

СТАНОВИЩЕ

От проф. дхн Тодор Делигеоргиев за дисертационния труд на Атанас Атанасов Курутос на тема „Синтез на цианинови багрила и изследване на фотофизични свойства на някои от тях“

Атанас Атанасов Курутос е роден на 12 септември 1988, в София – България. Има българско и гръцко гражданство. Завършва средно образование през 2007 година в Солун-Гърция, придобива бакалаварска степен в Университет Кингстън (Лондон-Великобритания) от 2007 до 2010 година, след това придобива магистърска степен в СУ ”Св. Климент Охридски” Химически факултет, Катедра по Органична Химия, по „Съвременни Методи за Синтез и Анализ на Органични Съединения” от 2011 до 2013 година. Кандидатства и спечелва конкурс за редовен докторант в СУ ”Св. Климент Охридски”, Факултет по Химия и Фармация, Катедра по Фармацевтична и Приложна Органична Химия, с научен ръководител проф. дхн Тодор Делигеоргиев. Темата на дисертацията е „Синтез на цианинови багрила и изследване на фотофизични свойства на някои от тях“. Владее перфектно английски, гръцки, немски и руски езици. Тук следва да се причисли и отличното владее на български език, тъй като той има и гръцко гражданство. Работил е като химик по органичен синтез и стереохимия, от юли 2012 до януари 2013 в Българска Академия на Науките, Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, ул. Акад. Г. Бончев, Бл. 9, 1113 София, България.

Като научен ръководител на Атанас Атанасов Курутос го наблюдавах внимателно в продължение на повече от две години. Мога да кажа, че той се справи блестящо с възложената му работа. Обръщам поглед назад 50 години и не намирам друг подобен случай в природните факултети – някой да защити за две години при работа с експеримент. В хуманитарните факултети може да има, но естеството на работата е друго. Затова докторант Атанас Атанасов Курутос ще стане еталон за защита в рамките на срока. Докторант Атанас Курутос се научи сам (подчертавам сам) по метода на проба-грешка да работи със спектрофотометър и спектрофлуориметър с каквито разполагаме в катедрата. Положителните изводи се потвърдиха и при моето посещение в “Лаборатория за изследване взаимодействията на биомакромолекули”, Институт Ruđer Bošković, Загреб – Хърватия - най-престижния химически институт в Хърватия, където той бе пратен за месец, за да се научи на нови методи. Той беше усвоил изследване на някои фотофизични свойства на цианинови багрила включително абсорбция, флуоресценция (с апарати с каквито ние не разполагаме в България), и работа по кръгов дихроизъм (японски апарат с какъвто не разполагаме в България) работа с различни полинуклеотиди, и туморни клетъчни линии. Мога да кажа, че той се трудеше неуморно в този институт от сутрин до вечер, защото имаше конкретни работни цели и знаеше, че разполага с ограничено време. Затова и отзивите за неговото посещение в този институт от ръководителя на групата – Dr . Ivo Piantanida – са много ласкави.

Тук искам да изтъкна и друг факт. Без неоченимата помощ на доц. д-р Н. Гаджев (съвети и препоръки) тази ранна защита не би станала.

Извършена е по обем огромна синтетична и спектроскопска работа.

Докторант Атанас Курутос има едно голямо предимство в сравнение с завършващите български студенти, които поради липса на инструменти или достъп до тях, не могат да боравят с тези инструменти. Той борави с лекота с различните инструментални методи – ЯМР, мас-спектри, ИЧ спектри, HPLC, кръгов дихроизъм и т.н.

Достойнствата на неговата работа са следните:

Получени са общо 118 съединения. От тях 62 багрила (48 нови неописани в литературата - 14 известни) и 54 полупродукти (14 нови неописани в литературата - 40 известни). Някои от методите включени в тяхното охарактеризиране са ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР, АРТ, DEPT 135, COSY, NOESY, HSQC, ^{19}F -ЯМР, ^{77}Se -ЯМР, ESI/MS, ИЧ.

Разработвайки нов реакционен уникален „зелен“ подход, чрез комбинация от микровълново нагряване и облъчване с ултразвук, са получени заместени и незаместени 2-тиометил- и 2-тиобензоилбензазоли използвайки *o*-аминофеноли, *o*-аминотиофеноли, *o*-фенилендиамин, и *o*-халогеноанилини. След тяхното кватернизиране, те представляват необходими полупродукти в синтеза на монометинцианинови багрила. Уникалността на метода се състои в това, че се използва комбинация от микровълново нагряване и облъчване с ултразвук (соникване), каквото няма описано в органичния синтез. В литературата са описани 2-3 подобни случая в областта на биосинтеза.

За получаване на цианиновите багрила описани в дисертационната работа, бяха синтезирани и други полупродукти като моно- и дикатионни производни на 2-метилбензазоли, 4-метилпиридина, 4-метилхинолина, диазабицикло[2.2.2]октана, (DABCO), N-метилморфолина, N-метилпиролидина, и N-метилпиперидина бяха синтезирани чрез оптимизиране на реакционните условия на известни синтетични методи и разработване на подобрени такива.

Чрез микровълново нагряване по нов синтетичен „зелен“ подход е получена серия от симетрични и несиметрични моноазацианинови багрила. Изследвани са и някои от фотофизичните им свойства в свободно състояние. Предимствата на метода са малко реакционно време, високи добиви, използването на зелени разтворители и ненатоварване на околната среда.

