

## РЕЦЕНЗИЯ

дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „Доктор“,  
на тема „Синтез, охарактеризиране и изследване на токсичността на естери на  
бексаротен“

с автор *Ивелин Росенов Илиев*

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

**Професионално направление:** 7.3. Фармация

**Докторска програма:** Фармацевтична химия

**Форма на докторантурата:** Редовна форма

**Научни ръководители:**

доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф.

доц. Яна Колева, д.х.

**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-109-114/09.02.2023 г. на Ректора  
на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

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 докторанта Ивелин Росенов Илиев са в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав в Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна и условията и реда за придобиване на ОНС „доктор“ в Медицински университет – Варна (МУ-Варна).

Той е зачислен като редовен докторант в катедра „Фармацевтична химия“ на Факултет „Фармация“ към МУ-Варна с научни ръководители доц. Светлана Фоткова Георгиева, дф и доц. Яна Колева, дх (Заповед № Р-109-53/31.01.2020 г.). По време на своята подготовка Ивелин Илиев е следвал стриктно процедурата по отношение на изискванията за редовна докторантура, което е видно от представените документи. Отчислен е с право на защита със Заповед № Р-109-114/09.02.2023 г.

### ***Кратки биографични данни за докторанта***

Ивелин Росенов Илиев е роден на 11.11.1994 г. Той завършва средно образование в ПТГ „Шандор Петьофи“ – гр. Разград със специалност „Компютърна техника и технологии“ с придобита квалификация „Техник на компютърни системи“. През 2019 г. в Медицински университет – Варна придобива ОКС „магистър“, специалност „Фармация“. След дипломирането си работи в аптеки от открит тип на длъжност магистър-фармацевт. Ивелин Илиев е зачислен през 2020 г. като докторант в редовна форма на обучение в докторска програма „Фармацевтична химия“, катедра „Фармацевтична химия“ на Факултет по фармация при МУ – Варна. През 2021 г. постъпва на работа в същата катедра на длъжност „асистент“, където работи и към момента. Владее английски език.

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

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд съдържа 171 страници и е онагледен с 63 фигури (плюс 5 в приложението) и 37 таблици. Цитирани са 213 литературни източника, от които два на кирилица. Научният труд включва следните раздели: въведение (2 стр.), литературен обзор (64 стр.), цел и задачи (1 стр.), експериментална част, в която са включени материали (2 стр.) и методи (12 стр.), резултати и обсъждане (60 стр.), изводи (1 стр.), приноси (1 стр.), използвана литература (13 стр.), списък на публикации и участия (2 стр.), финансиране (1 стр.) и приложения (5 стр.). Структурата на дисертацията е в съгласие с Процедура за придобиване на ОНС „доктор“ в МУ – Варна и Правилника на МУ.

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

Ретиноидът Бексаротен е одобрен от FDA за лечение на кожен Т-клетъчен лимфом (CTCL); наблюдават се терапевтични ефекти при лечение на рак на гърдата и на белите дробове. Редица проучвания описват потенциала на Бексаротен в лечението на неврологични заболявания, като болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и шизофрения. Неговата изразена хепатотоксичност, тератогенност при експериментални животни и проявени нежелани лекарствени реакции ограничават приложението му. Тези негови недостатъци могат да бъдат преодолени чрез прилагане на стратегия за разработване на предлекарства на Бексаротен, които да увеличат възможността за неговото прилагане. Това дава основание за синтез на нови, неописани в литературата аналози на Бексаротен, тяхното охарактеризиране, определяне на токсикологичен профил и изследване на възможностите за терапевтичното им приложение като предлекарства. В този смисъл темата на дисертационния труд на маг. фарм. Ивелин Илиев е подчертано **актуална**.

Целта на дисертацията и произтичащите от нея задачи за решаване са точно и конкретно дефинирани.

#### ***Познаване на проблема***

Литературният обзор е поместен на 64 страници и е базиран на богат литературен материал – **213 източника**.

Обзорът показва широко познаване на материята, а именно: обща характеристика на Витамин А и ретиноиди, включваща функция, физиологична роля и приложение на витамин А, структура, лиганди и класификация на ретиноиди; получаване, фармакокинетика, фармакодинамика, метаболизъм, токсичност, лекарствени взаимодействия и приложение на бексаротен; производни на бексаротен (разгледани са 5 метода за получаването им), предлекарства, и естерите като prodrugs; и преглед на *in silico* и *in vivo* методи за определяне на токсичност на новосинтезирани лекарства. Аргументирано са представени повечето значими проблеми, съществуващи в разискваната тема. Демонстрирани са изчерпателност с ясен и разбираем стил на писане.

