

# РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на доц. д-р **Георги Георгиев Йорданов**,  
на тема **„Нанотехнологии за лекарствни доставяне: Получаване и  
охарактеризиране на полимерни наночастици за биомедицински  
приложения“**,

представен за присъждане на научната степен **„доктор на науките“**

по професионално направление **4.2. Химически науки**

**Рецензент:** проф. дхн Георги Стефанов Георгиев, определен за член на научното жури със заповед № РД 38-726/05.12.2017 г. на господин Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски“

## 1. Описание на представените материали

За участие в процедурата дисертантът е представил: автобиография; копия от дипломи за бакалавърската степен „Химик“, за магистърската степен „Наноматериали и нанотехнологии“ и за образователна и научна степен „Доктор“ (номер 34159), декларации-съгласия на съавторите му (колегите Ангелова, Беджова, Скробанска и Евангелатов) за използване на съвместните им публикации в обсъждания дисертационен труд, автореферат; копия на 26 научни публикации (2 глави на издадени в чужбина научни книги, 15 публикации в индексирани списания и 9 - в неиндексирани такива), списък на 33 участия в национални и международни научни форуми (в 3 от тях той е поканен лектор), списък на 135 цитирания до края на м. октомври 2017 год.

## 2. Кратки биографични данни

Според автобиографията му общият брой на публикациите му е по-голям от 50, а този на цитатите му - по-голям от 300. Заслужават специално отбелязване дипломата му с отличие за завършено средно специално образование по природни науки и математика, двете бронзови отличия на международните олимпиади по химия в Дания (2000 г.) и Индия (2001 г.), наградата за изявен млад учен по полимери „Иван Шопов“ (2011 г.), наградата за най-добър млад учен на СУ „Св. Кл. Охридски“ за 2013 г. и голямата национална награда „Питагор“ за млад учен за 2014 г.

Професионалната му кариера досега е следната: след завършване на магистратурата през 2006 г. е докторант в ФХФ към СУ „Св. Кл. Охридски“ и след успешна защита на дисертационния си труд спечелва конкурс за асистент в същия факултет. До 2014 г. е главен асистент, а през 2014 г. се хабилитира и досега е доцент към катедра Неорганична химия. Специализирал е в Испания, Япония и Словакия.

## 3. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 221 страници, съдържа 109 фигури и 17 таблици, списъци на използваните съкращения (2 стр.) и на 390 литературни източника (31 стр.). Като се извади обемът, предоставен на тези и други необходими, но спомагателни за всяка дисертация съставни части, се получава, че съдържателната част на труда е изложена на 186 страници. От тях 42 страници са отредени на литературната справка и затова получените резултати са представени и обсъдени на 144 страници. Този обем е малък за обявената в заглавието на труда широка междудисциплинарна тема (Полимерни наночастици за биомедицински приложения) и е сигнал за безпокойство за съответствието между претенциозно заглавие и реални резултати и постижения.

Трудът е подразделен на 6 части: **а.** увод; **б.** кратък литературен обзор на стратегиите за доставяне на лекарства в наномедицината; **в.** поли(алкилцианакрилатни) наночастици като носители за лекарствени вещества; **г.** поли(стирен-съ-малеинова киселина) наночастици като такива носители; **д.** заключение; **е.** приноси. Основните резултати на труда са представени и обсъдени в третата и четвъртата, посочени по-горе, части. По-пълно е разработена **третата част** - тази за поли(алкилцианакрилатните) наноносители. Обсъдени са методите за получаване на този вид наноносители в „свободно“ (ненатоварено с лекарствено вещество) състояние, флуоресцентно маркирани с родамин-6G такива, както и натоварени с антибиотици (цефалексин и ципрофлоксацин), с антимикотика еконазол и с антираковите цитостатици хлорамбуцил, етопозид, епирубицин. При това, последният от посочените цитостатици е включен в поли(бутилцианакрилатните) наноносители по три различни метода: чрез полимеризация в смес от вода и ацетон, чрез нанопреципитация и чрез преполимеризация. Сравнени са *in-vitro* ефектите на получените по последния метод (преполимеризационен) поли(бутилцианакрилатни)-епирубицин наночастици върху жизнеспособността на A549 белодробни аденокарциномни клетки и на HeLa клетки, изолирани от цервикално-карциномна тъкан, което предава малко по-завършен вид на тази част от дисертацията. **Четвъртата част** включва полимераналогичното превръщане на поли(стирен-съ-маленов анхидрида) в амфифилния поли(стирен-съ-малеинова киселина) (ПСМК), утаително получаване на ПСМК-наночастици от съполимерен ацетонов разтвор във фосфатен буфер при pH 7.4 и включване на епирубицина в получените ПСМК-наночастици чрез просто смесване на дисперсията от тези наночастици с воден разтвор на епирубицина.

