

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Румяна Иванова Бакалска,

доцент в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

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

професионално направление 4.2. Химически науки

научна специалност *Органична химия*

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“*

Научни ръководители: *доц. д-р Стоянка Николова Атанасова от ПУ „Паисий Хилендарски“ и доц. д-р Илияна Стефанова Кънчева от Медицински университет гр. Пловдив.*

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД 22-1134 от 15.05.2025 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ съм определена 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 – докторант в редовна форма на обучение към катедра *Органична химия*, с научни ръководители доц. д-р Стоянка Николова Атанасова от ПУ „Паисий Хилендарски“ и доц. д-р Илияна Стефанова Кънчева от Медицински университет гр. Пловдив. Представеният от Миглена Милушева комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и 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;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

- справка за изпълнение на минималните национални изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“;
- сертификати от конференции.

Справката в *Scopus* показва, че докторантката Миглена Милушева е съавтор в 11 статии, публикувани в престижни научни списания и 2 глави от книги на международни издателства, а освен това и още 5 статии в нереферирани издания. За присъждане на ОНС степен „Доктор“ кандидатката участва с 3 статии в списания с квантил Q1 и висок импакт фактор, в които тя е първи автор, т.е. $3 \times 25 = 75$ точки. В допълнение, представен е в завършен вид дисертационният труд (50 точки) и автореферат по споменатата по-горе тема. Така, със 125 точки, докторантката значително надхвърля изисквания минимум по закона за РНС и правилника на ПУ „П. Хилендарски“ по процедурата за придобиване на ОНС „Доктор“.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Миглена Милушева е получила средното си образование в гимназията с преподаване на чужди езици "Ромен Ролан", гр. Стара Загора, с профилирано изучаване на английски език, немски език и биология. Последната една година от обучението си тя провежда в англоезична среда – в *Darlington School*, Рим, Джорджия (САЩ) със засилено изучаване на химия, биология, математика и английски език, което завършва с грамота за отличен успех и грамота за най-висок успех във випуска по анатомия и физиология. Докторантката е възпитаник на Химическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, специалност Медицинска химия (бакалавър), с успешно защитена дипломна работа в катедра Органична химия. В периода на обучението си като медицински химик, тя завършва и педагогическа специализация за учител по химия. Магистърската ѝ степен е в областта на хранителната химия. В следващите 5 години тя работи по специалността си в „Монди ЕААД“, гр. Стамболийски, а след това и за кратко в медико-диагностична лаборатория като клиничен лаборант, както и в областта на търговията с лекарства. От май 2021 год. до днес, Миглена Милушева е асистент в Медицинския университет в гр. Пловдив, където извежда лабораторни упражнения по химия със студенти от специалностите Медицина и Дентална медицина на български и английски език. От март 2023 г. е редовен докторант към катедра Органична химия на ПУ и е отчислена с право на защита през май 2025 година. През периода на своето обучение докторантката е изпълнила в пълен обем образователната част от своя индивидуален план. Посещавала е над 20 специализирани курсове и семинари, свързани с нейните преки научни интереси, като „Ретросинтез“ на оксфордския професор М. Молони, "Органична стереохимия" на проф. Ф. Алонсо от университета в Аликанте, "Биофункционализирани хетероциклени съединения" на доц. Статкова; интензивен курс по „Нуклеарна фармация“ с акцент върху образната диагностика и лечение с помощта на белязани с радионуклиди химични съединения, както и много полезните за докторанти курсове, организирани от академия *Yuventutis*. Не е случайно, че е отличена на национално ниво с приза „Докторант на годината 2024“.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Представената ми за рецензия дисертация на тема “Синтез на нови спазмолитици, повлияващи паметови функции при експериментални животни“ е в една много модерна и бързоразвиваща се през последните години област на лекарствения дизайн, а именно - разработването на хибридни молекули, съчетаващи фармакофорни елементи с различен механизъм на действие в рамките на една химична структура. Прицелната мишена на тези усилия са функционалните и възпалителни нарушения на гастроинтестиналния тракт, като синдром на раздразненото черво и възпалителна болест на червата, които продължават да са сериозно клинично предизвикателство. Актуалността на проблема се определя, от една страна, от все още недостатъчно изяснената патофизиология на тези социално значими заболявания, и от друга, от ограничената ефективност и нежеланите странични реакции на прилаганите понастоящем спазмолитици. Въпреки утвърдената им употреба, съществуващите лекарства често не постигат желания клиничен резултат, особено при пациенти с тежки или рефрактерни форми на заболяването, и могат да предизвикат нежелани реакции като сухота в устата, замаяване или нарушения в сърдечния ритъм. Това подчертава необходимостта от откриване на нови лекарствени молекули с подобрен фармакологичен профил – с по-висока ефективност, по-ниска токсичност и по-широк спектър на действие.

