РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Ивайло Петров Иванов, дх, Медицински факултет при Медицински университет - София, член на научно жури, определено със заповед № РД-38-213 от 23.04.2025 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“, професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия) на тема **„Рационален дизайн, синтез и *in vitro* изследване на метаболитни модулатори – инхибитори на карнитин ацилтрансферази**“ с автор асистент Савина Ивайлова Стоянова с научен ръководител проф. д-р Милен Георгиев Богданов

Описание на процедурата

Савина Ивайлова Стоянова е зачислена за редовен докторант по професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма „Органична химия“ към катедра „Органична химия и фармакогнозия“ със заповед № РД 20-193/25.01.2022 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“. Отчислена е с право на защита със заповед № РД 20-490/24.02.2025 г. Тя е положила всички изпити съгласно индивидуалния ѝ учебен план, а представените материали по процедурата за присъждане на ОНС “Доктор“ отговарят на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото прилагане и Условията и реда за придобиване на научна степен и заемане на академична длъжност в СУ „Св. Климент Охридски” и включват: копие на дипломи за придобити бакалавърска и магистърска степени, дисертационен труд, автореферат, списък на научните публикации по темата на дисертацията, справка за съответствие с минималните национални изисквания за ОНС „доктор“ за ПН 4.2. (Химически науки), автобиография, декларация за оригиналност и достоверност, протокол за проверка на оригиналността на дисертационния труд и становище от научния ръководител във връзка с процедурата за предотвратяване на плагиатство. Приложени са две публикации по темата на дисертационния труд.

Кратки биографични данни

Докторантката Савина Стоянова е завършила бакалавърска степен - специалност „Химия“ през 2020 г. и придобива степен „магистър“ по Екохимия (магистърска програма „Медицинска химия“) през 2021 г. във Факултета по химия и фармация на СУ “Св. Климент Охридски”. От юли 2023 г. е асистент към катедрата по Органична химия и фармакогнозия. Отчислена е с право на защита през месец февруари 2025 г.

Обща информация за дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на български език и съдържа 148 страници, в които са включени 58 фигури, 7 схеми, 6 таблици и са цитирани 249 литературни източници. Работата е структурирана в следните раздели: въведение (3 стр.), включващо целите и задачите на дисертационния труд, литературен обзор (43 стр.), резултати и обсъждане (48 стр.), експериментална част (38 стр.), обобщения и изводи (2 стр.), библиографско описание на цитираните литературни източници (14 стр.).

Към дисертационния труд са предоставени два автореферата, на български (61 стр.) и английски език (59 стр.), в които коректно и пълно са отразени основните резултати и приноси на дисертационния труд.

Цел на дисертацията и актуалност на тематиката

Ензимите, заедно с рецепторите, са главните биологични цели (мишени) при дизайна на лекарствени субстанции. Инхибирането на ензимите предлага възможност за въздействие върху определени биохимични пътища и регулиране на определени процеси в организма. Познаването на структурата на ензима и в частност на активния му център, както и структурата на субстрата и неговата химическа реактивоспособност могат да се използват като основа за рационални подходи при проектирането на лекарствени вещества.

Дисертационният труд включва изследователски материал, насочен към дизайн, синтез и *in vitro* изследване на потенциални инхибитори на карнитин ацилтрансферази. Това е актуална тема поради възможността тези инхибитори да повлияват положително на метаболитните процеси в организма - инхибиране на транспорта на мастните киселини в клетките, което да промени клетъчния енергиен метаболизъм, водещо до дълбоки последици за клетъчната енергийна хомеостаза. С оглед на казаното, мога да заключа, че темата на дисертационния труд е актуална и съответства на съвременните тенденции в областта на медицинската химия и фармация.

За изпълнение на целта на дисертационния труд са формулирани следните научни задачи: рационален дизайн и молекулен докинг, синтез и охарактеризиране на целевите съединения, сравнителен анализ и оценка на тяхната инхибираща способност, установяване на механизма на инхибиране за най-активните представители.

Литературен обзор

Съдържанието и структурата на обзора напълно съответстват на целта и задачите на дисертационния труд, адекватно са представени спецификите на научния проблем, засегнат в настоящия научен труд. В представения литературен обзор са разгледани структурните особености, разпространението и физиологичните функции на отделните ензими от семейството на карнитин ацилтрансферазите, систематично са представени различните типове инхибитори, като е поставен акцент върху връзката структура-активност, и са разгледани биологичните свойства на два класа съединения – изокумаринови производни и йонни течности, които също са обект на изследване в настоящата дисертация.

