

РЕЦЕНЗИЯ

на Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”, по научна специалност 02.11.11, “Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъци)”.

Тема: “Синтез на нови биологично активни съединения и изпитване на техните свойства”

Автор: Галина Георгиева Григорова, магистър по молекулярна биология, докторант към катедра Биотехнология при Университет “Проф. д-р Асен Златаров”;

Научни ръководители:

проф. д.м.н. Захари Райков

доц. д-р. Красимир Василев

Рецензент: проф. Александър Борисов Златков, дф, Катедра по фармацевтична химия, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет - София

Доказано е, че редица патологични процеси в човешкия организъм възникват под въздействието на свободни радикали. От друга страна стабилни свободни радикали, главно нитроксилни, предизвикват несъмнен интерес в изучаването на редица биологични проблеми като канцерогенезата, повлияването на туморния растеж, биологията на стареенето и редица други, основно поради възможността да участват в радикалови реакции без загуба на свободната валентност.

В качеството си на спин белези, спин уловители, спин сонди и парамагнитни модели на биологично активни съединения, те намират приложение при изследване структурата, конформационната динамика и микрорелефа на белтъците, ензимите, нуклеиновите киселини и мембраните за определяне концентрацията на биологичноактивните съединения в различни тъкани, тумори, кръв и др.. Във връзка с тези проучвания в последните години се развива интензивно синтезът и изследването на свойствата на нитроксилите. Стабилните нитроксилни радикали намират приложение при решаването на посочените по-горе проблеми чрез използване метода на електронния парамагнитен резонанс (ЕПР-метод). При въвеждане на нитроксилни радикали в структурата на биологично активни вещества могат да се модифицират не само функционалните групи, но и електронните, оптичните и стереохимичните свойства на молекулата и се получава парамагнитен модел на биологично активното вещество. По този начин чрез прилагане на ЕПР-метода могат да се изследват процесите, в които тези вещества участват в биосистемата, т.е. механизма на действието им. Също

така някои производни от тази група притежават биологична активност. Съществуват редица данни за получаване на парамагнитни модели на голям брой биологично активни съединения, включително и на метаболити.

Дисертационният труд използва методите на синтетичната органична химия за създаване на спин белязани рифамицин, цистеин, четвъртични амониеви соли и метални комплекси при използването на стабилен нитроксилен радикал – 2,2,6,6-тетраметиламинопиперидин-1-оксил (ТМРО), като впоследствие е изследвана тяхната *in vitro* и *in vivo* антибактериална активност спрямо *M. tuberculosis* и *St. aureus*. В този смисъл темата на дисертацията като цяло е актуална и значима за науката и практиката, включително за фармацевтичното производство. Считам обаче, че формулировката е твърде обща и лишена от конкретност предвид естеството и обема на извършената работа, описана в дисертацията. Темата трябва да бъде кратко и ясно формулирана и същевременно да е максимално информативна относно разработвания научен проблем – нещо, което в случая липсва.

Дисертационният труд е написан и структуриран общо взето стандартно и е представен на 110 страници, от които: съдържание – 3 страници, използвани съкращения – 1 страница, увод – 2 страници, 37 страници теоретична част, 1 страница цел и задачи, 10 страници експериментална част, 41 страници обсъждане на резултатите, 2 страници изводи и приноси, 10 страници литература. Включени са още списък на научните публикации и материали, докладвани на научни конференции, свързани с дисертационния труд, както и списък на статии в които е цитиран научен труд на дисертантката. Работата включва 17 схеми, 7 таблици и 21 фигури.

Теоретичната част (общо 37 страници), която по същество е **Литературен обзор** и би трябвало така да се нарича, показва добрата осведоменост на дисертантката по разработвания от нея проблем. Цитирани са 94 литературни източника, от които 85 на латиница и 9 на кирилица. От цитираните литературни източници 31 са от последните 10 години и 22 от последните 5 години.

В обзора подробно е разгледана антибактериалната активност на рифамицините и тяхната биотрансформация. Отделено е значително място на свободните радикали и ролята им в биологията и медицината. Поставен е акцент върху използването на нитроксилни радикали в биологията и медицината, както и образуването на свободни радикали при хинонови противотуморни вещества и при метаболизма на някои ксенобиотици.