Като градивни блокчета за създаване на новите хибридни молекули, авторите са избрали антраниловата киселина и 2-фенилетиламина, тъй като те са добре проучени, присъстват в редица биоактивни съединения и предлагат възможности за химична модификация. Адекватно е формулирана целта на дисертационния труд, а именно: синтез на нови производни на антраниловата киселина като кандидати за спазмолитици и вещества, повлияващи паметовите функции при експериментални животни, както и задачите за постигането ѝ. Ценното на този труд е, че авторите извървяват повечето етапи в изследването на потенциални лекарствени кандидати, започвайки от *in silico* моделиране за предсказване на биологичния профил, след това химичен синтез на избрани молекули и експериментално биологично тестване. Прилагат *ex vivo* модели за оценка на съкратителната активност и изясняване механизма на действие, докато *in vitro* тестовете разкриват допълнителни аспекти като противовъзпалителен и антимикробен потенциал. Проведените *in vivo* проучвания при експериментални животни пък дават възможност да се проследят системни ефекти, включително влияние върху когнитивните параметри – фактор с нарастващо значение при хронични заболявания, свързани със стрес и променено качество на живот. Получените резултати те сравняват с утвърдени референтни средства като мебеверин, диклофенак, ацетилсалицилова киселина и преднизолон.

Настоящият дисертационен труд 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.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор по темата обхваща 285 литературни източника от различни области на човешкото познание – химия, медицина, фармакология, биология, статистика и др. Благодарение на будния си ум и отличните си познания, придобити целенасочено в предходните образователни степени, както и с преподавателската си работа в Медицинския университет, докторантката е успяла да се справи творчески с обработката на информацията и демонстрира отлично познаване на проблема, както в химическата му, така и в биологичната част. Убедено смея да твърдя, че Милушева е оформен специалист в областта, способен да търси, систематизира и критично анализира научна литература.

5. Методика на изследването

В дисертационния труд са използвани модерни и адекватни методи за изследване и доказване на свойствата на получените органични съединения и за изследването на биологичната им активност. Химичната структура и чистотата на съединенията е доказана с температура на топене, ^1H - и ^{13}C -NMR; HRMS-анализи; FT-IR спектроскопия. Изследването на биологичната активност на новосинтезираните хибридни съединения е направено чрез съчетаване на съвременни подходи – *in silico* моделиране за предсказване на биологичния профил, *ex vivo* модели, а също и *in vitro* и *in vivo* тестове. Получените резултати са сравнени с утвърдени референтни средства и е направена статистическа обработка на резултатите. Избраната методика на изследване позволява постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е изложен на 172 печатни страници и включва въведение (2 стр.), литературен обзор (50 стр.), цел и задачи (1 стр.), собствени изследвания (60 стр.), експериментална част (28 стр.), изводи, приноси (3 стр.). Онагледен е с 13 схеми, 10 таблици и 32 фигури. Библиографската справка обхваща 394 литературни източника, основно от последните години.

