

# РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дхн Иво Грабчев

Катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология”

Медицински Факултет на СУ “Св. Климент Охридски”

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен **доктор**  
по научната специалност 4.2 Химически науки (Химия на високомолекулните  
съединения)

**Димитрина Георгиева Бабикова**

редовен докторант в Лаборатория по полимеризационни процеси към Институт по  
полимери на Българска академия на науките на тема:

**Функционални блокови съполимери за пренос и насочено доставяне на  
лекарствени вещества в клетки и клетъчни органели**

**Димитрина Георгиева Бабикова** се е дипломирала като бакалавър по специалността „Биотехнологии“ в СУ "Св. Климент Охридски", София. През 2007 г. придобива магистърска степен по специалността „Биотехнологии“ в Химикотехнологичен и Металургичен Университет. През 2006 г. постъпва като специалист „Биолог“ в Институт по Молекулярна Биология - БАН. През периода 2007 - 2013 г. работи като лаборант последователно в Белведере ЕООД, ВК "САКАР Любимец" , гр. Любимец и Белведере ЕООД, КАТАРЖИНА ЕСТЕЙТ, гр. Свиленград. През април 2013 г. след спечелен конкурс е зачислена като редовен докторант в Лаборатория по полимеризационни процеси към Институт по полимери на Българската академия на науките, с научен ръководител проф. д-р

Ивайло Димитров, а от октомври 2016 г. до момента, тя е асистент в същата лаборатория.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е изложен на 126 стр. Той съдържа 50 фигури, 7 схеми и 6 таблици и са цитирани 260 литературни източника, голяма част от които са от последните десет-петнадесет години, което показва актуалността и значимостта на проведените от докторантката научни изследвания. Дисертационният труд е написан ясно, точно и прецизно. Състои се от три основни части: Литературен обзор (40 стр.), Резултати и обсъждане (41 стр.) и експериментална част (15 стр.), където подробно са описани използваните материали, методите и измервателна апаратура за охарактеризиране на получените полимери.

**Литературният преглед** е доста подробен и е съсредоточен върху синтеза на линейни и нелинейни блокови съполимери и използването на „жива“ анионна и катионна полимеризация за получаване на блокови съполимери, различните видове на контролирана радикалова полимеризация, като полимеризация с пренос на атом, в присъствие на стабилни радикали, с отваряне на пръстен и полимеризация с обратимо предаване на веригата. Освен тези „по-класически“ методи специално внимание е обърнато на съвременните методи за модифициране на полимери или т.нар. „клик“ синтетични методи като циклоприсъединяване на азиди към алкини, «клик» реакциите Дилс-Алдер, и присъединяване на меркаптани към алкени. Детайлно са разгледани и функционалните полимерни системи за пренос на биологично активни лекарствени средства и възможностите за тяхното насочено доставяне до таргетните клетки. Изтъкнати са предимствата на самоасоциращите се амфифилни блокови съполимери във водна среда под формата на наноразмерни полимерни мицели, като биоразградимост и биосъвместимост, ниска токсичност, неимоногенност, стабилност в кръвния поток и възможност за контролирано освобождаване на лекарствените средства и др. Докторантката задълбочено се е спрела на използването както на синтетични, така и на природни полимери като носители на биологично активни вещества. Разгледани са възможностите за дизайн на мултифункционални полимерни носители на лекарствени вещества, чрез

използване на различни синтетични методи и техники, с цел получаване на желани функционални свойства. Специално внимание е отделено на куркумина като биологично активно вещество, във връзка с все по-нарастващия интерес към него, в резултат на широкото му приложение в лечението и профилактиката на различни заболявания и възможностите му за включване в полимерни носители като нано- и микрочастици, нанокапсули, наносфери, наногелове, и др.

Може да се каже, че литературният обзор показва много добрата осведоменост на докторантката в областта на синтеза и използването на високомолекулни съединения като носители на лекарствени вещества и напълно отговаря на заглавието на дисертационния труд. Обобщавайки данните в литературния преглед е формулирана целта на дисертационния труд като ” *Синтез на нови мултифункционални блокови съполимери, способни да се самоасоциират във водна среда, както и да се оценят възможностите за тяхното приложение като наноносители за насочено доставяне на хидрофобни лекарствени вещества в прицелни клетки и клетъчни органели*“.

