

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема **“СИНТЕЗ НА ЦИАНИНОВИ БАГРИЛА И ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФОТОФИЗИЧНИ СВОЙСТВА НА НЯКОИ ОТ ТЯХ”** за придобиване на образователната и научна степен “Доктор”

Дисертант: Атанас Атанасов Курутос, редовен докторант в катедра “Фармацевтична и приложна органична химия” към Факултета по химия и фармация на СУ “Св. Климент Охридски”

Професионално направление: 4.2. Химически науки (Органична химия)

Научен ръководител: проф. дхн Тодор Георгиев Делигеоргиев

Рецензент: проф. дхн инж. Владимир Божинов Божинов, Катедра “Органичен синтез и горива” при Химикотехнологичен и металургичен университет - София

Атанас Атанасов Курутос е роден през 1988 г. в гр. София. Завършва висше образование в ОКС “Бакалавър” по специалност “Химия” през 2002 г. в Университет Кингстън (Великобритания). През 2013 г. се дипломира с отличен успех и в ОКС “Магистър”, отново със специалност „Химия“, в магистърската програма „Съвременни методи за синтез и анализ на органични съединения“ във Факултета по химия и фармация на СУ “Св. Климент Охридски”. През Февруари 2014 г. е зачислен за редовен докторант с 3 годишен срок към катедра “Фармацевтична и приложна органична химия” при СУ “Св. Климент Охридски” по професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия) под ръководството на проф. Делигеоргиев, а през януари 2016 г., предсрочно е отчислен с право на защита. От юли 2012 г. до януари 2013 г. работи като химик по органичен синтез и стереохимия в Института по органична химия с център по фитохимия при БАН. През ноември 2015 г. специализира в областта на фотофизичното изследване на цианинови багрила в „Лаборатория за изследване взаимодействията на биомакромолекули“ към Института Ruđer Bošković в Загреб, Хърватия.

Научните интереси на докторанта са в областта на органичния синтез на хетероциклени органични съединения и багрила, абсорбционните и флуоресцентни свойства на веществата. В тази област е и представеният дисертационен труд, който е изложен на 234 страници и съдържа 65 схеми, 36 таблици и 66 фигури.

Цел на дисертационния труд е синтезът на нови цианинови багрила, съдържащи различни бензозолови хетероциклични остатъци, както и изучаването на техните фотофизични свойства за приложението им като потенциални маркери за ДНК и други видове биомолекули. Основният мотив на планираните изследвания е продиктуван от обстоятелството, че цианиновите багрила, благодарение на пренебрежимо слабата си флуоресценция в свободно, неасоциирано състояние, и високата си моларна абсорбируемост са известни с високия си потенциал като маркери за различни видове биологични единици. Наред с това, цианиновите багрила са известни със значимото си приложение като фоторецептори в различни фотохимични процеси, в лазерните, CD и DVD технологии, както и в редица други области, свързани с високите технологии. Трябва да се отбележи, че поставените цели и задачи са интересни и актуални, както от теоретична, така и от практическа гледна точка.

Литературният преглед кореспондира с поставените цели и е построен хронологично върху произхода, класификацията и приложението на цианиновите багрила, видовете хетероциклени системи, използвани в тяхната структура и основните им фотофизични характеристики. Значително място е отделено на традиционните и модерни синтетични методи за получаване на моно-, три-, пента- и хептаметинцианинови, както и азацианинови багрила. Дискутирани са още и възможните варианти на асоцииране на багрилата с ДНК при приложението на цианиновите производни като маркери за различни биологични единици, което е свързано със съвременните тенденции в биомедицинските изследвания. В обзора са цитирани 234 литературни източника от общо 379 в дисертационния труд.

Към тази част от работата трябва да се отправя забележка, че в края на литературния обзор липсват изводи и обобщение, което по-добре би очертало идеите на дисертационния труд, както и да мотивира по-добре поставената цел и задачите за нейното достигане. Независимо от това, литературният преглед е достатъчно информативен и показва високата компетентност на докторанта в областта на темата на дисертационния труд.

Постигнатите в дисертационния труд резултати са изложени ясно и са коментирани критично. Синтезирани са общо 116 съединения, 62 от които са нови, неописани в литературата. За охарактеризиране на съединенията, освен абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, са използвани и най-съвременни методи за структурен анализ в т.ч. ИЧ, ^1H и ^{13}C ЯМР и МС спектрометрия.

Научните приноси на дисертационния труд могат да бъдат групирани в две основни направления – синтез и изследване на цианинови багрила и необходимите за тях полупродукти.

I. Синтез на полупродукти за цианинови багрила.

1) Синтезирани са общо 12 производни на 2-тиометил- и 2-тиобензоилбензазола чрез циклизация на калиев 2-метоксиетилксантогенат с о-аминофенол, о-аминотиофенол или о-фенилендиамин до съответните 2-меркаптобензазоли, с последващо S-алкилиране или S-бензоилиране. При синтеза на новите съединения е използван подобрен метод с висока възпроизводимост, който за първи път използва комбинация от ултразвук и микровълново лъчение без изолиране на междинните продукти на реакцията. В резултат на това, съединенията са получени с високи добиви за кратко реакционно време в минимален обем разтворители.