Особен интерес (най-малкото от методична гледна точка) преставяват 2 подраздела (първият е включен в края на третата част, а вторият – в края на четвъртата част). В първия са представени и сравнени резултати за взаимодействието на основните протеинови компоненти на кръвната плазма (човешки серумен албумин, имуноглобулин-G и фибриноген) с поли(бутилцианакрилатни) наночастици без и с епирибидин (широкоспектърен антрациклинов антираков цитостатик), получени с помощта на повърхностен плазмонен резонанс (ППР, стр. 145-157). Вторият включва резултати по синтеза на наночастици от смеси на поли(бутилцианакрилат) с поли(стирен-съ-малеинов анхидрид) и тяхното приложение като носители на посочения по-горе епирибидин (стр. 178-188).

Уводът е много кратък. Изложен е на една и половина страници като на половин страница са описани сътрудничеството на колежата Йорданов със съавторите на работите му и проектите, по които са получени необходимите за изследванията инвестиции. Дефинирана е и **целта на труда: Получаване и охарактеризиране на нови колоидни лекарствени форми на антибиотици, антимикоцитици и цитостатици на основата поли(алкилцианакрилатни) и поли(стирен-съ-малеинова киселина) наночастици.** Изложената на една страница аргументация на тази цел е неубедителна. Би било по-уместно целта да се дефинира след детайлна литературна справка, открояваща постиженията и преди всичко проблемите по получаването, приложенията и ефективността на този тип нанополимерни лекарствени форми. Това би позволило конкретизиране на задачите, обезпечаващи достигането на целта. С определението „нови“ дефинираната цел е „широко отворена врата“ за новости в методиките за получаване, в комбинациите „полимер-лекарствено вещество-стабилизатор на дисперсията“, в характеристиките на наночастиците, в резултатите от *in vitro*-, предклинични и клинични изпитания. Липсва фокус на целта, възможен резултат от неизвършен анализ на достъпната литературна информация. Следствието от така дефинираната цел е впечатлението, че в работата се разчита на случайно попадение на наноразмерна лекарствена форма със значим терапевтичен ефект, който би оправдал консумирани интелект, време, усилия и инвестиции за извършените изследвания. Емпиричен подход, характерен за много специалисти по медицинска химия, посветили се на откриването и налагането на нови лекарствени субстанции без да ползват възможностите на теоретични и изчислителни подходи (QSAR/QSPR, компютърен дизайн на мутагенни прифили, комбинаторна химия) в работите си с цел намаляване обема на синтетичните и охарактеризиращи експерименти. Изпреварвайки представения по-долу анализ, резултатите от обсъжданото изследване не притежават такъв изключителен принос, което ги лишава от фундаментална и теоретична значимост. Работата по-скоро е със стойност на натрупване на подкрепящи и частично на надграждащи предишни резултати изследване. За съжаление, споменатото по-горе първично впечатление се затвърждава след запознаване с представената във втората част литературна справка.