Експерименталната част

Написана е ясно, без излишни подробности, но позволяваща експериментите да бъдат възпроизведени, ако е необходимо. На базата на предварителен теоретичен дизайн на потенциалните инхибитори, основан на структурно сходство с естествените субстрати, е проведен докинг (използвана е програмата AutoDock Vina). Въз основа на тези резултати са подбрани и синтезирани над 50 съединения, представители на три групи вещества: хетероциклени γ-бутиробетаини, 3-заместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и йонни течности – N1(3)-алкил-N3(1)-метилимидазолиеви соли. Някои от съединенията са пречистени чрез колонна хроматография. Синтезираните вещества са охарактеризирани с ядрен магнитен резонанс, инфрачервена спектроскопия и мас-спектрометрия с висока резолюция.

При изследванията за определяне на *in-vitro* ефекта на синтезираните съединения върху активността на карнитин ацетилтрансфераза е използвана модифицирана процедура за спектрофотометрично определяне на L-карнитин с реактива на Елман. За

определяне на началните скорости на реакциите е използван по-точен метод, предложен от Baici. За установяване механизма на инхибиране на най-активните съединения са проведени кинетични изследвания и получените данни са обработени с програмата за нелинеен регресионен анализ SigmaPlot v. 12.5.

Резултати от дисертационната работа

Резултатите от изследванията са представени ясно и систематично – теоретичен дизайн, молекулен докинг, синтез и доказване на структурата на получените съединения, определяне на инхибиращата им активност и механизма на инхибиране на най-ефективните инхибитори. Получените резултати и данни са представени и обсъдени адекватно, направени са логични научни обяснения и заключения.

Синтезът на хетероцикленитe γ-бутиробетаини е извършен на два етапа. Първият етап е заместителна реакция между избрания амин и етил 4-бромобутаноат в среда от ацетонитрил. Използването на този разтворител е добре теоретично обосновано. Вторият етап е хидролиза на получените естери.

Всички йонни течности са получени при взаимодействието на N-метилимидазол и съответния алкилбромид в среда от сух ацетонитрил. Серията от 3-заместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини са получени при взаимодействие на хомофталови анхидриди със съответните алдехиди в среда от сух хлороформ в присъствие на N,N-диметиламинопиридин като катализатор. Реакцията протича на два етапа: присъединяване и последваща вътрешномолекулна циклизация. Потвърдено е, че се наблюдава транс-диастереоселктивност, като тя е по-голяма при използване на ароматни алдехиди. За еднозначно доказване на конфигурациите на тези съединения, ЯМР-спектрите са снимани в различни разтворители и е отчетено различното влияние на смяната на разтворителя върху в $^{3}J_{3,4}$ константите. Наблюдаваният ефект е обяснен логично.

За оценка на инхибиторния ефект на синтезираните съединения върху активността на карнитин ацетилтрансферазата и извеждане на връзката структура - активност са определени концентрациите, необходими за понижаване на активността на ензима с 50% (IC_{50}). Получените резултати за хетероцикленитe γ-бутиробетаини са в добро съответствие с резултатите от молекулния докинг и са направени изводи за връзката структура - активност на основата на получените експериментални резултати. Йонните течности на базата на N1(3)-алкил-N3(1)-метилимидазолиеви соли също са инхибитори на изследвания ензим. Наблюдавана е зависимост между структурните елементи в състава на йонните течности, главно дължината на въглеводородната верига при N1(3) атома от имидазолния пръстен и инхибиторната им активност. За оценка на инхибиторния потенциал на синтезираните изокумаринови производни и ефекта на дължината на въглеродната верига на алкиловия заместител в положение 3, са проведени експерименти с три различни концентрации на веществата и е определена степента на инхибиране. Определянето на механизма на инхибиране и стойностите на константите на инхибиране (K_i), е направено като са използвани съединенията с най-висока инхибираща способност от трите серии вещества. Получените данни са обработени с програмата Sigma Plot, която включва интегриран модул за нелинейна регресия и интерполация към модели на отделните типове инхибиране. Някои от тези резултати са илюстрирани с графики в двойно-реципрочни координати (графика на Лаинуивър-Бърк).

