

СТАНОВИЩЕ

от д-р Йорданка Иванова Узунова, доцент по биоорганична химия, Медицински Университет-Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

по област на висше образование 4. Природни науки

професионално направление 4.2. Химически науки

докторска програма „Органична химия“

Автор: Миглена Златкова Милушева

Тема: Синтез на нови спазмолитици, повлияващи паметови функции при експериментални животни

Научни ръководители: доц. д-р Стоянка Николова Атанасова, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“ и доц. д-р Илияна Димитрова Стефанова-Кънчева, Медицински Университет-Пловдив

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Настоящото становище е изготвено въз основа на заповед № РД-22-1134/15.05.2025 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, с която съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура по защита на дисертационен труд на тема „Синтез на нови спазмолитици, повлияващи паметови функции при експериментални животни“ за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки; професионално направление 4.2. Химически науки; докторска програма „Органична химия“. Автор на дисертационния труд е Миглена Златкова Милушева, докторант в редовна форма на обучение към катедра „Органична химия“ с научни ръководители доц. д-р Стоянка Николова Атанасова, катедра Органична химия, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“ и доц. д-р Илияна Димитрова Стефанова-Кънчева, Катедра по медицинска физика и биофизика, Медицински Университет-Пловдив.

Представеният от докторантката комплект материали по процедурата отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, правилника за неговото прилагане и е в съответствие с чл. 36 (1) от правилника за развитие на академичния състав на ПУ- Паисий Хилендарски (от 16.12.2024 г.).

2. Актуалност на тематиката

В последните години във фармацията се наблюдава тенденция към „възраждане“ на добре известни лекарства за нови терапевтични приложения и за модифициране на активното вещество за подобряване на фармакологичните ефекти. В този смисъл синтезирането на нови структури съчетаващи различни фармокофори с добре известен фармакологичен ефект

като потенциални лекарствени кандидати със спазмолитична активност е актуална тематика и представената разработка е насочена към получаване на такъв тип съединения. Като допълнение се търси и оценява не само спазмолитичният ефект, но и допълнителен такъв, повлияващ когнитивните функции.

3. Познаване на проблема

Докторантката Миглена Милушева демонстрира задълбочено познание на тематиката, свързана с дисертационния труд. В дисертацията са цитирани 394 източника, от тях 285 са в раздела „Литературен обзор“, като значителна част от тях са публикувани през последните 10 години. Обзорът обхваща обобщена информация за етиологията и епидемиологията на възпалителните заболявания на червата и лекарствата прилагани за лечението им. Описани са свойства на антраниловата киселина и производните ѝ, както и методи за синтеза им свързани с темата на дисертацията. Стегнато и ясно е обоснована нуждата от хибридни молекули като потенциални лекарства действащи върху няколко цели при лечение на комплексни заболявания. Разгледани са експериментални модели за предклинична оценка на биологично активни вещества. Разделите в литературния обзор завършват с анализ и обобщение на литературата, което доказва, че докторантката е способна да търси, систематизира и критично анализира научна литература.

4. Методика на изследването

За постигане на поставената в дисертацията цел са синтезирани моно- и диамиди на антраниловата киселина след предварителна *in silico* оценка на фармакокинетичният и токсичен потенциал на вероятните кандидати за лекарства. Подбрани и синтезирани са 3 моноамида и 15 диамида на антранилова киселина. Всяка структура е доказана и охарактеризирана чрез няколко аналитични метода (Тънкослойна и препаративна хроматография, ^1H и ^{13}C ЯМР-, Мас-, ИЧ- спектрометрия), както и чрез тяхната Тг. За оценка на биологичните ефекти са използвани плъхове порода Wistar и гладкомускулни препарати от тях, за което са представени съответните разрешителни. Оценката на антимикробната активност е направена върху 10 щам бактерии (5 от тях Грам-положителни и 5-Грам-отрицателни), два щам дрожди и 5 щам гъбички.

Докторантката Миглена Милушева е усвоила отлично използваните методи и лабораторни похвати в областта на Органичния синтез и е придобила знания и умения за методи прилагани за оценка на биологична активност на малки молекули.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертацията има интердисциплинарен характер. Написана е на 170 страници и съдържа 12 таблици, 32 фигури и 13 схеми. Библиографската справка обхваща 394 литературни

източника. Дисертационният труд включва следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Собствени изследвания, Експериментална част (материали и методи), Изводи и Приноси. Превес има частта, посветени на собствените изследвания. Изводите и приносите са обобщени както следва:

Осъществен е дизайн на малки молекули като спазмолитици и са намерени синтетични подходи за получаването им. За първи път по посочения метод с много добри добиви са получени 18 хибрида на антранилова киселина, от които 16 нови структури, непубликувани в научната литература досега. Всички синтезирани съединения са пречистени, изолирани и охарактеризирани с техните температури на топене и спектрални методи, в това число FT-IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HRMS.