Справката (22 стр.) е върху взаимодействието на наночастици с протеини, принципите за дооставка на лекарствени вещества чрез наночастици (опсонизация и свързване с фагоцитарни клетки, ефект на увеличена проницаемост и задържане (EPR ефект)), токсичност на наночастиците. Безспорно е, че това са важни раздели на нанофармацията и авторът на дисертацията демонстрира познания в тези нехимични области, изискващи самообразование от страна на химика. Мярата обаче е изместена защото справката за получаването и приложението на полимерните наночастици е най-малка по обем (2 стр.). А това е същността на обсъжданата работа. Това изключва посочения по-горе, необходим за конкретизиране на целта, анализ на постижения и проблеми в това направление. Ето данни от „нета“, потвърждаващи това предположение: Справките за “Polymer nanoparticles for nanomedicines. A guide for their design” са 319000, за “Polymer nanoparticle preparation technique and size-controlled parameters” са 1830000, за “Polymer nanoparticles for drug delivery” – 1190000, за “Polymer nanoparticles for smart drug delivery” – 1150000, за „Polymer nanoparticles synthesis and novel application“ – 4380000, за “Theranostic polymer nanoparticles” (наночастици с комбинирани терапевтични и диагностични възможности) – 351000, за „Targeting theranostic polymer nanoparticles”:-301000 и за ”Polymer nanoparticles for personalized medicine” – 250000. Нека само 1 процент от този огромен обем от справки да представлява научен интерес, пак тяхното систематизиране и анализ е невъзможно да се вмести в отредените 2 страници. Съществено е, че част от посочените теми (например тези за полимерните наночастици за интелигентно доставяне на лекарствени вещества, за комбинираното терапевтично и диагностично приложение, за приложение в персонализираната медицина) са много по близо до фронтвата

линия на изследванията и приложенията в това направление от това, което се представя в обсъжданата работа. Заслужава отбелязване също нецитираната книга “Polymer nanoparticles for nanomedicines. A guide for their design”, излязлата през 2016 под редакцията на С. Vauthier (директор на CNRS-център в университета Париж-юг и редактор на списанието “Pharmaceutical Research”) и на G. Ponchel. Обзор от 2003 г. на С. Vauthier и сътр. е цитиран в обсъжданата работа (цитат под номер 356). Защо поостарелият обзор е предпочетен пред по-съвременната книга с много повече и с по-актуална информация е за мен загадка. Ясно става, че обсъдената кратка, но много широка по тематичен обхват, литературна справка не подпомага конкретизирането на целта и на задачите на изследването. Остава надеждата, че очакваните систематика и анализ на извършените до и по време на обсъжданото изследване се съдържат в литературните справки в началото на всяка от съдържателните трета и четвърта части на работата.

Специализираната справка за поли(алкилцианакрилатните) (ПАЦА) наночастици като носители на лекарствени вещества е 13 страници. Обсъдени са резултати на около 15 изследвания около 45 изследвания на методите за получаване на ПАЦА-наночастици чрез дисперсионна полимерзация (главно по анионен механизъм) и наноутаяване, взаимодействието на този вид наночастици с протеини и включването на антимикробни лекарства и цитостатици в тях и токсичността на този вид наночастици. Отбелязани са постижения, включително и достигания до клинично изпитание-фаза III доксорубин, включен в поли(изохексилцианакрилатни) наночастици под търговското име Livatag®. Но анализ на достигнатото с открояване на проблемите и тук не се открива. Към това следва отново да се добави констатацията, че справката е далеч от пълнота. Например справките в „нета“ за “Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for anticancer drugs” са 26500, а за “Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for antimicrobial drugs” са 16200. Подобна е ситуацията и със специализираната справка за наночастици на поли(стирен-съ-малеиновата) киселина (ПСМА). Тя е 6 страници, ползва около 15 източника, главно изследвания на Maeda и сътр. - основоположник на EPR-ефекта. Допуснато е повторно описание на този ефект, описан подробно в началото на дисертацията (стр. 20-23). Впрочем, Maeda демонстрира този ефект тъкмо с ПСМА-наночастици, откъдето авторът е взаимодействал използването на този амфифилен съполимер. Представени са положителни резултати от предклинични изследвания на тези наночастици за доставка на цитостатици (антрациклини, танеспимицин, цинк-порфиринов комплекс), както и тяхната способност да стимулират макрофаговата активност. Посочени са работи, деклариращи липсата на токсичен ефект на ПСМА-наночастици, въпреки че метаболитният профил на този съполимер е неизвестен и крайно интересен, а биоразграждането засяга само страничните вериги на съполимера. Интересен, защото диметилсулфоксидният разтвор на полу(стирен-съ-малеинов анхидрид) (предшественика на ПСМА) е лекарство с революционна значимост (с клиника на фаза 3 и предложено от S. Guha от университета в Делхи) за контролиране на човешката раждаемост чрез обратимо и контролирано инхибиране на мъжката сперма (RISUG). Лека (нехирургична), обратима, евтина и контролирана мъжка стерилизация – мечта за голяма част от човечеството, включително и за нашата страна. Друга, крайно интересна изява на физиологичната активност на използвания в обсъжданата работа ПСМА с избраното молно отношение на мономерните звена (3/1 в полза на стирена) и M=2000 Da демонстрира неговият продажен продукт (Lipodisq®, Merck), регистриран от Malvern Cosmetics Ltd. Той формира уникални дисковидни наночастици с мембранните липиди (с размер около 10 nm) и е в основата на най-модерни технологии за изолиране и изследване на мембранни протеини. Загадка е, че този продажен съполимер не е цитиран и използван в обсъжданата работа и, че не е направен поне опит за прилагане на разработените Lipodisq®-нанотехнологии за хидрофобните цитостатици и антибиотици. Това недоглеждане подкрепя нееднократно изразеното вече безпокойство за липсата на пълна справка за извършеното по избраните в работата проблеми. Ето какво показва справката от „нета“ по тези проблеми: за „Poly(styrene-co-maleic acid)” - 1570000 справки, за „Poly(styrene-co-maleic acid) nanoparticles” – 328000, а „Poly(styrene-co-maleic acid) nanoparticles for drug delivery”- 157000 справки. Видно е отново, че и тази справка е с много празноти и не може да бъде сигурна основа за дефиниране на конкретни и значими задачи.

