

РЕЦЕНЗИЯ

от

доц. Мая Маргаритова Захариева, дф – Институт по микробиология :Стефан Ангелов“,
Българска академия на науките

на

дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'
професионално направление 7.3. „Фармация“
докторска програма „Технология на лекарствените форми и биофармация“

Автор: Николай Станчев Захариев

Форма на докторантурата: редовна

Катедра: „Фармацевтични науки“ на Фармацевтичен факултет при Медицински университет - Пловдив

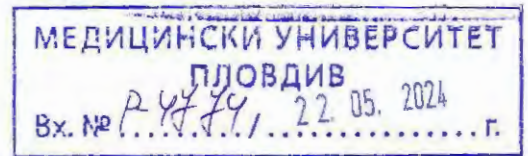
Тема: „Наноразмерни носители за насочена доставка на лекарства за противотуморна терапия“

Научен ръководител: Доц. Бисера Пилчева, дф - Медицински университет, Пловдив

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на хартиен/електронен носител е в съответствие с чл.70 (1) от I.Раздел. Придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г. и включва следните документи:

1. Заявление (по образец от сайта на МУ-Пловдив) до Ректора на МУ-Пловдив за допускане до официална защита с опис на документите – с входящ номер и дата от Деловодството.
2. Дисертационен труд – в 1 екземпляр на хартиен носител и в електронен (в PDF формат) за публикуване в Open Science Cloud.
3. Автореферат* на български език и на един от езиците, които традиционно се ползват в съответната научна област, на хартиен носител и в електронен (в PDF формат). Авторефератът на чужд език се изисква само на електронен носител (в PDF формат).
4. Творческа автобиография – европейски формат, подписана от кандидата.



5. Диплома за образователно-квалификационна степен „магистър“ с приложение (нотариално заверени копия).
6. Списък на публикациите и научните трудове по темата на дисертационния труд.
7. Копия на публикациите и научните трудове по темата на дисертационния труд (с подпис на докторанта).
8. Заповед за зачисляване в докторантура и протокол от разширен катедрен съвет за зачисляване.
9. Протокол от разширен КС за отчисляване с право на защита.
10. Заповед за отчисляване с право на защита.
11. Протокол от изпит – докторантски минимум по специалността (по образец от сайта на МУ-Пловдив).
12. Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи (по образец от сайта на МУ-Пловдив).
13. Сертификат за получени кредити от обучението по груповия учебен план.
14. Други документи, свързани с хода на процедурата.
15. Информационна карта на НАЦИД за защитен дисертационен труд на български език.
16. Информационна карта на НАЦИД за защитен дисертационен труд на английски език.
17. CD/флаш памет с pdf-формат на автореферат (на български и чужд език) и дисертация, както и doc-формат на информационните карти на НАЦИД – 3 броя.

Докторантът е приложил **3 публикации и един регистриран полезен модел.**

Нямам забележки и коментари по документите.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Асистент Николай Станчев Захариев е роден на 12.08.1993 г. в Златоград. През 2017 г. завършва Фармацевтичен факултет на Медицински университет - Пловдив с отличен успех от държавните изпити. От 2018 г. е асистент-преподавател в катедра „Фармацевтични науки“. Зачислен е като редовен докторант към същата катедра през 2019 г. По време на докторантурата започва специализация по Технология на лекарствата и биофармация и е завършил курс по Защита и хуманно отношение към опитните животни (30/09/2022 – 30/09/2022. Тракийски университет, Ветеринарномедицински Факултет, Стара Загора), като придобитите по време на тези обучения знания той използва целесъобразно за научни и образователни цели.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Представеният проект на дисертационен труд със заглавие “Наноразмерни носители за насочена доставка на лекарства за противотуморна терапия” е свързан с решаването на особено наболял проблем в терапията на онкологичните заболявания, а именно насочената доставка на цитостатици в прицелните малигнени клетки. Основна цел на труда е да се разработи модел на лекарство-доставяща система с потенциал за насочена доставка и контролирано освобождаване на антрациклиновия антибиотик даунорубицин от носителя. Поставените задачи напълно отговарят на поставената цел и начертават целесъобразно експерименталния план на дисертацията.

