

# РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд

на тема: **Нови производни на антимикробни агенти**

представен от докторант Бойка Миладинова Стойкова за присъждане на образователната и научна степен „**доктор**” по научната специалност 4.2. „Химически науки” (Органична химия)

от доц. д-р инж. Данчо Любенов Даналев, катедра „Биотехнология”,

Химикотехнологичен и металургичен университет - София

## **Кратки биографични данни**

Магистър Бойка Стойкова е родена на 30 август 1985 г. ОКС „бакалавър“ завършва в специалност „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“, гр. Благоевград през 2008г., а 2 години по-късно завършва и ОКС „магистър“ на същата специалност, специализация „Биологично-активни вещества и лекарствени средства“, от където логично следва и разработването на нейния дисертационен труд, което започва в началото на 2013 г. в катедра „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“, гр. Благоевград, в областта на Органичната химия с акцент върху нови лекарствени средства с антимикробна активност. По време на своето обучение като бакалавър тя е участвала в Лятно училище „Measurement Science in Chemistry“ в гр. Celje в Словения и в летен стаж организиран от Балканфарма-Дупница АД в „Лаборатории на качествен контрол“. От представеното от кандидатката за ОНС „доктор“ кратко СВ става ясно, че по време на разработване на дисертационния труд тя е участвала в три курса на обучение: „Проследимост на измервания в лаборатории за изпитване и калибриране. Прилагане на математико-статистически модели за оценка“, НАПОО при „Евробул тренинг“, ООД, гр. София, Принципи и приложение на метрологията в химията в гр. Благоевград и Лабораторни изпитвания в гр. Стара Загора по двустранен проект с Гърция. По време на докторантурата докторантката Бойка Стойкова е реализирала два обмена по програма Еразъм в Карловия Университет в гр. Прага, Чехия, където е разработила и части от дисертационния труд. Всички тези активности показват, че докторантката умее да работи добре в екип, има натрупан значителен опит в сътрудничеството с други учени в сходни научни области и инвестира в своето обучение и кариерно израстване, което е една предпоставка за добрата ѝ бъдеща реализация. Завършеност на нейното

обучение придава и добитата по време на нейното обучение допълнителна квалификация учител по „Химия и опазване на околната среда“.

### **Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите**

Представената ми за рецензия дисертация е разработена на 151 стандартни страници и включва класическите раздели: Увод – 1 стр., Цел и задачи - 1, Литературен обзор - 26, Резултати и дискусия - 51, Експериментална част - 41, Обобщение на резултатите – 2 стр., Приноси от дисертационния труд – 1 стр. и Използван алитература – 7 стр. Балансът между литературния обзор и получените и дискутирани от докторантката резултати е добре спазен за един дисертационен труд. Цитираната литература в своята цялост е след 2000 г., което е свидетелство за актуалността на разработваната тематика и факта, че тя е направена в съответствие с всички съвременни тенденции в науката в същата научна област. Получените резултати от разработването на дисертационния труд са систематизирани и подредени в голям брой таблици, схеми и фигури, което прави изключително добро впечатление. Ще си позволя да изкажа своята забележка тук, че липсата на номерация на литературните източници затруднява проследяването на техния брой. Литературата е систематизирана по азбучен ред на първият автор, изключително добре подредена, по еднороден начин, което прави добро впечатление и улеснява нейното използване.

Трудът разработва един актуален проблем за медицинската практика като е насочен към синтез на нови антимикробни препарати и изцяло отговаря на научната специалност претендирана от кандидатката за ОНС „доктор“, 4.2. „Химически науки“. Особено добро впечатление прави, че не само са синтезирани огромен брой **73** нови неописани в литературата съединения, а в процеса на тяхното получаване са получени общо **89** производни. Новосинтезираните съединения са изпитани за биологична активност. Комбинацията от синтез и биологична активност е придало цялост и завършеност на дисертационния труд. и прави приноса на докторантката към практическия аспект на ОНС „доктор“ значим.

Голям брой инфекции в човешкия организъм са резултат от действието на бактериите от заобикалящата ни среда. Дори онези от тях, които в определени граници имат положителен ефект, напр. *E. coli* в стомашно-чревния тракт, притежава патогенни щамове, предизвикващи анемия, бъбречна недостатъчност, проблеми с уринарния тракт. Едни от най-тежките заболявания, протичащи със сериозна симптоматика, са предизвикани от действието на бактерии като например туберкулоза (*Mycobacterium*

*tuberculosis*), сифилис (*Treponema pallidum*), проказа (*Mycobacterium leprae*) и др. Естествената защита на организма от действието на бактериите се осъществява благодарение на имунната система. В редица случаи обаче, когато тя е компрометирана е необходимо организмът да бъде подпомогнат в борбата си с бактериалните инфекции чрез внесени отвън лекарствени препарати. Всичко това е наложило динамично търсене на нови антибактериални средства за нуждите на фармацевтичния пазар и медицината. В този контекст неоспорим е факта, че тематиката на настоящият проекто-дисертационен труд е изключително атрактивна и важна от практическа гледна точка.

