

РЕЦЕНЗИЯ

от акад. проф. Иван Георгиев Иванов

на дисертационния труд на Радослав Людмилов Чайров *“Синтез и анализ чрез HPLC на аналози на противовирусни препарати”*, представен за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** в област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, професионално направление 4.2. „Химически науки”, научна специалност **„Органична химия”**

1. Обща част

Дисертационният труд на Радослав Людмилов Чайров, докторант при Катедра „Химия“ на Природо-математическия факултет към Югозападния университет - Благоевград на тема: *„Синтез и анализ чрез HPLC на аналози на противовирусни препарати”*, представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.2. „Химически науки”, докторска специалност „Органична химия” е изработен под научното ръководство на доц. д-р Иванка Станкова и доц. д-р Данчо Даналев. Той обхваща 141 страници и съдържа, 35 фигури, 7 таблици и 25 схеми на химични реакции. Библиографията включва 199 литературни източници.

2. Кратки биографични данни

Радослав Чайров е роден на 07.05.1985 г. Той е възпитаник на ЮЗУ „Неофит Рилски“, където през 2009 г. завършва Природо-математическия факултет с ОКС „Бакалавър“ - специалност „Химия“, а през 2011 г. и ОКС „Магистър“ със специалност „Биологичноактивни вещества и лекарствени средства“. От 2014 г. е докторант при Катедра „Химия“. След завършване на висшето си образование, до зачисляване в докторантура, Р. Чайров е работил като учител по химия, радиоводещ и химик-аналитик в Балканфарма - Дупница АД (Ак-тавис). Р. Чайров е публикувал досега 7 научни статии и 6 резюмета от научни доклади. Участвал е в разработването на 4 научно-изследователски проекти.

3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на Радослав Чайров е посветен на разработването на нови противогрипни лекарствени средства – производни на амантадина и римантидина. Грипът е едно от най-често срещаните и бързо разпространяващи се инфекционни заболявания, което само в САЩ ежегодно причинява смъртта на 36 000 души, хоспитализацията на повече от 200 000 души и боледуването в по-лека форма на милиони други. Три пъти през последното столетие, грипните вируси са причинили опустошителни пандемии, най-страшната от които е *„Испанският грип”* през 1918-1919 г., засегнал повече от 25% от популацията на света и убил над 40 милиона души. По-късно две други пандемии, *„Азиатският грип”* от 1957 г. и *„Хонг Конгският грип”* от 1968 г., също убиват милиони хора по света. В по-ново време (1997, 2003, 2007, 2011 г.) сме свидетели на нови пандемии, които благодарение на новите противогрипни средства и съвременните схеми за лечение, не бяха така смъртоносни.

Характерно за грипните вируси и в частност на пандемичвия вирус тип А е високата им преживяемост дължаща се на бързата адаптация към нови гостоприемници. В основата на тази адаптивност стои бързата изменчивост на вируса, която се дължи на голямата му генетична нестабилност и мутабилност. Високата честота на мутиране на някои гени (главно гените на повърхностните антигени хемаглютенин, невраминидаза и йонния канал M2) не позволява създаването на траен имунитет и води до лекарствена резистентност към наличните противогрипни лекарства.

Във връзка с последното фармацевтичните компании и изследователските институции работят усилено върху създаването на нови лекарствени средства проявяващи актив-

ност и върху мутиралите вируси. От тази гледна точка актуалността на разработваната тема не подлежи на съмнение.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор обхваща около 40 страници от дисертацията. Той е написан на точен и приятен за четене научен език. Обзорът представлява интерес и е полезен за всеки, който се интересува от проблемите на грипа и противогрипната терапия. Материалът е представен в пет подраздела, от които първият е посветен на структурата и репликацията на грипния вирус, а вторият и третият на лекарствените средства прилагани за лечение на грипни инфекции причинени от вирусния тип А. Тъй като наличните лекарствени средства са два вида - *блокери на йонния канал M2* (необходим за репликацията на вирусите в инфектираните клетки) и *инхибитори на невраминидазата* (осигуряваща проникване на грипните вируси в междуклетъчното пространство и таргетните клетки). Към първата група спадат, аминокислотните производни на адамантана - амантадин, римантадин и техни производни, а към втората – занамивир, ланинамивир, оселтамивир (Tamiflu®) и перамивир. Особено внимание е отделено на антивирусните предлекарства, които добиват биологична активност след биотрансформация в организма, както и на тяхното предимство пред готовите биологично активни съединения. Описан е механизма на действие и връзката структура-биологична активност на противогрипните средства, като е отбелязана бързата загуба на биологична активност на адамантановите производни (амантадин и римантадин) вследствие на мутации в гена на M2 протеина. По тази причина те са избягвани при лечението на грипни инфекции причинени от съвременни (мутирали) вируси, но пък са предизвикателство пред фармацевтите и химиците-синтетици за създаване по техен модел на нови лекарствени средства проявяващи активност и спрямо вирусните мутанти.

