

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р инж. Петър Тодоров Тодоров

на дисертационен труд на инж. Неда Орлинова Анастасова

на тема: "Синтез и изследване на хепатотоксичност и антиоксидантна активност на N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони" за придобиване на образователната и научна степен "доктор" по научната специалност 7.3

Фармация (Фармацевтична химия)

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

Докторантката инж. Неда Орлинова Анастасова е завършила висшето си образование в Химикотехнологичен и Металургичен Университет-София, паралелно в две специалности "Фин органичен синтез" и "Инженерна екология и опазване на околната среда", ОКС Бакалавър през 2011 г. В периода април 2011 – юли 2011г. Неда Анастасова е спечелила ERASMUS гранд за изготвяне на дипломна работа в лаборатория по химична технология на текстила в Universitat Politècnica de Catalunya, Барселона, Испания. През 2012 г. завършва магистратура по специалност "Фин органичен синтез" с отличен успех от дипломната защита и среден успех от курса на обучение Отличен 5.91. На 01.03.2013 г. е зачислена като редовен докторант към катедра "Органичен синтез и горива" при ХТМУ с ръководители доц. д-р Анелия Маврова и проф. дхн Владимир Божинов. Отчислена е с право на защита на 01.10.2016 г. (Заповед Р-ФХ-243/10.10.2016 г.). Докторантката е положила в срок с отличен успех 4-те специализиращи и общопрофилни изпити, предвидени в програмата. Тя владее английски, испански и китайски език.

От 2012 г. до 2013 г. работи като химик към Института по органична химия с център фитохимия на БАН. От 09.2014 г. до 12.2014 г. е технически сътрудник в Biotechlab. През април 2016 г. отново е назначена като химик към Института по органична химия с център фитохимия на БАН, като от октомври месец на същата година е назначена като асистент

към СОА, ИОХЦФ, БАН.

инж. Неда Анастасова е участвала в международно лятно училище по инструментални методи за анализ през юли 2012 г. в Университета в Марибор, Словения и в Университета в Нови Сад, Сърбия, а през юли 2013 г. в Университета в Скопие, Македония. Научните ѝ интереси са в областта на фармацевтичната химия, синтеза на нови биологично активни съединения, както и в областта на съвременните методи за пречистване и анализ на органични съединения.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Дисертационният труд се отнася до една актуална за фармацията и фармацевтичната химия тематика, а именно създаването на нови и усъвършенстването на вече известни методи за синтез на бензимидазолови производни, както и изследването на тяхната биологична активност, в частност откриване на нови антиоксиданти и цитопротектори. Темата за антиоксидантите е особено актуална в наши дни, тъй като те са нискомолекулни съединения, чийто основно свойство е унищожаването на свободните радикали в живите организми, които са отговорни за развитието на редица заболявания, туморни процеси и стареене и др. Дисертационният труд е представен на 136 страници, от които 33 стр. Литературен обзор, базиран на 158 източника, включително и от 2016 г. Добро впечатление прави умението на дисертантката да обобщава експериментални данни и да илюстрира направените изводи чрез подходящо оформени таблици (8 на брой), фигури (35 на брой) и схеми (34 на брой).

В литературният обзор дисертантката е разгледала подробно видовете свободни радикали, както и ендогенните и екзогенни причинители на оксидативен стрес. Описани са етапите на липидна пероксидация, както и механизмите на антиоксидантно действие. Много ясно е написана и стратегията при разработването на бензимидазолови производни с антиоксидантна активност. Специално внимание е отделено и на различните методи за синтез, както и на различните модификации в структурата на бензимидазолите необходима за проявяването на очакваната биологична активност. От литературният обзор става ясно, че

дисертантката се е запознала много добре с литературните сведения по темата и свободно борава с тях. Въз основа на това точно и ясно е формулирана целта на дисертационния труд и са определени съответните 9 задачи за изпълнение.

Експерименталната част е описана в раздел Материали и методи и заема 23 страници. Тя е написана кратко, точно и ясно и съдържа необходимата информация за изпълнение на описаните експерименти. Всички синтезирани съединения, както и извършените биологични изследвания са детайлно описани в раздела Материали и методи, и са дадени в 31 страници приложения – DFT-анализ, ИЧ- и ЯМР- спектри, данни за инхибирането на липидната пероксидация и предполагаемия механизъм на антиоксидантното действие на изследваните съединения. Добро впечатление прави фактът, че всички синтезирани съединения са много надеждно охарактеризирани и идентифицирани с Тт и Rf стойности, с ИЧ-, ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектри, а за по пълното охарактеризиране на някои от съединенията са използвани 2D хомоядрена корелация – COSY и 2D хетероядрена корелация с едноквантова кохерентност - HSQC. На 2 от съединенията е направен и рентгеноструктурен анализ на монокристал.