Теоретично е изследвано повлияването на спазмолитичната активност от въвеждането на различни заместители. Измерена е спазмолитичната активност на всички синтезирани съединения, като за пет от тях (6b и 6d от първа група, 4 от втора група, 8d и 8e от трета група) тази активност е по-добра в сравнение с познатия спазмолитик мебеверин. Оценена е противовъзпалителната активност на всички синтезирани съединения по два метода *in vitro* и *ex vivo*. Всички изследвани съединения проявяват обещаваща защита срещу термичната денатурация на албумин, като най-силна активност демонстрират съединения 3 и 6d. *Ex vivo* изследванията излъчват хибридите 6e, 6d и 5 като вещества със съществено инхибиращо действие върху синтеза на провъзпалителния цитокин IL-1 β , а хибриди 6e, 4 и 7a показват най-висока активност спрямо експресията на ензима nNOS.

Изследвана е активността на три от съединенията, с много добра спазмолитична активност при повлияване паметови функции на експериментални животни, като едно от тях (6d) оказва значим ефект в процесите на памет и обучение.

Установена е много добра антимикробна активност за съединение 4 спрямо патогенните гъбички *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* и *Rhizopus* sp. и умерена активност спрямо дрождите *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*. Изследваните щамове Грам-положителни бактерии *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* и Грам-отрицателни бактерии *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* проявяват умерена чувствителност по отношение на хибрида 4 и диамидните му производни 7a–e.

Установена е връзката структура–биологична активност за всяка от групите синтезирани съединения, която може да служи като основа за бъдещ рационален дизайн на биологичноактивни съединения.

Доказана е степен на биологична активност, характеризираща един от хибридите като вещество с функционални характеристики на спазмолитик с противовъзпалително действие, повлияващо паметовите функции при експериментални животни.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Представени са 3 научни съобщения по дисертационния труд, публикувани в специализирани и мултидисциплинарни международни списания от първи квартал (Q1) – International Journal of Molecular Sciences (IF 4,9), Pharmaceuticals (IF 4,3) и Molecules (IF 4,2). Докторантката е първи автор и на трите публикации. Към момента на рецензиране са забелязани общо 22 цитата по 2 от тях. Общият наукометричен резултат от публикуваните статии е 75 точки (Q1 – 3x25 точки), което надвишава националните минимални изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“ и изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ПУ-„Паисий Хилендарски“ (изискуеми 30 точки). Освен това резултатите са презентирани на общо 18 национални и международни научни форуми, като Миглена Милушева е първи автор в 11 от постерите и докладите.

7. Автореферат

Авторефератът е написан ясно и стегнато, отразява последователността на изследванията описани в дисертационния труд и води логично до формулиране на основните постижения на докторантката. Използван е коректен научен език, а дискутираните превръщания и получените резултати са надлежно онагледени със съответните схеми, фигури и таблици.

Като критична бележка към автореферата може да се отбележи липсата на списък с цитирана литература – задължителен реквизит към всеки самостоятелен научен труд.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Към докторантката имам следните критични бележки. Считам, че оформлението на дисертацията може да се подобри, като в главата „Материали и методи“ се представят всички използвани реагенти, както и концентрациите на всички разтвори. Намирам, че легендите към фигурите е по-удобно да бъдат след надписа на фигурата. На фигура 22 има несъответствие на стойностите за съединение 7e и 8e с тези представени в таблица 9, което отдавам на техническа грешка. Въпреки, че в методиката е посочен броя на експерименталните животни използвани в тестовете за обучение и памет, посочването му при фигурите с резултатите е необходимо (напр. фиг. 26,27,28,29). Направените забележки не омаловажават стойността на дисертационния труд.

Имам следните въпроси към Миглена Милушева.

1. Защо е важно новосинтезираните молекули да не са субстрати на Р-гликопротеина?
2. На какво бихте отдали липсата на ефект на релаксация на 8e при концентрация 10^{-6} mol/L? (фиг. 17)
3. Кой статистически тест е приложен за разпределение на резултатите от биологичните тестове? И кой е метода за анализ на резултатите при тестовете за памет и обучение?

Получените резултати предоставят редица възможности за бъдещо развитие, както от синтетична, така и от биологична гледна точка. Бих препоръчала да се продължи синтетичната работа с нови хибридни молекули и не само производни на антранилова киселина. Да се доизясни ролята на получените производни с най-голям спазмолитичен ефект в процеса на възпаление, като се използват и други методи за оценка на активността на NOS или концентрацията на NO и експресията на интерлевкини.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ-„Паисий Хилендарски“. Миглена Милушева демонстрира солидни теоретични знания и практически умения в както в органичната химия, така и в областта на методите за оценка на биологична активност, което показва, че е придобила способност самостоятелно да планира, провежда и докладва научни изследвания. Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за изследването, постигнатите резултати и декларираните приноси, представени в дисертационния труд и автореферата и предлагам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Миглена Милушева в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма Органична химия.

12.06. 2025 г.

Изготвил становището:

Доц. д-р Йорданка Узунова