

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор”
на гл. ас. Стефка Стоянова Калоянова
в Катедра „Приложна органична химия”, Факултет по химия и фармация,
Софийски Университет „Св. Кл. Охридски”

Тема: „Синтез на нови флуоресцентни цианинови багрила за маркиране на биообекти”

Научен ръководител: проф. дхн Тодор Г. Делигеоргиев

Рецензент: проф. дхн Стефан Е. Бояджиев, Медицински Университет – Плевен

Изложението на материала по дисертацията от 194 стр. е оформено според утвърдената в страната ни традиция: въведение (3 стр.), литературен обзор (41 стр.), обсъждане на резултатите (63 стр.), експериментална част (72 стр.), заключение (2 стр) и литературни източници (13 стр.). Цитирани са 300 литературни източника. Фактическият материал е богато онагледен с 54 схеми и 50 фигури. Значителна част от получените данни са представени в 11 таблици. Илюстрациите и таблиците спомагат за прегледното представяне на синтезите и за сравнението на получените данни за изследваните съединения.

Целта на дисертационния труд е да се синтезират нови флуорогенни монометин цианинови багрила за нековалентно маркиране на нуклеинови киселини, с подобрени свойства в сравнение с достъпните в практиката. Поставени са четири конкретни задачи в хода на работата: 1) оптимизиране условията за синтез на полупродуктите за получаване на цианинови багрила съдържащи бензоиламино, тиазоло[4,5-*b*]пиридин и хиназолинов фрагмент; 2) синтез, изолиране и пречистване на нови моно- и дикатионни асиметрични монометин цианинови багрила, аналози на Тиазолово оранжево; 3) определяне на фотофизичните характеристики на новите багрила (абсорбционни максимуми и моларни абсорбционни коефициенти) в органичен разтворител, във воден буферен разтвор и в присъствие на стандартна двДНК; 4) изследване на флуоресцентните свойства на багрилата в свободно състояние и след свързване с двДНК в буферен разтвор. Веднага ще спомена, че тези задачи са изпълнени изцяло и резултатите от тяхното изпълнение са вече публикувани в четири статии в международните авторитетни списания *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, също *B: Biology*, и *Dyes and Pigments*. За отбелязване е също, че споменатите четири публикации в основата на дисертацията са само малка част от общата научна продукция на Ст. Калоянова – 30 статии, което говори за нейни участия в научни проекти с разнообразен характер. Част от резултатите в дисертацията са получени в сътрудничество с други изследователи и са представени накратко в изложението с цел по-пълно описание на свойствата и областите за възможно приложение на новите багрила. Изрично е подчертано, че тези данни и резултати не са обект на защита на настоящата дисертация.

Поради интердисциплинарния характер на работата на Ст. Калоянова, обзорът на литературата по темата включва няколко различни области като характеристики на цианиновите багрила и известни, общи методи за техния синтез, взаимодействие на малки молекули, в частност изследваните структури, с ДНК и маркиране на биообекти (ДНК, РНК, протеини, цели клетки) с цел количествено определяне с подходящи методи. Често в тях се използва флуоресценцията на багрилото, която се повишава многократно след свързване на багрилото с биообекта. В отделни подраздели на обзора са представени накратко основните направления и методи, свързани с приложенията на флуорогенни цианинови багрила: А) монометин цианинови багрила за количествено определяне на нуклеинови киселини чрез спектрофотометрични методи, чрез флуориметрия, за PCR в реално време и за хибридизационни техники; Б) приложения на цианиновите багрила във флуориметрия; В) цианинови багрила за маркиране на живи/мъртви клетки; Г) багрила за флуоресцентен резонансен пренос на енергия; Д) цианинови багрила за маркиране на протеини и Е) за белязане на специфична ДНК секвенция с помощта на маркер-цианиново багрило. Актуалността на дисертационния труд е видна от цитираните в обзора и в по-нататъшното изложение статии, много от които са публикувани през последните няколко години. Прави впечатление умелото цитиране не само на оригинални статии, но когато е основателно, и на вторични източници – справочници и монографии. Цитираните множество патенти показват значението на избраната тема и конкретни обекти за практиката.

