

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Деница Богомилова Момекова, дфн  
Фармацевтичен факултет на Медицински университет – София

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт; професионално направление 7.3 Фармация, докторска програма „Технология на лекарствените форми и биофармация“

**Автор:** Николай Станчев Захариев

**Форма на докторантурата:** редовна

**Катедра:** Фармацевтични науки

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

**Научен ръководител:** доц. Бисера Пиличева, дфн –

Медицински университет – Пловдив, Фармацевтичен факултет

Настоящата рецензия е изготвена на основание на Заповед на Ректора на Медицински Университет – Пловдив № Р 1175/ 16.04.2024 и решение на първото заседание на научното жури, проведено на 19.04.2024г. Тя е съобразена с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение (ППЗРАСРБ) и Правилника на МУ–Пловдив по ЗРАСРБ.

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният от докторант Николай Станчев Захариев комплект материали на електронен носител е в пълно 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:

- Заявление до Ректора на МУ-Пловдив за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд
- автобиография в европейски формат с подпис на докторанта
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование
- заповед за зачисляване в докторантура,
- заповед за отчисляване с право на защита
- протокол за издържан изпит или докторантски минимум по специалността
- протокол от катедрен съвет за предварително обсъждане на досертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури
- дисертационен труд
- автореферат на български и английски език
- списък на научните публикации по темата на дисертацията

- копия на научните публикации
- списък на участията в научни форуми
- списък на забелязани цитирания
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи
- други документи, свързани с хода на процедурата – полезен модел

Във връзка с дисертационния труд докторантът е приложил три публикации. Всички представени от докторанта документи са в пълно съответствие с Правилника за реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Р България, както и в съответствие с процедурата за придобиване на ОНС „Доктор“ в МУ-Пловдив.

## **2. Кратки биографични данни за докторанта**

Николай Станчев Захариев е роден на 12.08.1993 г. През 2017г завършва висшето си образование във Фармацевтичен факултет на Медицински Университет-Пловдив като придобива магистърска степен по фармация. През 2018г., Николай Захариев постъпва като асистент в катедра „Фармацевтични технологии“ на Фармацевтичен факултет на МУ–Пловдив. В същото висше учебно заведение продължава и следдипломната му на квалификация, където от 2020 г. е в ход специализацията му по линия на СДО по „Технология на лекарствата с биофармация“. Успоредно с това Николай Захариев е посетил няколко допълнителни класификационни курса относно „Защита и хуманно отношение към опитните животни, използвани за научни или образователни цели“ във факултета по Ветеринарна медицина към Тракийски университет – Ст. Загора както и обучителен курс по *Електронна микроскопия*, организиран от Българското кристалографско дружество. Докторантът владее писмено и говоримо английски език на много добро ниво.

Със заповед на Ректора на МУ-Пловдив от 17.12. 2021г Николай Захариев е зачислен на редовна докторантура в катедрата по Фармацевтични технологии към Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив, а на 01.04. 2024 е отчислен с право на защита.

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

Концептуалният подход, насочен към осигуряване на оптимални концентрации от лекарственото вещество до съответните му мишени за действие се нарича прицелно лекарствено доставяне (*drug targeting*). Един от най-перспективните подходи за практическо реализиране на концепцията за насочено лекарствено доставяне и респективно, преодоляване на недостатъците на лечението с лекарства с малка терапевтична ширина и/или неблагоприятни фармакокинетични свойства, е основан на включването им в наноразмерни носители. Важно преимущество на наноносителите са възможностите, които те предлагат за повърхностното им модифициране и функционализиране, което позволява оптимизиране на колоидната им стабилност, на фармакокинетиката и на тъканното им разпределение. През последните години разработването на наночастици се разшири до голям спектър от клинични приложения. Въпреки интензивното им изследване обаче, сериозен проблем в технологичен и терапевтичен аспект се явява незадоволителната им ефективност на доставяне на лекарствените молекули в терапевтично адекватни концентрации в прицелните компартименти. Това налага нуждата от разработване на ново поколение наноразмерни носители, т.нар.