Една от широко използваните в научните среди стратегии за създаване на нови лекарствени средства е синтеза на хибридни молекули, с цел получаване на нови съединения с двоен ефект. Такъв е и случаят на синтезираните в настоящия дисертационен труд нови съединения, производни на познати на пазара противовирусни средства (амантадин, римантадин и оселтамивир) с хетероцикленни съединения, аминокиселини и др.

Дисертационния труд нелогично за мен започва с раздела **ЦЕЛ и ЗАДАЧИ**, който по мое мнение би трябвало да следва **Литературния обзор** и логично да бъде изведен от него. Целта и отделните задачи на дисертантката обаче са поставени точно, ясно и кратко, което позволява да се проследи тяхното реализиране по време на разработването на дисертацията

В раздела **Литературен обзор**, в контекста на разработваната проблематика, са разгледани строежа на грипните вируси и противогрипната химиотерапия, причината за появата на резистентност и създаването на нови производни на съществуващи в практиката химиотерапевтици с цел преодоляването ѝ. Разделът обхваща само съвременна литература, което свидетелства за актуалността на направеното проучване и е написан на добър научен език. Последователно той разглежда използваните в медицинската практика препарати за лечение на HSV-1 и 2 (Херпес симплекс вируси 1 и 2) (ацикловир, ганцикловир и пенцикловир) и противогрипните препарати инхибитори на невроамидазата (занамивир, ланинамивир, оселтамивир и перамивир) и на M2 йонния канал (аминоадаманти). Внимание е обърнато и на модерните противохерпесни и противовирусни предлекарствени средства. Разгледана е структурата на грипния вирус и механизма на действие на отделните лекарствени препарати от фармацевтичния пазар. Към представянето на раздела имам няколко технически забележки:

1. Всички представени схеми и картинки в литературният обзор са отпечатани в черно бял вариант, което не придава добър вид на дисертационния труд, а и затруднява разчитането на част от илюстрационния материал. Докторантката е могла да отпечата някои страници цветно с цел да се запази стойността на положения от нея труд. Видно е, че в частта резултати и дискусия, където тя представя собствените си резултати това е направено и спомага за много коректна визуализация и възприемане на получените резултати

2. Фигурите са представени с техния английски текст, а е могло да бъдат преведени, с което докторантката да покаже своята компетентност в терминологично отношение в разработваната от нея тематика.

3. Използвани са и доста чуждици, които имат своя аналог на български език като превенция/**профилактика**; домейн/**участък** и др.

В контекста на цялостният литературен обзор, в който са разгледани наистина голям брой от производни на противовирусни препарати, съдържащи различни модификации не става ясно дали някой от тези аналози е намерил приложение в медицинската практика и бих искал докторантката да дискутира този въпрос.

Добро впечатление прави, че са обхванати всички възможни модификации на съществуващи в практиката лекарствени препарати с цел получаване на предлекарства или нови активни субстанции в това число модификации с аминокиселини, с хетероциклени молекули, с тиолсъдържащи остатъци, с азоли, тиазоли и дитиазоли, с коджикова киселина, свързване посредством линкери, модификация с хидроксиканелени киселини и стероиди.

Разделът **Резултати и дискусия** е разделен на няколко части в съответствие с поставените от докторантката задачи в началото на дисертационния труд. Той включва:

1. Синтез на производни на противогрипните агенти амантадин, римантадин и оселтамивир с аминокиселини

В този раздел докторантката отделя специално внимание на химичните трансформации на противогрипни агенти с аминокиселини чрез създаване на amidна връзка чрез кондензация с активиране по EDC/HOBt-метода. Получени са производни на противогрипните агенти амантадин, римантадин и оселтамивир с аминокиселините Tyr, Cys, Nur, Asp и Glu. Докторантката е мотивирала тези свои синтези с данни от сходни изследвания публикувани в литературата, като е дискутирала и получените свои резултати по отношение на добив и чистота в светлината на наличните данни. Получените съединения са подложени на биологични тестове за определяне на тяхната

антирадикалова активност и антитирозилазна активност и противогрипна активност. По отношение на първата активност докторантката стига да заключи, че подбраният брой съединения е недостатъчен за да се изведе обща зависимост структура-активност. По отношение на антитирозилазната активност и тяхното приложение при меланом на кожата докторантката също не достига до съществен ефект в сравнение с известни вече в практиката химиотерапевтици. Съединенията не показват активност и спрямо грипния щам А (H3N2).

