

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Огнян Иванов Петров

Факултет по химия и фармация, СУ "Св. Климент Охридски"

на дисертационен труд

*"Рационален дизайн, синтез и in vitro изследване на метаболитни модулатори – инхибитори на карнитин ацилтрансферази"*

представен от **Савина Ивайлова Стоянова**

за присъждане на образователна и научна степен **"Доктор"**

по професионално направление: 4.2 „Химически науки“,

докторантска програма: „Органична химия“

Савина Стоянова завършва висшето си образование през 2020 г. като бакалавър по химия (направление „Органична химия“) във Факултет по химия и фармация на СУ "Св. Кл. Охридски". По-късно, през 2021 г. придобива образователна степен „магистър“ по магистърска програма "Медицинска химия" в същият факултет. Със заповед на Ректора РД 20-193 от 25.01.2022 г. е зачислена като редовен докторант по професионално направление 4.2 Химически науки, докторантска програма Органична химия с научен ръководител проф. д-р Милен Богданов. Отчислена е с право на защита със заповед РД 20-490 от 24.02.2025 г.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд на тема "Рационален дизайн, синтез и *in vitro* изследване на метаболитни модулатори – инхибитори на карнитин ацилтрансферази" обхваща 153 страници, структуриран в следните раздели: Въведение - 3 стр.; Литературен обзор - 43 стр.; Резултати и обсъждане - 48 стр.; Експериментална част - 38 стр.; Обобщение и изводи - 2 стр. и Литература - 14 стр. Цитирани са общо 249 литературни източника. Фактическият материал е богато онагледен с 58 фигури, 7 схеми и 8 таблици. Илюстрациите и таблиците спомагат за прегледното представяне на получените данни за изследваните съединения.

Дисертационният труд има за цел синтеза и *in vitro* изследване на потенциални метаболитни модулатори, които оказват своя ефект чрез забавяне и/или блокиране на окислението на мастни киселини в организма. Темата на дисертацията разглежда актуален проблем – засиленото разграждане на мастни киселини стои в основата на

редица заболявания свързани с метаболитните нарушения, включително сърдечно-съдови заболявания, белодробни заболявания и др. Разработването на регулатори, стимулиращи използването на глюкозата като основен енергиен източник и/или инхибитори на бета-окислението в клетките е обект на редица изследвания през последните няколко десетилетия.

Конкретните задачи, които са поставени са: 1) провеждането на рационален дизайн и молекулен докинг; 2) синтез и охарактеризиране на избраните структури; 3) проследяване ефекта на синтезираните съединения върху активността на един от ензимите от семейството на карнитин ацилтрансферазите и 4) установяване механизма на инхибиране за най-активните структури.

В литературния обзор е подробно описано семейството ензими с общо наименование – карнитин ацилтрансферази. Разгледани са различните видове ензими от тази група, структурата им, сходство между тях и техните функции, което показва ролята им в процеса на окисление на мастните киселини. Представени са някои от основните усложнения и заболявания, до които води засиленото разграждане на мастни киселини в организма, както и са обобщени изследваните към днешна дата инхибитори на отделните ензими от групата на карнитин ацилтрансферазите. Литературният обзор завършва с кратък преглед по отношение на биологичната активност на два класа съединения – изокумарини и йонни течности. Представители на двата класа съединения са избрани като обект на изследване в настоящия дисертационен труд.

Изследвани са три серии съединения, които са подбрани на база проведения рационален дизайн. Първата серия съединения са производни на гама-бутиробетайна с вариращи заместители в гама-позиция. Поради своето структурно сходство с един от субстратите на карнитин ацилтрансферазите и въвеждането на допълнителни групи, които се предполага, че биха повишили афинитета на съединенията към активния център на ензима, представителите на серията на хетероциклените гама-бутиробетайни се очакват да бъдат ефективни инхибитори на карнитин ацилтрансферазите. Заместителите са избрани с цел изясняване на връзките структура-активност, чрез проследяване ефекта на обема и полярността на групата, както и наличието на спрегната система и свободна карбоксилна група.

