

РЕЦЕНЗИЯ

от д.н. Пантелей Петров Денев – професор

<https://ras.nacid.bg/dissertation-preview/23412>

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

по: област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика
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

Научен ръководител: доц. д-р Стоянка Атанасова
доц. д-р Илияна Стефанова-Кънчева

Общо описание на представените материали

Със заповед № РД-22-1134 от 15.05.2025 г. на ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема ***Синтез на нови спазмолитици, повлияващи паметови функции при експериментални животни*** за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2 Химически науки, докторска програма Органична химия. Автор на дисертационния труд е Миглена Златкова Милушева – докторантка в редовна форма на обучение към катедра „Органична химия“ с научен ръководител доц. д-р Стоянка Николова Атанасова от Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ и доц. д-р Илияна Димитрова Стефанова-Кънчева от Медицински университет – Пловдив.

Представеният от Миглена Златкова Милушева комплект материали на електронен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- протокол от катедрения съвет, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;

- копия на научните публикации;
- списък на забелязани цитирания;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

Докторантката е приложила 3 броя научни публикации, 5 участия в научно-изследователски проекти, 9 участия в международни конференции, 8 участия в национални конференции.

Кратки биографични данни за докторанта

Миглена Милушева завършва средното си образование в Гимназия с преподаване на чужди езици "Ромен Ролан", Стара Загора с профилирано изучаване на английски и на немски език. Тя придобива ОКС „бакалавър по медицинска химия“ през 2012 г., а ОКС „магистър по хранителна химия“ през 2016 г. в Химически факултет при Пловдивски университет "Паисий Хилендарски".

Има натрупан практически и професионален опит като клиничен лаборант и химик в Самостоятелна медико-диагностична лаборатория „Каридад“, както и като лаборант и младши технолог в „Монди Стамболийски“ ЕАД, където самостоятелно извършва анализи на производствени суровини, междинни отпадни продукти и оценяване на крайна продукция: пробонабиране, пробоподготовка и извършване на анализа, изчисляване и представяне на резултатите в подходящ вид посредством титриметрия, тегловни анализи, спектрофотометрия, упражнява контрол над производството на целулоза на база аналитичните данни. От месец май 2021 г. е асистент в Медицински университет – Пловдив, където извежда лабораторни упражнения по „Химия“ на студенти по Медицина и Дентална медицина на английски и български език към Катедрата по биоорганична химия.

Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Известно е, че съвременният начин на живот се характеризира със своята динамичност, нервно напрежение, бързо и нерационално хранене, непълноценна почивка и отдих. Тези фактори често предизвикват функционални нарушения на гастроинтестиналния тракт, между които синдромът на раздразненото черво (IBS) и възпалителната болест на дебелото черво (IBD), които продължават да представляват сериозно клинично предизвикателство. За лечение и терапия на тези състояния най-често се прилагат спазмолитиците. Те проявяват своя ефект чрез директна релаксация на гладката мускулатура, модулиране на калциевите канали и антихолинергична активност. Независимо от дългогодишната им употреба, съществуващите спазмолитични препарати често показват недостатъчна ефективност или предизвикват нежелани реакции, което налага търсенето на нови лекарствени кандидати с подобрени фармакологични профили.

Актуалността на дисертационния труд „Синтез на нови спазмолитици, повлияващи паметови функции при експериментални животни“ на докторантката Миглена З. Милушева се състои в това, че тя представя оригинални данни за синтеза,

характеристиката и биологичната оценка на нови хибридни производни на антраниловата киселина като потенциални спазмолитици с допълнителна модулация на паметовите функции при експериментални животни.

Сред перспективните насоки е разработването на хибридни молекули, съчетаващи различни фармакофорни елементи с цел оптимизиране на биологичната активност и безопасността. Антраниловата киселина е известна структурна единица в редица биоактивни съединения, което я определя като подходяща основа за синтез на нови производни с потенциален противовъзпалителен ефект. 2-Фенилетиламините, от друга страна, са прекурсори на серотонина и в тази връзка могат да послужат като добра основа за синтез на спазмолитици. В тази връзка, интерес за докторантката е представлявало съчетаването на двата фармакофорни остатъка с цел получаване на нови хибридни молекули, като аналози на съществуващи лекарствени средства. Това разширява набора от достъпни структурни аналози, подпомага изучаването на връзките между структура и биологично действие и служи като отправна позиция в създаването на нови лекарствени средства, като алтернатива на терапевтиците, използвани в практиката.

Познаване на проблема

Докторантката Миглена З. Милушева е направила критичен преглед на 394 научноизследователски статии, съобщения на научни конференции и нормативни документи, които имат отношение към темата на дисертацията. По-голяма част от тях са публикувани през последните 15 години.

