

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Нели Миленова Вилхелмова-Илиева

департамент „Вирусология“, Институт по Микробиология "Стефан Ангелов" – БАН

Член на научно жури, сформирано със Заповед № I-116/04.08.2025 г. на Директора на
Институт по Микробиология "Стефан Ангелов" – БАН

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
„доктор“

По: област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика“,
направление 4.3 „Биологически науки“,

Научна специалност: Микробиология, шифър 01.06.12.,

Автор: Симеон Емилов Димитров,

Тема: „Изпитване потенциала на нови производни на етамбутол и изониазид с цел
проучване на тяхната антитуберкуозна активност“,

Научни ръководители: Доц. д-р Виолета Вълчева Русева и Проф. д-р Милка Милчева
Милева.

Актуалност на разработвания научен проблем:

Темата на представения дисертационен труд от Симеон Емилов Димитров е свързана с провеждането на фармакологичен скрининг на новосинтезирани производни на етанбутол и изониазид с оглед на тяхната токсичност и антимикобактериална активност, както и да се изяснят някои аспекти от механизма на тяхното действие срещу *Mycobacterium tuberculosis*.

Въпреки разработените ваксини и химиотерапевтици туберкулозата продължава да представлява сериозна заплаха за общественото здраве, поради увеличаващия се брой на резистентните щамове. Глобалните усилия за овладяване на резистентната туберкулоза са обвързани с Глобалната стратегия на СЗО за намаляване на заболяемостта и смъртността до 2035 г. За овладяване на тази глобално разпространена епидемия възниква обаче и необходимостта от спешно разработване на нови антитуберкуозни агенти, които да намалят времето за лечение, да въздействат специфично върху резистентните щамове при ниски терапевтични дози. Повечето от проучваните структури се провалят по ред причини например показват специфична или кумулативна цитотоксичност спрямо отделни човешки тъкани и клетки, формират токсични метаболити, имат слаба бионаличност поради проблемна фармакодинамика и фармакокинетика. Основни изисквания към новите химиотерапевтици са те да притежават ниска токсичност и висока антимикобактериална активност, с което да се постигне добра ефективност и минимални нежелани странични ефекти.

Структура на дисертационния труд и оценка на резултатите и приносите

Представената дисертацията е написана на 156 стандартни А4 страници текст по общоприетата схема, както следва: Въведение (2 стр), Литературен обзор (41 стр), Цел и задачи (1 стр), Материали и методи (13 стр), Резултати и дискусия (53 стр), Изводи (1 стр), Приноси (1 стр), Публикации във връзка с дисертацията, Открити цитати, Доклади

пред научни форуми на научните резултати (2 стр), Използвана литература (32 стр) с цитирани 329 литературни източника. Спазени са препоръчителните съотношения между отделните части на труда. Работата е богато илюстрирана с 21 таблици и 40 фигури, обобщаващи получените резултати.

Литературният обзор показва задълбочените познания на докторант Симеон Димитров върху съвременните изследвания по темата на дисертацията. Отделено е специално внимание на оксидативния стрес в патогенезата на инфекцията с *M. tuberculosis*. Описани са различните механизми на възникване на антибиотична резистентност. Представена е класификацията и механизмите на действие на съществуващите до момента антитуберкулозни лекарства.

Цели и задачи – Целта е точно и ясно дефинирана, като за постигането ѝ са изведени шест добре формулирани и логически-свързани задачи:

1. Да се установи *in vitro* антимикобактериалната активност на новосинтезирани химични съединения срещу референтни щамове *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и *Mycobacterium smegmatis* MC2155;
2. Да се анализират енергийните взаимодействия между протеинови мишени при *M. tuberculosis* и синтезираните съединения и да се идентифицират молекули (лиганди) с висок афинитет към тези мишени чрез молекулен докинг;
3. Да се изследва трансмембранната пропускливост на подбрани съединения;
4. Да се определи *in vitro* цитотоксичност, *in vivo* остра и подостра токсичност в експериментален модел на мишки, да се проследят патоморфологичните промени и маркерите на оксидативните увреждания в таргетните органи;
5. Да се изследва редокс-модулиращият капацитет на съединенията в химични моделни системи;
6. Да се индуцира *in vitro* мутагенеза и изолиране ДНК от резистентните мутанти, с последващо пълно геномно секвениране и биоинформатичен анализ.

Материали и методи – Методологията използвана при разработването на дисертационния труд е добре описана и дава възможност за възпроизводимост на резултатите. Използвани са методики на различно ниво на оценка на очкования резултат. Използвани са както *in vitro*, *in vivo*, *in silico* модели, така и патоморфологична оценка на тъканни проби. Без съмнение, настоящия раздел потвърждава, че дисертационният труд представлява сериозно и задълбочено изследване, на високо методологично ниво.

Резултати и дискусия – Представените резултати за разделени в осем основни подраздела и са обобщени от кратко заключение. Представен е синтеза на подбрани аналози на етанбутол и изониазид и е определена тяхната токсичност *in vitro* и *in vivo*. Определена е тяхната антимикобактериална активност *in vitro*. Чрез молекулярен докинг е определен трансмембрания им пермеабилитет. Направена е патоморфологична оценка на промените в таргетни органи след приложение на подбраните аналози. Проследена е антиоксидантната активност и редоксмодулиращия капацитет след третирането с подбраните съединения. Проведена е *in vitro* мутагенеза и изолиране на резистентни мутанти на *M. tuberculosis* H37Rv с последващо пълно геномно секвениране.