интелигентни наносистеми, позволяващи насочено освобождаване на енкапсулираните лекарства в резултат на стимул от страна на организма (напр. промяна в рН, ензимен състав и др.).

В тази връзка, идеята за оптимизиране на ефективността на доставяне на антирациклиновия антибиотик даунорубицин посредством включването му в наночастици на основата на природни, биосъвместими и биоразградими полимери - казеин и фукоидан, с потенциал за рН-зависимо прицелно освобождаване е от много съществено научно и практическо значение, което безспорно демонстрира актуалността на темата на дисертационния труд.

#### **4. Познаване на проблема**

Доказателство за познаването на проблема от докторанта може да се намери в литературния обзор на дисертационния труд, който е написан на 43 страници с включени 232 литературни източника, обем напълно достатъчен да се направи преглед на най-новите тенденции в научната област на дисертацията. Голяма част от литературните източници са от последните 5 години, което илюстрира задълбочен поглед върху съвременното състояние на проблема. Обзорът е структуриран в 5 подраздела. В първия и втория раздел детайлно са разгледани основните предимства на наноразмерните носители, както и предизвикателствата, асоциирани с тях. Очертани са и най-новите тенденции в дизайна на наноразмерните платформи за лекарствено доставяне, а именно разработването на стимул-чувствителни носители с прицелно лекарствено освобождаване. В третия подраздел са показани възможностите за използване на казеин като природен био разградим и биосъвместим полимер за получаване на наночастици, посредством различни омрежващи агенти или в резултат на електростатични взаимодействия с подходящи полиелектролити. В следващ подраздел на обзора подробно са описани перспективите на разпръсквателното сушене като метод за получаване на възпроизводимии популации от наноразмерни носители с висока ефективност на натоварване с лекарства и оптимални физикохимични характеристики. В последния раздел са разгледани фармакологичните свойства на даунорубицина и приложението му в противотуморната химиотерапия, както и подходите за намаляване на тежестта на нежеланите му ефекти, посредством енкапсулирането му в наноразмерни носители.

Литературният обзор е много добре и логично структуриран, като логично са обобщени съвременните тенденции в дизайна на наноразмерните носители, което е доказателство за добрата теоретична подготовка и познаването на проблема от дисертанта.

#### **5. Методика на изследването**

Разделът „Материали и методи“ в дисертационния труд е написан много добре и достатъчно подробно, за да позволи лесното възпроизвеждане на описаните методики. Прави впечатление подходящо подбрания експериментален дизайн и използването на съвременни методи за получаването и охарактеризирането на натоварените с даунорубицин наночастици. Дисертантът е използвал и предимствата на мултифакториалния дизайн за оценка на едновременното влияние на няколко променливи върху ключови характеристики на получените носители, което позволява избора на оптимални технологични параметри за получаване на възпроизводимии популации от наночастици с висока ефективност на натоварване и желани физикохимични характе-

ристики. Всичко това дава възможност за получаване на коректни резултати и провеждане на изследванията на високо научно ниво.

#### **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е написан на 156 страници, онагледен е с 20 таблици и 50 фигури, цитирани са 232 литературни източника. Научният труд включва следните раздели: въведение, съдържание, списък с използвани съкращения, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи, приноси и литература. Структурата на отделните части е подходяща, като отделните подсекции следват логиката на извършената експериментална работа и коментират резултатите.

Целта на дисертационния труд е добре формулирана и е резултат от критичния анализ на научната литература по темата на дисертацията, направен в литературния обзор. За практическото реализиране на поставената цел, ясно и коректно са формулирани осем задачи, решаването на които дава възможност за постигане на приложими в практиката резултати.