Обобщение и изводи

- На базата на детайлния анализ на структурните характеристики на активните центрове на карнитин ацилтрансферазите и структурата на познатите инхибитори е направен рационален дизайн на целеви съединения като потенциални инхибитори - хетероциклени аналози на γ-бутиробетаин, 3-заместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и йонни течности на основата на N1(3)-алкил-N3(1)-метилимидазолиеви соли.
- Предварителната оценка на техния инхибиторен потенциал е проведено докинг изследване спрямо карнитин ацетилтрансфераза и карнитин палмитоилтрансфераза. Получените резултати показват потенциала на изследваните съединения да са инхибитори на тези ензими.
- Синтезирани и охарактеризирани са над 50 съединения от трите групи вещества, потенциални инхибитори на карнитин ацилтрансферазите.
- На съединенията от изкумариновата серия е проведен конформационен анализ и са установени емпирични зависимости за еднозначно определяне на конфигурацията на отделните диастереоизомери, тъй като използването на константите на спин-спиново взаимодействие не дава възможност за еднозначно определяне на изомерите.
- Количествена оценка на инхибиращите ефекти на получените съединения е направена чрез *in vitro* изследвания, в които карнитин ацетилтрансферазата е използвана като моделен ензим.
- Всички представители от групата на γ-бутиробетаините се проявяват като инхибитори на ензима със стойности на IC_{50} в интервала 2.24 – 43.6 mM. Съединенията от групата на йонните течности показват сходна с тях инхибираща способност, като стойностите на IC_{50} са в интервала 0.93 – 30.8 mM. Някои от тези съединения имат по-ниски стойности на IC_{50} в сравнение с тези на Мелдониум (одобрено лекарство; IC_{50} = 11.4) и MeGBB (препарат в III-та фаза на клинично проучване; 9.32 mM). Някои от съединенията от групата на изокумариновите производни инхибират ензимната реакция при по-ниски концентрации (IC_{50} са в интервала от 100 μM до 1 mM).
- Въз основа на получените данни са направени изводи относно връзките структура-активност за трите серии съединения.
- При групата на γ-бутиробетаините се наблюдават следните зависимости: увеличаването на обема на заместителите в γ-позиция води до нарастване на инхибиторния ефект, наличието на карбоксилна група е от ключово значение за инхибирането на ензима, ароматният характер на заместителя в γ-позиция не е определящ фактор за по-висока активност.
- В серията от йонни течности е наблюдавана зависимост по отношение на дължината на алкиловия остатък - нарастването ѝ води до повишаване сродството на тези съединения към карнитин ацетилтрансферазата, наличието на бензенов остатък в края на алифатната верига, оказва сравнително малък ефект върху инхибиращата способност.
- Главният фактор, обуславящ инхибиращия ефект на 3-заместените 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини е наличието на хидрофобен алкилов заместител със средна или дълга верига в 3-позиция, като не се наблюдава зависимост по отношение на инхибиращи ефект на *транс* и *цис* изомерите.
- Определен е типът на на инхибиране за най-активните в това отношение вещества. Установено е, че γ-изохинолинбутиробетаин е обратим конкурентен инхибитор (K_i = 3,5 mM). Тази стойност е близка до инхибиторната константа (K_i = 1.63 mM) на лекарствения препарат Мелдониум, който също е конкурентен инхибитор.

- Изомерните 3-децил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и 3-децил-6,7-диметокси-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини са инхибитори от така наречения смесен тип (със стойности за K_i в границите 0.13 – 0.38 mM). Тези инхибитори имат по-голямо сродство към ензим-субстратния комплекс, отколкото към свободния ензим. За разлика от тях, N1(3)-децил-N3(1)-метилимидазолиев бромид, най-активният представител на групата на йонните течности който също е инхибитор от смесен тип (K_i = 0.77 mM), има по-голямо сродство към свободния ензим.
- Тези резултати дават основание, да се предположи, че изследваните съединения имат потенциал за използване като метаболитни модулатори и за лечение на системни възпалителни процеси, исхемична болест, диабет и някои видове рак, при условие, че преминат през всички фази на клинично проучване.

