Р Е Ц Е Н З И Я

от проф. д-р Машенка Борисова Димитрова

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – Българска академия на науките (ИЕМПАМ-БАН)

Относно: дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“ по специалност „Органична химия“ от Професионално направление 4.2 „Химически науки“, Област на висше образование 4 „Природни науки, математика и информатика“.

Автор: ас. Весела Михайлова Михайлова – докторант в катедра „Органична химия и фармакогнозия“, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“

Научен ръководител: доц. д-р Донка Николова Ташева

Тема: „Синтез на дизаместени производни на пиролин- и пиролидинкарбоксилни киселини с потенциална биологична активност“

Ас. Михайлова е представила изрядна документация, в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложение на ЗРАСРБ и специфичните изисквания на СУ, отразени в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“.

Биографични данни

Весела Михайлова е завършила висшето си образование във Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“. През 2013 г. тя придобива бакалавърска степен по химия в специалност „Компютърна химия“ след защита на дипломна работа на тема „Синтез и хроматографски изследвания на заместени 2-амино-5-оксонитрили“. В периода 2013-2015 г. продължава обучението си за магистърска степен в специалност „Съвременни методи за синтез и анализ на органични съединения“, което завършва през 2015 г. със защита на дипломна работа на тема „Синтез на 3,5-дизаместени производни на пролина“. През 2016 г. е зачислена като редовен докторант в катедра „Органична химия и фармакогнозия“ с ръководител доц. д-р Донка Ташева. Считано от 15.03.2018 г., редовната докторантура на Весела Михайлова е трансформирана в задочна с решение на Ректора на СУ, във връзка със спечелване на конкурс за асистент. На 01 март 2019 г. кандидатката е отчислена от докторантура с право на защита. От м. октомври 2018 г. тя е асистент към катедра „Органична химия и фармакогнозия“ на ФХФ и провежда семинари и упражнения по органична химия на студенти редовно и задочно обучение от ФХФ и БФ на СУ.

Изпълнение на критериите за придобиване на ОНС „доктор“

В изпълнение на минималните национални изисквания по чл. 2б от ЗРАСРБ за придобиване на ОНС „доктор“ в професионално направление 4.2 „Химически науки“, ас. Весела Михайлова е представила подробни данни по групи показатели, както следва:

Група А: Представен за защита дисертационен труд – **50 т.** (минимално изискване 50 т.)

Група Г, Показател 7: Две публикации в реферирани и индексирани научни списания в световни бази данни – **37 т.** (минимално изискване 30 т.)

Група Ж, Показател 25: Участие в четири научни проекта – **20 т.** (минимално изискване 0 т.)

От тази справка се вижда, че при успешна защита на дисертационния труд, ас. Михайлова ще събере 107 точки при изискуем минимум от 80 т., с което надхвърля минималните изисквания за придобиване на ОНС „доктор“. Необходимо е да се подчертае и качеството на представената научна дейност. Двете публикации са в списанията *Molecules* и *MolBank*, които са реферирани и

индексирани в *Web of Science* и имат квартили, съответно Q1 и Q4. Публикуването в такива списания след стриктно рецензиране, е несъмнен успех за кандидатката и показател за научното значение на представените данни. Също така, при отсъствие на изискване за участие в проекти, ас. Михайлова е била член на колективите на 4 проекта, три от които са финансирани от ФНИ на СУ и един – от ФНИ на МОН. Важен актив е и участието на кандидатката в осем научни форума – 5 национални и 3 чуждестранни (USA), на които са показани резултати, свързани с дисертационния труд. Може да се заключи, че наукометричните показатели на Весела Михайлова са в пълно съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и дори ги надхвърлят.

Към тези данни трябва да се добави и активната преподавателска дейност в два факултета на СУ.

Анализ на дисертационния труд

Актуалност на темата

Огромното разнообразие от ракови заболявания, познати в съвременната медицина, изисква постоянно търсене на нови потенциални терапевтици от природен и синтетичен произход. Тази тенденция е отразена в концепцията за персонализирана медицина, според която сходните симптоми не означават еднаква патогенеза и може да изискват различно третиране при всеки пациент за достигане на желания ефект. Затова, за всяко заболяване е необходим широк набор от медикаменти, от които да се избере най-подходящия. Това означава, че търсенето на нови лечебни препарати е винаги актуално. Голям брой публикации от последните години са посветени на антитуморното действие на производни на пирола и пиролидина, които са често срещани в природата. Практически няма обаче, изследвания върху биологичното действие на пиролини, въпреки че те също присъстват в структурата на природни продукти като алкалоиди и феромони. Така, проучването на производни на пиролините остава все още неразработена ниша от потенциални терапевтици, която е станала оригинален обект на дисертацията на ас. Михайлова.

