

## **РЕЦЕНЗИЯ**

на дисертационен труд на Галина Георгиева Григорова на тема „Синтез на нови биологично активни съединения и изпитване на техните свойства” за присъждане на образователна и научна степен „доктор” по професионално направление „Биотехнологии”, научна специалност 02.11.11 „Технология на биологично активни вещества”

**Рецензент: проф. д-н Цонка Иванова Годжевъргова**

**Катедра Биотехнология при Университет „проф. д-р А. Златаров”**

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд се отнася до синтез на нови биологично-активни съединения, тяхното охарактеризиране и изследване на антимикробната им активност.

### **1. Актуалност на проблема**

Връзката между химичния строеж на съединенията и тяхното биологично действие представлява голям теоретичен интерес за разкриване природата на онези биохимични процеси, които стоят в основата на биологичните явления. Несъмнен интерес представляват свободните радикали в изучаването на редица биологични проблеми като канцерогенезата, повлияването на туморния растеж, биологията на стареенето и редица други. В тази връзка синтеза на нови биологично-активни съединения като модифициран рифамицин и негови производни в предоставеният ми за рецензия дисертационен труд е актуален въпрос с теоретично и практическо значение.

### **2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите**

Дисертацията е структурирана и написана по общоприетия начин с обем 107 страници. Тя съдържа разделите: литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи, литература, списък на публикациите свързани с дисертационната работа. Онагледена е с 7 таблици, 21 фигури и 17 схеми.

Дисертантката прави своя обзор въз основа на 96 литературни източници. Техният преглед в началото на дисертацията е разположен на 41 страници и ясно показва, че тя познава състоянието на проблема в световен мащаб. Обзорът разглежда въпроси относно антибактериалната активност на рифамицин, използването на нитроксилните радикали, образуване на свободни радикали при метаболизма на някои ксенобиотици и спин белязани алкилиращи противотуморни съединения. Дисертационният труд би спечелил, ако в края на литературния обзор имаше ясно очертани изводи какво е постигнато от други автори по разработваната тема, какво не е направено и кои от нерешените задачи ще бъдат решени от дисертантката.

**Основната цел** на дисертационния труд е да се синтезира модифициран Рифамицин SV, да се получат и охарактеризират комплексни съединения на 2,2,6,6-тетраметил-4-амино-пиперидин-1-оксил (ТМРО) и 2,2,6,6-тетраметил-4-амино-пиперидин (ТМАР) и да се изследва тяхната антибактериална активност. За постигането на тази цел са дефинирани шест задачи. Те биха звучали по-добре, ако са подредени според последователността на експериментите, изложени в резултати и обсъждане. В материали и методи са описани много подробно методиките и анализите, използвани при провеждане на експериментите. Липсва само методиката за изследване влиянието на рифамицин и негови производни с ТМРО и ТМАР върху растежа на култивирани туморни клетки или да бъде посочен литературен източник за тази методика и къде са направени тези изследвания.

Изследователската част на дисертационния труд може да се раздели в три основни направления:

*1. Получаване на спин белязани четвъртични амониеви соли, цистеин и рифамицин и тяхното охарактеризиране*

По първо направление дисертантката е получила най-напред стабилен радикал на 2,2,6,6-тетраметил-4-аминопиперидин-1-оксил, наречен ТМРО. На базата на това съединение са получени спин белязани четвъртични амониеви соли, цистеин и рифамицин. За доказване синтеза на тези съединения са изследвани техните инфрачервени спектри. Един от най-значимите резултати в дисертационния труд е синтезирането на спин белязан рифамицин и неговия амин. Нитроксилният радикал на

модифицирания рифамицин с ТМРО е доказан чрез ЕПР анализ. Установените основни фрагменти чрез маспектроскопия и представените химични отмествания на протоните при всичките 47 въглеродни атоми чрез ЯМР потвърждават модифицирането на рифамицина с ТМРО.

## *2. Получаване на спин белязани метални комплекси и тяхното охарактеризиране*

По второто направление дисертантката е получила редица метални комплекси. Първо са синтезирани спин белязани комплекси на ТМРО с ванадил сулфат, натриев молибдат и меден сулфат и са представени тяхните ИЧ спектри. След това са получени комплекси на ТМАР с натриев волфрамат, ванадил сулфат, сребърен нитрат, железен хлорид и кобалтов хлорид и е доказана тяхната структура чрез ИЧ-ФТ спектроскопия. Получени са и комплекси на рифамицин с цинк и мед, но те са доказани чрез УВ спектри, тъй като при ИЧ спектри не са получени съществени разлики преди и след комплексообразуването.

## *3. Изследване на антибактериална активност на рифамицин, рафимицин+ТМРО, рафимицин+ТМАР и комплекси между ТМРО и ТМАР с някои тежки метали*

Тази част на дисертационният труд е съществена, тъй като тя показва практическото приложение на синтезираните биологично активни съединения. Дисертантката е установила, че рифамицинът има най-голям инхибиращ ефект върху растежа на клетки на *E.coli* в сравнение с модифицирания рифамицин и всички останали изследвани комплекси на тежките метали. Прави впечатление при изследване на инхибиращия ефект на комплексите на тежките метали, че определяща роля играе вида на металния йон. Така най-силен инхибиращ ефект имат комплексите на медните и цинкови йони. Интересни са получените резултати за антибактериална активност на рифамицин и негови производни с ТМРО и ТМАР ин витро срещу широк спектър грам положителни и грам-отрицателни микроорганизми, включително и туберколожни микроорганизми. Установено е, че модифицирания рифамицин е четири пъти по-активен спрямо *Mycobacterium tuberculosis* в сравнение със самия рифамицин. Същите съединения са изследвани за противотуморно действие ин витро върху култивирани туморни клетки. Доказано е 85% подтискане на преживяемостта на тези туморни клетки. Установено е, че

спин белязания рифамицин има по-ниска токсичност от самия рифамицин. Накрая дисертантката е използвала невронни мрежи – един съвременен, перспективен метод за предсказване на натрупването на биомаса в присъствие на комплекси на ТМРО с йони на тежки метали. Тези резултати са представени в табл. 6 и 7, но е пропуснато да се впише вида на микроорганизмите.