Втората серия от съединения са 3,4-дихидроизокумарини и 6,7-диметокси-3,4-дихидроизокумарини с карбоксилна група в 4-та позиция и вариращ заместител в 3-та

позиция, което води до сходство с два от субстратите на изследваните ензими. Заместителите включват алкилов остатък с нормална верига и различна дължина на въглеродородния скелет, фенилов остатък и арилови заместители с наличие на полярни функционални групи. Изборът на заместителите позволява изследването на ефекта на дължината на въглеродородния скелет, вида и ориентацията в пространството на заместителите върху активността на съединенията.

Третата серия са йонни течности с N-метилимидазолиев катион и вариращи 1) заместител при втория азотен атом и 2) анион. Заместителите са подбрани с цел изясняване на връзките структура-активност, чрез проследяване ефекта на дължината на въглеродородния скелет, разклоняването на веригата, полярността на заместителите, наличието на спрегната система и влиянието на аниона върху инхибиращите свойства на съединенията.

За сериите от гама-бутиробетаини и изокумаринови производни е проведен молекулен докинг спрямо активния център на два от ензимите в семейството на карнитин ацилтрансферазите. Теоретичните изчисления показват по-висок афинитет на изследваните съединения спрямо използваните контроли и субстратите на двата ензима, с което и техния потенциал като инхибитори на ензимите от това семейство.

Следващата част от дисертационния труд представя синтеза и охарактеризирането на избраните структури. Получени са десет хетероциклени аналози на гама-бутиробетаина. Синтезът е проведен на два етапа – алкилиране и хидролиза. Условието на първата реакция са оптимизирани по отношение на температура, разтворител и реакционно време и съединенията са изолирани с добри добиви. Получените като следствие на алкилиране вещества, са подложени на хидролиза като за едно от тях, при което общата процедура не е приложима, е разработен индивидуален метод. Съединенията са охарактеризирани посредством ЯМР-спектроскопия и HRMS-спектрометрия и резултатите са сравнени с тези от литературата за структурите, при които са налични данни.

Изокумариновите структури са получени при взаимодействието на хомофталов или 6,7-диметоксихомофталов анхидрид със серия от алдехиди в присъствието на ДМАП като катализатор. Катализаторът е избран на база данни от предходни изследвания в групата за влиянието на катализатора върху стереселективността на процеса, както и възможността за получаване на странични продукти. Поради образуването на два

стереогенни центъра в хода на реакцията, продуктите са пречистени и изолирани чрез колонна хроматография с получаване на двойка от диастереоизомери (*цис-/транс-*). За определяне на конфигурацията на съответния диастереоизомер е проведен конформационен анализ. За една от диастереоизомерните двойки са снети ЯМР-спектри при различни условия – температура и разтворител, за оценяване влиянието на външните фактори върху конформационното равновесие и промяната в химичното отместване и стойностите за константата на спин-спиновото взаимодействие. От така направения анализ е определена конфигурацията за синтезираните общо 11 диастереомерни двойки изокумаринови производни.

Йонни течности с N-метилимидазолиев катион са синтезирани чрез реакция на кватернизация с добри добиви. Получени общо 24 йонни течности, които са охарактеризирани посредством ЯМР спектроскопия.

За оценяване ефекта на съединенията върху активността на изследвания ензим – карнитин ацетилтрансфераза, е трансфериран и оптимизиран спектрофотометричен метод с използване на реактив на Елман.

Всички съединения от първата серия вещества проявяват добра инхибираща способност в концентрация от 5 mM и тяхната активност е сравнима с използваните контроли, за които са посочени данни в литературата, че проявяват инхибиращ ефект спрямо ензима. За всички представители на серията и използваните контроли е определена стойността за  $IC_{50}$ . Съединенията инхибират ензимната активност в ниската милимоларна концентрация ( $IC_{50}$  в границите 2-45mM), като две от тях проявяват посилен ефект спрямо използваните контроли. Получените резултати са анализирани и са изведени връзките структура-активност. Установено е, че наличието на свободна карбоксилна група и неполярна обемиста група като заместител в гама-позиция водят до засилване на инхибиращите свойства на молекулата.