## 2. Модифициране на противогрипните агенти амантадин, римантадин и оселтамивир със съединения, съдържащи хетероциклен пръстен

Планираните химични трансформации са извършени отново по EDC/HOBt метода. На получените нови аналози отново е определена антирадикалова активност, антитирозилазна активност и противовирусна активност. Получените съединения отново или не показват активност или показват съизмерима активност с тази на контролните препарати. Тази група съединения допълнително е била подложена на тестове за антибактериална и противогъбична активност. Установено е, че от синтезираните съединения, производните на коджаковата киселина се открояват с най-висока антибактериална активност спрямо моделни щамове Г- микроорганизми. Две от съединенията са показали и добра противогъбична активност.

## 3. Получаване на антимикуобиални агенти чрез свързване на две молекули посредством диаминен или дикарбоксилен линкери

Направени са синтези с римантадин и 1-адамтан карбоксилна киселина и N-Вос-1-оселтамивир-1-карбоксилова киселина, като са използвани адипинова киселина като дикарбоксилен линкер и 1,6-диаминохексан като диаминен. За получените съединения е определена антитирозилазна активност с използване на Допахром-тест, като получените нови съединения показват по-висока активност от използваните контроли коджакова киселина и хидрохинон. В допълнение те са подложени на тестове за антибактериална и противогъбична активност спрямо моделни щамове микроорганизми и е установено че бисадамнтоиламидът потиска микробиалния растеж едновременно и на Г- и на Г+ микроорганизми. Едно от получените съединения се откроява с добра противогъбична активност.

## 4. Получаване на халогенирани производни на антимикуобиални агенти

Като първа група са получени производни с монофлуорирани аминокиселини F-Phe, F-Trp и F-Tyг оселтамивир, римантадин и заместени канелени киселини. На новосинтезираните съединения е определен антирадикаловия потенциал, като те са

показали много висока активност. Определена е и анти tiroзиназната активност, като такава не е установена за тестваните съединения и накрая е изследвана противовирусната активност спрямо грипен вирус А (H3N2). Не е наблюдавано инхибиране на вирусната репликация от тестваните съединения.

Получени са и втора група бромирани производни на аналози на аминокиселини, съдържащи канелена киселина. Експериментирани и приложени са няколко възможности за реакцията на бромиране. Новосинтезираните аналози показват разнообразна антибактериална активност, която е дискутирана и умело синтезирана и представена в табличен вид.

#### 5. Свързване на стероиди и противогрипни агенти

Последната част от работата по дисертационния труд е свързана с получаването на противогрипни агенти комбинирани със стероиди. Извършена е директна кондензация с подходящи изходни субстрати, свързване посредством дикарбоксилен линкер и получаване на стероидни аминопроизводни. За тази група съединения е определена противовирусна активност спрямо репликация на три щама грипен вирус. Едно от съединенията показва добър и широк противовирусен ефект.

Всички получени резултати са систематизирани изключително прегледно в таблици и фигури, което спомага за лесното им интерпретиране. Впечатление прави добрият аналитичен подход на докторантката при интерпретирането на получените резултати и сравняването с данни от литературата. Резултатите са представени стегнато, без излишни подробности, което спомага за лесното им проследяване.

Всички новосинтезирани съединения са коректно доказани чрез съвременни техники, включващи едно и двумерен ЯМР, маспектрометрия, ИЧ и УВ анализ и са коректно интерпретирани, като са дискутирани различни особености. Правилното интерпретиране на получените данни показва усвояването на най-модерните техники за анализ на органични молекули от страна на докторантката, което несъмнено доказва изпълнението на образователната част от разработването на дисертационния труд. Намирам за изключителен принос, че като част от дисертационния труд, получените съединенията са изпитани за разнообразна биологична активност. Това е помогнало на докторантката да придобие и някои допълнителни знания и е придало на дисертационния труд цялостен и завършен вид.

#### **Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд**

Автореферата напълно покрива дисертационния труд, като включва Увода, Целта и поставените задачи, раздела Резултати и дискусия, Обобщение на получените резултати, приносите от дисертационния труд и научната активност под формата на публикации, цитати, участия в научни форуми и проекти на докторантката.