Наукометрични показатели

По темата на дисертацията Савина Стоянова е съавтор на 2 научни публикации, публикувани в индексирани и реферирани списания - Molecules (Q1) и Molbank (Q4). Така по показател Г от Препоръчителните критерии на СУ кандидатката събира 37 точки, при изискуем минимум от 30 точки. Към момента е забелязан 1 цитат и h индекс = 1, което и носи 12 допълнителни точки. Резултатите от проведените по дисертацията изследвания са представени на 7 научни форума. В този смисъл, наукометричните показатели на докторантката, надхвърлят минималните изисквания по брой точки по група показатели за ОНС "Доктор" в професионално направление Химически науки.

Коментари, въпроси и препоръки

- На стр. 48 от дисертационния труд е предложен механизъм, съгласно който каталитичният хистидин депротонира хидроксилната или съответно тиолната група, която впоследствие участва в процеса на ацилно нуклеофилно заместване. Това означава, че хистидинът осъществява специфичен базичен катализ, което е невъзможно заради голямата разлика в pK_a стойностите на имидазоловия остатък от хистидина и вторичната хидроксилна група на карнитина. В този смисъл хистидинът осъществява общ базичен катализ, което е отразено в цитираната статия при разглеждане на каталитияния механизъм на карнитин ацилтрансферазите (Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases. Annals of the New York Academy of Sciences 2004, 1033(1), 17-29).
- На стр. 73-74 е написано, че реакциите между N-метилимидазол и алилбромид, съответно бензилбромид, протичат като мономолекулно нуклефилно заместване (D_N+A_N). По литературни данни механизмът на тези реакции е бимолекулно нуклефилно заместване (A_ND_N) (Hansen T, Vermeeren P, De Jong L, Bickelhaupt FM, Hamlin TA. S_N2 versus S_N2' competition. The Journal of Organic Chemistry 2022, 87(14), 8892-901; Rawlings RE, McKerlie AK, Bates DJ, Mo Y, Karty JM. Origin of the S_N2 Benzylic Effect: Contributions by π Delocalization and Field/Inductive Effects. European Journal of Organic Chemistry 2012(30), 5991-6004); Hammou Y.A. Organic Chemistry Reaction Mechanisms, 2020, p.55-56.
- Известо е, че N,N-диметиламинопиридин (ДМАП) е ефективен нуклеофилен катализатор в реакциите на ацилно нуклеофилно заместване (Scriven EF. 4-Dialkylaminopyridines: super acylation and alkylation catalysts. Chemical Society

Reviews. 1983, 12(2), 129-161), което е отбелязано и в статията, публикувана в Molbank, но няма коментар каква е връзката между каталитичния му ефект (освен като база) и механизма на реакцията между хомофталови анхидриди и алдехиди. Може ли да предложите алтернативен механизъм на вътрешномолекулната циклизация с участие на ДМАП като нуклеофилен катализатор?

- Йодидните йони са много добър катализатор на реакции на нуклеофилно заместване. Такъв катализ е ефективен в апротонни разтворители като ацетон и ацетонитрил. Като се има предвид добрата разтворимост на NaI в ацетонитрил, препоръчвам използването му в бъдещи експерименти в реакции на нуклеофилно заместване с участието на алкилхалогениди.
- На фигура 58 е представена зависимостта на степента на инхибиране от концентрациите на различните инхибитори. Предлагам за графично илюстриране на концентрационно зависимо инхибиране на ензим и определяне на IC_{50} да се използва зависимостта на относителната активност на ензима или относителната степен на инхибиране като функция от десетичния логаритъм от концентрацията на инхибитора. Тази зависимост се използва широко в ензимологията, както и при представяне на данните на ефекта от дозата във фармакологията.

Посочените критични бележки по никакъв начин не променят отличното цялостно впечатление от дисертационния труд и работата на докторантката, както и не омаловажават постигнатите съществени резултати.

Заключение

Дисертационният труд и наукометричните показатели на Савина Стоянова напълно съответстват на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, както и на изискванията за придобиване на научната степен „Доктор“ от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“.

Предвид всичко гореизложено, убедено препоръчам на уважаемите членове на научното жури да присъдят на Савина Ивайлова Стоянова образователната и научната степен „Доктор” в професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия).

11.05.2025 г. Рецензент: *Ивайло Иванов*

доц. д-р Ивайло Иванов, дх