Въведението умело насочва читателя към естеството на изследванията, а в литературният обзор докторантката е отделила специално внимание върху запознаването с възпалителните заболявания на червата и синдрома на раздразненото черво, като критично се обсъждат ефикасността на прилаганите понастоящем терапевтични средства и техните нежелани ефекти и ограничения. Следва запознаване с хибридните молекули и антраниловата киселина, чийто хибридни производни са предмет на настоящата дисертация, както и с експерименталните модели в предклиничната оценка на биоактивни вещества. Считам, че подразделът за антраниловата киселина би могъл да се съкрати за сметка на обширните исторически данни. Ясно са формулирани целта на изследванията и научно-изследователските задачи. За постигане на поставената цел е направен първоначален скрининг и селекция на активни структури чрез *in silico* компютърни модели, на основата на които авторите установяват, че всяко едно от съединенията **3–8** може да се приеме като потенциален терапевтичен кандидат. Следва синтеза на целевите молекули с много добри добиви, а след това и на техните амиди по познати от литературата методи. Избраният от авторите синтетичен подход включва

взаимодействие на изатоев анхидрид с незаместен и различно заместени 2-фенилетиламини. Получените амиди, представляващи „хибрид“ на антраниловата киселина и 2-фенилетиламин, се превръщат в диамидни производни чрез реакция на ацилиране. При избора на ацилхлориди авторите предпочитат такива с фенилови и бензилови заместители, пред алкиловите, на основата на предварително проведеното компютърно моделиране за токсичност и биологични ефекти. Структурата на всички синтезирани съединения е потвърдена коректно чрез ^1H - и ^{13}C -NMR, HRMS-анализи и FT-IR спектроскопия. Основната част от изследванията по дисертационния труд, включващи синтезите и пречистването на съединенията, компютърното моделиране и определянето на *in vitro* противовъзпалителна активност, са извършени в Химическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“. Биологичните изпитания започват с изследване влиянието на хибридните молекули върху контрактилната функция на гладки мускули *ex vivo*. С цел да се определи противовъзпалителния потенциал на синтезираните хибридни съединения, авторите правят оценка на тяхната активност и в *in vitro* условия (инхибиране денатурацията на албумин) и в *ex vivo* условия (чрез имунохистохимична оценка). Получените резултати са изключително интересни и обнадеждаващи. Известно е, че амидите на антраниловата киселина са много добри антимикробни агенти, ето защо авторите провеждат и *in vitro* оценка на антимикробната активност. Като се има предвид, че когнитивните нарушения често съпътстват употребата на някои спазмолитици, авторите изследват потенциала на три от веществата, показали най-висока спазмолитична и противовъзпалителна активност, по отношение влиянието им върху паметовите функции при експериментални животни. Установяват, че трите изследвани съединения не влошават когнитивните функции и не потискат локомоторната активност на експериментални животни, даже едно от тях - съединение **6d** е показало най-висок терапевтичен потенциал, подобрявайки както обучението, така и краткосрочната и дългосрочната памет. Експерименталното определяне на спазмолитичната активност, *ex vivo* противовъзпалителната активност и влиянието над паметовите функции е осъществено в Медицински университет – Пловдив под ценното ръководство на другия научен ръководител доц. д-р Илияна Кънчева от МУ.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Интегрирането на резултати от *in silico* моделиране, химичен синтез, биологично тестване и *in vivo* изследвания предоставя цялостна представа за фармакологичния потенциал на разработените съединения. В този смисъл, приносите на дисертационния труд на Миглена Милушева са безспорни, като най-съществените могат да се обобщят както следва:

Научни приноси: 1) Осъществен е дизайн на малки молекули като спазмолитици и са намерени синтетични подходи за получаването им; 2) Теоретично е изследвано повлияването на спазмолитичната активност от въвеждането на различни заместители; 3) 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.

Научно-приложни приноси: 1) За първи път, посредством предложения синтетичен метод, са получени 18 съединения, от които 16 нови, непубликувани досега в научната литература; 2) За първи път е измерена спазмолитична активност на всички 18 синтезирани съединения и за пет от тях тази активност е по-добра, в сравнение с познатия спазмолитик мебеверин; 3) Доказана е степен на биологична активност, характеризираща един от хибридите като вещество с функционални характеристики на спазмолитик с противовъзпалително действие, повлияващо положително паметовите функции при експериментални животни.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите, включени в дисертацията, са публикувани в 3 научни статии в специализирани международни списания с отворен достъп - *International Journal of Molecular Sciences* (Q1, IF 4.9), *Pharmaceuticals* (Q1, IF 4.3) и в *Molecules* (Q1, IF 4.2). Понастоящем, броят на независимите цитати в базите данни *Scopus* и/или *Web of science* значително надхвърля посочените от докторантката 21, което е сигурен критерий за разпознаваемост в научната общност. Всички научни публикации са съставени в съавторство и са на английски език, което е обичайно за химическото направление, като в статиите по-горе, докторантката е първи автор. Както може да се види в „Авторския принос“ за всяка една статия, Миглена Милушева е активен участник не само в експерименталната работа по синтеза, изолирането и пречистването на съединенията, но и в писането на оригиналния ръкопис, в прегледа и редактирането, във визуализацията на резултатите. Не открих данни за плагиатство и смятам, че получените данни са оригинални, което се подкрепя от факта, че публикациите са в международни списания с независимо рецензиране. За Миглена Милушева изчисленият индекс на Хирш е 4, въз основа на данните от *Scopus*.