Предстои анализ на посочените по-горе съществени (трета и четвърта) части на дисертацията. Отразените в тях изследвания ползват обща методология: получаване на полимерни наночастици (чрез дисперсионна полимерзация, утаяване или чрез преполимеризация), изолиране и пречистване на наночастиците, включване на лекарственото вещество в наночастиците (ако то не е включено по време на полимеризацията или утаяването), определяне размера, разпределението по размер и на повърхностния заряд

на наночастиците, на ефективността на включване на лекарственото вещество и на неговата масова част в наночастиците и на скоростта на отделянето му водна среда и условия, имитиращи физиологичните. На част от пробите лекарствени вещества *in vitro* са определени и сравнени ефектите на лекарствните вещества (свободни или включени в наносител) върху клетки от злокачествени образувания, а на още по-малка част наночастици – взаимодействието с основните протеини на кръвната плазма. В тази обща методична схема е пропуснато определянето на добива на наночастици по полимер, което би открито загубите на полимера при формирането на наночастици – необходима информация за икономиката и приложимостта на нанодиспергирането. Заслужава обаче насърчително отбелязване заслугата на автора на труда да обезпечи реализирането на трудноизпълнима за нашите условия верижка от широк набор от експериментални методи за получаването, стабилизирането и охарактеризирането на полимерните наночастици: химически (синтез на полимери чрез емулсионна и суспензионна полимеризация, методи за тяхното изолиране и пречистване, полимераналогични превръщания чрез хидролиза и чрез карбодиимиден метод, стабилизиране на дисперсиите чрез нискомолекулни повърхностноактивни вещества и чрез полимерни стерични стабилизатори, тънкослойна и гелово-проникваща хроматография) физични (динамично лазерно светлоразсейване (ДЛС), УВ-, ИЧ- и ЯМР-спектроскопии, флуоресцентна микроскопия, електронна микроскопия в двете и модификации (сканираща и трансмисионна), повърхностен плазмонен резонанс) и биохимични (изолиране и грамотно боравене с карциномни клетки, МТТ-анализ (с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид) за определяне на преживяемостта на клетки, Western blot анализи за определяне активността на каспаза-3 и на протеина Р-53). Насърчителното е, че претендентът не само проектира и ползва с различна степен на компетентност посочените методи, но и, че е успял да организира плодотворна съвместна изследователска работа както с колеги от ФХФ, така и с колеги от Биологическия факултет и от Словакия. Предстои обаче още по-тежкото предизвикателство в това направление, това за скъпите предклинични и клинични изпитания на избрани и заслужили това лекарствени наноформи.

Интерпретацията на получените резултати е предпазлива и внимателна. Посочени са установени неясноти като са направени отправки за бъдещи изследвания за изясняването им. Често като критерий за истинност на получени ависимости са използвано наличието на подобни, плучени от други автори зависимости. Едва ли това е най-надежното доказателство, но драстични, пораждащи остро неприемане предположения и обяснения, не са забелязани. Далеч не всички обяснения са безспорни и за част от тях ще стане дума малко по-надолу.