Съединенията от серията на изокумарините са изследвани в различни микромоларни до милимоларни концентрации. Установено е, че всички съединения проявяват инхибиращи свойства. Някои от представители проявяват висока активност в микромоларни концентрации, докато при други инхибиращ ефект се наблюдава единствено в милимоларни концентрации. Наблюдаваните резултати са анализирани и е установено, че удължаването на въглеродородната верига в алкиловия заместител води до повишаване на активността на съединенията. Наличието на допълнителни

заместители не води до повишаване на активността, докато заместването на алкилов с арилов заместител намалява инхибиращите свойства.

За всички 24 съединения от серията на йонните течности е определена стойността за  $IC_{50}$ . Направен е подробен анализ на получените резултатите и е установено, че по отношение на връзката структура-активност най-значими фактори са дължината на въглеводородната верига и природата на аниона. Най-активни са йонните течности с нормален децилов заместител и е наблюдавана тенденцията, че с намаляване дължината на веригата, инхибиращият ефект намалява. По отношение на влиянието на аниона, резултатите са оценени чрез хаотропните/космотропните свойства на йоните и стабилността на ензима. Наблюдаваните зависимости са в съответствие със серията на Хофмайстер.

Последната поставена задача има за цел да изясни механизма на инхибиране за най-активните съединения от всяка серия. Това включва един хетероциклен гама-бутиробетаин, две диастереоизомерни двойки изокумарини и една йонна течност. Използван е оптимизиран спектрофотометричен метод за оценяване активността на ензима в присъствие на различни концентрации от инхибитора и субстрата – L-карнитин. Приложен е кинетичен подход за измерването и е изчислена началната скорост за всяка отделна реакция. Резултатите са обработени и е предложен най-вероятният механизъм на инхибиране спрямо представените данни. За хетероцикления гама-бутиробетаин е установено, че е конкурентен инхибитор, с активност съпоставима с тази на една от използваните контроли, която е и лекарствен продукт за инхибиране окислението на мастните киселини. Резултатът потвърждава първоначално изведената хипотеза, че хетероциклените гама-бутиробетаини са структурни аналози на един от субстратите на ензима, което предполага техния висок афинитет към активния център на ензима и сходен начин на свързване. При останалите съединения е изчислен смесен тип на инхибиране със стойности за константата на инхибиране показваща по-висок афинитет на съединенията спрямо гама-бутиробетаина.

В хода на разработването на дисертационния труд са публикувани две научни публикации в реферирани международни издания в които докторантката е първи автор. Постигнатите резултати са представени на 7 научни форума. До момента е забелязан един цитат. Общият брой точки по Група от показатели Г е 37, което покрива минималните изисквания от 30 т. за ОНС “Доктор” в съответното професионално

направление. Авторефератът е изготвен старателно и включва всичко най-съществено от представения ми за рецензия дисертационен труд.

**Заключение:** Дисертационният труд, представя Савина Стоянова като перспективен млад учен в областта на органичната химия. Уверено считам, че докторантката притежава много добра теоретична и експериментална подготовка. Под научното ръководство на проф. Милен Богданов, е успяла да постигне съществени научни резултати, като демонстрира задълбоченост, систематичност и аналитичен подход - предпоставка за бъдещи самостоятелни изследвания.

Извършената работа е достатъчна по обем и напълно съответства на изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Препоръчителните критерии за придобиване на научни степени в СУ.

Оценката ми за дисертационния труд е изцяло положителна. С убеденост ще гласувам „ДА“ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на Савина Ивайлова Стоянова, по професионално направление 4.2 „Химически науки“ (Органична химия).

06.06.2025 г

София

Рецензент: .....

(проф. д-р Огнян Петров)