В обзора на дисертацията е представено точно и ясно актуалното състояние в научната литература за възпалителните заболявания на червата и лекарствата, насочени към множествения симптоматен комплекс на синдрома на раздразненото черво. Обърнато е особено внимание на антранилова киселина и нейни производни, като са разгледани свойствата, биохимията и синтеза на антранилова киселина и нейни производни като вещества, притежаващи противовъзпалителна активност. Анализирани са: хибридните молекули, като видове и противовъзпалителни средства; експерименталните модели в предклиничната оценка на биоактивни вещества; значението на животинските модели при разработването на лекарства, както и етичните аспекти и алтернативи на опитите с животни.

Като принос към образователната част на докторантурата е правилната оценка, обсъждането и обобщаването на коректно цитираните научни факти и идентифицирането на проблеми, които обосновават ясно формулираната основна цел. Литературният преглед дава възможност на докторантката да се ориентира правилно в тематиката и да открие съществените проблеми, както в научен така и в научно-приложен аспект. Поставените изследователски задачи са конкретни, изпълними и правилно подредени и решаването им изгражда експерименталната част на дисертационния труд.

Методика на изследването

В съответствие с анализа на литературните данни и направените обобщени изводи е формулирана основната цел на дисертационната разработка: да се синтезират нови производни на антраниловата киселина като потенциални кандидати за спазмолитици и вещества, повлияващи паметовите функции при експериментални животни.

За постигане на тази цел са поставени конкретни задачи: *in silico* оценка за биологичната активност и потенциална токсичност на нови хибридни молекули; синтез на изходна хибридна молекула, съчетаваща фармакофорни остатъци на антранилова киселина и заместени 2-фенилетиламини; получаване на амиди на хибридната молекула с цел разширяване на обхвата на реакцията и създаване на производни с подобрена спазмолитична и противовъзпалителна активност; определяне на спазмолитична и противовъзпалителна активност на получените съединения в сравнение с използвани спазмолитици като мебеверин и противовъзпалителни средства като диклофенак, аспирин, ибупрофен и преднизолон; оценка на антимикробната активност на синтезираните съединения; определяне на ефекта на веществата върху паметови функции при експериментални животни.

За изпълнението на набелязаните задачи е използван голям набор от характерни методи за синтез на изходни и модифицирани хибридни молекули, методи за *in vitro* и *ex vivo* определяне на противовъзпалителната, на спазмолитичната, на антимикробната им активност върху експериментални животински модели, тъкани и материали, като и методи за *in vivo* определяне повлияването на двигателна активност и когнитивни способности на плъхове.

Основната част от изследванията по дисертационния труд, включващи синтезите и пречистването на съединенията, компютърното модулиране и определянето на *in vitro* противовъзпалителна активност, са извършени в Химическия факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. Експерименталното определяне на спазмолитичната активност, *ex vivo* противовъзпалителната активност и влиянието над паметови функции е осъществено в Медицински университет – Пловдив. Изследванията за антимикробно действие са проведени в Университета по хранителни технологии в Пловдив. ЯМР измерванията са направени в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, София. HRMS-спектрите са заснети в Медицински университет – София. Представените резултати и направеният научен анализ на тези резултати са оригинални, извършени с необходимата повтораемост и са на много добро качествено и научно ниво.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен на 170 стандартни машинописни страници и съдържа 32 фигури, 12 таблици и 13 схеми. Цитирани са 394 източника. Конструирването на дисертационния труд отговаря на изискванията, съдържайки необходимите основни части: заглавна страница, съдържание, въведение (2 страници), литературен обзор (48 страници), цел и задачи, материали и методи, описани като собствени изс-

ледвания (60 страници), резултати и обсъждане, описани като експериментална част (28 страници), изводи, приноси и литература, които следват логическа последователност, позволяваща на докторанта да изследва и анализира с избраните научни методи поставените проблеми.

Дисертационният труд е написан на много добър професионално-научен език, с добър стил, стегнатост и прегледност. Материалът се чете и възприема лесно. Отделните части са добре балансирани по обем.

В раздела „Експериментална част” са описани прецизно основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията: синтетичните методи за получаване на изходните хибридни молекули и техните диаמידни производни, експерименталните животински модели, тъкани и материали, методът за *ex vivo* определяне на спазмолитична активност, методите за *in vitro* и *ex vivo* определяне на противовъзпалителната активност, методът за *in vitro* определяне на антимикиробна активност, методи за *in vivo* определяне повлияването на двигателна активност и когнитивни способности на плъхове.

Структурата на новосинтезираните съединения е доказана с помощта на ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектри, записани на спектрометър Bruker Avance III HD 500 (Bruker) при 500 MHz (^1H -ЯМР) и 125 MHz (^{13}C -ЯМР) и стайна температура (295 K), инфрачервените спектри са заснети с FT-IR спектрометър VERTEX 70 (Bruker Optics), температурите на топене са определени с апарат Kruss M5000 (A. Krüss Optronic GmbH), HRESIMS спектрите са получени на масспектрометър Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Inc.) с HESI-II. За скрининг на биологични ефекти, фармакокинетични свойства и токсичност са използвани свободно достъпните софтуерни продукти: PASS Online, SwissADME, ProTox-II, OSIRIS20.