Конвенционалните химиотерапевтици, какъвто представлява и антрациклиновият антибиотик даунорубицин, се характеризират с неспецифично цитостатично действие и редица тежки странични нежелани ефекти. Специално за даунорубицина това са кардиотоксичност, миелосупресия, анемия и тромбоцитопения. Нанотехнологията е един от съвременните подходи, който цели повишаване на специфичността и ефикасността на антинеопластичните лекарства и едновременно намаляване на токсичните им ефекти. Имайки предвид тези факти, даунорубицинът е подходящо и правилно избрано лекарство за включване в нано-доставяща лекарствена система. Докторантът правилно е насочен към използване на биополимерните наночастици като носители за даунорубицина, тъй като те показват по-добър токсикологичен профил от синтетичните, както и висока степен на биосъвместимост и биоразградимост при попадане в организма. През последните няколко десетилетия широко приложение за насочено лекарствено доставяне намират полимери, които променят физико-химичните си характеристики в зависимост от определени параметри на средата. Особено актуални за таргетна терапия, са тези, при които освобождаването на включените в тях лекарствени молекули се определя единствено от вариациите на рН в организма и затова може да се осъществи на мястото на действие. Както е известно малигнените клетки се характеризират с по-високо рН в сравнение със здравите. Избраният в дисертацията наноносител казеин е особено подходящ за целта, тъй като е общопризнат за безопасен (GRAS) и предлага биосъвместимост, биоразградимост и биорезорбируемост при перорално приложение. Казеиновите молекули приемат в зависимост от рН на средата различни конформации, които са най-благоприятни енергийно. При кисела среда те се уплътняват, а при намаляване на киселинността набъбват и позволяват освобождаване на включените лекарства. Друго тяхно предимство е способността им да проникват вътреклетъчно през плазмената мембрана по енергийно независим начин, което повишава клетъчното усвояване при перорално приложение. Много добра идея, осъществена в дисертацията на следващ етап е и функционализирането на казеиновите наночастици с биополимера от морски произход фукоидан, което предвижда да подобри разпределението на лекарството в организма и да намали риска от проявата на нежелани лекарствени реакции.

За оценка на биологичната активност на композитните наносистеми са проведени серия от стандартни *in vitro* и *ex vivo* тестове, с които задължително започват предклиничните фармакологични проучвания. Тези тестове охарактеризират цитотоксичността, степента на пенетрация в третираните клетки и ефектите върху гладката мускулатура на нанокомпозитните системи с даунорубицин и поставят много добра основа за по-нататъшни фармакологични изследвания.

Поставената цел и прилежащите ѝ задачи за разработване на нанокомпозитните системи от биоразградимия полимер казеин, функционализиран с фукоидан за насочено доставяне на даунорубицин са целесъобразни и актуални предвид публикуваната до момента информация в

научната литература. Последователността на избраните модерни физико-химични и фармакологични тестове придават завършеност на представения научен труд.

4. Познание на проблема

В литературния обзор на представения труд много подробно са разгледани преимуществата на природните полимери като протеини и полизахариди като биопоносими, биоразградими и нетоксични носители, както в частност са казеинът и полизахаридът фукоидан, използван за функционализиране на казеиновите наночастици чрез получаване на нанокompatibilни структури с оптимални физико-химични свойства. Отделено е специално внимание, както на предимствата на казеина, като носител в лекарство-доставящи системи, така и неговите недостатъци и съответно възможността за преодоляването им чрез свързване в казеин-полиелектролитни комплекси. В библиографията са включени 232 литературни източника. От тях 191 са цитирани в литературния обзор, което свидетелства за огромния труд, положен от докторанта при прегледа на наличната научна литература по въпроса. Докторантът е анализирал публикуваната информация и в обзира е направил критично обобщение на досегашните постижения в областта, описал е належащите проблеми и е обосновал научно целта на дисертационния труд. От написаното се вижда, че докторантът се е научил да борави с научна литература и на базата на обработената информация да поставя научни хипотези.

5. Методика на изследването

Дисертационният труд се отличава с богата методология от получаването и охарактеризирането на казеин-фукоидан композитните наноструктури до тестването на тяхната фармакологична активност. Прави добро впечатление последователната и добре аргументирана взаиморъзка между проведените физико-химични и фармакологични тестове. Избраните методи са съвременни и логично намират своето място в последователната експериментална каскада на научната разработка, което способства за обосноваването на практическата приложимост на новосъздадените композитните наночастици като лекарствени наноносители и разкрива потенциала им за преминаване към по-високи технологични нива на разработка.

Казеиновите частици са получени по метод на коацервация с последващо разпръсквателно сушене, докато Казеин/фукоидан композитните наночастици са получени чрез полиелектролитно комплексобразуване, омрежване на комплекса с глутаралдехид и последващо разпръсквателно сушене. Докторантът е извършил значителен обем експерименти за установяване на оптималните условия за получаване и на двата вида частици, варирайки съотношението полимер/лекарствено вещество, концентрацията на омрежващият агент и интензитета на разпрашаване. Той е определил последователно размера, разпределението по големина и зета потенциала на получените частици чрез динамично светоразсейване. Описал е тяхната повърхностната морфология със сканираща електронна микроскопия и е използвал голям набор от съвременни методи за охарактеризиране фазовото състояние на лекарственото вещество (прахова рентгенова дифрактометрия, термогравиметричен и диференциален термичен анализ, диференциална сканираща калориметрия). Всички тези тестове са правилно подбрани и напълно охарактеризират

физико-химично наноносителите, което е необходимо за последващите фармакологични тестове.