#### ***Цел и задачи на изследванията***

На базата на направения литературен обзор, дисертантът формулира **целта на настоящата дисертация**, а именно да бъдат получени, структурно охарактеризирани и изследвани група нови, не описани в литературата Бексаротенови естерни производни и да бъде изготвен токсикологичен профил на ретиноидните аналози. Дефинирани са **6 основни задачи**, като последователността и решаването им дава възможност за постигане на крайната цел.

### ***Методика на изследването***

Избраните методи дават възможност за логично решение на поставените задачи във връзка с посочената цел на дисертационния труд.

Методът за синтез на естери на бексаротен е описан обстойно с изключение на това, че не е посочено точното количество на разтворител, необходим за разтваряне на 0,03 g бексаротен. Този пропуск би затруднил възпроизвеждането на синтеза. Освен това, не става ясно проведени ли са предварителни изследвания за определяне на оптималните реакционни условия на процеса на синтез.

Приложените инструментални аналитични методи са общоизвестни, съвременни и правилно използвани. Излишно дисертантът е отделил време и място за обяснение на същността на определяне на точка на топене, IR, UV-Vis и TLC, тъй като те са широко застъпени в курса на обучение за ОКС „магистър“ в ПН 7.3. „Фармация“.

*In silico* анализът за прогнозиране на биологичния ефект и теоретична оценка на токсичността на Бексаротен, новосинтезирани Бексаротенови естери и техните метаболити е извършен чрез използване на три софтуерни програми.

В т. „2.6. Определяне на обща токсичност посредством *in vivo* модели“ така направеното описание на експеримента повдига някои въпроси:

1. Защо 5-те групи съдържат различен брой експериментални животни?
2. В т. „2.6.2. Приготвяне на разтвори“ кое налага включването на „няколко капки“ Tween 20 като суспендиращ агент и как е избран именно този ПАВ?
3. Разтвори ли са приготвени или суспензии за третиране на експерименталните животни?
4. Как се дефинира „ниво на липсващ ефект“?

### ***Анализ на резултатите***

Проведените собствени изследвания са представени на 73 страници и включват 33 таблици и 26 фигури. Таблиците и фигурите са ясни и прегледни. Изследванията са проведени в следните основни направления, които следват логично поставените задачи, а именно:

1. Приложен е прост метод на естерификация на бексаротен в присъствие на оксалил хлорид в среда на алифатни алкохоли. Липсва информация как е определена кристалната структура на получените естери на бексаротен (E1 и E2) и тяхната разтворимост в различните разтворители, посочени в таблица 6. По-правилно би било да се отчете, че са получени твърди вещества с бял цвят.

2. Проведен е ТСХ анализ за проследяване на реакционния процес с различни подвижни фази и установяване на края на процеса на естерификация. Липсва точно описание на всички използвани отношения на компонентите на приложените дву- и многокомпонентни такива, което би затруднило възпроизвеждането на експеримента. Не са посочени литературните източници, на базата на които са определени точно тези подвижни фази. Въпреки това, прилагането на подвижна фаза хексан : етил ацетат в отношение 1 : 1 е дала резултат, според докторанта.
3. Получените естери на бексаротен са охарактеризирани чрез добре известни физични методи.
  - 3.1. Определена е температурата на топене на твърдите вещества E1 и E2. Като се има предвид, че E3 и E4 не са в твърдо агрегатно състояние, присъствието им в таблица 10 е излишно. При стапяне на твърдо вещество, то преминава от твърдо агрегатно състояние в течно, а не се получава разтвор, както е посочено в дисертационния труд. Като се има предвид заключението на дисертанта за нереагирал бексаротен и непълно протекъл процес на естерификация, каква е точността при определяне на експерименталния добив (не „практичен“ и „практически“, както е упоменато) и изчисления процентен такъв?
  - 3.2. За доказване структурата на новосинтезираните аналози на Бексаротен е проведен сравнителен ATR-FTIR анализ на спектрите на Бексаротен, като изходно съединение, и на новополучените негови естери в областта  $4000-500\text{ cm}^{-1}$ . Резултатите отново показват, че процесът на естерификация не е протекъл напълно при посочените експериментални условия.
  - 3.3. Разработен и валидиран е бърз UV-Vis метод за количествено определяне на бексаротен. Снети са спектрите на новосинтезираните E1, E2, E3 и E4 в различни разтворители и техни смеси. Установено е, че разработеният UV-Vis метод за количествено определяне на бексаротен не е подходящ за определяне на негови смеси с E1, E2, E3 и E4.
  - 3.4. Приложен е модифициран HPLC анализ за определяне на чистотата на естерите E1, E2, E3 и E4. Резултатите показват, че са налични примеси в E2, E3 и E4, които не са идентифицирани.
4. Приложени са *in silico* методи, като теоретичен подход за прогнозиране на биологичната активност на E1, E2, E3 и E4.
  - 4.1. Използваният QSAR Toolbox за симулиране на чернодробен *in vivo* метаболизъм и чернодробен S9 метаболизъм при плъхове, както и кожен метаболизъм, представят