Постигнатите от Ст. Калоянова резултати могат да се резюмират както следва:

- Синтез на необходимите полупродукти. В тази глава са описани последователно получаването на хетарилтиоли, за някои от които е приложена микровълнова радиация, съкращаваща реакционното време и по-подходящи за опазване на околната среда разтворители. По тази нова процедура са синтезирани с висок добив редица бензотиазол-2-тиоли, 1,3-тиазолопиридин-2-тиоли и 1,3-оксазолопиридин-2-тиоли. Следващите синтетични стъпки са метилиране или алкилиране по серния атом на тиола и кватернизирание на азотсъдържащ хетероцикъл. Разработена е нова методика за S-алкилиране използвайки облъчване с ултразвук при стайна температура в присъствието на база на Hünig, с което се постигат високи добиви и чистота на продуктите за кратко реакционно време. Необходимото кватернизирание на определен от желаното крайно багрило азотен атом е извършено по три основни метода: А) загряване на изходните компоненти в подходящ разтворител до кипенето му; Б) стапяне на изходните вещества без разтворител до 120-150°C; В) реакция в разтвор при стайна температура и по-дълго време. Чрез оптимизация на тези реакционни условия за известни от литературата процедури и разработване на техни подобрения са получени и характеризирани значителен брой кватернерни соли на бензазоли, оксазоло- или тиазолопиридини, хинолини, пиримидини и пиридини. В няколко случая кватернизиранието на бензотиазоли е предшествано от ацетилиране или бензоилиране

на amino заместител в бензеновото ядро. Нужните за споменатите полупродукти изходни съединения като бензодиазини, заместени пиридини и пиримидини, диамидини и 3-йодопропил-амониеви соли са синтезирани по реакции описани в литературата.

Въпреки че описаните синтези на полупродукти не представляват централната част от дисертацията на Ст. Калоянова, считам за уместно да подчертая, че обикновено подготвителната работа преди „възловия етап“ в синтеза отнема значително време и усилия. Само специалист, който е работил химичен синтез, би оценил трудностите, усилията и упоритостта, вложени за изолиране на десетките изходни съединения с привидно елементарни структури.

- Синтез и характеристики на монометин цианинови багила, аналози на Тиазолово оранжево (**D1-D17**). Тези неописани преди 6-бензоиламино- (или ацетил-амино)-заместени аналози на Тиазолово оранжево са синтезирани чрез кондензация на кватернизирани 2-метилтио-6-заместени-бензотиазоли с кватернерни 4-метил-хинолиниеве или 4-метилпиридиниеви соли. Прилагането на база на Hünig потиска нежелани странични реакции. Багилата в метанолен разтвор абсорбират в областта 453-519 nm с моларна абсорбируемост $\epsilon = 37900 - 93100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ и флуоресценцията им е незначителна в буферен разтвор. Флуоресценцията нараства многократно в присъствие на двДНК и Стоксовото отместване е 20-30 nm, като три от съединенията са показали внушителните 800 до 1000 пъти нарастване на флуоресцентната интензивност. Анализът на стойностите на асоциационните константи, на моларната флуоресценция и изключващия съседни позиции параметър е довел до извода, че е предпочетена интеркалацията в ДНК веригите на багилата от този тип.

- Синтез и характеристики на монометин цианинови багила съдържащи кватернизиран бензотиазол или бензоксазол и хиназолин или 1'-N-алкилиран хиназолин (**E1-E13**). Реакция между 2-метилбензотиазола или 2-метил-бензоксазола сол и 4-(метилтио)хиназолин в отсъствие на допълнителна база води до основните, незаместени по азотните атоми в хиназолиновия фрагмент, структури. В тези случаи напускащата тиометилова група е предислоцирана в компонента, съдържащ хиназолиново ядро и, вероятно, базичността му е достатъчна да осигури протичане на реакцията без добавен амин. За тази кондензация са разработени две оригинални процедури: А) в оцетен анхидрид при 70-100°C и Б) стапяне за кратко време при 100-110°C. Алкилиране по 1'-азотния атом с разнообразни алкилхалиди е позволило разширяване на серията с още 10 представителя. Всички 1'-N-алкилирани в хиназолиновото ядро съединения показват два абсорбционни максимума около 442-455 nm и 466-482 nm, като по-дълговълновият е по-интензивен с моларна абсорбируемост $\epsilon = 55000 - 102000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ и собствената им флуоресценция във воден буфер е слаба. В присъствие на двДНК флуоресценцията със Стоксово отместване около 20 nm нараства чувствително, като за три от тях се достига до 200-300кратно увеличение. Трите дикатионни багила от този тип показват подобни

характеристики, но по-малко повишение на флуоресцентната интензивност след свързване с двДНК.