Докторантката умело е подбрала и усвоила голям брой съвременни методи, приложими и в пълно съответствие с поставената цел и задачи на дисертационната работа. Миглена Милушева е придобила необходимия методичен опит при провеждане на научения експеримент, обобщаване достоверността на получените резултати и извеждане на проявените закономерности.

Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Резултатите от дисертационния труд имат преди всичко научно-приложна стойност. В дисертацията са изложени оригинални данни за синтеза на нови хибридни производни на антраниловата киселина, тяхната характеристиката и биологичната им оценка като възможно приложение за спазмолитици, притежаващи допълнителна модулация на паметовите функции при експериментални животни. Синтезирани са нови хибриди на антранилова киселина, на които е измерена спазмолитичната активност, като за пет от тях 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 *in vitro* определената термична денатурация на албумин, като

най-силна активност демонстрират съединенията 2-амино-N-фенилетилбензамид и N-фенилетил-2-(2-фенилацетамидо)бензамид. При изследване на спазмолитична активност при повлияване паметови функции на експериментални животни съединението оказва значим ефект в процесите на памет и обучение. Установена е много добра антимикробна активност за съединението 2-амино-N-(3-хлорофенилетил)бензамид спрямо патогенните гъбички *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* и *Rhizopus* sp. и умерена активност спрямо дрождите *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*. Умерена чувствителност по отношение на хибрида 2-амино-N-(3-хлорофенилетил) бензамид и диамидните му производни проявяват 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*.

Определена е връзката структура–биологична активност за всяка от групите синтезирани съединения.

Като приноси с научен характер могат да се посочат:

- Осъществен е дизайн на малки молекули като спазмолитици и са намерени синтетични подходи за получаването им.
- Теоретично е изследвано повлияването на спазмолитичната активност от въвеждането на различни заместители.
- Намерени са ясни зависимости между молекулната структура и биологичната активност за синтезираните съединения, които могат да служат като основа за бъдещ рационален дизайн на биологичноактивни съединения.

Приноси с научно-приложен характер:

- Посредством предложения синтетичен метод, са получени 18 съединения, от които 16 представляват нови структури, непубликувани досега в научната литература.
- Измерена е спазмолитична активност на всички 18 синтезирани съединения и за пет от тях тази активност е по-добра в сравнение с познатия спазмолитик мебеверин.
- 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.

Установените и доказани резултати дават стабилна основа за продължаване на бъдещата научно-изследователска дейност на докторантката.

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Представени са 3 научни разработки по дисертационния труд, които са публикувани в реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация. Всичките публикации са в научни списания, отразени с световните база данни в кuartил Q1, с което покрива минималните научни изисквания за

професионално направление 4.2. Химически науки. Общият импакт фактор е 13,4. Получените резултати по представените научни разработки са намерили отзвук в химическата литература, като във връзка с тях са намерени 22 независими цитата в базите данни *Scopus* и/или *Web of science*.

Материалите от публикациите са включени в дисертацията. Докторантката е представила списък с участия в 10 международни и 8 национални научни конференции. В научните публикации докторантката Миглена Милушева е водещ автор, което показва, че тя е основният изпълнител на научния експеримент.

Докторантката е включена и в два проекта, финансирани от ФНИ на МОН и един в рамките на проект ДУЕкоС при ПУ „Паисий Хилендарски“, чиято тематика е свързана с дисертационната разработка. Спечелила е два пъти конкурс по Националната програма „Млади учени и постдокторанти – 2“ – модул млади учени, селекция 2022 г. и 2024 г.

Във връзка с провеждането на процедура за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, Миглена Златкова Милушева е подписала „Декларация за оригиналност и достоверност“, в която декларира, че резултатите и приносите в научната продукция, които представя в процедурата, са оригинални и не са заимствани от изследвания и публикации, в които няма участия, а представената информация във вид на копия на документи и публикации, лично съставени справки и др. съответства на обективната истина.

Декларирам, че не съм открил данни за плагиатство.

Тези данни ми дават основание да твърдя, че представените научни разработки покриват както националните наукометрични изисквания според ППЗРАСРБ, така и тези на ПУ „Паисий Хилендарски“ за получаване на образователната и научна степен „доктор“.

Автореферат

Авторефератът е в обем 36 страници, съдържа 18 фигури, 4 таблици и 2 схеми, които отразяват коректно основните резултати и приноси на дисертационния труд и отговаря на специфичните изисквания на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички на изисквания(та) на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд показва, че докторантката Миглена Златкова Милушева притежава/не притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по

научна специалност „Органична химия“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам, почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Миглена Златкова Милушева в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2 Химически науки, докторска програма Органична химия.

07.06.2025

Рецензент:

проф. д.н. Пантелей Денев