

## РЕЦЕНЗИЯ

дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „Доктор“,  
на тема *„Получаване и охарактеризиране на бексаротенови производни с потенциална  
биологична активност“*  
с автор *Надя Василева Агова*

**Област на висше образование:** *7. Здравеопазване и спорт*

**Професионално направление:** *7.3. Фармация*

**Докторска програма:** *Фармацевтична химия*

**Форма на докторантурата:** *Докторант на самостоятелна подготовка*

**Научни ръководители:**

*Доц. Светлана Георгиева, дф*

*Проф. Александър Златков, дф*

**Катедра:** *„Фармацевтична химия“ при Факултет по фармация на Медицински университет  
– Варна „Проф. д-р Параскев Стоянов“*

**Рецензент:** *доц. Величка Йорданова Андонова, дф*

Научна специалност: *Технология на лекарствените форми и биофармация*

Институция: *Факултет по фармация, Медицински университет – Варна „Проф. д-р Параскев  
Стоянов“*

Вътрешен член на Научно жури, назначен със заповед № Р-109-295/25.09.2019 г. на Ректора  
на Медицински университет – Варна „Проф. д-р Параскев Стоянов“

Адрес за контакт:

Пощенски адрес: *гр. Варна 9000, бул. Цар Освободител 84, Факултет по фармация, Катедра по  
фармацевтични технологии, УС по технология на лекарствените форми и биофармация, каб.  
306 (МК, ет. 3)*

Електронен адрес: *[Velichka.Andonova@mu-varna.bg](mailto:Velichka.Andonova@mu-varna.bg); [andonova\\_v@abv.bg](mailto:andonova_v@abv.bg)*

Тел.: *+359 52 677 050; + 359 888 603 272*

***Общо представяне на процедурата***

Представеният комплект материали от докторантката Надя Агова са в съответствие с Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет-Варна (МУ-Варна).

Тя е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка в катедра „Фармацевтични науки и фармацевтичен мениджмънт“ на Факултет по фармация към МУ-Варна с научни ръководители доц. Светлана Георгиева, дф и проф. Александър Златков, дф (Заповед № Р-109-385/06.12.2016 ). По време на своята подготовка тя е следвала стриктно процедурата по отношение на изискванията, предявени към докторантите на самостоятелна подготовка, което е видно от представените документи. Отчислена е с право на защита със Заповед № Р-109-295/25.09.2019 г.

***Кратки биографични данни за докторанта***

Надя Василева Агова е родена през 1991 г. През 2015 г. се дипломира във Фармацевтичен факултет на МУ-Варна като магистър-фармацевт. От месец март 2016 г. до сега работи в МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна като асистент по фармацевтична химия. Нейните научно-изследователски интереси са в същата област. Тя е административен асистент в Катедрата по фармацевтична химия, а от октомври 2016 г. допълнително развива своите професионални умения и в аптека „Медунифарм“ гр. Варна.

Надя Агова придобива специалност „Анализ на лекарствени продукти“ през юни 2019 г. Има добро владение на английски език. Редовен член е на Български фармацевтичен съюз (БФС).

Познавам лично докторантката от началото на септември 2018 г. Тя е организиран и отговорен човек, който се отличава с изключителна позитивност, много добро отношение към колегите и умения за работа в екип.

***Структура и раздели на дисертационния труд***

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е написан на 157 страници, онагледен е с 27 таблици и 70 фигури. Научният труд е оформен много добре и включва следните раздели: въведение (2 стр.), литературен обзор (50 стр.), цел и задачи (1 стр.), експериментална част (материали и методи, 13 стр.), резултати и обсъждане (60 стр.), изводи, приноси, използвана литература (132 литературни източника), списък на публикации и участия по

дисертационния труд, финансиране и списък с други публикации и участия на докторантката. Структурата на дисертацията е в съгласие с Процедурата за придобиване на ОНС „доктор“ в МУ – Варна и Правилника на МУ.