В раздела Резултати и дискусия заемащ 60 страници дисертантката разглежда синтеза и спектралното охарактеризиране на N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони. Предложен е нов синтетичен подход за синтез на 1,3-дизаместени бензимидазол-2-тиони, базиран на реакцията на присъединяване по Михаел на α,β - ненасително карбонилно съединение, в частност метилакрилат. Съществено, което трябва да се отбележи е, че успешно са оптимизирани условията за протичане на реакцията по Михаел. Молното съотношение на използваните реагенти е намалено многократно (от 1:11 до 1:2), реакционното време е драстично намалено (от 6 часа на 2 часа) и най-важното което трябва да се отбележи е получаване на дизаместено производно на бензимидазол-2-тиона в чист вид, което еднозначно е доказано с помощта на съвременни ЯМР- анализи.

По голяма част от раздела Резултати и дискусия е посветена на фармакологичните изследвания, в частност хепатотоксичност и

антиоксидантна активност. Това е напълно оправдано, тъй като дисертационния труд е за придобиване на степен в областта на фармацевтичната химия. От данните за хепатопротективния ефект върху новосинтезираните бензимидазолони производни е изведена връзката за влиянието на различните заместители в бензимидазоловия цикъл върху цитотоксичността на съединенията. От направените изводи става ясно, че най-ниска хепатотоксичност проявяват съединенията с бензоилен заместител в 5-та позиция на бензимидазоловия пръстен. В групите на хидразоните се намират най-нетоксичните съединения, тези незаместените в 5-та позиция, съдържащи *o*-, *m*- или *p*-метоксиалдехиден остатък. За да определят структурата и нейното влияние върху биологичните свойства са извършени DFT-изчисления и монокристална рентгенова дифракция. Определени са възможните конформери и механизмите на антиоксидантно действие в полярна и неполярна среда на базата на изчислените енталпии на отцепване на водороден атом (HAT) и йонизационния потенциал при пренос на единичен електрон (SET). Установено е че хидразоните имат най-висок капацитет от изследваните съединения да бъдат донори на електрони и да улавят свободните радикали по SET механизма.

От направената връзка структура-активност (SAR) и от данните за физикохимичните и биологични свойства на естерите и хидразоните на бензимидазол-2-тионите става ясно, че те имат добра разтворимост и способност да навлизат в клетките от една страна и от друга, имат ниска хепатотоксичност. Установено е, че хидразоните от своя страна притежават по-висока липофилност в сравнение с естерите и хидразидите, което определя по-високия им афинитет към липидните мембрани. Това означава, че някои от новосинтезираните бензимидазол-2-тионов производни проявяват благоприятни свойства и висок потенциал да намерят приложение като хепатопротектори.

От теоретична и практическа гледна точка трябва да се отбележат и изследванията за генериране на радикал-анион и по-точно влиянието на нитроароматната група в молекулата на съединенията, тъй като тя е вероятната причина за възникване на хепатотоксичност. На схема 34 са представени хипотетичните продукти на редукцията на съединение 8

(3,3'-(5-нитро-2-тиоксо-1H-бензо[d]имидазолил-1,3(2H)-диил)дипропаноат) и генерирането на анион-радикала в електрохимична клетка. Настъпващата промяна е отчетена и описана въз основа на ИЧ-спектралните характеристики и теоретично пресметнатата геометрия на молекулата.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Авторефератът отговаря на изискванията на Правилника на ХТМУ и отразява напълно резултатите от проведените изследвания.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Научните постижения в дисертационния труд са представени чрез осем извода и четири приноса, по основни от които са:

- ✓ Представен е нов синтетичен подход за синтез на 1,3-дизаместени бензимидазол-2-тиони базиран на реакцията на присъединяване по Михаел.
- ✓ Разработени са подходящи реакционни методи за синтез, изолиране и пречистване на всяко едно от новосинтезираните съединения.
- ✓ Получени са перспективни N,N'-дизаместени бензимидазол-2-тиони, които са от интерес за фармацевтичната химия и представляващи потенциални хепатопротектори и антиоксиданти.
- ✓ Направена е връзката структура-биологична активност (SAR), която дава основание бензоилните и незаместените в 5-та позиция на ароматното ядро производни на N,N'-дизаместените бензимидазол-2-тиони да се разглеждат, като перспективни водещи структури за лекарствен дизайн на съединения с хепатопротективен ефект по механизмите на антиоксидантно действие и инхибиране на липидната пероксидация.