Получена е нова серия от монометинцианинови багрила съдържащи бенселеназолиев хромофор на които са определени максимумите на поглъщане (λ_{max}), флуоресцентните максимуми (λ_{fl}), и моларните абсорбируемости (ϵ). Допълнителни изследвания са проведени с двДНК, при които се наблюдава значително повишаване на флуоресцентния интензитет на съединенията съдържащи метилов заместител и при двата азотни атома на хромофорите. Получените багрила не са по-добри от стандартните такива (Тиазол оранж и Оксазолово жълто), но са по-добри от масово използваните Пропадиев йодид, Етидиев бромид, DAPI и Hoechst багрила.

Синтезирани са монометинцианинови багрила аналози на известните „Тиазол Оранж“ и „Оксазолово Жълто“ от тях 5 нови и 3 известни. От изследванията на багрилата с двДНК е установено многократното нарастване на флуоресценцията вследствие на образуването на комплекси. Определени бяха и свързващите константи които показват стабилно свързване на съединенията (най-вече при бензотиазоловите). Такива изследвания с тези багрила не са правени.

Серия от други аналози на „Тиазол Оранж“ (13 нови съединения) с два положителни товара също бяха получени с цел изследване на приложението им като флуоресцентни ДНК маркери. Съединенията показват по-голямо повишаване на флуоресцентната интензивност в сравнение с монокатионните багрила. Допълнителни експерименти са проведени със спленоцити от наши колеги в „Лаборатория по имунопатология и експериментална имунотерапия“ към Института по Микробиология, БАН, за изследване на потенциала на част от багрилата като биомаркери. Резултатите показват че съединенията са подходящи за белязане на мъртви или апоптични клетки. Багрилата са специфични за ДНК, не се свързват с РНК или белтъци и не проявяват токсични свойства. Тези резултати показват, че синтезираните от нас багрила имат практическо приложение и те не са обект на настоящата защита.

Синтезирани са несиметрични три- и тетракасионни монометинцианинови багрила. Термичните изследвания с различни полинуклеотиди, показват много голям стабилизиращ ефект на багрилата върху двойно верижните спирали при значително ниско съотношение на [багрило]/[полинуклеотиди] = 1:100. За определяне на модела на свързване са приложени както флуориметрични измервания, така и кръгов дихроизъм. От резултатите е установена интеркалация като преобладаващ модел на свързване. Също така някои от багрилата показват висока селективност към определени полинуклеотиди. Флуоресцентната интензивност, както и константите на свързване са значително по-високи от моно- и дикасионните цианини. Тези багрила могат да се използват като заместители на търговските хомодимерни багрила ТОТО-1 и УОУО-1 в различни изследвания, без да притежават някои от недостатъците им.

По нов „зелен“ подход са получени несиметрични триметинцианинови багрила. Предимствата на метода са намалено реакционно време (багрилата се получават за няколко минути), високи добиви, използването на малко количество разтворители и ненатоварване на околната среда.

В присъствие на двДНК се наблюдава многократно нарастване на флуоресценцията на образувалите се комплекси. Като представители на серията, две от багрилата са изследвани с различни полинуклеотиди използвайки кръгов дихроизъм за определяне на модела на свързване. Допълнително са направени и термични изследвания. Резултатите показват силно изразена зависимост от структурата на съединенията, а и от вида на полинуклеотидите при стабилизирането на двойноверижните спирали. В повечето случаи се наблюдава склонност към свързване в малката бразда.

Чрез нов „зелен“ синтетичен подход бяха получени и набори от мезо-хлор симетрични пента- и хептаметинцианинови багрила. Представения метод превъзхожда известните до сега процедури за получаване на такива съединения по отношение на времетраене, добиви на изолираните продукти и реакционните условия. Определени са и максимумите на поглъщане (λ_{\max}), флуоресцентните максимуми (λ_{fl}) и моларните абсорбируемости (ϵ) в различни разтворители. В зависимост от структурата на съединенията, както и от полярността на разтворителя се наблюдават съответни отмествания по отношение на абсорбционните и флуоресцентните им спектри.

Заклучение. Всичко гореказано ми определя отношението към дисертационния труд на докторант Атанас Атанасов Курутос. Извършена е огромна по обем синтетична и спектроскопска работа за кратък период от време. Някои резултатите от дисертацията са публикувани в четири работи – две с импакт фактор (*J Fluoresc.* и *Bulgarian Chemical Communications*) и две без импакт фактор). Създадени са нови зелени подходи при методите за синтез на полупродукти и багрила. Отличават се с малко времетраене, високи добиви, използване на зелени разтворители и/или малко количество разтворители, ненатоварване или незначително натоварване на околната среда. Проведени са и спектрални изследвания на получените багрила. Определени са моларните абсорбируемости, дължината на вълната на поглъщане, флуоресцентните максимуми, константите на свързване на багрилата към двДНК и други полинуклеотиди, установен е (чрез кръгов дихроизъм) преобладаващия механизъм на свързване – интеркалация, както и стабилизиращия ефект на багрилата върху двойно верижната спирала.

Всичко гореказано ме мотивира да кажа твърдо «ДА» за успешната защита на докторант Атанас Атанасов Курутос. Смятам, че напълно заслужава образователната и научна степен «ДОКТОР» и че дисертационния труд е извършил своето предназначение.

София 11.02.2016 Съставил становището: проф. дхн Т. Делигеоргиев