Биофармацевтичното поведение на разработените системи, вътреклетъчното проникване и разпределение, както и тяхната *in vitro* цитотоксичност с и без натоварване с даунорубицин докторантът е изследвал върху лимфобластната клетъчна линия Reh. Наборът от актуални тестове е достатъчен, за да разкрие предимствата на разработените наноносители по отношение на изброените в предното изречение параметри и да определи най-подходящата наносистема за натоварване с даунорубицин. Докторантът е усвоил необходимите методи за клетъчно култивиране и проследяване на биохимични характеристики на клетъчни системи, като напр. активност на митохондриалните дехидрогенази и митохондриален метаболизъм след въздействие с наносистемите. Интерес представлява проведеното изпитване за взаимодействия на наночастиците с човешки серумен албумин, който може да повлияе разпределението, транспорта и освобождаването на им *in vivo* условия, както и моделът за изследване на промените в спонтанната съкратителна активност на гладко мускулни препарати от морски свинчета.

Статистическият анализ е извършен с няколко съвременни програми и показва, че докторантът е придобил задълбочени знания за изчислителните методи, прилагани при количествена оценка на биофармацевтични и фармакологични данни.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Представеният дисертационен труд е написан на висок научен стил върху 156 страници и е оформен съгласно изискванията към дисертационните трудове на Медицински университет - Пловдив. Текстове са богато и сполучливо онагледени с 50 фигури и 20 таблици. От тях 37 фигури и 17 таблици съдържат обобщение на получените собствени резултати. В библиографията са включени 232 литературни източника. В труда е направен подробен анализ на литературата. Формулирани са осем задачи във връзка с изпълнението на поставената цел. Използваните материали и методи описани с подробни протоколи. Резултатите и обсъждането им съставят основната част от труда. Резултатите са представени гочно и пълно. Направени са 8 извода. Изводите са логични и обхващат цялостното многообразие на получените експериментални данни. Посочени са 5 приноса. Литературната справка включва 157 литературни източници, всички на латиница. Много добро впечатление прави факта, че повечето от тях са от последните 5 години.

Дисертацията на Николай Захариев следва утвърдената в страната обща схема на структуриране, като е спазено съотношението между отделните части:

- 1) Въведение – 1 стр.
- 2) Литературен обзор – 41 стр.
- 3) Цели и задачи – 2 стр.
- 4) Методи и материали – 19 стр.
- 5) Резултати и обсъждане – 64 стр.
- 6) Изводи – 1 стр.

- 7) Приноси – 1 стр.
- 8) Използвана литература – 20 стр.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приносите в дисертационния труд на Николай Захариев за с научен и научно-приложен характер. Те обобщават получените от докторанта оригинални експериментални данни относно актуален научен проблем – таргетно доставяне на цитостатици на мястото на действие. Докторантът за първи път е предложил нов модел на наночастици от казеин, включващи антрациклиновия антибиотик даунорубин и е разработил лекарство-доставяща система с казеин и фукоидан в една и съща нанокompatитна структура. По отношение на биологичните ефекти, за първи път в настоящата дисертация е установена релаксация на гладка мускулатура след прилагане на казеин в микромолярни концентрации, като докторантът за първи път е изследвал въздействието на даунорубин върху спонтанната съкратителна активност на гладко-мускулни препарати от корпусната част на стомаха на морско свинче.

В допълнение, дисертационният труд предлага модел за изследване на спонтанната съкратителна активност на гладки мускули, кои то да бъде алтернатива на *in vitro* изследванията за степен на освобождаване, позволяващ оценка на биологичния ефект в реално време. Практическата насоченост на приносите е много ценна за медицинската практика. Регистрираният полезен модел отваря много добри перспективи за развитие и внедряване в практиката на едно по-високо технологично ниво на разработка.

8. Преценка на публикациите на дисертационния труд

Научните публикации, свързани с дисертационния труд са 3 броя. Отбелязан е и един регистриран полезен модел. Изключително постижение представлява фактът, че и трите публикации са публикувани в престижни международни реферирани списания, с фактор на значимост между 5.0 и 5.4 и класирани в най-високия квартал Q1. Докторантът е първи автор, както на трите публикации, така и на регистрирания полезен модел, като неговият принос е най-голям. Публикациите включват съществена част от резултатите от дисертационния труд. Те са цитирани общо 14 пъти (без автоцитати) в международната база данни Scopus, което е впечатляваща цифра, като се има предвид, че първата публикация е от 2021 г. Големият брой цитати свидетелства за интереса на научната общност към публикуваните резултати и е доказателство за тяхното високо качество и тяхната актуалност. Докторантът е участвал в 6 научни форума, от които 2 международни, 1 с международно участие и 3 национални. Докторантът е водещ изследовател на един вътреуниверситетски проект към МУ-Пловдив на тема: „Биополимерни нано системи за насочена доставка на лекарства за противотуморна терапия“ и участва в още два – един национален, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ и един международен по „Програма за стратегически изследвания и иновации за развитие на МУ-Пловдив (ПСНИИР-МУП)“.