Бих обърнал внимание на докторантката че представянето на значението трибуквените съкращения на аминокиселините в дисертационния труд и в автореферата не е необходимо, тъй като те са приети от IUPAC, а не са изкуствено заложиени.

### **Приноси от разработения дисертационен труд**

Приносите на дисертационния труд бих обобщил накратко както следва:

1. Получени забележителен брой (**73**) нови неописани в литературата съединения чрез конвенционален синтез в разтвор;
2. Разработени са два „зелени“ метода за бромиране на амиди чрез активиране с ултразвук
3. Изследвана е биологичната активност на новосинтезираните аналози срещу целеви вируси, микроорганизми и гъби като част от съединенията показват добра биологична активност.
4. Изследвана е радикалулавящата активност на голяма част от съединенията, като са изведени някои зависимости структура-активност.
5. Изследвана е и тирозиназната инхибираща активност на новосинтезираните съединения и са изведени някои зависимости

### **Мнение за публикационната активност на докторантката**

Част от получените по време на разработване на дисертационния труд резултати са систематизирани и публикувани в 8 научни труда, представени към дисертационния труд и автореферата. От тях 4 в списания с и.ф. и SJR, което бих искал да кажа, че освен че покрива дори повече от необходимото изискванията на ЗРАС на РБългария и правилниците към него е забележително за един дисертационен труд в областта на синтеза и биологичната активност на органични съединения. С тази си публикационна активност докторантката напълно е изпълнила и второто от изискванията на ЗРАС на РБългария за научния характер на дисертационния труд. Резултатите са докладвани на 17 национални и международни научни форуми, което несъмнено показва, че докторантката е придобил умението да синтезира, обобщава и излага получените от нея

резултати на добро научно ниво. Бих искал да отбележа, че са забележани шест цитата на работи от дисертационния труд. Техният брой е забележителен за една докторска дисертация, което показва, че докторантката е вече добре разпознаваема за международната научна общност и ѝ създава един добър за всеки млад учен h-фактор, оценка на нейните качества като учен. Докторантката е участвала в разработването на 6 научни тематки под формата на проекти, свързани с работата ѝ по дисертационния труд, което несъмнено е оформило в нея един добър бекграунд, доказан с нейната реализация.

### **Лични впечатления от докторантката и заключение**

Познавам магистър Бойка Стойкова от съвместната ни работа с колеги от катедра „Химия“ на ЮЗУ „Неофит Рилски“, гр. Благоевград, с нейния научен ръководител гл. ас. д-р Мая Чочкова и участията ни заедно в голям брой научни мероприятия. Личните ми впечатления са, че тя е един много организиран и подреден млад учен, който с готовност поема различни предизвикателства и с лекота успява да се справи с тях. Тя успява да представи своите разработки на един много достъпен и в същото време на достатъчно високо научно ниво начин. Освен, че е член на Европейското Пептидно Дружество, докторанта е активен член и на Българското Пептидно Дружество и взема винаги участия в мероприятията организирани от него. Направените забележки и отправените въпроси за изясняване, същността на работата и постигнатите от докторантката резултати, в никаква степен не намаляват общото впечатление за много голямата по обем, прецизно и добросъвестна извършена и интерпретирана експериментална работа, което е доказателство за отлични теоретични познания и практически умения на дисертанката по научната специалност към която е претенцията за докторката степен, както и в близки и свързани научни области. Дисертационния труд без съмнение по мое мнение съдържа голям брой научни и научно-приложни резултати, които намирам за оригинални.

Като отчитам факта, че „доктор“ е образователна и научна степен, докторантката Бойка Миладинова Стойкова напълно е изпълнила целите на обучението в тази ОНС, като е усвоила най-съвременните техники за синтез, пречистване и анализ на органични молекули. Дисертационният труд е изработен под ръководство на гл. ас. д-р Мая Чочкова и насоките на проф. дхн Ценка Милкова, които са утвърден учен в областта на органичната химия, което несъмнено е доказателство че докторантката е получил от тях широки познания в тази област. Всички тези факти са довели до оформянето на



дисертация с високо фундаментално и научно-приложно ниво, което вече е довело до успешното реализиране на докторантката.

Във връзка с всичко изложено до тук убедено ще подкрепя присъждането на образователната и научна степен „доктор” по Научната специалност 4.2. Химически науки (Органична химия) на магистър Бойка Миладинова Стойкова.

12.08.2017 г.

София

С Уважение:

/доц. д-р инж. Данчо Даналев/