Към литературния обзор имам следните забележки. Макар и обемен и информативен, литературния обзор създава впечатление по-скоро за механичен сбор на отделните части (11 на брой), а не за логически свързани елементи. Литературният обзор би трябвало да повдигне някои въпроси или разногласия, които изискват по-нататъшно проучване. Литературният обзор

трябва да служи като обосновка на важността на дисертацията, от гледна точка на това какво тя ще допринесе към изследвания проблем и с какво ще обогати научното познание до момента. Научният проблем, изследван в дисертацията би трябвало да се очертае по естествен начин от литературния обзор. В този смисъл не е ясно защо в обзора са разгледани спин белязани алкилиращи противотуморни съединения след като се работи върху антибактериални средства и се търси антибактериална активност. Категорично не мога да се съглася с даденото от дисертантката определение за антибиотици на страница 16 – химическо съединение с подчертан биологичен ефект, изразен в унищожаването или забавянето на растежа на микроорганизми. Това определение подхожда за антибактериални средства. Съгласно съвременната класификация антибиотиците са подгрупа на антибактериалните средства. Във всички учебници по фармацевтична химия за антибиотик се дава определението – съединения или техни модификации, които са продукт от микробиялния метаболизъм, които в ниски концентрации спират или инхибират развитието на други микроорганизми. В този смисъл сулфонамидите и хинолоните не са антибиотици. За тях може да се употреби термина химиотерапевтици, независимо, че в последно време той се ползва основно за лекарства за лечение на ракови заболявания, или още по-добре - антибактериални средства. На места обзорът е написан повествователно, в монографичен стил без цитиране на литература за данни които очевидно са литературни. Например стр. 22 втори абзац отдолу – „изследванията на други автори показваха,.....” и не се цитира литература, стр. 24 – втори абзац отгоре – „някои автори са на мнение, че....” – отново няма цитат, както и на ред други места. Считаю, че е отделено малко място за акумулацията и комплексите на тежки метали, както и антибактериалната им активност. Не се споменава върху какви микроорганизми са проведени изследванията и дали сред тях са използваните от дисертантката *M. tuberculosis* и *St. aureus*.

Целта е формулирана ясно и точно. За реализирането и са поставени **6 задачи**, формулирани точно и в логическа последователност.

В експерименталната част са описани методиките, използвани от дисертантката в нейния труд. Представеният им голям брой показва, че в методичен аспект дисертационният труд е разработен чрез подходящи и правилно подбрани експериментални методи. Приложени са адекватни методи за обработка и анализ на резултатите. Експерименталните постановки не пораждат съмнение. Трябва да се отбележат някои пропуски и неточности. Определянето на количеството на свързан метал се извършва спектрофотометрично по метода на стандартната права, но никъде не е посочено валидиран ли е този метод – определени ли са показателите линейност, повтораемост, възпроизводимост, специфичност.

В частта **Резултати и обсъждане** ясно се вижда системния подход при осъществяването на изследванията. В изпълнение на основната цел на дисертацията – синтез на модифициран Рифамицин SV, получаване, охарактеризиране на комплексни съединения и изследване на тяхната антимикробна активност, дисертантката коментира получаването на стабилен нитроксилен радикал 2,2,6,6-тетраметиламинопиперидин-1-оксил (ТМРО) и базирани на него четвъртични амониеви соли, както и спин белязан цистеин. За получаването на последния е използван карбодимидния кондензационен метод, като бегло е представен обобщеният му механизъм. Считаю, че можеше да се обърне по-голямо внимание на механизма, тъй като, както е известно от литературата, ходът да процеса много се влияе от реакционните условия, силата на киселина, базичността на амина и др. Едно изследване в тази насока би дало много по-голяма теоретична тежест на разработката. За доказване на структурите на получените съединения е използвана ИЧ спектроскопия като бърз лесен и ефективен метод. Интерпретацията на спектралните данни е адекватна. Емпирично е изведена зависимост на антибактериалната активност от четвъртия въглеродороден остатък.