9. Лично участие на докторанта(ката)

Докторантът Николай Захариев участва лично в проведеното научно изследване, за което свидетелства фактът, че е първи автор на трите публикации и регистрираният полезен модел. Приносите, описани в дисертационния труд са лично дело на докторанта и са получени с подкрепата и съдействието на неговата научна ръководителка доц. Бисера Пиличева, дф.

10. Автореферат

Авторефератът напълно отговаря на изискванията на правилника на Медицински университет – Пловдив. В него са отразени кратко и ясно, без пропуски, постигнатите резултати. Написан е на 74 страници, като съдържа 41 фигури и 16 таблици. От направеното обобщение може да се придобие ясна представа за целите, задачите и изпълнението на дисертационния труд. Включени са обсъждането на резултатите, изводите и приносите, както и библиографията с 54 литературни източника.

11. Критични забележки и препоръки

Докторантът се е съобразил с всички направени от мен забележки при аprobацията на дисертационния труд, затова нямам критични забележки и препоръки към проведеното изследване и приложения комплект материали.

12. Лични впечатления

Познавам докторанта Николай Захариев от аprobацията на дисертационния му труд, проведена през април 2024 г. По време на презентацията му ми направиха силно впечатление неговата увереност и компетентност при представяне на проведеното научно изследване. Той представи получените резултати и тяхната значимост кратко, ясно и изчерпателно, в логична последователност, което е характерно за млади учени със силна отдаденост към научната работа и съществено участие в проведените експерименти. Докторантът показва ангажираност към проведеното изследване, отговори изчерпателно и компетентно на всички зададени въпроси и остави изключително приятно впечатление за мотивиран млад учен, който е готов да се впусне в дебрите на науката с отдаденост и ентузиазъм.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Повече от очевидно е, че получените резултати представляват солидна база за бъдещи изследвания на по-високо технологично ниво за получаване на фармацевтичен продукт с медицинско приложение. Най-важното обаче е, че те обогатяват съществено наличните данни в световната научна литература за използването на казеиновите молекули в комбинация с полизахаридни полимери за нанокomпозитни системи, включващи класически цитостатици с цел повишаване тяхната бионаличност и намаляване на токсичните им ефекти. Получените резултати са много обещаващи и перспективни за бъдещи изследвания в тази посока. Предвид високото им качество, поръчвам продължаване на научните разработки с тестване и да други полизахаридни биополимери. Интересно би било и задълбочаване на фармакологичните тестове върху по-голям набор от ин витро клетъчни системи за оценка на

антинеопластичен ефект, с цел да се разшири диапазона на целевите неоплазии. Това би помогнало да се премине към подходящ *in vivo* модел на неоплазия, спазвайки изискванията на концепцията за трите R – „reduction, refinement and replacement” (намаляване, усъвършенстване и заместване) на опитите с животни. Бих се радвал, ако в бъдеще Николай Захариев продължи научната си кариера със същия нестихващ ентузиазъм и целенасоченост, тъй като според мен той вече е изграден млад учен и преподавател с отлични способности и талант.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на маг. фарм. Николай Захариев *съдържа съдържа редица научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в областта на биофармацията и технологията на лекарствените форми*. Предоставеното научно изследване **покрива всички** изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ – Пловдив за дисертационен труд. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват и на специфичните изисквания на МУ – Пловдив. Считаю, че дисертационният труд и наличието на три публикации в престижни международни научни списания с фактор на значимост между 5 и 5.4, цитирани 14 пъти, както и регистрираният полезен модел надхвърлят многократно качествените и количествени критерии за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

Дисертационният труд показва, че докторантът Николай Захариев **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Технология на лекарствените форми и биофармация“ като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Високата научна стойност на получените резултати показва авторът като изграден и задълбочен изследовател в областта на съвременната фармацевтична наука и разработването на нови лекарствени форми за насочено приложение на лекарства.

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 маг. фарм. Николай Станчев Захариев в докторска програма по „Технология на лекарствените форми и биофармация“.

Рецензент:

(Доц. Мая Захариева, дф)

Заличено на основание
Чл.5 §1, б.“В” Регламент (ЕС)2016/679