Докторантът разглежда амантадина и в друга плоскост - като лекарствено средство за лечение на болестта на Паркинсон (БП). Този ефект е открит случайно при лечение на грип у пациенти страдащи от паркинсонизъм, което впоследствие е потвърдено многократно. Тази интересна находка разкрива възможност пред докторанта да разшири приложението на своите съединенията и в посока на БП.

Литературният обзор завършва с подраздел, който не е пряко свързан със синтетичните противогрипни лекарствени препарати, но е полезен за тези, които се интересуват от терапията на грипа. Той е посветен на ролята на свободните радикали при грипни инфекции и невродегенеративните състояния.

След задълбочения анализ на литературните данни, докторантът достига до извода, че приложението на противогрипните средства трябва да бъде съпроводено от проследяване на грипните вируси за поява на първична или популационна лекарствена резистентност, с цел да бъде взето правилно решение при избора на подходящи средства за лечение. Така в резултат на задълбочен и критичен анализ на съществуващата литература Р. Чайров успява да намери своята изследователска ниша и да формулира точно и ясно целите и задачите на своята дисертация.

5. Целесъобразност на Целите и задачите

Целта на дисертацията е да се синтезират нови производни на амантадин и римантадин с алфа-аминокиселини, и да се изследва биологичната им активност, с оглед установяване на закономерности по отношение на връзката структура-биологична активност. За постигането на тази цел са формулирани шест задачи, три от които се отнасят до химичния синтез на новите съединения, а останалите са свързани с изучаването на тяхната химична стабилност и биологично действие.

Намирам целта и задачите на дисертацията като целесъобразни и адекватни на профила на докторантурата.

6. Методика на изследването

Методичният раздел, озаглавен „Експериментална част“ обхваща 26 страници. Той е поместен в края на дисертацията, което не е типично за българските дисертационни трудове, но пък е практика за много научни списания в областта на химията и фармацията. В големи детайли са описани синтезите на всички новополучени съединения, тяхното хроматографско пречистване и физикохимично/структурно охарактеризиране с NMR и ESI-MS. Съединенията са изследвани и за химична стабилност (устойчивост към хидролиза при pH 1.0 и 7.4) чрез анализ на хидролизните продукти с HPLC. Те са изследвани и за биологична (токсичност и антивирусна) активност при *in vitro* и *in vivo* условия. В първия случай изследванията са провеждани върху клетъчни култури (MDCK клетки), а във втория – върху експериментални животни (мишки и плъхове). Провеждани са и токсико-биохимични изследвания за влиянието на синтезираните вещества върху метаболизма на моделни субстрати на чернодробната P-450 монооксигеназа, а именно, повлияването на продължителността на хексобарбиталовата наркоза, както и влияние върху поведенческите реакции (невромускулна координация, ориентировъчното поведение, памет и обучение) на третираните животни. Трябва да отбележим, че експерименталните данни са обработени с подходящи статистически методи и адекватен софтуер. Подробното описание на препаративните и аналитични методи позволява експериментите да бъдат възпроизведени без необходимост от допълнителна методична литература, а дисертационния труд да послужи като методично пособие при обучението на други студенти и докторанти специализиращи в областта на фармацевтичната органична химия. Методичният раздел представя докторанта като подготвен и ерудиран изследовател, което е и една от основните цели на докторантурата.

7. Оценка на получените резултати

Резултатите от проведените изследвания са представени и дискутирани на около 40 страници в раздел „Резултати и Обсъждане“. Разделът е съставен от две части, отнасящи се до получаването/синтеза на противовирусните вещества и изследването на техните биологични свойства. Както беше вече отбелязано, докторантът избира да синтезира аминокиселинни производни на двата класически M2 блокера – амантадина и римантадина, с цел да послужат като предлекарства и за мутирала грипни вируси. С изключение на една от аминокиселините (4-флуор-фенилаланин), всички останали аминокиселини използвани за конюгация амантадина и римантадина са природни. Идеята е конюгатите да бъдат биосъвместими, т.е. да бъдат разпознаваеми от животинските/човешките ензимни системи и техните хидролизни продукти да не са токсични.

Използвайки рутинни методи за амидиране, Р. Чайров синтезира четири нови амидни производни на амантадина с алфа-аминокиселините тирозин, фенилаланин, валин и аланин и едно с неприродната аминокиселина 4-флуофенилаланин. Той синтезира и девет нови аналози на римантадина чрез амидирането му с фенилаланин, валин, левцин, изолевцин, глицин, α -аланин, β -аланин, 4-D-флуофенилаланин и 4-L-флуофенилаланин. С цел да повиши ефективността на свързване на M2 блокерите с M2 протеина, той провежда допълнителна модификация на аминокгрупата на амидните производни чрез въвеждане на гуанидинова група. Гуанидинирани са амантадиновите производни с Tug, Val и Ala, както и римантадиновите производни с Tug, α -Ala и β -Ala. Гуанидирането е проведено с използване на 1H-пиразол-1-карбоксамидин и N,N'-ди-Вос-1H-пиразол-1-карбоксамидин.

Новополучените съединения са пречистени до хомогенност с прекристализация и хроматографски техники, а тяхната структура е доказана със спектроскопски методи, включително ЯМР и мас-спектроскопия.