#### ***Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи***

Ретиноидите участват в редица процеси в човешкия организъм. Те имат ключова роля в зрителния процес, регулацията на клетъчната пролиферация и диференциация, имунни процеси, ембрионалното развитие, активиране на гените на туморна супресия. Това обуславя приложението им в утвърдени терапевтични схеми при лечение на редица заболявания. Бексоротен е трета генерация ретиноид, селективен агонист на RXR рецепторите, одобрен от FDA и EMA за лечение на кожна Т-клетъчна лимфома (CTCL). Освен това, той е използван “off-label” за лечение на едроклетъчен карцином на белия дроб и рак на гърдата. В тази връзка, интересът към бексаротенови производни с потенциално антинеопластично приложение прави работата на маг. фарм. Надя Агова **изключително актуална**. Разработването на методология за синтез на бексаротенови производни и тяхното последващо охарактеризиране **категорично подчертава нейната значимост** в научен и приложен аспект. Целта на дисертацията и произтичащите от нея задачи за решаване са много точно и конкретно дефинирани.

#### ***Познаване на проблема***

Литературният обзор е поместен на 50 страници и е базиран на богат литературен материал – **132 източника** от последните 10 години, а така също и от един по-дълъг период от време.

Обзорът показва задълбочено познаване на ретиноидите по отношение на структура, класификация, синтез, механизъм на действие, физиологично значение и фармакотерапевтично приложение. Същият задълбочен изследователски подход е приложен и за бексаротен като трето поколение ретиноид. Специално място е отделено и на хидразоните като клас съединения с висок потенциал в антинеопластичната терапия. Изводите от направената литературна справка са последователни и аргументирани. Представени са всички значими проблеми, свързани с темата на работата. Демонстрирани са изчерпателност, ясен и разбираем стил на писане, аналитичност и логическа връзка между разделите на литературния обзор.

### *Цел и задачи на изследванията*

На базата на направения литературен обзор, докторантката обосновава посочва научния проблем, **синтезиран в целта на настоящата дисертация**, а именно да бъдат получени, структурно охарактеризирани и изследвани група нови, не описани в литературата бексаротенови производни, както и в задачите, които трябва да се решат във връзка с поставената цел.

Дефинирани са **5 основни задачи** по отношение на: разработване на подходяща методика за синтез на нови хидразид-хидразонови производни на антинеопластичния препарат бексаротен; структурно охарактеризиране получените производни посредством съвременни инструментални методи за анализ (IR, NMR, MS); разработване на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните производни; теоретична оценка на токсичността на бексаротен, неговите метаболити и новосинтезираните производни; оценка на антиоксидантния потенциал на целевите структури с помощта на доказани методи (DPPH, ABTS, електрохимичен метод). Поставените задачи са правилно формулирани, а тяхното обстойно изследване, анализиране и решаване води към реализиране на поставената цел.

### *Методика на изследването*

Избраните методики дават възможност за задълбочено, аналитично и логично решение на поставените задачи във връзка с посочената цел на дисертационния труд. Използваните вещества и реагенти са с необходимата чистота и качество, а за охарактеризиране и изследване на новите бексаротенови производни са приложени разработени от докторантката валидирани съвременни методи за анализ: TLC, UV-Vis, ATR-FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, MS. Иновативният подход в работата на докторантката е показан и в приложения QSAR-метод за оценка на потенциалната токсичност на новосинтезираните бексаротенови производни. В раздел „Експериментална част“ и по-конкретно в методите, описващи синтеза на метилов естер на бексаротен, хидразид на бексаротен и съответните 5 хидразонови производни на бексаротен (V1-V5) са посочени резултатите от съответния синтез – описания на веществото, молекулна маса и добив. Добивът е много важна характеристика на всеки един синтез и определя неговата икономическа ефективност, освен това е резултат, който би трябвало да бъде посочен в раздел „Резултати и обсъждане“ към т. 1 на поставените задачи.

*Анализ на резултатите*

Проведените собствени изследвания са представени на 60 страници и включват 22 таблици и 42 фигури. Таблиците и фигурите са ясни и прегледни. Резултатите са представени в 7 точки като от първа до трета кореспондират със задача 1, четвърта точка – със задача 2, пета точка – със задача 3, шеста точка – със задача 4 и седма точка – със задача 5. Изследванията следват логично поставените задачи, а именно:

1. Проведен синтез на бексаротенови хидразони, който е осъществен в няколко етапа (точки 1-3 от раздела):

1.1. Получаване на метилов естер на бексаротен;

1.2. Получаване на хидразид на бексаротен като прекурсор за синтеза на съответните хидразонови производни на бексаротен ;

1.3. Получаване на хидразони на бексаротен. Получени са пет хидразонови производни на бексаротен (V1-V5).

