

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на доц. д-р **Иванка Николова Николова**
За придобиване на **Научна степен "Доктор на науките"** в Област 4. "Природни науки, математика и информатика", професионално направление 4.3 "Биологични науки", научна специалност "Вирусология"

Тема: "In vitro и in vivo изследване на антивирусната активност на серии нови диарил етери и техни аналози – перспективни химиотерапевтици в анти-ентеровирусната терапия"

Рецензент: проф. дн Пенка Петрова

Департамент „Обща микробиология“, Лаборатория „Микробна генетика“
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, член на Научното жури,
определено със Заповед № I-46/28.03.2025 г.

1. Биографични данни за кандидата

Доц. д-р Иванка Николова е родена в Бургас. Завършва Руска Езикова гимназия, а висшето си образование – в Биологическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, където придобива магистърска степен по биология и химия. Научният ѝ път започва през 1995 г. в Института по микробиология „Стефан Ангелов“ към БАН като биолог-специалист, по-късно става редовен докторант, а темата на дисертацията ѝ е насочена към вируса Коксаки В1 – вирус, който ще остане обект на изследванията ѝ години наред. Доц. Николова преминава през всички стъпала на академичната кариера: от научен сътрудник, през главен асистент, до доцент. През 2016 г. тя е назначена за ръководител на Департамент „Вирусология“, а още от 2012 г. оглавява и Лабораторията по експериментална химиотерапия на етеровирусните инфекции. Под нейно ръководство се развиват редица национални и международни проекти, фокусирани върху синтеза на нови антивирусни съединения и тяхната оценка в условия in vitro и in vivo. Днес д-р Николова е не само водещ вирусолог, но и Председател на Научния съвет на Института по микробиология.

2. Актуалност на темата на дисертационния труд

Актуалността на темата на дисертационния труд е продиктувана от глобална разпространеност на етеровирусите, ограничените възможности за превенция, липсата на одобрени антивирусни препарати и рисковете за развиване на лекарствена резистентност. Етеровирусите са сред най-често срещаните човешки патогени, засягащи всички възрастови групи, особено децата и имунокомпрометираните пациенти. Те предизвикват широк спектър от заболявания – от обикновена настинка до тежки и животозастрашаващи състояния като менингит, енцефалит, миокардит и остри парализи. Мащабът и разнообразието на етеровирусните инфекции подчертават значимостта на разработването на ефективни терапии. Въпреки, че съществуват ваксини срещу полиовирусите и етеровирус А71, няма налични ваксини срещу повечето от останалите над 280 серотипа, което прави превенцията затруднена. В тази светлина, терапевтичният подход чрез антивирусни средства се очертава като

единствена алтернатива при голяма част от клиничните случаи. Към момента няма регистрирани лекарства за лечение на ентеровирусни инфекции. Повечето изследвани съединения показват ефективност само *in vitro*, докато *in vivo* активността им е слаба, често съпроводена с висока токсичност и ниска селективност. Това създава критична нужда от откриване на нови, ефективни и безопасни молекули. Ентеровирусите се характеризират с висока честота на мутации, което води до бързо развитие на лекарствена резистентност.

Темата на дисертацията се фокусира върху комбинирана терапия и молекули, насочени както към вирусни белтъци, така и към клетъчни фактори, което е иновативен и стратегически подход за ограничаване на този проблем. Изследваните диарил етери и техни аналози показват не само антивирусна активност срещу ентеровируси, но и ефект срещу други вируси като коронавируси и аденовируси, а перспективата за разработване на широкоспектърни антивирусни средства е от ключово значение при бъдещи пандемични заплахи. В своята работа доц. Николова съчетава фундаментални научни аспекти (вирусна репликация, вирус-клетъчни взаимодействия) с приложна насоченост – синтез, тестване и оптимизация на антивирусни агенти. Затова дисертационният труд е ви не само научно релевантен, но и с висок потенциал за практическа реализация.

3. Данни за дисертационния труд и анализ по раздели

Дисертационния труд е написан на 189 страници и съдържа следните раздели (в приблизителен брой страници): Увод (2 стр.), Литературен обзор (43 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (16 стр.), Резултати и дискусия (76 стр.), Заключение (9 стр.), Приноси (1 стр.) и Литература (38 стр.). Цитираните източници са 351, като близо 40% от тях са от последните десет години, а около 20% - от последните пет години (2019–2024). Материалът е онагледен с 31 таблици, 46 фигури и множество схеми, които са без номерация.

