. Methods for determining the minimum inhibitory/bactericidal concentration (MIC/MBC) and the Time-Kill test were also used to assess the bacteriostatic/bactericidal effect. The methods used in the dissertation correspond to the tasks, ensuring their implementation.

3.4. Evaluation of the dissertation work

Tencheva's dissertation is written on 107 pages, contains 25 tables, 8 schemes and 37 figures and 120 cited literary sources. It is structured according to the generally accepted requirements for this type of work and contains the following sections: Introduction (1 page); Literature review (25 pages); Aim and objectives (1 page); Experimental part (13 pages) Results and Discussion (41 pages) Conclusions (1 page) and Contributions (1 page) and Literature. A list of the doctoral student's scientific publications and participation in scientific forums is attached to the dissertation. The abstract is written on 56 pages and faithfully reflects the content of the dissertation and the contributions of the conducted research. The goal of the dissertation is convincingly argued in accordance with the literature review. To achieve this goal, five tasks have been formulated that correspond to the goal. Experimental work has been carried out on each task, the results of which are clearly presented, very well illustrated and discussed in the light of what is known on the relevant issues in the scientific literature. At the end of the dissertation, nine conclusions have been drawn and three contributions of a scientific and methodological nature have been formulated, which faithfully and accurately reflect the main results of the conducted experimental research. The most significant scientific results and contributions from the research in the dissertation can be summarized as follows:

Eight new memantine analogues – with the unnatural acids H-Phe(4-F)-OH, H- -L-Ala-OH and with the natural amino acids H-Gly-OH, H-Val-OH, H-Phe-OH, H-Ala-OH, H-Tyr-OH, 4 new memantine analogues with nootropics: cavintone, piracetam, modafinil and picamilon, and 2 new memantine analogues with thiazole derivatives were synthesized.

X-ray diffraction analysis of β -Ala-Mem and (4-F)Phe-Mem was performed. The results showed that single crystals of β -Ala-Mem crystallized in a centrosymmetric manner, and the compound (4-F)Phe-Mem in a non-centrosymmetric manner.

The in vitro antioxidant activity of a series of memantine hybrids with different amino acids was investigated and the activity of the compounds was found to be insignificant with the exception of Gly-Gly-MEM, (4-F)Phe-Mem and Phe-Mem. The antiviral activity against influenza viruses A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), as well as against strains A/Wuhan/359/1995 (H3N2) and A/Jinnan/15/2009 (H1N1) in vitro was determined and H-Val-Mem was shown to exhibit activity against the oseltamivir-susceptible strain A/FortMonmouth/1/1947.

The effect of the memantine hybrid (Tyr-Mem) against Parkinson's disease has been studied. It has been found that memantine hybrid – Tyr-Mem, improves the memory functions of the tested animals, with the effect being comparable to that of memantine, but with much less toxicity. On the other hand, the effect of this compound on the memory of the studied mice is comparable to those of the substances cavintone and tyrosine, with significantly reduced acute toxicity. Biological and histological studies of the memantine hybrid (Tyr-Mem) have been conducted, showing that it has a positive effect only on scopolamine-impaired short-term memory, with its effect being comparable to that of the compound H-Tyr-OH.

The neuroprotective effect of the newly synthesized compounds against Alzheimer's disease was investigated in vitro and it was shown that amino acid memantine hybrids exhibit neuroprotective effects against copper-induced A β toxicity, glutamate-induced excitotoxicity, oxidative stress and hypoxia.

The antimicrobial activity of the newly synthesized analogues was studied against – Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* NBIMCC (6538), *Bacillus megaterium*, Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (NBIMCC 3397), *Salmonella enterica* (NBIMCC 869) and yeasts: *Rhodotorula* sp. (BF 16-25), *Candida lusitanae* (BF 74-4). The results show that H-(4-F)Phe-Mem is effective against all tested strains. The inhibitory effect is comparable to that of the antibiotics tetracycline and nystatin.

On the topic of the dissertation, Alexandra Tencheva has presented two scientific publications in journals indexed in the Web of Science database, with quartiles Q1 and Q2. The total number of points from indicator G is 45 (with 30 points required), according to the minimum national requirements for OHC "doctor". In both publications, Alexandra Tencheva is the first author, which demonstrates her leading participation and contribution to the research conducted and its presentation. The doctoral student has presented her results with participation in 3 national and 1 international scientific forums.

Conclusion:

Alexandra Tencheva's dissertation presents results that contribute to the development of new drugs for the treatment of Parkinson's disease and Alzheimer's disease based on new memantine

analogues. The research applied appropriate methods for synthesis and characterization of biologically active compounds. The doctoral student has mastered a wide range of experimental methods and demonstrated his ability to present his scientific research to the academic community, which establishes him as a highly qualified young scientist. The dissertation meets all the requirements of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the regulations for its implementation, including the internal regulations of the South-West University "Neofit Rilski". All this gives me reason to give a positive assessment of the conducted research, the results of which are presented in detail in the dissertation. I strongly recommend to the esteemed scientific jury to award the educational and scientific degree "Doctor" to Alexandra Ivanova Tencheva in the field of higher education 4. Natural Sciences, Mathematics and Informatics, professional field: 4.2. Chemical Sciences.

27.05.2025

Signed by:

Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета от 27 .04.2016 г.

/Assoc. prof. Yordan Handzhiyski/