2) Синтезирани са общо 22 бензазолиеви соли чрез кватернизирани на азотния атом от азоловия цикъл при взаимодействие на 2-тиометил- или 2-метилбензазоли с диметилсулфат или различни алкилхалогениди, както и чрез кватернизираща циклизация с нормални дихалогеналкани.

3) Синтезирани са с високи добиви 4 кватернерни амониеви соли на 4-метилхинолина при взаимодействие с различни алкилхалогениди, както и монокватернерните соли на 4-метилхинолина и 4-метилпиридина след взаимодействие с 5-кратен излишък на 1,3-дийодопропан при стайна температура, с което се избягва получаването на нежеланите бис-продукти. По аналогичен начин, при взаимодействие с 1,3-дибромпропан, са получени и монокватернерните амониеви соли на N-метилморфолина, N-метилпиперидина, N-метилпиридолина и пиридина, които след това са използвани за получаване на поликатионни производни на 4-метилхинолина при нагряване на еквивалентни количества от реагентите в среда на метоксиетанол.

4) Чрез N-алкилиране с метил- или бутилйодид са получени две монокватернерни соли на диазабицикло[2.2.2]октана като полупродукти за синтез на багрила с три

положителни заряда. За получаване на монокватернерната амониева сол на диазабицикло[2.2.2]октана с един допълнителен положителен заряд, той е подложен на *N*-монокватернизиране с посочената по-горе монокватернерна сол на *N*-метилпиперидина с 1,3-дибромпропан. Реакциите са протекли с количествени добиви.

5) С оглед използването му като полупродукт за синтез на триметинцианинови багрила е синтезирано едно съединение чрез ацилиране с оцетен анхидрид на търговския продукт 1-етил-4-(2-(фениламиновинил)хинолин-1-иев йодид.

II. Синтез и изследване на цианинови багрила.

1) Синтезирани са три серии еднозарядни монометиназацианинови багрила (общо 7, пет от които нови), монометинцианинови багрила с бензселеназолиев хромофор (6 нови) и монометинцианинови багрила, аналози на „Тиазол оранжево“ и „Оксазолово жълто“ (8 съединения, от които 5 нови). Изследвани са базовите фотофизични характеристики на синтезираните съединения в свободно състояние и са направени необходимите заключения от получените резултати. В присъствие на двДНК монометинцианиновите багрила с бензселеназолиев хромофор и аналозите на „Тиазол оранжево“ и „Оксазолово жълто“ повишават значително флуоресцентната си интензивност. Свързващите константи на последната група багрила към ДНК са от порядъка на $1.4 - 6.6 \times 10^7$, което предполага стабилно свързване, което е изразено в по-голяма степен при багрилата, съдържащи бензотиазолиев хромофор.

2) Синтезирани са 13 нови дикатионни монометинцианинови багрила при взаимодействие на 2-тиометилбензотиазолиев соли с дикатионни производни на 4-метилхинолина. В присъствие на двДНК новите съединения показват значително по-голямо усилване на флуоресцентната си интензивност (от 69 до 252 пъти) в сравнение с монокатионните багрила, поради осуетяване на възможността за въртене около метиновата връзка при тези условия. Изчислените константи на свързване, както и значителните промени във флуоресцентната интензивност в присъствие на нуклеинова киселина показват, че съединенията притежават висок потенциал като биомаркери.

3) Синтезирани са и още 6 монометинцианинови багрила, 2 от които нови, при взаимодействие на 2-тиометилбензозолиев соли с кватернерни соли на 4-метилхинолина или 4-метилпиперидина с 1,3-дийодпропан. Получените багрила по-нататък са използвани като изходни продукти за получаване на 4 нови несиметрични три- и тетракасионни монометинцианинови багрила, при взаимодействие с различни монокватернерни соли на диазабицикло[2.2.2]октана. Определени са базовите фотофизични характеристики на съединения, константите на свързване с полинуклеотиди и флуоресцентното усилване са значително по-високи от обичайните за моно- и дикатионните цианини, а термостабилизиращият ефект на багрилата върху двойноверижните спирали е значителен дори при много ниско съотношение на багрило към нуклеотид (1:100). Чрез флуорометрични изследвания и кръгов дихроизъм е установено, че интеркалацията е преобладаващият модел на свързване на багрилата с полинуклеотиди. Всичко това показва, че новите багрила притежават висок потенциал за различни изследвания на полинуклеотиди.