Безспорно най-важна част от дисертационния труд са резултатите от собствените изследвания и обсъждането им, които са описани в 62 страници и са богато онагледени с 37 фигури и 16 таблици. Експерименталните резултати следват логично изпълнението на поставените задачи и са проведени в следните направления:

- Разработване и детайлно охарактеризиране на празни и натоварени с даунорубицин казеинови наночастици. Като основен метод за получаването им Николай Захариев използва метода на коацервация с последващо разпръсквателно сушене. За извеждане на оптимални условия за получаване на наночастици с висока ефективност на натоварване и желани физикохимични характеристики, докторантът е използвал пълен  $3^2$  факториален дизайн. В резултат на проведения анализ е установено, че най-голямо влияние върху добива на наночастици, техните размери и ефективност на натоварване оказва концентрацията на казеина и на омрежващия агент – с оптимални концентрации от 1% и 1.5 M, за казеин и  $\text{CaCl}_2$ , съответно.
- На основата на този оптимален състав са приготвени натоварени с даунорубицин наночастици, като са изследвани различни съотношения полимер: даунорубицин и на основата на получените данни за ефективността и капацитета на натоварване докторантът е извел като оптимално съотношение полимер:даунорубицин 25:1.
- Пригответените наночастици са подложени на детайлно физикохимично охарактеризиране, като е установено, че концентрацията на полимера и омрежващия агент влияят и върху морфологията на получените частици. Те са плътни и сферични при по-високите концентрации на казеин и омрежващ агент и тороидна форма при най-ниските изследвани концентрации.
- При проследяване на профилите на освобождаване е установено рН зависимо разтваряне и освобождаване на даунорубицин при някои от разработените състави. Това дава основание на докторанта да продължи изследванията в посока разработване на наносистеми с насочено доставяне на даунорубицин до туморния интерстициум, което логично се изразява в разработването на втори вид наноносители на основата на казеин и фукоидан, като хипотезата е, че модифицирането на повърхността на казеиновите частици с обвивка от фукоидан, ще доведе до забавяне на освобождаването на даунорубицин в условията на системната циркулация, като същевременно ще осигури контролирано освобождаване в туморния интерс-

тициум. Тези композитни наночастици са получени чрез полиелектролитно комплексобразуване и омрежване на получените комплекси с глутаралдехид и последващо разпръсквателно сушене. В това направление на изследванията основен принос на докторанта е извеждането на оптимален състав на наночастиците (съотношение на казеин и фукоидан), както и на оптимални технологични параметри за получаване на частици със желани физикохимични характеристики и висока ефективност на натоварване. В резултат на проведенния факториален дизайн е изведен математически модел, който се характеризира с много добра корелация между прогнозните и получените експериментални данни, което е от изключително практическо значение и позволява точно предсказване на отговора при различни нива на вариране на технологичните параметри.

- На следващ етап от разработването на дисертационния труд е проведено детайлно онкофармакологично проучване на оптимални модели, натоварени с даунорубицин наночастици в сравнителен аспект спрямо свободен даунорубицин. Получените резултати показват, че включването на даунорубицин в разработените наноносители е съпроводено с оптимизиране на цитотоксичната му активност. Изследван е и е доказан механизма, по който разработените наноразмерни лекарство-доставящи системи предизвикват ерадикация на третираните туморни клетки, а именно генериране на ROS и нарушаване интегритета на митохондриалните мембрани и компрометиране на нормалното функциониране на тези клетъчни органи. Изследвано е и влиянието на разработените наносистеми върху спонтанната съкратителна активност на гладко мускулни препарати от морски свинчета.

Получените от докторанта резултати показват безспорния потенциал на разработените наноносители като перспективни наноплатформи за насочено доставяне на даунорубицин.

При анализа на дисертационния труд добро впечатление ми направи умелото анализиране и обсъждане от страна на Николай Захариев на получените резултати и очертаване на основни наблюдавани тенденции, което показва задълбоченото познаване на материята от докторанта.

В резултат на подходящо подбрения експериментален дизайн, правилното провеждане на изследването и коректното интерпретиране на данните, са направени 8 извода, отразяващи ясно и пълно получените резултати.