#### **4. Основни приноси**

1. Получени са наноразмерни лекарствени форми на цефалексин, ципрофлоксацин, еконазол, хлорамбуцил и етопозид включени чрез анионна полимеризация на етилцианакрилат и бутилцианакрилат. Ползена е информацията за влиянието на концентрацията на мономера, лекарственото вещество, вида и концентрацията на повърхностно-активното вещество и рН както върху наноформирането, така и върху посочените по-горе характеристики на наночастиците и дифузията навключените в тях лекарствени субстанции.

2. Адаптирани са утаителни методики за получаване на поли(бутилцианакрилатни) наночастици, натоварени в различна степен с хлорамбуцил, еконазол и епирубицин. По този начин се преодолява възможно взаимодействие между лекарствена субстанция и мономер или нарастваща полимерна молекула по време на полимеризацията и се разкрива допълнителна възможност за намаляване размера на наночастиците..

3. Подобна адаптация е реализирана и за методиката за включване на епирубицина в поли(бутилцианакрилатни) наночастици чрез преполимеризация.

4. Ползена е опитната информация за взаимодействието на основните протеини на кръвната плазма (човешки серумен албумин, фиброниген и имуноглобулин-) с наноразмерните поли(бутилцианакрилатни) наночастици без и с включен в тях епирубицин с помощта на метода на повърхностен плазмонен резонанс.

5. Установената цитотоксичност на чист поли(бутилцианакрилат) спрямо A549- и HeLa-карциномни клетки (Фиг. 63, 78 и 81), поставящо под съмнение общоприетото, но недоказано с пълен мутагенен профил твърдение за нетоксичност на поли(алкицианакрилатите).

6. Плодотворната комбинация на флуоресцентна (Фиг. 79, 80 и 82) и електронна (ТЕМ, Фиг. 83) микроскопии за проследяване разпределението на епирубицина вътре в HeLa-карциномните клетки като са регистрирани съществени разлики в това разпределение в зависимост от това дали лекарството е въведено без носител или е включено в полимерен наноносител.

7. Интересна е информацията за получаване на наночастци чрез съвместно утаяване на хидрофобния поли(бутилцианакрилат) с амфифилния поли(стирен-съ-малеинова киселина), способни да сорбират епирубицин и албумин и да формират наноагрегат с хидрофобно ядро, съдържащо епирубицин и хидрофилна обвивка.

Отбелязано бе вече, че приносите съдържат полезна информация с подкрепяща и надграждаща значимост. С по-голяма значимост е приносът 5.