Приносите на изследванията имат научен и научно-приложен

характер и отразяват представените резултати.

5. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд

Резултатите от дисертационната работа са отразени в 2 научни публикации с IF. Част от описаните резултати са публикувани в престижното международно списание - *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (IF=2.92), като са забелязани и 6 цитата. Публикацията е посветена на синтеза, електронните свойства и биологичната активност на нови бензимидазолови производни.

По-голяма част от научните резултати са публикувани в *Arabian Journal of Chemistry* (IF=3.61). Публикацията е посветена на нов синтетичен подход за синтез на 1,3-дизаместени бензимидазол-2-тиони по реакцията на присъединяване по аза-Михаел, детайлно е описана изследваната хепатопротективна активност при *in vitro* модел на оксидативен стрес, индуциран от терт-бутилхидропероксид. Направени са и квантово-химични изследвания, като е дадена и връзката структура-биологична активност.

Представени са и 8 участия в доклади и постерни съобщения по темата на дисертационния труд на научни форуми в България и чужбина, включително и участия в Международното лятно училище по инструментален анализ.

6. Критични бележки и коментари

Дисертацията е написана ясно и точно на високо научно ниво. В работата се забелязват някои стилни и печатни грешки. Имам няколко основни забележки и коментари:

- Би било хубаво да се даде количеството на даденото новосинтезирано съединение в грамове, а не само процентния добив;
- Използването на изрази като “бял прах”, “светлокафяв прах” и т.н. не смятам за коректни;
- На страница 19 наименованията на съединения 5 и 6 не отговарят на химичните структури;

- На страница 28, схема 5 не съответства на казаното в текста.

Към дисертантката имам следните въпроси:

- 1) Относно хидразонните производни на бензимидазолите (16-45): има ли данни в литературата за влиянието на други алкилови остатъци (с по-дълги вериги) различни от метиловата група на 5-та позиция в бензимидазола, и как би повлияло наличието на електронодонорни заместители в тази позиция върху биологичната активност на съединенията?
- 2) Мелатонинът на който вие сте се позовали във вашите изследвания съдържа метокси група в 5-та позиция в бензимидазола, какво би станало при замяната ѝ с етокси или фенокси група например?
- 3) Как бихте оценили получените от вас резултати според “Правилото 5 на Липински” за оценка на лекарственото подобие?

7. Лични впечатления за дисертанта

Познавам лично инж. Неда Анастасова още като студентка от курса по Органична химия и съм с отлични впечатления от нея. Това се потвърди и от представянето на дисертационния ѝ труд пред разширения катедрен съвет при катедра “Органичен синтез и горива”, където с голяма увереност представи научната си работа.

8. Заключение

Представеният дисертационен труд е напълно дисертабилен, с оригинален принос за науката в една много интересна и переспективна за приложение област, каквато е фармацевтичната химия. Получените резултати са актуални и имат научно-приложен характер. Направените изводи са подкрепени от впечатляващ обем експериментални резултати. По време на разработването на дисертационната работа инж. Неда Анастасова е усвоила разнообразни методи и техники за синтез, анализ и изследване, които са тълкувани много добре с разбиране и на добър научен език. Резултатите са представени в 2 научни публикации с IF и 8 доклада на

научни форуми, като за значимостта на получените резултати говорят и излезлите вече 6 цитата. Представените материали и резултати напълно съответстват на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за условията за реда на придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Химикотехнологичния и Металургичен Университет-София.

Въз основа на изложеното по-горе с убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на инж. магистър Неда Орлинова Анастасова и препоръчвам на уважаемите членовете на научното жури да подкрепят присъждането ѝ на образователната и научна степен "доктор" по научната специалност 7.3 Фармация (Фармацевтична химия).

22.02.2017 г.

гр.София

Рецензент:



/доц. д-р инж. Петър Тодоров/