

Рецензия

на дисертационен труд на тема: „*Теоретично изследване на факторите, управляващи процесите на свързване и селективност на инхибитори на хистон деацетилазата*“, представен от **Николай Ангелович Тошев** за присъждане на образователната и научна степен „**доктор**“ по професионално направление 4.2. Химически науки (Теоретична химия)

Дисертационният труд на Николай Ангелович Тошев обхваща фундаментални теоретични изследвания върху пространствената структура, енергетиката, стабилността и координационното поведение към Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+} на серия биолиганди-инхибитори на хистон деацетилаза, HDAC8. Взаимодействието на биолигандите с активния център на хистон деацетилазата е оценено чрез изчисления на моделни структури на ензимно-инхибиторни комплекси, HDACi-HDAC8, с различни представители на хидроксамовите киселини и техните сяра- и селен- производни.

Темата на дисертационния труд е актуална и значима тъй като е мотивирана от търсенето на нови структурно модифицирани лиганди, които в съгласие с концепцията за изоформеното инхибиране, следва да осигуряват селективно инхибиране, минимизиране на страничните ефекти от действието на лекарствените препарати и повишаване на терапевтичния индекс.

Целите и конкретните научни задачи на дисертационния труд са ясно и точно дефинирани, въпреки сложността на структурите, процесите и механизмите, по които протичат взаимодействията в ензимно-инхибиторния комплекс. В изследванията се отличават основно две цели: 1) детайлно физикохимично охарактеризиране на серия хидроксамови киселини и техни метални комплекси и 2) изследване на факторите определящи селективното взаимодействие на хидроксамовите киселини с активния център на ензима хистон деацетилаза 8, HDAC8. Целите са постигнати чрез конструирането, оптимизирането и доказването на серия структурни модели на хидроксамовите киселини и на ензимно-инхибиторната система (HDACi-HDAC8). Тъй като създаването на нови селективни към определена изоформа инхибитори се постига чрез структурна модификация на различните елементи от фармакофорния модел, Николай Тошев е насочил теоретичното моделиране в дисертацията, на първо място, към изследване на пространствената структура (конформери, тавтомери), енергетиката, стабилността и координационните свойства на възможните лиганди-инхибитори. В следващ етап на изследванията, за да се установят факторите, които управляват процеса на свързване на хидроксамовите киселини към активния център на хистон деацетилаза, HDAC8, на базата на рентгеноструктурни данни са конструирани теоретични модели, с които са изследвани специфичните взаимодействия в съответните ензимно-инхибиторни комплекси, HDACi-HDAC8.

За постигане на целите и решаване на задачите в дисертацията, Николай Тошев е избрал подходящ теоретичен подход, който на молекулно ниво позволява достъп до структурата

на съединенията и механизмите на техните взаимодействия, и който е в състояние да осветли връзката „структура-специфични свойства“ на изследваните системи. Теоретичното моделиране е проведено коректно с утвърден и валидиран метод на изчислителната химия, B3LYP/6-311++G(d,p), доказал се като надежден по отношение на точност, време и компютърен ресурс за изследването на геометриите и стабилността на конформерите на различни хидроксамови киселини и техните метални комплекси. Някои по-важни резултати, изводи и конкретни приноси в изследванията на дисертационния труд са както следва.

- В рамките на теорията на функционала на електронната плътност, в детайли е изследвана структурата, енергетиката и взаимодействията на серия структурно модифицирани потенциални инхибитори на хистон деацетилазата (*субероиланилид хидроксамова киселина (SAHA), модифицирани със S и Se аналози (SAHA-S, SAHA-Se) и аналози с модифицирана карбонилна група (carb-S-SAHA, carb-Se-SAHA)*); определени са стабилните конформери в неутрална и депротонирана форма, в газова фаза и разтворител. Определените енергии на депротониране за двата възможни протона, O-H и N-H, са показали, че S и Se аналозите се депротонират по-лесно в сравнение с немодифицираната субероиланилид хидроксамова киселина.
- Проведено е коректно и изчерпателно теоретично моделиране на координационното поведение на двувалентни метални йони (Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+}) към изследваната серия инхибитори. Установено е предпочетено бидентатно хелатно координиране с O-H депротонираните лиганди и тетраедрична конфигурация на комплексите с две молекули вода във втората координационна сфера. Интересен резултат от изследването е, че Zn^{2+} проявява най-висок афинитет по отношение на всички изследвани лиганди и така Fe^{2+} и Mg^{2+} не са йони-конкуренти при свързването (оценката е по енергия на йонен обмен).
- Конструирани и оптимизирани са реалистични структурни модели на ензимно-инхибиторни комплекси, HDACi-HDAC8.
- Доказано е влиянието на дължината на линкерната верига, вида на свързващата единица, модифицирането на крайната група, липсата или наличието на линкер върху афинитета и селективността на серия хидроксамови киселини по отношение на ензима хистон деацетилаза, HDAC8.
- Идентифицирани са „ключови“ взаимодействия, които оказват съществено влияние върху афинитета и селективността на хидроксамовата киселина към активния център на ензима хистон деацетилаза, HDAC8 (напр. взаимодействието между кислородния атом от анилидната група (-NHCO-) на инхибитора на субероиланилид хидроксамова киселина (SAHA) и водороден атом от фрагмента His180). Регистрирани са и „допълнителни“ взаимодействия с по-слабо влияние.
- Установена е ключовата роля на свързващата единица за определянето на афинитета и селективността на инхибитора към ензима-домакин. В рамките на обсъждания фармакофорен модел, свързващата частица е определена като самостоятелна

структурна единица, отделно от линкера, заедно с хидроксамовата глава и крайната група.