Литературен обзор

Литературният обзор е написан на 85 страници и е посветен на различните методи за синтез на производни на Δ^1-пиролина. Подразделен е по типа на методите (напр. вътрешномолекулна циклизация, циклоприсъединяване, прегрупировки, прилагане на различни катализатори и др.). Описан е синтеза на 146 групи съединения въз основа на 229 литературни източника. Прегледът на литературата е критичен - посочени са предимствата и подходящия обхват от реагенти за всеки отделен синтез. Обърнато е специално внимание на стереоселективността на описаните методи. Прави впечатление добрият стил и прецизността на изложението, което показва отличната осведоменост на кандидатката по избраната тема. Независимо от това считам, че литературният обзор е твърде обстоен, като заема над 45 % от обема на дисертационния труд. Бих препоръчала на авторката да се придържа към по-стегнати и целенасочени обзори в бъдещата й работа.

Целите и задачите на дисертацията са изведени на базата на направения обзор и са дефинирани кратко и ясно. Цели се разработване на ефективни методи за синтез на 3,5-дизаместени производни на 3,4-дихидро-2Н-пирол-2-карбоксилна киселина и на 3,5-дизаместени производни на пролина, както и тестиране на антитуморната им активност *in vitro*.

Резултати и дискусия

Разделът „Резултати и дискусия“ е под номер 3 в дисертационния труд и заема 36 страници. В него подробно е описан синтеза на 10 групи съединения с различни заместители и функционални групи, като някои от тях са изходни реагенти, други са междинни съединения и/или крайни реакционни продукти. На всеки етап от синтетичния процес са тестирани различни реакционни условия, като е определено времетраенето, добива, съотношението между диастереомерите, а след пречистване чрез колонна хроматография – и добива на преобладаващия диастереомер. Такъв

подход неизменно води до заключения относно най-подходящите реакционни условия като разтворители, катализатори и др. за получаване на възможно най-високи добиви при много добра стереоселективност на реакцията.

Стартовата реакция за многоетапния синтез е присъединяване по Михаел на аминоацетонитрил с дифенилметилиденова защита на амино групата към заместени арилметилиденацетофенони (халкони) до получаване на 3,5-диарилзаместени 2-амино-5-оксонитрили със защитена амино група. Част от реагентите също са синтезирани, но по познати методи и затова не са описани в дисертацията. Установена е зависимостта между типа на заместителите в ароматните ядра и времетраенето, добива и стереоселективността на реакцията, което е от полза за бъдещи синтези на подобни съединения. Като принос трябва да се отбележи приложеният нов подход за синтез на заместените 2-амино-5-оксонитрили в условията на твърдо-течен междуфазов катализ с използване на калциев оксид като база. На следващият етап е проведена хидролитична циклизация на Михаеловите адукти, при която едновременно се сваля защитата на амино групата и се получават целевите диарилзаместени карбонитрили на Δ^1-пиролина. При подбраните от авторката условия с различно съдържание на солна киселина в реакционната смес, пиролинкарбонитрилите са получени с високи добиви и без епимеризация, което също може да се отбележи като принос. Последващата метанолиза на нитрила до метилов естер е проведена с реакция на Pinner, което не е описано в литературата и е съществен принос в органичния синтез. Получени са *trans*-изомерите с много добър добив, а като страничен продукт при някои от съединенията е получен и амид. Добро решение на авторите е да запазят нитрили, които също да се използват за биологични тестове, защото е добре известно, че слабо активните метилови естери и съответните карбоксилни киселини са с по-ограничено въздействие върху клетки в сравнение с нитрилите.

Получаването на аналози на пролина е проведено чрез редукция на азометиновата връзка в синтезираните Δ^1-пиролинкарбонитрили до съответните пиролидинкарбонитрили с тестиране на различни редуктори. Тези опити са показали добри добиви и висока диастереоселективност при използването на натриевоборен хидрид в оцетна киселина, по-специално за *trans*-изомерите. При *cis*-нитрилите, продуктите на редукция са превърнати в р-толуенсулфонати с цел по-лесното им пречистване. Авторите са предложили метод на *one-pot* хидролитична циклизация с редукция, по който значително преобладава един от диастереомерите и той може да бъде пречистен и изолиран с висок добив чрез колонна хроматография. Този метод е несъмнен успех, защото съкращава както реакционното време, така и броят на етапите при синтеза. Следват съответно, метанолиза, за която също са подбрани най-добрите реакционни условия и получаване на крайния продукт - аналог на пролина чрез хидролиза на естера до карбоксилна киселина в алкални условия.