За реализирането на тази цел изследванията са насочени към решаването на четири основни задачи:

1. Синтез и охарактеризиране на функционални амфифилни диблокови съполимери, съдържащи биоразградим хидрофобен блок, носещ крайна реакционноспособна група и хидрофилен поликатионен блок, модифициран със субклетъчно насочващи лиганди;
2. Синтез и охарактеризиране на мултифункционален амфифилен триблоков съполимер, съдържащ лиганди за клетъчно и субклетъчно насочване и състоящ се от биосъвместим хидрофилен полиетерен блок, свързан чрез киселинно разградима връзка с биоразградим хидрофобен блок и поликатионен блок;
3. Синтез и охарактеризиране на нефункционализиран амфифилен триблоков съполимер за сравнителни изследвания;
4. Изследване на възможностите за приложение на получените функционални съполимери като наноносители за насочено доставяне на лекарствени вещества в клетки и клетъчни органели.

Така дефинираната тема, цели и задачи на дисертационния труд са в една изключително актуална научна област на синтетичната полимерна химия, която в последните години се развива интензивно във връзка с търсенето на нови полимери с ниска токсичност, с възможност за адресна доставка на биологично активни вещества и тяхното потенциално приложение в наномедицината. Безспорен, тук е приносът на научния ръководител проф. Димитров, който е насочил докторантката към разработването на тази тематика, а нейният принос е в прецизността и задълбочеността за нейното изпълнение.

В разделът **Резултати и обсъждане** са обособени 3 подраздела, които описват методите за получаване и охарактеризиране на новите амфифилни блокови съполимери, с различна функционалност; самоасоцииране на синтезираните блокови съполимери и тяхното физикохимично охарактеризиране и *in vitro* изследване на получените нови полимерни наноносители като преносители на биологично активни вещества.

1. **В първия подраздел**, който може да се отнесе като синтетичен са обобщени следните дейности:

✓ чрез използване на методи на контролирани полимеризационни процеси и реакции на модификация са описани синтезите и техниките на структурно охарактеризиране на нови функционални амфифилни диблокови съполимери на основата на поли(D,L-лактид)-блок-(*N,N* диметиламиноетил метакрилат), съдържащи крайна алкинова и странични субклетъчно насочващи (трифенилфосфониеви) лиганди (A-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>).

✓ Синтезиран е мултифункционален амфифилен триблоков съпололимер, състоящ се от модифициран с крайна клетъчно насочваща (лактобионова) група полиоксиетиленов блок, който е свързан чрез разградима в слабо кисела среда връзка за хидрофобния блок на A-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>.

➤ Получен е хетеробифункционален полиоксиетилен с крайни лактобионова и ароматна алдехидна група (LBA-PEO-CHO).

➤ Крайната алкинова група на A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> е превърната в първична аминогрупа чрез „клик“ реакция с азидопропиламин, получавайки H<sub>2</sub>N-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>.

➤ Чрез удвояване на LBA-PEO-CHO и H<sub>2</sub>N-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>, формирайки лабилната ароматна иминна връзка между полиетерния и полилактидния блокове е получена мултифункционалната триблокова архитектура.

➤ Синтезиран и охарактеризиран е нефункционализиран амфифилен триблоков съполимер полиоксиетилен-блок-поли(DL-лактид)-блок-(N,N-диметиламиноетил метакрилат), без лиганди и разградима връзка между блоковете, който е използван при сравнителни изследвания.

Структурата на всички новосинтезирани съполимери е доказана и охарактеризирана чрез използване на <sup>1</sup>H-ЯМР и ИЧ спектроскопия. Гел-проникваща хроматография е използвана за доказване формирането на ди- и триблокови съполимерни архитектури. Хроматограмите също така показват мономодални криви на елуиране, с ясно отместване към по високи молекулни маси, след всеки етап на полимеризация.

2. **Във втория подраздел** е описано изследването и получените резултати от самоасоциирането на новосинтезираните амфифилни съполимери във водна среда.

➤ Показано е, че функционалните ди- и триблокови съполимери, формират колоидно стабилни наноразмерни агрегати във водна среда.

➤ Съполимерните мицели са физикохимично охарактеризирани, чрез абсорбционна спектроскопия и са определени критичните концентрации на мицелообразуване. Чрез методът на динамично светлоразсейване е показано, мономодално, тясно разпределение на получените частици по размери, което зависи от полимерния състав и хидрофобно-хидрофилния баланс при диблоковите съполимери. Стойностите на зета потенциала показват, че повърхността на получените мицели е положително натоварена. Чрез ТЕМ е показано, че наночастиците са със сферична форма. Получените съполимерни мицели са използвани като системи за пренос на биологично активни вещества, като за целта

е избран куркумин, благодарение на това, че той е природен биопродукт, с доказани разнообразни терапевтични свойства.