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

Приносите на дисертационния труд, обобщени от докторанта, са 5, които бих разделила на 4 приноса с научно-теоретичен и 1 с научно-практичен характер. Аз искам да обърна внимание на 3 от тях, които считам за особено важни:

- За първи път са разработени и детайлно охарактеризирани наносители за насочено доставяне на даунорубицин на основата на казеин и казеин:фукоидан, характеризиращи се с оптимизирана цитотоксична активност в сравнение със свободното вещество и възможност за контролирано доставяне на цитостатика.
- За първи път е изследвана и доказана предизвикана от прилагането на казеин гладкомускулна релаксация.

- Разработен е модел за оценка на спонтанната съкратителна активност на гладки мускули, позволяващ оценка на биологичния ефект в реално време.

Считам, че приносите на дисертационния труд, са в значителна степен дело на докторанта, разбира се под нещото ръководство на неговия научен ръководител – доц. Бисера Пиличева. За значимостта на разработката и перспективите за практическата реализация на разработените наноситеми свидетелства и реализираният полезен модел.

#### **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд и лично участие на докторанта**

Във връзка с процедурата по защита на дисертацията си, докторантът, Николай Захариев, представя 3 (три) публикации, обобщаващи по-важните резултати от проведените изследвания. Следва да се отбележи, че и трите статии са в списания с висок импакт фактор и ранг Q1 за полимерна наука и фармация, а при направена цитатна справка са установени общо 14 цитирания, което показва недвусмислено значимостта и актуалността на проведените изследвания. Николай Захариев е представил съобщения по темата на дисертацията на шест национални и международни научни форуми.

Следва да се отбележи, че както в реализираните по дисертацията публикации, така и в съобщенията от научните форуми, докторантът е първи автор, което отново свидетелства за значителния принос и личното участие на Николай Захариев при разработването на дисертационния труд.

За желанието на докторанта да се усъвършенства и развива като независим и ерудиран млад изследовател свидетелства и участието му в три научни проекта, като в един от тях е водещ изследовател.

#### **9. Автореферат**

Авторефератът има обем 66 страници като включва поставената цел и задачи, използваните методи, получените собствени резултати и адекватна дискусия по тях, направените изводи и приноси. Изготвен е съгласно изискванията, залегнали в релевантните нормативни документи, и е напълно в съответствие с представения ми за рецензиране дисертационен труд.

#### **10. Критични забележки и препоръки**

Дисертацията е написана на много добър научен език, лесно се следва логичната последователност в проведените експерименти и резултатите от тях, което прави труда изключително информативен и четивен.

Нямам съществени забележки по дисертационния труд, а само една препоръка за бъдещи изследвания на докторанта по тематиката. Предвид изразената колоидна нестабилност на наноразмерните носители, интегрален елемент от детайлното технологично и биофармацевтично охарактеризиране на наноразмерни носители е проследяването на стабилността им в процеса на съхранение и прогнозиране на срока на годност. В тази връзка препоръката ми към докторанта, при бъдещи подобни разработки, е да планира и провежда изследвания по стабилност с цел по-голяма завършеност на цикъла по разработване на нови наноразмерни носители.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд на докторант Николай Станчев Захариев „Наноразмерни носители за насочена доставка на лекарства за противотуморната терапия“ съдържа оригинални резултати с принос в оптимизирането на насоченото доставяне на вещества с ниска терапевтична ширина. Задълбоченият анализ и безспорното качество на дисертационния труд показват, че докторантът притежава задълбочени теоретични познания и професионални умения в областта на научната специалност „Технология на лекарствените форми и биофармация“ и по-специално в разработването и охарактеризирането на наноразмерни лекарство-доставящи системи. Николай Захариев показва ерудиция и професионални умения за самостоятелното формулиране на научни хипотези, провеждане на изследвания и коректно обобщаване и тълкуване на получените резултати.

Дисертационният труд отговаря на заложените изисквания в ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на МУ - Пловдив. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на МУ – Пловдив за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“.

Въз основа на гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** на дисертационния труд и **препоръчвам на почитаемите членове на научното жури да гласуват за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на Николай Станчев Захариев по професионално направление 7.3 Фармация и научната специалност „Технология на лекарствените форми и биофармация“**

16.05.2024г.

София

Рецензент: .....

/Проф. Деница Момекова, дфн/

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