- Синтез и характеристики на тиазоло- и оксазоло[4,5-*b*]пиридиниеви багрила (**A1-A16**). Тези нови багрила са получени чрез кондензация на 2-(метилтио)тиазоло- или 2-(метилтио)оксазоло[4,5-*b*]пиридиниеви соли с кватернерни 4-метилпиридиниеви, 4-метилхинолиниеве или 4-метилпиримидиниеви соли в присъствие на база на Hünig. В зависимост от структурата, багрилата поглъщат в областта 453-560 nm (в метанолен разтвор) с $\epsilon = 32000 - 186000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Повишението на флуоресценцията след свързване с двДНК е сравнително по-малко, като достига до 200 пъти. Стоксовото отместване е 17-77 nm. Данните за асоциационните константи на свързване с тимусна ДНК, температура на топене на комплексите с ДНК и индуцирани кръгово-дихроични спектри на някои от тези багрила, получени в сътрудничество, показват нисък афинитет на свързване, липса на стабилизация на използваните синтетични ДНК и РНК последователности и неспецифично свързване на багрилата.

- Синтез и характеристики на хлорни аналози на Тиазолово оранжево (**C1-C8**). Багрилата от тази група са синтезирани по класически метод от кватернизирани 2-метилтио-5-(6- или 7-)хлор-бензотиазол и 4-метилхинолини в присъствие на базата на Hünig. Избраните заместители, хлорен атом и хидроксиетилова група, модулират хидрофобността и разтворимостта на багрилата в полярен разтворител. Тези съединения показват абсорбционни максимуми в областта 498-503 nm (в разтвор на метанол) с $\epsilon = 59800 - 84800 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Стоксовото отместване на флуоресценцията в присъствие на двДНК е около 20 nm и увеличението на флуоресцентната интензивност е 130-300 пъти след свързване с двДНК. Някои от хлор-заместените аналози на Тиазолово оранжево са изследвани с флуоресцентна микроскопия за маркиране на живи клетки. Установена е известна селективност към оцветяване на ядрата. С тези съединения са проведени също флуориметрични анализи за индуцирана клетъчна смърт.

- Синтез и характеристики на други монокатионни и неутрални монометинцианинови багрила (**N1-N16**). Синтезът на представителите от тази обширна група багрила е осъществен използвайки разработените за съединения **E1-E3** две нови процедури. Директно загряване на изходните вещества без разтворител за кратко време намалява количеството нежелани странични продукти. Когато изходните вещества се топят при твърде различни температури е използван оцетен анхидрид като разтворител, но без да се прибавя амин. Стапяне на 2-метилтио-6-хлортиазоло[4,5-*b*]пиридин с 1,4-диметилпиридиниев или 1,4-диметилхинолиниев метосулфат води до неутрални багрила. Фотофизичните характеристики на багрилата в тяхната неутрална и протонирана форма са установени в разтвор на метанол. Тези съединения имат много ниска собствена флуоресценция, която в две от багрилата се повишава 120-130 пъти след свързване с двДНК.

В експерименталната част са описани кратко и ясно проведените синтези, както и характерните спектрални данни и елементни микроанализи за всички изследвани съединения.

Авторката е обобщила в 11 извода резултатите от изследванията си по синтез на нови флуоресцентни цианинови багрила за маркиране на биообекти. Изводите отразяват правдиво постигнатото. Приемам Изводи 2 и 4 като потвърждаващи и обогатяващи известни факти, Изводи 7 и 10 като получени в сътрудничество с други изследователи, а останалите са от оригинални приноси.

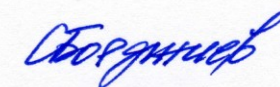
Авторефератът е изготвен старателно и включва всичко най-съществено от представения ми за рецензия труд.

Заключение: Дисертационният труд представя гл.ас. Стефка Стоянова Калоянова като перспективен учен в областта на органичния синтез насочен към модерни приложения на нови съединения в практиката. По обем изпълнената работа и резултати надхвърлят изисквания минимум в Препоръките на Софийски Университет „Св. Кл. Охридски“ по критериите за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности по професионално направление „Химически науки“. Кандидатката притежава необходимите теоретични знания по специалността, както и способност за бъдещи самостоятелни изследвания.

Оценката ми за дисертационния труд „Синтез на нови флуоресцентни цианинови багрила за маркиране на биообекти“ на гл.ас. Стефка Стоянова Калоянова е изцяло положителна. С убеденост ще гласувам „ДА“ за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ на гл. ас. Стефка Стоянова Калоянова по специалността „Органична химия“ (01.05.03.), научно направление „Химически науки“ (4.2.).

14.06.2012 г.
Плевен

Рецензент:



(проф. Стефан Е. Бояджиев, дхн)