Литературният обзор в дисертацията на доц. Николова представлява задълбочен и многопластов научен анализ, който очертава основите, върху които се изграждат експерименталните ѝ изследвания. Обзорът е структуриран в няколко логически свързани раздела, които систематично представят съвременните познания в областта на ентеровирусите и антивирусната химиотерапия. В първата част са представени разпространението и клиничното значение на ентеровирусите. Включена е таксономичната класификация на род *Enterovirus* в контекста на семейство *Picornaviridae*, съдържащо над 280 серотипа, от които само срещу четири съществуват лицензирани ваксини. Подчертава се, че родът предизвиква широк спектър от заболявания: менингит, енцефалит, миокардит, сепсис, както и остра вяла парализа. Особено внимание се обръща на серотипове като EV-A71, EV-D68, коксакивируси B1–B6, еховируси и други, както и на циркулацията на ваксинални и диви полиовируси, включително съвременни данни за огнища в Европа, САЩ и Азия (до 2023–2024 г.). Анализирани са и последиците от инфекции при новородени и имунокомпрометирани пациенти.

Следващ дял от литературния обзор разглежда молекулната структура на ентеровирусите, архитектурата на вирусния капсид и организацията на еднOVERижния положителен РНК геном. Подробно са описани състава и структурата на капсида и хидрофобния джоб, мишена на някои антивирусни средства. Обърнато е внимание на вирусния *rocket factor*, на IRES елементите (включително различните им типове), както и на ролята на вирусно-кодирания протеин VPg за инициране на РНК репликацията. Описан е и протеолитичният процес на разпадане на полипротеина в активни ензими и структурни компоненти. С красиви илюстрации са демонстрирани етапите на репликативния цикъл на ентеровирусите и освобождаването на новите вирусни частици. Подчертана е ролята на вирусни и клетъчни фактори, особено мембранни пренареждания и участието на фактори на гостоприемника в репликативните комплекси.

Най-съществената част от обзора е посветена на терапевтичните стратегии и предизвикателства и на анализ на съществуващите и експериментални антивирусни средства като Pleconaril, MDL-860, дизоксарил, както и нови химични класове терапевтици. Обсъдени са проблемите с резистентността, токсичността, лошата бионаличност и неблагоприятните фармакокинетични свойства. Авторката подчертава значението на комбинирана терапия, насочена към различни вирусни белтъци, както и на иновативната стратегия за таргетиране на клетъчни протеини, което може да осигури широкоспектърна ефективност и да намали риска от резистентност. Литературният обзор в дисертацията не е просто преглед на фактология, а изгражда логическа и концептуална рамка, върху която се основават собствените изследвания на авторката. Той ясно очертава научния проблем, недостатъците на съществуващите терапии и нуждата от нови подходи – насочени към комбинирани терапии и молекулен дизайн на иновативни съединения. Това придава висока стойност на самото изследване и го позиционира като съществен принос към антивирусната наука. Обзорът е базиран на ключови публикации от водещи списания и на документи на международни здравни институции като СЗО, което демонстрира добро познаване на най-съвременния материал по темата.

Целта на дисертацията е провеждането на *in vitro* и *in vivo* изследване на антиентеровирусната ефективност на инхибитора на клетъчната фосфатидилинозитол-4-киназа бета (PI4KB) MDL-860, както и на библиотека от новосинтезирани негови аналози. При успешно изпълнение на 10 конкретни задачи, ще бъдат идентифицирани по-ефективни и безопасни химиотерапевтични агенти за комбинирани терапевтични схеми или монотерапевтични курсове за лечение на ентеровирусни инфекции. Целта и задачите са формулирани точно и конкретно, с ясен научен фокус.

Методологичната част включва различни подходи за оценка на антивирусната активност на изпитвани съединения срещу ентеровируси, както *in vitro*, така и *in vivo*. За сравнителен анализ са използвани референтни инхибитори на ентеровирусната репликация, като отправна точка за ефективност. При изследването на новите съединения са използвани клетъчни култури, заразени с

различни щамове на ентеровируси, а в част от опитите са включени и опитни животни – основно мишки – за оценка на ефективността на съединенията в условия, близки до реална инфекция. Описана е и методиката за изследване на цитотоксичност на всяко съединение поотделно. Описани са и методите за тестване на двойни комбинации от съединения – и по отношение на антивирусната активност, и на цитотоксичността им, за да се оцени потенциалният синергизъм или антагонизъм между тях.

Други методи включват *in vivo* експерименти с опитни животни, описани са методите за определяне на вирусния титър в тъкани, вкл. мозъчна, както и класическия плаков метод за количествена оценка на вирусни частици. За молекулярна характеристика на вирусите е приложен RT-PCR и секвениране, което дава информация за генетични промени, свързани с чувствителност или резистентност. Накрая, всички получени данни са подложени на статистически анализ, за да се потвърди тяхната достоверност и значимост. Използваните методи са съвременни и съответстват на най-новите тенденции в изследването на вируси.