В таблица 6 са посочени физичните характеристики на новосинтезираните хидразонови производни на бексаротен като е посочена разтворимост във вода, метанол и DMSO. В раздел „Експериментална част“ не открих описание на съответните проучвания върху разтворимостта на тези вещества.

2. Структурно охарактеризиране на получените производни посредством инструментални методи за анализ.

2.1. Инфрачервена спектроскопия, чрез която е потвърдено наличието на метилови остатъци и връзка C=N в структурата на продукти от V<sub>1</sub> до V<sub>5</sub>. Инфрачервените спектри на петте новосинтезирани съединения са поразително сходни в относителните позиции и интензитети на получените пиковите, което потвърждава близката структурна връзка между тях. Това основно се дължи на присъстващия бексаротенов скелет, съдържащ три ядра и свързаните към тях метилови остатъци. Въпреки структурното сходство са налице значителни различия, които насочват вниманието към внасянето на разнородни заместители и образуването на нови хидразонови производни с потенциален биологичен ефект.

2.2. <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопия. Във всички разгледани спектри са отчетени сигнали, сходни с тези, описани при анализа на бексаротен. Въпреки значителното сходство на получените данни, резултат от общата структура на изследваните вещества в пробите, се отчитат съществени различия, насочващи към осъществените структурни промени.

2.3. МАС-спектрометрия. Макар и изключително близки, получените масспектри при анализ на бексаротеновите производни показват и множество различия, резултат от извършените структурни промени и сложната структура на новополучените хидразонови съединения.

3. Модифициран HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните бексартенови хидразони като на първо място е валидиран HPLC-UV метод за количествено определяне на бексаротен. Хроматографският метод е валидиран по степен на разделяне, селективност, линейност, прецизност, точност, граница на откриване и граница на количествено определяне като посочените характеристики са съобразени с изискванията на ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text of Methodology.

4. Определяне на потенциалната метаболитна активност на бексаротен, бексартенови метаболити и новосинтезирани хидразид-хидразонови производни посредством прогнозиране на метаболитни модели. Този анализ представлява теоретично предсказване на възможна биоактивация на метаболитите на тези съединения и е подходяща основа за последващи *in vitro* и *in vivo* изследвания за потвърждаване на получените резултати.

4.1. На основата на направения анализ са идентифицирани и обобщени механизмите, посредством които метаболитите на новополучените съединения могат да потенцират чернодробно увреждане, чрез специфични реакции на взаимодействие с биологичните макромолекули (ДНК и протеини) в черния дроб. Представените данни сочат, че при нито едно от новополучените производни няма наблюдавани метаболити, но симулатора прогнозира възможност за метаболизъм в черния дроб. При всички прогнозирани метаболити механизмът на свързване с протеини включва формиране на шифови бази.

4.2. Определяне на потенциалната възможност за продуциране на кожни метаболити на бексаротен и новосинтезирани негови хидразони посредством прогнозиране на метаболитни модели. Получените данни при всички новосинтезирани бексартенови производни показват отрицателен резултат за възможност за продуциране на кожни метаболити.

5. Антиоксидантна активност. Използваните анализи (ABTS • + и DPPH) са широко прилагани методи за оценка на антиоксидантния капацитет на природните продукти. Освен тях, за определяне на антиоксидантния капацитет на бексаротен и неговите новосинтезирани производни, е използван и електрохимичен метод. На базата на получените резултати е установено, че химичните структурни особености на новосинтезираните хидразонни производни на бексаротен не водят до проява на значителен антиоксидантен потенциал. Бексаротен и неговите производни не притежават антиоксидантен потенциал. Приложеният електрохимичен метод позволява да се определи цялостния антиоксидантен потенциал на изследваните бексаротен и негови производни. Анализът показва, че с най-висок антиоксидантен потенциал се отличава бексаротен, а последващите модификации в структурата му водят до понижаване на антиоксидантния ефект.