Макар и накратно, но ясно и точно е описано получаването на спин белязан рифамицин и неговия амин. Структурите са потвърдени чрез ИЧ, ЕПР, ^1H -ЯМР и МАС – спектри. Подобавачо внимание е обърнато на получаването на спин белязани комплексни съединения. Направено е относително подробно тълкуване на ИЧ спектрите на получените комплекси и е предложена вероятна структура. Установена е зависимост на антибактериалната активност от вида на металния йон, като е доказан бактерициден ефект на комплекса на рифамицин с Zn^{2+} спрямо *E. coli*, докато медния и ванадилния комплекс проявяват бактериостатичен ефект. Показана е възможността да се прогнозира с помощта на невронни мрежи натрупването на бомаса при култивиране на *E. coli* в присъствие на комплекси на ТМРО с йони на тежки метали.

Доста подробно и с разбиране дисертантката описва проведените изследвания за установяване на антибактериалната активност на получените от нея нови съединения. Ясно се вижда от предстваните графики и таблици, че изследваните съединения показват отчетлив антибактериален ефект. Най-голяма активност проявява рифамицинът модифициран с ТМРО, като активността му е по-голяма от използвания за сравнение рифамицин. Спрямо *M. tuberculosis* спин белязания дериват превъзхожда рифамицина четири пъти при по-ниска LD_{50} , което е значимо постижение.

Изводите като цяло отразяват правилно получените в дисертационния труд резултати. Проведените изследвания намират решение на поставените задачи с което целта на дисертацията е постигната.

Авторефератът (общ обем 46 страници) отразява точно и в достатъчна степен съдържанието на дисертационния труд.

Накратко приносите на настоящия дисертационен труд се свеждат до:

1. За първи път е получен спин белязан рифамицин с висока антибактериална активност *in vitro* спрямо *M. tuberculosis* и *S. aureus*.
2. Въвеждането на стабилни нитроксидови радикали намалява *in vivo* токсичността, изразена като LD₅₀.
3. Възможността на изследваните съединения да образуват комплекси с йони на тежки метали ги прави потенциално приложими като детоксиканти.
4. Доказана е възможността за получаване на спин белязани кватернерни амониеви соли, проявяващи отчетлив антибактериален ефект.
5. Охарактеризираните комплекси, включващи модифициран рифамицин, могат да бъдат използвани за по-нататъчни изследвания свързани с приложението им в медицинската практика.

Дисертантката отбелязва като принос цитирам: „Наличието на свободен електрон в съединенията позволява използването на ЕПР метода за изследване на взаимодействията им с клетки или клетъчни мембрани, което е важно при изследване проникването на съединенията през мембраните на туберкулозните бактерии, които са труднопроходими и устойчиви на антибактериални вещества.”. Без експериментално потвърждение, макар и в минимална степен (което в дисертацията липсва), това съждение има пожелателен характер и не би следвало да се отбелязва като научен принос от дисертантката.

Печатни и граматически грешки в текста има не малко количество. Също така на много места в раздела „Собствени изследвания” у читателя се създава усещане за разхвърляност и неподреденост. Така например, фигури 10 и 11 (стр. 59 и 60) предхождат фигури от 1 до 6 (стр. 61 - 63). Две различни схеми на стр. 64 и 65 са отбелязани като Схема 12. От изложението читателят остава с впечатление, че изследванията за LD₅₀ са дело на дисертантката, но в експерименталната част липсва методика по която това е извършено.

Към дисертантка имам следните въпроси:

1. В експерименталната част в синтетичните методики никъде не са посочени добиви на получените съединения. Защо? И по конкретно, какъв е добива при получаване на спин белязания цистеин?
2. По какъв начин е проследяван хода на реакцията за да се определят реакционните времена?
3. В изложението се коментират вероятни структури на комплексите на ТМРО с йони на тежки метали. Тъй като се работи в среда включваща вода, не би ли било възможно в комплекса да има координационно свързана вода и какви доказателства можете да предоставите, че такава няма?

Заклучение

Представената от Галина Григорова дисертация засяга актуална от теоретична и практическа гледна точка тема. Поставените цели и задачи са изпълнени успешно, а дисертантката е усвоила и използвала съвременни методи.

Във връзка с дисертацията са публикувани 4 научни статии, от които 1 в списание с IF. Материали свързани с дисертационния труд са докладвани на 2 международни научни конференции.

Дисертантката е представила справка за цитати – 1 на брой. По отношение тези наукометрични показатели, дисертантката напълно покрива изискванията за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”.

Всичко това ми дава основание да препоръчам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “Доктор” на Галина Григорова.

София.
02.09.2013 г.

Рецензент:
(проф. Анд. Златков, дф)