Важен дял в изследванията на докторанта са свързани с изучаването на химичната стабилност и биологичните свойства на новополучените съединения. Като критерии за химична стабилност е възприета устойчивостта към хидролиза във водни разтвори при pH

1.0 (имитиращи стомашен сок) и pH 7.4 (физиологичното pH за повечето клетки и тъкани) на 37 °C в продължение на 5 часа. Чрез количествено определяне на хидролизните продукти с HPLC, докторантът намира, че всички изследвани съединения са устойчиви и при двете стойности на pH, като стабилността им при pH 7.4 е около 2 пъти по-висока.

Антивирусната активност на синтезираните от Р. Чайров съединения е изследвана *in vitro* (в клетъчни култури) спрямо два щама на грипния вирус A/H3N2 - Hong Kong/68 и Aichi. Аналозите на амантадин с аминокиселините Phe и L-Phe(4-F)-OH проявяват най-висока активност, но тя е по-ниска от тази на изходния амантадин в същия концентрационен порядък. При производните на римантадина най-висока активност показва производното с аминокиселината Gly, съчетана с ниска цитотоксичност. Неговата активност е около 3 пъти по-висока от тази на амантадина.

С три съединения (тирозинил-амантадин, фенилаланил-(4-F)-амантадин и фенилаланил-амантадин) са проведени *in vivo* изследвания върху плъхове и мишки с цел да се провери активността им при животински модели на болестта на Паркинсон. За целта е изследвана токсичността им при интраперитонеално въвеждане, където е показано, че при дози под 150 mg/kg телесно тегло те не причиняват интоксикация. Намерено е също, че тирозинил-амантадинът проявява позитивен ефект при ригидност на мускулатурата и подпомага паметта и обучението както при мишки така и при плъхове, а фенилаланил-(4-F)-амантадинът и тирозинил-амантадинът удължават хексобарбиталния сън на експерименталните животни.

Обобщавайки резултатите си, докторантът стига до извода, че въвеждането на различни аминокиселинни остатъци в молекулата на амантадина и римантадина не оказва съществено влияние върху тяхната противовирусната активност, единствено Gly-римантадина проявява висока активност (3 пъти по-висока от тази на амантадина), съчетана с ниска цитотоксичност. Той забелязва и друга зависимост - че съединенията с по-висока противовирусна активност имат по-висок антипаркинсонов ефект и по-висока стабилност в кисела среда.

Тук трябва да отбележим, че експериментите свързани с прилагане на химическа методология (синтез, пречистване и анализ на новите съединения) са провеждани лично от докторанта, а биологичните изследвания са провеждани със съдействието на биолози, вирусолози, фармаколози и невролози от други изследователски институции. Резултатите обаче са осмисляни и интерпретирани от докторанта и са неразделна част от неговата дисертация. По този начин дисертацията на Р. Чайров е добър пример на завършен интердисциплинарен научен труд и той има стойност само в неговата цялост.

Резултатите от проведените изследвания са богато илюстрирани с фигури, таблици и схеми и са дискутирани задълбочено в светлината на литературните данни съвременните научни теории.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Изследванията свързани с дисертационния труд на Р. Чайров имат подчертан научно-приложен характер. Синтезирани са 20 нови адамантанови съединения, които обогатяват световната база данни с 20 нови химични структури, а изследването на техните биологични свойства (токсичност, противовирусна активност и анти-паркинсонов ефект) допринася за изясняването на връзката структура-биологична активност при този важен клас противогрипни и антипаркинсонови фармацевтични средства.

8. Публикации

Резултатите от изследванията в дисертацията на Р. Чайров са отразени в 3 научни статии където той е водещ автор, от които 2 са в реферирани национални списания (едното, Bulgarian Chemical Communication е с ИФ) и една е доклад отпечатан в пълен текст в

сборник от материали на европейски симпозиум. Резултатите са представени и на 6 научни форуми, от които 3 са международни. В 4 от докладите докторантът е водещ автор.

Извън посочените трудове, Р. Чайов е автор на още 4 научни статии, които не са свързани с неговата дисертация.

До сега статиите на докторанта са цитирани три пъти.

9. Автореферат

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Дисертационният труд е написан с вещина на точен и ясен научен език и към него нямам критични бележки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Радослав Людмилов Чайров е пример за комплексно научно изследване в областта на химията на физиологично-активните вещества с подчертан научно-приложен характер. При неговата реализация са използвани знания и умения от различни области на науката, като химия, фармация, биохимия, вирусология и др. Приложена е модерна методология и експериментална техника, с помощта на която са получени значими научни резултати, отразени в 3 научни статии (от които 1 в списание с ИФ) и 6 научни доклади. Със своите научни постижения и умения докторантът се представя като задълбочен изследовател, който удовлетворява напълно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и вътрешните правилници на ЮЗУ-Благоевград за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”. Това ми дава основание убедено да препоръчам на Научното жури определено да проведе защитата на дисертационния труд на Р. Чайров и *да му я присъди*.

12.10.2017 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/