Като цяло, в дисертационния труд са получени много експериментални резултати, използвани са съвременни методи за анализ, получени са интересни резултати, но се чувства необходимостта от по-подробно тълкуване на резултатите и търсене на връзката между химичния строеж на съединенията и тяхното биологично действие. В дисертационният труд има технически грешки.

В заключителната част са направени 8 изводи, в които са резюмирани резултатите от изследванията по поставените задачи. Те са точни, ясни и произтичат изцяло от експерименталните резултати.

### **3. Характеристика и оценка на приносите на дисертационния труд**

Научните постижения в дисертационния труд са представени чрез формулираните шест научно-приложни приноси. Към най-значимите **приноси** на дисертационния труд могат да се отнесат:

1. За първи път е получен спин белязан рифамицин, който проявява висока антибактериална активност *in vitro* срещу *Mycobacterium tuberculosis* и *Staphylococcus aureus*.
2. Рифамицинът, модифицираният рифамицин и спин белязаният рифамицин показват 85% подтискане на преживяемостта на култивирани туморни клетки.
3. При изследване токсичното действие *in vivo* е доказано, че нитроксидните стабилни радикали намаляват токсичността на рифамицина изразена като средна летална доза.
4. Получените спин белязани четвъртични амониеви соли с подходящи въглеводородни остатъци са високо активни антимикробни съединения.

### **4. Мнение за публикациите на дисертантката по темата на дисертационния труд.**

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 4 публикации - две публикации в чужди списания (Фармация с импакт фактор 0,962 за 2012 г. и периодично издание на Полската академия на науките), една

публикация в Годишника на Университет „проф. д-р А. Златаров”, една в сборник на Международна конференция „Образование, наука, икономика и технологии”, Бургас. Дисертантката има 1 цитат. Статиите са в съавторство, но в три от публикациите дисертантката е на първо място, а в четвъртата е на трето място. Няма никакво съмнение, че дисертантката е самостоятелна. Тя е участвала в две международни конференции и това е доказателство за популяризиране на научните резултати.

## **5. Оценка на съответствието между автореферата и дисертацията**

Авторефератът е в обем 46 страници и е със структура и съдържание, съответстващи на дисертационния труд.

Държа да отбележа, че направените бележки в рецензията не са от съществен характер и не влияят по никакъв начин върху общото ми впечатление за една добре извършена работа от дисертантката. Освен това извършена е голяма по обем експериментална работа и съответно са налице значителни научно-приложни приноси. Галина Григорова се е запознала и използвала редица съвременни методи за анализ - Инфрачервена спектроскопия, Абсорбционна спектроскопия, Електронен парамагнитен резонанс, Ядрено магнитен резонанс, Масспектроскопия. Убедена съм, че дисертационният труд е лично дело на дисертантката и я представя като изследовател, умело съчетаващ методите за синтез на редица биологично-активни вещества и изследване на тяхните антибактериални свойства.

## **6. Въпроси и препоръки към дисертантката:**

1. В много литературни източници са изследвани инхибиращите капацитети на различни тежки метали и са установени техните редове по степен на инхибиране на растежа на редица видове микроорганизми. Има ли разлика между инхибиращия капацитет на изследваните от вас спин белязани метални комплекси с този на съответните чисти метални соли?

2. Защо сте използвали различни метални йони при синтезирането на комплекси на ТМРО, ТМАР и рифамицин? Според мен, така трудно може да се направи сравнение на антибактериалната им активност и на влиянието на вида на органичната част на комплексите върху антибактериалната им активност.

3. На базата на колко опита са представени резултатите в колоните 2-6 от таблица 6?

4. Обяснете, защо при изследване на антибактериална активност, модифицираният рифамицин има по-голям ефект от рифамицин, докато при изследване на подтискането растежа на култивираните туморни клетки обратно.

### **Заклучение**

В дисертационния труд на Галина Георгиева Григорова се разглеждат важни и актуални научно-приложни въпроси. В процеса на разработване на дисертацията си Галина Григорова е разширила и задълбочила своите знания в областта на получаване на нови биологично активни вещества. По начина на разработване, структура, обем и съдържание и постигнати научно-приложни приноси, представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за неговото прилагане, както и на съответния Правилник на Университет „проф. д-р Асен Златаров” - Бургас. Всичко това ми дава основание да дам положителна оценка на дисертационния труд и да препоръчам на Научното жури да присъди на **Галина Георгиева Григорова** образователна и научна степен „доктор” по професионално направление Биотехнологии, научна специалност **02.11.11 „Технология на биологично активните вещества (включително ензими, хормони, белтъци)”**.

16 септември 2013 г.

Бургас

Рецензент:



/проф. д-р Ц. Годжевъргова/