➤ Определена е почти количествена ефективност и капацитет около 10% на натоварване за мицелите, като чрез сравняване на зета потенциалите е показано, че куркуминът основно е включен в хидрофобните ядра на мицелите, а не в тяхната периферия. Чрез диализа във фосфатен буфер е проследено *ин витро* освобождаването на куркумина при условия близки до физиологичните (pH =7, и 37°C) в продължение на 24 часа. От получените профили за освобождаване на куркумина е показано, че само около 10% се освобождават през първите 1-2 часа от ядрата на мицелите, последвано от сравнително равномерно освобождаване през следващите 24 часа, което може да се изтъкне като предимство при циркулацията им в кръвния поток.

➤ С оглед на потенциалното *ин vivo* приложение натоварените с куркумин наномицели, са обработени допълнително с трети полимерен блок от полиоксиетилен, който предварително е модифициран с цел въвеждане на групи за активна адресна доставка на мицелите към таргетните клетки. От друга страна полиестерният блок участва във формирането на повърхността на наночастицата, като значително понижава стойностите на положителния повърхностен товар. Чрез гел проникваща хроматография и динамично разсейване на светлината е изследвано отделянето на полиестерния слой в слабо кисела среда (имитираща физиологичната среда на туморните клетки) при 37°C от повърхността на наномицелите.

3. **В третия подраздел** са описани получените резултати от *ин витро* изследванията на биологичната активност на новополучените полимерни наномицели върху различни човешки клетъчни линии, които могат да се групират както следва:

➤ Установено е, че ненатоварените мицели проявяват слаба цитотоксичност върху клетъчната пролиферация на немалигнени и малигнени клетъчни линии, което е добър атестат за потенциални *ин vivo* приложения;

➤ Въведеният в съполимерните наномицели куркумин проявява по силна токсичност върху туморни клетъчни линии и резистентните им варианти, в сравнение със свободния куркумин;

➤ Полимерни наноносители, с въведен куркумин, показват добре изявена способност да индуцират апоптоза и притежават по-силно инхибиране на ядрения транскрипционен фактор в туморни клетъчни линии и техните резистентни варианти в сравнение със свободния куркумин и натоварени с него нефункционализирани полимерни мицели;

➤ Резултатите от проведените изследвания върху ефективността на клетъчната интернализация и субклетъчното насочване показват преимущественото натрупване в митохондриите на функционалните полимерни наноносители, в сравнение на нефункционализираните им аналози. Това прави новосинтезираните мицели перспективни наносистеми за адресна доставка на биологично активни вещества до таргетни клетки и клетъчни органели.

Дисертационната работа има подчертан интердисциплинарен характер, съчетаващ синтеза, спектралното охарактеризиране и идентифициране на получените съединения. Приложният аспект, в случая изследване на биологичната активност на синтезираните полимерни системи, е проведен съвместно с Фармацевтичния факултет на Медицински университет, София. Така цикълът от изследването на новите съединения се затваря, което е характерно за съвременните научни изследвания.

**Приносният характер на дисертационния труд може да се обобщи както следва:**

1. Получени и охарактеризирани са нови амфифилни ди- и триблокови съполимерни архитектури с предварително зададен състав и функционални свойства;
2. За първи път са получени мултифункционални трислойни наноразмерни носители на хидрофобното лекарствено вещество куркумин, носещи клетъчно и субклетъчно насочващи лиганди, отделящ се външен полиетерен слой в слабо кисела среда, както и ендозомно дестабилизиращ междинен слой;

3. Показан е потенциалът на новите мултифункционални системи да преодоляват биологични бариери при преноса, да се насочват към таргетни клетки, успешно да се интернализират и да доставят биологичното активното вещество в специфични клетъчни органели.

Част от описаните в дисертационния труд резултати са оформени в 2 статии, публикувани в престижните международни списания с висок импакт фактор: *RSC Advances* (2016, IF=4.036, Q1) и в *ACS Biomaterials Sci. Eng.* (2019, IF=5.395, Q1). За актуалността на разработената дисертация може да се съди и от факта, че и две статии вече са цитирани от чуждестранни учени съответно 5 и 14 пъти. По темата на дисертационния труд са представени два доклада и шест постерни съобщения на национални и международни конференции в София, Банско и Париж. По време на разработване на докторската си работа Димитрина Бабикова е била член на 5 научни проекта, с финансиране от БАН и ФНИ към МОН.

**Нямам конкретни лични впечатления от докторантката.**

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представените резултати от разработената дисертация са актуални, добре научно интерпретирани и могат да се отнесат към категориите новост за науката и обогатяване на съществуващите знания. Те напълно отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на Института по полимери и Българската академия на науките. Въз основа на изложеното до тук с убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на **Димитрина Георгиева Бабикова** и предлагам на уважаемите членове на научното жури да подкрепят присъждането ѝ на образователната и научна степен **"ДОКТОР"** в професионално направление 4.2. Химически науки, по научна специалност „Химия на високомолекулните съединения”.

12.02.2023 г

Рецензент:

/Проф. дхн И. Грабчев/