данни за теоретичната възможност естерите на Бексаротен да бъдат използвани като предлекарства. Първите два подчертават необходимостта от задълбочено изследване за тяхната генотоксичност и нарушаване на функциите на клетките.

- 4.2. Чрез Molinspiration софтуер е установено, че Бексаротен има най-голяма биологична активност от всички изследвани съединения. Анализът показва, че естерите сами по себе си също имат активност спрямо разгледаните рецептори и ензими, което означава, че естерите не отговарят напълно на определението за предлекарства.
- 4.3. В допълнение е извършено теоретично прогнозиране на абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен посредством PreADME/Tox софтуер. Установено е, че чревната абсорбция след орално приложение за естерите е отлична (100%) и всички анализирани съединения имат висок афинитет към плазмените протеини (100%). Бексаротен е с най-ниската степен на абсорбция през кръвно-мозъчната бариера в сравнение с новосинтезирани естери на Бексаротен (със стойности над 10.00). От анализираните съединения всички са инхибитори на CYP2C9 и само Бексаротен не инхибира CYP3A4. От анализираните естери само E1 показва канцерогенна активност при плъхове. Анализираните съединения имат среден риск при инхибиране на гена hER и, следователно, не са потенциално кардиотоксични производни според *in silico* тестовете. E2, E3 и E4 са с най-обещаващия ADME/T *in silico* профил, показващ висока чревна абсорбция и задоволителен профил на разпределение. Трите съединения са с малка бъбречна екскреция. Съединението E1 показва висока токсичност, поради мутагенно и карциногенно действие, вероятно дължащ се на хидролизата на E1 до Бексаротен и метанол, описано т. 4.1. Съединенията E2, E3 и E4 показват по-ниска токсичност. Според ADME/T, профилът на съединения E2, E3 и E4 ги прави потенциални антинеопластични агенти с действие в ЦНС.
5. В т. 5 от „Резултати и дискусия“ са представени резултатите от *in vivo* изследване с експериментални животни – мъжки плъхове от порода Wistar. След еднократно третиране на животните с бексаротен и етилов естер на бексаротен в две дози са установени психо-соматични промени в поведението на част от животните, третирани с етилов естер на бексаротен. Би могло само да се предположи, че този ефект се дължи на отделения етанол в резултат на хидролиза на естера. Наблюдаваният ефект върху телесното тегло на експерименталните животни и тяхното поведение за мен не е достатъчен, за да се направи заключението, че липсват симптоми на токсичност при

отчитане на телесната маса след еднократно перорално приложение на бексаротен и неговия етилов естер, тъй като всеки оток на орган, следствие на възпалителен процес или интоксикация би довел до покачване на телесната маса. По-нататък дисертантът провежда биохимично изследване за нивата на чернодробните ензими ASAT и ALAT и C-реактивният протеин (CRP). Наблюдавани са незначителни изменения в концентрациите на ASAT и CRP при експозираните групи спрямо контролата. От представените данни е видно, че концентрацията на ALAT при животните, третирани с E2 в доза 500 mg/m<sup>2</sup> телесна повърхност е по-ниска спрямо всички останали групи. Резултатите не са дискутирани. Направеният макроскопски оглед на вътрешните органи след еднократно приложение на бексаротен и етилов естер на бексаротен не би могъл да се отчете като надежден диагностичен метод, поради възможността наблюдаваните изменения в бял дроб и ГИТ да се дължат на редица други фактори, които не са свързани с изследваните съединения. В същото време не е коментирано състоянието на черния дроб при условие, че са изследвани нивата на ASAT и ALAT. Дисертантът прави заключението, че бексаротен и новосинтезираният му етилов естер не повлияват значимо телесното тегло и не притежават органна токсичност. Категорично заключение за последното може да се направи само след хистологично изследване, което не е проведено.