За този период от близо 2 години, докторантката е докладвала резултатите от изследванията си по дисертацията на 10 тематични международни и 8 национални конференции, като най-честата форма на представяне е орална презентация или доклад. Докторантката е член на работния екип през този период на 5 проекта, 2 от които са финансирани от фонд Научни изследвания към МОН, 2 проекта от ПУ „Паисий Хилендарски“ и един от Медицинския университет – Пловдив

9. Лично участие на докторантката

Един химик не работи сам в съвременното научно дирене. Обикновено експертните му умения се допълват от колеги-специалисти по различни и взаимно необходими за успеха на един работен проект научни направления. В тази връзка, както е видно от преценката ми на научната продукция на докторантката по-горе, г-жа Милушева е работила в съавторство с точно необходимите специалисти за провеждане и успешното завършване на всяко едно изследване. Нейният личен принос е несъмнен във всяка една публикация – тя е първи автор.

10. Автореферат

Авторефератът в обем от 36 стр. е направен съгласно изискванията и представя в кратък и информативен вид съдържанието на дисертацията. Отразени са целите и задачите, основните резултати и обсъждането им, изводите на постиженията, както и списъка с публикации. Струва ми се, че отсъствието в него на раздела „Материали и методи“ само би допринесъл за по-стегнатия му вид. Приятно впечатление правят интелигентно изказаните благодарности към хора и институции, без които настоящият труд би бил невъзможен.

11. Критични забележки и препоръки

Нямам критични забележки към представените ми материали, напротив – документацията по процедурата е окомплектована и подредена изрядно, което не само облекчава работата на научното жури, но и утвърждава цялостното отлично впечатление от творческото представяне на кандидата. Бих искала да поставя 2 въпроса:

- „В дисертацията са описани 18 съединения, от които 16 представляват нови съединения“. *Твърдението се основава на справка в Reaxis, друга база с данни или в научната периодика?*
- „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“. *Какви според Вас са следващите стъпки в оценката на биологичния профил на съединението с обещаващ потенциал, за да се прилага то за терапевтични цели?*

12. Лични впечатления

Познавам Миглена Милушева още от студентските ѝ години като лектор на основен курс по Органична химия в Химическия факултет на ПУ. Буден и любознателен ум на критично мислещ млад човек с любов към Органичната химия не може да остане незабелязан! Много дейна, организирана, ентусиазирана; и с онзи „по-широко скроен“ поглед на света, който добиват хората, живели в чужбина, тя не се бои свободно да изразява личната си позиция или да задава въпроси. Добрите ѝ презентационни и комуникативни умения се основават не само на ведрия ѝ характер и непосредственост в общуването, но и на задълбочени познания и отличното владение на английски език (C1). Бих могла само да се гордея, че млади хора като нея продължават щафетата в науката и в преподаването на химията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертацията на Миглена Милушева представлява задълбочено и системно изследване в актуална област на лекарствения дизайн и **съдържа оригинални научни проучвания** 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. **Научно-приложните резултати** в дисертационния труд са свързани с приложените *ex vivo* модели, *in vitro* и *in vivo* тестове на получените съединения при експериментални животни. Извършената работа е значителна по обем и разнообразна по характер, което дава основание да се предположи, че докторантката Миглена Златкова Милушева **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Органична химия като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

В заключение, дисертационният труд **отговаря 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“.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на 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.

06.06.2025 г.

Рецензент:

(доц. д-р Румяна Бакалска)