- Определено е влиянието на два аминокиселинни участъка от ензимния джоб върху афинитета и селективността на инхибитора към ензима: Asp267 и His180. Тези фрагменти определят свързването към катиона в активния център и селективността на инхибитора към ензима.
- Установено е, че геометрията на металния център не се променя съществено при промяна на отделните елементи от фармакофорния модел на хидроксамовите аналози. В същото време, афинитетът и селективността на инхибиторите и техните производни зависят в значителна степен от структурните и физикохимични характеристики на линкера, свързващата единица и крайната група и в по-малка степен от взаимодействието между хидроксамовата глава и металния йон.

Описаните в дисертационния труд изследвания и резултати са публикувани в три научни статии: една в *Journal of Molecular Modeling*, 2018, 24(5), 114 (Q3, IF=1.35), една в *Bulgarian Chemical Communications*, 2018, 50, с. 228-236 (Q4, IF=0.24) и една препоръчана за публикуване с две положителни рецензии в *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2021 (Q3, IF=1.53). Върху статията, публикувана в 2018 г. в *Journal of Molecular Modeling*, към момента на оформяне на материалите, са забелязани 3 цитата. Резултати от изследванията са представени на 8 национални и международни форуми със 7 устни доклада и едно постерно представяне. Николай Тошев е участник в два научно-изследователски проекта, единият приключил (ФНИ, № ДН 09/4 от 2016 г.) а другият е текущ (в рамките на двустранно сътрудничество България-Русия, 2019 г.). В 2018 г., той получава Първа награда на Националния конкурс за наградата „Аквахим“ на Съюза на химиците в България за най-добра дипломна работа.

Дисертационният труд е написан върху 87 машинописни страници и включва 31 фигури, 35 уравнения, 20 таблици и 6 схеми, които са достатъчно информативни и илюстрират добре същността и резултатите от извършените изследвания. Литературният обзор, включващ 141 източника, отразява коректно съвременното състояние на научния проблем. Цитираната литература е описана в добра последователност, избирателно и със съпътстващ анализ и оценка на данните, както и с акцент върху тези от тях, които могат да подпомогнат интерпретацията на резултатите в настоящето изследване. Авторефератът е направен съгласно изискванията и отразява правилно основните положения и научните приноси на дисертацията.

Въпроси и коментари

1. Съгласно възприетите теоретични модели, взаимодействието на хидроксамовите киселини с металния център на ензима се осъществява чрез донорно-акцепторна връзка метал-лиганд. В същото време са регистрирани и други по-слаби взаимодействия (електростатични, Ван дер Ваалсови) определени като „ключови“ и „допълнителни“. Възниква въпросът: Защо афинитетът и селективността на инхибиторите и техните

производни зависят в значителна степен от тези слаби взаимодействия (чрез структурните и физикохимични характеристики на линкера, свързващата единица и крайната група) и в по-малка степен от взаимодействието между хидроксамовата глава и металния йон?

2. От изследванията се оформя изводът, че *геометричната структурата* на лигандите (хидроксамовите киселини) и на формиращите се метални комплекси е определяща при взаимодействията в ензимно-инхибиторния комплекс и от нея основно зависи свързването и селективността на инхибиторите на хистон деацетилазата. Как би могло да се обясни предпочетеното свързване на всички изследвани лиганди (особено S и Se аналозите) към Zn^{2+} ?

3. Химичните и биохимичните реакции протичат в разтвор. Какво е значението на изчисленията, проведени в газова фаза. Оценявани ли са и какви са стойностите на енергията (силата) на водородните връзки в газова фаза и разтвор?

Заклучение. Структурата, обемът и съдържанието на дисертационния труд на Николай Тошев отговарят на изискванията на ЗРАСРБ и на препоръчителните критерии за придобиване на образователната и научната степен „доктор” в СУ за професионално направление „Химически науки”. Представените в дисертацията моделни теоретични изследвания са проведени на високо научно ниво, коректно и изчерпателно, а резултатите от тях са безспорен принос към изследването на структурата, стабилността, активността и специфичните инхибиращи свойства на хидроксамовите киселини и техните сяра- и селен-производни по отношение на ензима хистон деацетилаза. Изводите в дисертацията кореспондират с поставените цели и задачи. Те имат фундаментално значение за областта и могат да се използват като добра база при бъдещи изследвания на тези и сходни системи. Описаните в дисертацията изследвания представят Николай Тошев като много добре подготвен специалист, с изградени специфични изследователски умения и капацитет за провеждане на теоретични изследвания върху бионеорганични системи. Направеният по-горе анализ на материалите, научните резултати и изводите от изследванията в дисертационния труд ми дава основание без колебание да дам своята положителна оценка като убедено гласувам с „да“ за присъждането на образователната и научна степен **“доктор”** на **Николай Ангелович Тошев** по професионално направление 4.2. „Химически науки” (Теоретична химия).

Рецензент:

14 юни 2021 г., София

(Наташа Трендафилова, проф. д-р)