### ***Изводи***

В синтезиран вид са представени 7 извода, които произтичат от получените резултати от всяка една задача поотделно. Тяхната формулировка по-скоро показва резултата от извършената експериментална работа по дисертационни труд на Ивелин Илиев.

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

Детайлното ми запознаване с дисертационния труд на Ивелин Росенов Илиев показва, че в него има налице научно-теоретични и научно-приложни приноси, които са с оригинален характер и са реално защитени в представения труд.

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

Докторантът има общо 4 (четири) публикации по дисертационния труд. Публикуваните статии отразяват експерименталните изследвания, включени в дисертацията. Ивелин Росенов Илиев е взел участие в 14 (четиринадесет) научни форума у нас и в чужбина. Представените материали са във връзка с дисертационния труд.

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

Личното участие на докторанта в прегледа на проблема, формулиране на целта и задачите, провеждане на експерименталните изследвания, анализ на резултатите и изведените приноси е налице. Видна е и подкрепата на научите ръководители.

### ***Автореферат***

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията. В него са включени целта и задачите и описание на използваните материали и методи. Представените изследвания и обсъждане напълно отразяват основните резултати, постигнати в дисертацията. Получените резултати 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.

### ***Критични забележки и препоръки***

Препоръките ми са в следните направления:

1. Да се обърне внимание на термините и тяхното основно значение като се използват научно приети такива. Например, в литературния обзор неправилно са използвани някои термини като „мехлеми“, „администрация“ вместо „приложение“ или „път на въвеждане“, „фармацевтични свойства на лекарствата“, „химиотерапевтичен индекс“, „химиопрофилактични“ и др.; в „Методи“ – „бистър, хомогенен разтвор“, „след темпериране разтворът остава бистър и в колбата се отделя утайка“, „разтвор се суши“ (стр. 76), „оценка на риска от химични съединения“ (стр. 83), не става ясно какво се разбира под понятието „фармацевтични профили“ (стр. 142).
2. Да се следва правилото „от общото към частното“ като се следва логиката на процесите / изследванията. Прави впечатление, че фармакодинамиката на бексаротен е разгледана преди неговата фармакокинетика в литературния обзор. Също така, тъй като методите за синтез на производни на бексаротен предшестват точката за предлекарства, не става ясно от изложението така разгледаните негови аналози и производни явяват ли се предлекарства, както и има ли други проучвания на prodrugs на бексаротен.
3. Използваните в дисертацията понятия аналог, производно и предлекарство на бексаротен еднозначни ли са?
4. С оглед възпроизвеждане на експериментите, е необходимо те да бъдат надлежно описани и да се избягват изрази като „достатъчно количество“ и „няколко капки“,



като тези в описаните методики за разтваряне на бексаротен в „Обща методика за получаване на естери на бексаротен“ и „Приготвяне на разтвори“ в „Определяне на обща токсичност посредством *in vivo* модели“.

5. Избраните реакционни условия, в частност реакционното време за получаване на естерите на бексаротен, вероятно са резултат на предварителни проучвания, които не са упоменати никъде в дисертационния труд. Задълбоченият анализ на предварителните проучвания е необходим с оглед постигане на желания резултат.

Направените препоръки не омаловажават стойността на извършената работа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа оригинални научни резултати, които представляват принос в науката*, и отговаря 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 докторантът **Ивелин Росенов Илиев** притежава теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Фармацевтична химия“ като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

Поради гореизложеното, 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 **Ивелин Росенов Илиев** в докторска програма „Фармацевтична химия“ за разработения дисертационен труд на тема „Синтез, охарактеризиране и изследване на токсичността на естери на бексаротен“.

12.04. 2023 г.

гр. Варна

Рецензент: .....

(доц. Величка Андонова, дф)