## 5. Критични забележки и препоръки

### 5.1. Технологичен брак

■ Литературната справка затруднява читателя защото не е структурирана според частите на дисертацията. ■ Нарушен е принципът за автономност в текстовете под фигурите. За по-голямата част от тях се налага да се търси информация в текста (понякога на страници, отдалечени от тази на която е разположена фигурата) за да се възприеме представеното на фигурата. Пример за това е Фиг. 41, в текста под която не е посочено вида на лекарството, условията (освен температурата) при които се съхраняват поли(бутилцианакрилатни) наночастци. Читателят остава и с очакване за хипотеза за обяснение на двата локални минимума на кривата, получена при 4 °С. ■ На стр.85 и 86 две различни фигури са с еднакъв номер (43). Неточността е пренесена и в текста. ■ Списъкът на съкращенията е непълен, което затруднява читателя. ■ Справките 151 и 152 са идентични. ■ Справката 297 е за поли(пропиленсулфидни) наночастци, а не за обсъжданите в текста поли(алкицианакрилатни) такива. ■ На част от представените криви (Фиг. 16, 17, 37a, 41) „пресилено“ са фиксирани екстремумите. Един от клоновете на кривите съдържа само по една опитна точка. ■ На стр. 70 е грешно отнасянето на PEG-PEO-PEG (хомополимер) към триблоковите амфифилни съполимери. ■ На Фиг. 35 са представени резултати, получени по три различни метода. В текста под фигурата те не са идентифицирани поотделно. В показания на същата фигура ЯМР-спектър сигнал при 1.0 ppm няма, както се твърди в текста, описващ спектъра. Същото е в сила и за представения на Фиг. 49 спектър. Грешно-скалирана е абсцисата, ако се съди по Фиг. 46 ■ На много места се твърди, че са подбрани оптимални условия за различните процедури. Никъде не се посочва обаче критерият за оптималност, първата крачка при всяка оптимизационна задача ■ На Фиг. 92 се обсъждат DLS данни, показани на Фиг. 48<sup>a</sup> и 49<sup>b</sup>, а фигури с такова съдържание няма. Посочените на стр.148 Фиг. 1a и н стр. 149 Табл. 18 са също сгрешени. ■ На стр. 94 погрешно е посочена Табл. 6, намираща се на стр. 100. ■ На същата 94 стр. се обсъждат непоказани TLC хроматограми. Същото е в сила и за подобни хроматограми, дискутирани на стр. 97 и стр. 111 ■ Посочването на стр. 112 Табл.12 е неточно. Същото е в сила и за посочените на стр. 149 и 156 Табл 18, както и за Табл 19 (стр. 167). ■ Би било полезно и по-убеждаващо сравняването на представените на Фиг. 62 криви за отделяне на етопозид от наночастците с тази на дифузията на чистия етопозид. ■ Представените на Фиг. 64 флуоресцентни микрографи са трудноразбираеми. По-добре би било те да бъдат допълнени с количественото определяне на флуоресцентната интензивност ■ Не става ясно разделени ли са двете, посочени в Табл. 13, фракции поли(бутилцианакрилат), или техните ММР-характеристики са определени от представената на Фиг.70 обща хроматограма. Ако е последното, то как са разделени двата пика на хроматограмата? Хипотези за обяснение както на бимодалността на ГПХ-кривите, така и на повече от 20-кратното увеличение на молекулните маси на полимера в присъствие на епирубицин липсват. ■ Странно (меко казано) е твърдението на стр. 126 за **малко** намаляване на ефективността на включване на епирубицина в поли(бутилцианакрилатните) наночастци на основата на показаните криви на Фиг. 73<sup>b</sup>. От фигурата се вижда, че то е приблизително двукратно (от 70% на 35%). Не е ясно също откъде отново на стр. 126 е взета

тази 3.5 % масова част на епирубицина в същите наночастици след като от същата фигура (73<sup>б</sup>) се вижда, че този процент е 0.5% при ефективност на включване 35%. ■ Пропуснати са необходими цитати за Western blot analyses и за МТТ-изпитания (стр. 130), ■ Как е доказано твърдението, че показаните на Фиг. 76 разпределителни криви са логнормални? Номерацията на пробите на тази фигура не е въведена в Табл. 15. • Преходът от масови към молни концентрации на зависимостите за включения епирубицин в поли(бутилцианакрилатни) наночастици, получени чрез преполимеризация (Фиг. 75 – 77) затруднява сравняването им с подобни зависимости за наночастици, получени преди това чрез полимеризация или утаяване. ■ Данните за цитотоксичната активност на чист поли(бутилцианакрилат) спрямо HeLa карциномни клетки, показано на Фиг. 81, не противоречат ли на общоприетото, но недоказано с пълен метаболитен профил, твърдение за нетоксичност на поли(алкилцианакрилатите)? Съмнението нараства с предположението (стр. 143) за усилено радикалообразуване в клетките в присъствие на поли(бутилцианакрилат) и с установеното усиление на капсазаната-3 активност от този полимер, равна с тази на антираковия епирубицин. Не са представени опитните доказателства обаче за тази равностойност и не е ясно дали това са собствени или чужди данни. ■ Няма опитни доказателства за твърдението на стр. 142 за 50% увеличение на епирубицина в HeLa-карциномните клетки, третирани с включен епирубицин в поли(бутиленцианакрилатни) наночастици, получени чрез преполимеризация. ■ В Табл. 16 са дадени повърхностните концентрации на трета протеина на кръвната плазма върху сензорния чип на прибора. С тези концентрации протеините взаимодействат с наночастиците в обема. Не е ясно тогава защо размерността на скоростната концентрация на асоциация е  $M^{-1} s^{-1}$  (Фиг. 88). ■ Стойностите на максималния капацитет на показаните на Фиг. 87 сензограми са най-големи за фибриногена, а на хистограмите на Фиг. 89<sup>а</sup> неговите стойности са най-малки. ■ Декларацията за 10% отделяне на епирубицина от наночастици на поли(стирен-съ-малеинова киселина) за 7 часа (стр. 177) е без опитно потвърждение. ■ В текста под Фиг. 105 е посочена Фиг. 1, което е нов пропуск. ■ Представените на Фиг. 108 две криви на освобождаване на епирубицина би следвало да се допълнят поне с още една, тази за освобождаването му от поли(бутилцианакрилатните) наночастици. Това би позволило по-ясно открояване на приноса на смесването на двата полимера при формирането на наочастиците. ■ На Фиг. 14 линкерния полиетиленоксид е с неправилно преставени мономерни звена. ■ Не са представени необходимите опитни данни за определянето на **масовите части** на еконазола и хлорамбуцила, включени в поли(бутилцианакрилатни) наночастици чрез използвания УВ-спектроскопски метод, на **ефективностите на включване** на цефалексина в поли(етилцианакрилатни) наночастици и на ципрофлоксацина и на хлорабуцила в поли(бутилцианакрилатни) наночастици, както и на **освобождаването** на цефалексина в поли(етилцианакрилатни) наночастици и на ципрофлоксацина, хлорабуцила и на етопозидата от поли(бутилцианакрилатни) наночастици.