Изводи – страница и половина ясно формулирани 10 извода, отразяващи основни резултати от проучването.

Приноси – в рамките на половин страница докторантът и неговите ръководители

извеждат четири приноса:

1. За първи път в България е проведен фармакологичен скрининг на селектирани производни на EMB и INH. Установени са „*lead compounds*”- две ароилхидразонови и две нитрофурилиамидни химични съединения с най-висока *in vitro* антимикобактериална активност
2. Взаимодействията на ароилхидразона 3d с NAD⁺ и Tyr158 доказват, че 3d може да бъде инхибитор, който се свързва директно с InhA, без да изисква активиране от KatG, което го прави ефективен срещу MDR-TB.
3. Двете ароилхидразонови съединения (3a и 3d) и двете нитрофурилиамидни съединения (DO190 и DO209) проявяват ниска цитотоксичност и добро вътреклетъчно натрупване в нормални и туморни клетъчни линии, което ги прави подходящи лекарствени кандидати за последващи предклинични изследвания.
4. За първи път в България, чрез метода на индуцирана *in vitro* мутагенеза, са получени мутантни клонове на референтните щамове *M. smegmatis* и *M. tuberculosis H37Rv*, устойчиви на нарастващи концентрации над установената минимална инхибираща концентрация на избраното съединение. Установената мутация в ген *Rv3755c* е свързана с медирана лекарствена резистентност и лекарствена толерантност.

Представеният за разглеждане комплект материали е в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на БАН за прилагане на ЗРАСРБ и отговаря на критериите на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН за придобиване на образователна и научна степен „доктор“.

Докторантът е приложил 3 броя публикации по темата на дисертацията и съответния доказателствен материал. Общата му научна продукция е 5 публикации в международни списания, h-индексът на докторанта е 4, по данни на Scopus. Представени са 4 участия с доклад и представяне на 3 постера на международни конференции.

Лично участие на докторанта

Доказателство за личното участие на докторанта е едната статия по темата на дисертацията, в които Симеон Димитров е първи автор. Аз имам и лично впечатление от работата на Симеон през годините. Добро впечатление прави способността му да работи в екип, което е мой личен извод от мои наблюдения и от впечатления споделени с неговите ръководители през годините на неговата докторантура. Положително влияние върху изграждането на Симеон като перспективен млад учен е и способността да се комбинира професионалният опит на двамата ръководители, работещи в различни направления, резултат от което е представения цялостен и методично богат дисертационен труд. През целия период на дисертацията, той показваше всеотдайност, инициативност и желание да реши възникналите в хода на работата проблеми. Това ми дава основание да приема безспорно личния принос на докторанта в извършените изследвания.

Критични забележки, препоръки и въпроси

Представените до тук обобщения относно дисертационния труд на Симеон

Димитров са показателни за това, че пред нас е един обещаващ млад учен. Затова аз ще си позволя да изкажа няколко критични бележки, които той да използва в бъдещите си трудове.

1. При включването на схеми, таблици и фигури трябва внимателно да се следи всяка една да бъде номерирана и озаглавена, така че достатъчно добре да представя информацията, включена в нея. В дисертационния труд забелязах на страница 60 таблица, която не е номерирана и наименована.
2. При представянето на схеми, таблици и фигури трябва внимателно да се проследи последователността на тяхното номериране и да не се повтаря или прескача номер. Във връзка с това забелязах няколко неточности в представения дисертационен труд:
 - а) има три таблици с номер 16 (на страници 97, 98 и 110), което променя общия брой на таблиците;
 - б) на страница 104 по логиката, по която са номерирани фигурите трябва да е фигура 28, но е фигура 29. Фигура 29 има и на страница 106 (която е истинската фигура 29);
 - в) от фигура 21 до края на дисертационния труд се получава повторение на номерацията на фигурите. Има две фигури 21 (на стр 93 и 111), две фигури 22 (стр 93 и 111), две фигури 23 (стр 94 и 112) и по същия начин повторена номерация до последната фигура. Очевидно става въпрос за печатна грешка, която подвеждащо води и до грешна номерация на фигурите в текста.

В резултат от тези пропуски вместо посочените 30 фигури в дисертацията има представени 40 фигури, и вместо 18 таблици има реално 21 таблици.

Заклучение

Представеният от Симеон Димитров дисертационен труд представлява оригинален принос в науката и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности на Института по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН. Представените материали и дисертационни резултати по актуалност, обем на изследванията, постигнати научни приноси и публикационна дейност напълно съответстват и на специфичните изисквания, приети във връзка с Правилниците на БАН и на ИМикБ-БАН за приложение на ЗРАСРБ. Въз основа на гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка на проведеното изследване и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Симеон Димитров образователната и научна степен „доктор“ в област 4.3. Биологични науки, научна специалност Микробиология.

16.09.2025г.
София

Изготвил становището:
/доц.д-р Нели Вилхелмова-Илиева/