В следващия подраздел са описани методите за структурно охарактеризиране на изолираните продукти, които са ИЧ-спектроскопия, ^{1}H и ^{13}C ЯМР и мас-спектрометрия с висока резолюция (HRMS) в положителен йонен режим. ESI-MS и MS/MS анализите са позволили да се определи типа на йонна фрагментация в позитивен режим и структурата на получените йони. Относителната конфигурация на някои от съединенията е определяна с NOESY- спектри.

Особен интерес предизвиква подраздел 3.9, в който са описани резултатите от *in vitro* анализи на антипролиферативната активност на избрани съединения върху панел от човешки туморни клетъчни линии с различен произход, проведени със стандартен МТТ-тест. Всички тестове са проведени с Δ^1-пиролинкарбонитрили. Пиролидинкарбонитрилите, както и съответните метилови естери и карбоксилни киселини, не са изследвани за биологична активност, което може да стане продължение на дисертационния труд като отделна интердисциплинарна разработка. Определени са IC_{50} (концентрациите на полу-инхибиране) за всяка клетъчна линия и всеки потенциален терапевтик, както и SI (индекса на селективност) спрямо нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A (епител от човешка млечна жлеза). Направено е и сравнение с действието на стандартния химиотерапевтик цисплатина. С предварителни експерименти, очаквано е установена значително

по-висока биологична активност на заместените пиролинкарбонитрили в сравнение с тази на съответните естери. Много интересен резултат от работата е селективното действие на единия от диастереомерите при много клетъчни линии в сравнение с другия диастереомер. От таблично представените данни може да се заключи, че заместителите в ароматните ядра са с по-малко значение за биологичната активност от вида на диастереомера, което също може да бъде обект на бъдещи изследвания. Като краен резултат от проведените *in vitro* анализи, кандидатката е отделила 2 съединения с потенциален терапевтичен ефект – *trans*-4л за белодробен аденокарцином и *cis*-4н за колоректален и белодробен карциноми и тройно негативен рак на млечна жлеза. Според мен, към тях може да се прибавят и *cis*-4д за цервикален карцином и *cis*-6н за хепатоцелуларен и колоректален карциноми и карцином на простата. Това предложение се основава на високите SI, които са решаващи при избора на потенциални терапевтици (SI > 2.5 се счита за добър индекс на селективност).

В експерименталната част от дисертацията са описани синтетичните методи, достатъчно детайлно, за да могат да бъдат повторени. Дадени са и данните от ИЧ, ЯМР и HRMS, които са полезни като база данни за бъдещи синтези на сходни съединения.

Накрая на дисертационния труд е дадено стегнато обобщение на резултатите, а по-нататък са посочени и основните приноси, които подкрепям изцяло. Приносите бяха обсъдени по-горе, при анализа на раздел „Резултати и дискусия“.

Автореферат

Авторефератът отразява правилно съдържанието на дисертацията.

Освен дължината на литературния обзор, нямам съществени забележки към дисертацията. Има някои технически грешки, например, на стр. 96 долу е объркана номерацията на съединенията. Тези малки грешки по никакъв начин не намаляват стойността на представения за оценка труд.

Заключение

Представеният за рецензия дисертационен труд е интердисциплинарен. Проведените синтези са специално предназначени за получаване на производни на Δ^1-пиролина и аналози на пролина, които са потенциални антитуморни средства, но не са добре проучени досега. Темата е актуална, а извършената работа е огромна по обем. На всеки етап от синтезата са проучени различни условия за провеждане на реакцията, в резултат на което са намерени най-подходящите способи за постигане на високи добиви и добра стереоселективност. Редица от направените заключения са с приносен характер в областта на органичния синтез. В процеса на работа докторантката е усвоила важни за бъдещата ѝ дейност умения като целенасочен подбор на научна литература, провеждане на синтези, изолиране, пречистване и спектрално охарактеризиране на реакционни продукти. Важно за нейната подготовка е и запознаването с други области на познанието като *in vitro* анализи на биологична активност, обработка на резултатите и критичен подбор на потенциални агенти за приложение в медицината. Ас. Михайлова изцяло покрива критериите за придобиване на ОНС „доктор“, заложени в ЗРАСРБ и неговите правилници. Въз основа на изложеното по-горе, убедено препоръчвам на почитаемото НЖ да присъди на Весела Михайлова ОНС „доктор“ по органична химия от професионално направление 4.2 „Химически науки“.

09.06.2025 г. Рецензент:

/проф. М. Димитрова/