Раздел „Резултати“ е комбиниран с дискусия. Тъй като целта на дисертацията е да се изследва ефективността на нови тройни антивирусни комбинации срещу експериментална невроинфекция, ключови са *in vivo* експериментите с тройни комбинации от антивирусни съединения. Изследвана е антивирусната ефикасност и ефекта върху лекарствената резистентност на тройна комбинация от инхибитори на ентеровирусната репликация – плеконарил, гуанидин-HCl и оксоглауцин (PGO), приложена по схема на последователно алтернативно редуване (САА), спрямо невроинфекция с коксакивирус В1 (CVB1) в новородени мишки. Прилагането на комбинацията по САА курс води до значително повишаване на преживяемостта (PI до 68%, MST до 10.4 дни) и редуциране на инфекциозния вирусен товар в мозъчните тъкани, като най-изразен ефект се наблюдава при плеконарил 200 mg/kg. Монотерапиите с отделните съединения показват ограничена ефективност. Чрез плако-инхибиращ тест е установено, че САА курсът с PGO поддържа повишена чувствителност на вируса към плеконарил и оксоглауцин до 13-тия ден от инфекцията, предотвратявайки селекцията на резистентни варианти. Данните потвърждават предимствата на последователното комбинирано приложение като ефективна стратегия срещу невротропни ентеровирусни инфекции, осигуряваща не само антивирусна активност, но и забавено развитие на лекарствена резистентност с минимизиране на токсичните ефекти.

Следваща задача на дисертацията е чрез молекулярно-генетични подходи да се изясни РМО, прилагана по САА схема, повлиява развитието на лекарствена резистентност и повишена чувствителност при ентеровирусна инфекция. За тази цел е извършено секвениране на вирусни изолати от мозъците на мишки, третирани с отделни антивирусни средства и с комбинацията РМО. Установени са единични аминокиселинни замени в структурни и неструктурни вирусни протеини.

Насърчена от добрите резултати с MDL-860, дисертантката изследва негови новосинтезирани аналози срещу ентеровируси (CVB1, CVB3, PV1). Първоначално са тествани 12 съединения (1a–12a) за цитотоксичност и антивирусна активност *in vitro*, като най-обещаващите (1a, 11a и 12a) са изпитани и *in vivo*. Съединение 1a показва най-силен защитен ефект. В дисертационния труд е представено целенасочено *in vitro* изследване на 60 синтетични производни на MDL-860 (обозначени от 13в до 72в), всички притежаващи общ фармакофорен елемент 2-циано-5-нитро-заместен бензенев пръстен. Тествани са срещу три ентеровирусни представители – PV1, CVB1 и CVB3, като MDL-860 е използван като референтна молекула. Съединението 39в се откроява с най-широк антивирусен профил, съпоставим с този на изходната структура, а други седем съединения демонстрират селективна активност спрямо отделни вируси.

Дисертантката проследява структурно-функционалната връзка между малки модификации в молекулната архитектура и наблюдаваната антивирусна ефективност, като идентифицира закономерности с потенциална стойност за бъдещ дизайн. Три от съединенията – 39в, 41в и 47в – са подложени на *in vivo* изпитване върху новородени мишки, инфектирани с CVB1. Отчетените умерени защитни ефекти при 39в и 41в разкриват несъответствие между *in vitro* и *in vivo* активността, което е коректно анализирано от авторката.

В допълнение е проведен QSAR анализ, целящ да оцени влиянието на различни заместители в ядрото на 5-нитробензонитрилите върху цитотоксичността и антивирусния потенциал спрямо PV1, CVB1 и CVB3. На основата на резултатите се предлага рационален подход, свързан със структурните и физикохимичните параметри на съединенията, който може да подпомогне бъдещи стратегии в молекулярния дизайн на антивирусни агенти.

В заключителната част на дисертацията се подчертава значимостта на откритите нови съединения с антивирусна активност и тяхната роля в контекста на съвременните предизвикателства пред терапията на ентеровирусните инфекции. Основните изводи включват:

- Изчерпване на структурните възможности за оптимизация в някои части на молекулата на MDL-860 и акцентиране върху други по-перспективни ядра.
- Съединения с доказана *in vivo* ефективност и ниска токсичност при модел на ентеровирусна инфекция в новородени мишки.
- Широкоспектрна активност, установена и срещу други вируси като човешки коронавирус OC43 и аденовирус тип 5.
- Получените резултати могат да се използват като основа за оптимизиране на молекулната структура и за бъдещо разработване на антивирусни препарати с висока ефикасност и безопасност.