4) Синтезирана е серия от 9 несиметрични триметинцианинови багрила, 6 от които нови, чрез взаимодействие на заместени или незаместени кватернерни бензозолиев соли с 1-етил-4-(2-(фенилацетамидовинил)хинолин-1-иев йодид. Определени са базовите фотофизични характеристики на багрилата и аналитично е коментирано влиянието на структурата на бензотиазолиевият хромофор върху тях. Флуоресцентната интензивност рязко се увеличава в присъствие на двДНК. Две от багрилата в серията са изследвани в присъствие на нуклеотиди термично и с кръгов дихроизъм за определяне модела на свързване.

Наблюдавана е силна зависимост от структурата на съединенията и вида на нуклеотида. Установена е тенденция за комплексобразуване в малката бразда.

5) Синтезирани са 9 симетрични *meso*-хлорзаместени пента- и хептаметинцианинови багрила с един положителен товар чрез подобрен синтетичен подход. Структурата на съединенията е базирана на заместени или незаместени 2-метилбензотиазолиевеи или 2-метилбензоселеназолиевеи соли. Определени са базовите фотофизични характеристики на съединенията и са коментирани отместванията на абсорбционните и флуоресцентни максимуми в зависимост от структурата на съединенията и полярността на разтворителя.

Независимо от постигнатите повече от добри резултати, към тази част от работата могат да се отправят някои забележки:

- Смятам, че работата би спечелила, ако е бил добавен коментар за предимствата на новия метод за синтез на 2-тиометил- и 2-тиобензоилбензазоли, както и на новите синтетични подходи, коментирани в настоящата работа, при съпоставяне на получените резултати с тези, получавани в класическите условия на реакцията.

- Редно би било да се посочи в работата, освен бройката, кои от съединенията са нови, неописани в литературата.

- Споменава се, че посочените в таблиците добиви се отнасят за сурови продукти! Възниква въпросът, посочените температури на топене също ли се отнасят за сурови продукти? И ако да, температурите на топене на известните продукти отговарят ли на посочените в литературата?

- Посочено е, че кватернерните соли на 4-метил хинолина с метил- и етилйодид (стр. 55), както и кватернерните соли на други циклични третични амини с 1,3-дибромпропан (стр. 58) се получават с добри добиви в рамките на 10 мин. до 48 часа!!! Това е разлика в продължителността на реакциите от 288 пъти!? Как може да бъде обяснено това?

- Недоумение буди и твърдението на стр. 57, че реакциите за получаване на монокватернерните соли на лепидина и γ -пиколина се провеждат в отсъствие на разтворител, а два реда по-долу е отбелязано, че протичат в среда на ацетон?

- На стр. 61 неточно е отбелязано, че „ацилирането става при кипене на 1-етил-4-(2-(фенилацетамидовинил)хинолин-1-иев йодид, защото това съединение всъщност е крайният продукт.

- На стр. 52 от Автореферата в извод № 7 е записано: „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 не са обект на настоящата защита.“ Не разбирам как нещо, което детайлно е описано в дисертацията (стр. 88-92) не може да бъде предмет на защита!? Необходимо е да бъдат изяснени мотивите за това заявление!

В обобщение на казаното до тук може да се заключи, че докторантът успешно се е справил с трудоемката синтетична работа на голям брой сложни и комплексни съединения. В рамките на дисертационния труд е извършена огромна по обем и качество експериментална работа, която разкрива значителен потенциал за бъдещо развитие на тази изключително интересна и перспективна тематика в посока на практическото приложение на синтезираната група съединения в различни сфери на високите технологии.

Част от получените в дисертационния труд резултати са оформени в 4 статии и са докладвани на 6 конференции в чужбина. Една от статиите е публикувана в престижното международно списание с импакт фактор *Journal of Fluorescence*. Другите три статии са публикувани в списания без импакт фактор: *Acta Scientifica Naturalis*, *Bulgarian Chemical Communications* и *Molbank*.

Авторефератът отразява правилно приносите на дисертационния труд. Но трябва да се отбележи, че най-вероятно, в стремежа си да съкрати неговия обем, докторантът е допуснал редица стилистични неточности. Като се прибавят и многобройните печатни грешки, смятам, че авторефератът трябва да се преработи с оглед подобряване на неговото звучене!

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Атанас Атанасов Курутос е посветен на интересни и актуални проблеми в областта на синтеза и фотофизичните изследвания на значителен брой цианинови багрила като потенциални маркери за различни биообекти. Изследванията са проведени на високо научно равнище и са съчетани с най-съвременни методи за анализ. Безспорен е личният принос на докторанта към получените резултати, които са обсъдени аналитично и достатъчно критично. Отправените забележки имат дискуссионен характер и в никакъв случай не понижават високата научна и образователна стойност на дисертационния труд. При неговото разработване, авторът е израснал като компетентен изследовател, способен да борави със съвременни методи за синтез и спектроскопски анализ на високо равнище.

Въз основа на изложеното от мен положително становище, убедено препоръчвам на членовете на почитаемото Научно Жури да гласуват „за“ присъждането на образователната и научна степен “Доктор” на маг. Атанас Атанасов Курутос.

София, 16.02.2016 г.

Рецензент:

/проф. дхн В. Божинов/