Бракът е твърде много, но не прави невъзможно разбирането на съдържанието.

## 5.2. Забележки по същество

Допълненията към критиката за липса на фокус върху фронтви постижения и проблеми са:

- Представена на Фиг. 10 схема на анионната полимеризация е с **принципиален пропуск** – противойонте. Тъкмо взаимодействието „нарастващ анион – катионен противойон“ е определящия фактор както за кинетиката на полимеризацията, така и за микроструктурата на получаващите се макромолекули. И тъкмо на основата на това взаимодействие може да се изгради разумно обяснение на оставеното без такова (стр. 124) двукратно нарастване на молекулната маса на поли(бутилцианакрилата) (Табл. 13) в присъствие на епирубицин, катион с обемиста хидрофобна обвивка.
- Представени са две по-особени зависимости (Фиг. 68 и 73) на масовата част и на ефективността на включване на епирубицина в полибутилцианакрилатни наночастици като функция от концентрацията на цитостатика. Особеното в тях е нарастването на масовата му част при монотонно намаляване на ефективността му на включване. Възможен ли е въобще този противоположен ефект на епирубиновата концентрация? Опитът да се докаже тази възможност теоретично не бе убедителен. Биха били полезни за тази цел изходните опитни резултати.

- На стр. 9 е заявена авторова интерпретация на представата за „вълшебния куршум“ като пресечница на колоидната на фармацевтичната науки. Без да се омаловажава значимостта на последните, пропуснато е тази на полимерната наука. Тя се откроява не само от това, че голяма част от наночастиците са полимерни ( в това изследване например те са само полимерни), но и защото по-голямата част от целите на „вълшебния куршум“ са също полимерни, вярно биополимерни, но полимерни: ензими, сигнални протеини, рецептори, интегрини, нуклеинови киселини, полизахариди. Цялата генна онкотерапия и персоналната медицина са с биополимерни цели. Историята от началото на века с Imatinib ( с търговското име Gleevec, инхибитор на сигнален тирозинкиназен рецептор - елемент на увредена сигнална верига за експресиране на необходими за раковите клетки протеини), развихрил надеждите за ефективна таргетна онкотерапия след успешното му приложение против хронична миелогенозна левкемия (средно 5-годишно удължаване на живота на 59% от болните), е друго ярко потвърждение на полимерната значимост за представата „вълшебен куршум“.

- На стр. 91 и 92 е постулирано различие между емулсионна и дисперсионна полимеризации в зависимост от използвания стабилизатор. То поражда безпокойство. Полимерната общност е възприела колоидната класификация на дисперсиите и затова всяка полимеризация с образуване на две и по-голям брой фази по време на полимеризацията е дисперсионна. Ако дисперсната фаза е течност, то полимеризацията е емулсионна, ако тя е твърда, полимеризацията е суспензионна. Мини- и микро-емулсионната полимеризации са предмет на допълнително подразделяне. Месторазположението на инициатора също понякога се използва за разграничаване на различните видове дисперсионни полимеризации.