Научните и приложни приноси, обобщени в дисертацията, са значими и подпомагат развитието на областта в световен мащаб. Те могат да бъдат обобщени така:

- Създадена е нова терапевтична схема: Въведено е последователно редуващо се прилагане на антиентеровирусни съединения (CAA), което

предотвратява възникване на лекарствена резистентност при вирусна невроинфекция в новородени мишки.

- Направен е широкомащабен *in vitro* скрининг на съединения с антивирусна активност. Извършен е анализ на 114 нови аналога на MDL-860, от които 10 показват активност сравнима или по-висока от референтното съединение.
- Идентифицирани са съединения - кандидати за бъдещи предклинични разработки на лекарства.
- Направени са ценни QSAR анализи: Построени са математически модели за предсказване на антивирусна активност, подпомагащи рационалния дизайн на лекарства.
- Получени са данни за разширен спектър на антивирусната активност на нови съединения. Установено е, че някои от съединенията действат и срещу вируси извън ентеровирусното семейство, което разширява потенциала им за терапевтична употреба.

4. Публикации по темата на дисертацията и съответствие с нормативните документи

Дисертационният труд е подкрепен от значителна научна продукция: 26 научни статии, свързани с темата на дисертацията, публикувани в международни списания, както следва: 12 в списания с Q1 рейтинг, 8 - в Q2, 3 - в Q3, 3 - в Q4. Общо научни статии по темата (2014–2023): 31 статии, индексирани в Scopus и Web of Science. За прегледност, проверените данни подредени в таблица са следните:

Показател	Данни
Брой публикации (2014–2023)	26 пълнотекстови научни статии, индексирани в <i>Scopus</i> и <i>Web of Science</i>
Класификация по квантил на изданията	Q1: 12 статии Q2: 8 статии Q3: 3 статии Q4: 3 статии
Научни точки (група Г)	429 точки
Авторско участие	Първи автор: 3 публикации (11,5%) Втори автор: 5 публикации (19,2%) Трети и следващ автор: 18 публикации (69,2%)
Повторения с предходна докторска дисертация	Няма припокриване с предходни публикации, използвани за придобиване на ОНС "доктор"
Цитирания (общо)	103
Научни точки от цитирания (група Д)	188 точки
Н-индекс (Scopus)	7
Научни форуми	Общо участия: 20, от тях в чужбина: 15

Научни проекти по темата на дисертацията	4 проекта, финансирани от ФНИ:- В02-11 (2014–2019)- КР-06-КИТАЙ/31 (2020–2022)- КР-06-Н49/2 (2019)- КР-06-Н31/7 (текущ проект)
--	--

Резултатите са част от финансирани научноизследователски проекти към Фонд „Научни изследвания“ (включително двустранен договор с Китайски партньори), както и множество други договори с фирми, научни организации и даже частни лица. Тази активност потвърждава водещото място на дисертанта в сферата на антивирусната химиотерапия и подчертава значението на нейната работа за бъдещото разработване на нови антивирусни агенти.

От направения анализ се вижда, че представените от доц. Николова данни по съответните групи съгласно Правилника за прилагане на ЗРАСРБ напълно удовлетворяват, а в някои случаи значително надхвърлят, минималните национални изисквания за присъждане на научната степен „доктор на науките“ (изм. и доп. ДВ, бр. 15 от 19.02.2019 г.). В рамките на група А (50 т.), група Б (100 т.), група Г (изискани 100 т.) и група Д (изискани 100 т.) доц. Николова е натрупала общо 767 точки – повече от два пъти над необходимия минимум от 350 точки.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на доц. д-р Иванка Николова представлява оригинално и задълбочено научно изследване, посветено на синтеза, характеристиката и антивирусната активност на нови диарил етери и техни аналози срещу ентеровируси. Работата се отличава с ясна научна хипотеза, логично структурирана експериментална част и обосновани изводи, подкрепени от надеждни данни. Авторката демонстрира висока научна ерудиция и умения за интердисциплинарен подход в областта на медицинската химия, фармакологията и вирусологията.

Предложеният труд отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и ППЗРАСРБ и допълнителните изисквания на Института по микробиология "Стефан Ангелов" за присъждане на научната степен „Доктор на науките“. На база на извършения критичен анализ и направените констатации, **изразявам своето изцяло ПОЛОЖИТЕЛНО становище и препоръчвам и на останалите членове на Научното жури да подкрепят присъждането на Научната степен „Доктор на науките“ на доц. Иванка Николова Николова.**

26.05.2025 г.

Рецензент:

(проф. дн Пенка Петрова)