***Изводи***

В синтезиран вид са направени 5 извода, които произтичат логично от получените резултати от всяка една задача поотделно. Те определят основните научно-теоретични и научно-приложни приноси на дисертационния труд на Надя Агова и са отлична основа за последващи изследвания и надграждане на този труд.

***Приноси и значимост на разработката за науката и практиката***

Детайлното ми запознаване с дисертационния труд на Надя Агова показва, че в него са налице, както научно-теоретични, така и научно-приложими приноси, които са с оригинален характер и са реално защитени в представения труд. Разработеният в катедра „Фармацевтична химия“ триетапен синтетичен подход за получаване на нови хидразд-хидразонови производни на бексаротен представлява оригинален принос към химията на синтетичните ретиноиди. Валидираният HPLC метод за определяне на бексаротен и неговите производни самостоятелно и в смеси, както и проведеното структурно охарактеризиране на новосинтезираните съединения посредством ИЧ-спектроскопия, 1H-ЯМР-анализ и Масспектрометрия, QSAR-анализ и антиоксидантна активност имат не само научно значение, но и са с приложен характер.

***Преценка на публикациите по дисертационния труд***

Докторантката има общо 3 (три) публикации по дисертационния труд. Публикуваните статии отразяват експерименталните изследвания, включени в дисертацията. Надя Василева Агова е първи автор на две от тях, а на третата е втори автор. Докторантката е взела участие в 4 (четири) научни форума у нас. Представените материали са във връзка с дисертационния труд.

***Лично участие на докторанта в проведеното дисертационно изследване***

Личното участие на докторантката в обширния преглед на проблема, формулиране на целта и задачите, провеждане на експерименталните изследвания, анализ на резултатите и изведените приноси е налице. Видно е задълбочено разбиране на специфичната материя и свободно боравене с терминологията в дисертационния труд. Налице е умение да се представят и описват научните резултати, както и подкрепата на научните ръководители.

### *Автореферат*

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията. В него са включени кратко въведение, целта и задачите и описание на използваните материали и методи. Представените изследвания и обсъждане напълно отразяват основните резултати постигнати в дисертацията. Последните са онагледени с достатъчен брой фигури и таблици. Изводите съвпадат с тези в дисертационния труд. Включени са научните приноси, както и списък на публикациите и участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд. Запознаването с автореферата дава възможност напълно да бъде разбран разработвания проблем, проведените изследвания и тълкуване на получените резултати. Много добро впечатление прави проектната активност на докторантката, което е видно от финансирането на този дисертационен труд.

### *Критични забележки и препоръки*

Нямам съществени критични забележки към представения дисертационен труд. Направила съм дребни коментари, които са отразени в по-горните раздели на рецензията. Те в никакъв случай не омаловажават стойността на дисертационния труд на Надя Василева Агова. Имам някои препоръки към докторантката за бъдещата ѝ научна дейност.

1. Да се проведат допълнителни изследвания по физико-химичното охарактеризиране на бексаротеновите производни (напр. температура на топене, разтворимост, разпределителен коефициент масло/вода) и изследвания по стабилност, които са изключително важни характеристики на всяко едно вещество.
2. Да се фокусира върху изпитване на биологичната активност на новосинтезираните хидразонови производни на бексаротен на базата на прогнозния QSAR-анализ.
3. Представяне на резултатите в реномирани и реферирани научни периодични издания с оглед увеличаване на общия импакт на научно-изследователската работа на Надя Агова.



**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд *съдържа оригинални научни и научно-приложни резултати, които представляват принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ-Варна.

Дисертационният труд показва, че докторантката **Надя Василева Агова притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Фармацевтична химия“ като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

Поради гореизложеното, убедено давам своята *положителна оценка* за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и *предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“* на *Надя Василева Агова* в докторска програма „Фармацевтична химия“ за разработка на тема „Получаване и охарактеризиране на бексаротенови производни с потенциална биологична активност“.

05.10. 2019 г.

гр. Варна

Рецензент: .....

(доц. Величка Андонова, дф)