- На стр. 34 е представена хипотеза за тристадийн механизъм на емулсионната анионна полимеризация на алкилцианакрилатите. Тя не отчита неразтворимостта на тези полимери във вода. Скоростта на хидроксил-иницираната анионна полимеризация на тези мономери е много голяма, което води до бързо получаване на много голямо количество утаящ се полимер. Тъкмо това високоскоростно формиране на втвърдяваща се полимерна маса е в основата на приложението на полицианакрилатите като „секундни“ лепила и на приложението им за получаване на полимерни и хибридни наночастици. Конверсията на мономера обаче не достига толкова бързо 100%. Непрореагиралата негова част е своеобразен разтворител за полимера като се формира ядро от поли(алкилцианакрилатен) гел с твърда обвивка от същия полимер. Обвивката практически не съдържа активни нарастващи вериги, докато ядрото съдържа такива (уловени в „дифузионна“ клетка), които нарастват много по-бавно поради увеличаващите се дифузионни ограничения и изчерпване на мономера. Част от тях бавно се дезактивират, но друга част продължават нарастването си до пълното изчерпване на мономера. Това е причината за бимодалността в разпределителните криви по молекула маса, показана на Фиг. 70 за поли(бутилцианакрилата), а не предложеното от Behan и сътр, реинициране.

**5. Личният принос** на дисертанта е несъмнен. На 18 от представените 26 публикации той е първи автор, на 6 – втори, а на 1 - пети. По-голямата част от тях са публикувани в авторитетното списание *Colloid and Surfaces* (различните му модификации).

**6. Авторефератът** отразява пълно и точно основните резултати, представени в дисертационния труд.

### **7. Препоръки**

- Благодарности към доц. д-р Ц. Душкин, доц. д-р М. Симеонова и други колеги за съвместните първи стъпки, особено важни - като всички първи стъпки.

- Запознаване с нецитирани в дисертацията, но важни за тематиката книги: - “Polymer nanoparticles for nanomedicine. A guide for their design” (C. Vautheir, C.Ponche, Eds, 2016); -“Nanoparticles as drug carriers” (V. Torchilin, Ed, 2006); -“Intracellular delivery. Fundamentals and application” (A. Prokop, Ed, 20013); - “ Nano-sized polymers. Preparation, properties, applications” (S. Fakirov, Ed., 2016).

- Специално внимание към алтернативата на алкилцианакрилатите – метилиден малоната 2.1.2 ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{COOR}_1)\text{COOCH}_2\text{COOR}_2$ ;  $\text{R}_1$  и  $\text{R}_2$  - алкили), при които цианогрупата е заменена с естерна. Отново две електроноакцепторни групи (естерни в този случай) формират силен електрофилен център в мономерната група, предпоставка за бърза анионна полимеризация, обезпечаваща скоростно формиране на адхезионен слой



и на наночастци. Предимствата са поне две: по-голяма дълготрайност на залепването и по-ниска токсичност в сравнение с поли(алкилцианакрилатите).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Дисертационният труд отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (чл. 12(3)) и на специфичните критерии за придобиване на научни степени в Софийския университет за професионално направление Химически науки. Дисертационната работа е обемисто и систематично опитно изследване в бурно развиващите се наномедицина и нанофармация. Не е акуратно оформена и структурирана. Не е и на предния край на тези научни направления (наноносители за активно целево доставяне на лекарства, за генна терапия, за персонализирана онкотерапия) поради недостиг на фокусировка върху фронтите постижения и проблеми и локални трудности. Но са получени полезни резултати, намерили вече свои читатели. Интерпретацията им е предпазлива. Чрез самообразование авторът е придобил знания и умения, необходими за това междудисциплинарно изследване и е проявил настойчивост и организационни способности да постави началото на нанофармацевтичните изследвания в нелеките условия у нас и във ФХФ. Ето защо оценката ми за изследването, резултатите, приносите, както и за качествата на техния автор, **доц. д-р Георги Йорданов Георгиев, е положителна**

05.03.2018 г.

Рецензент: .....

/Проф. дхн Г. С. Георгиев/

**Приложение. Пропуски в списъка на съкращенията**

V-ATPase (стр. 17), ACE (стр. 22), CFU (стр. 78)