

# РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема **“СТЕРЕОХИМИЯ НА ЛИНЕЙНИ ТЕТРАПИРОЛИ, ПРОИЗВОДНИ НА ЖЛЪЧНИТЕ ПИГМЕНТИ И ТЕХНИТЕ СЪСТАВНИ ЕЛЕМЕНТИ”** за придобиване на научната степен “Доктор на химическите науки” по научната специалност 01.05.03 – “Органична химия”

**Докторант:** доц. Стефан Емилов Бояджиев, дх, докторант на самостоятелна подготовка към катедра “Химия и биохимия & Физика и биофизика”, Факултет по Медицина в Медицински Университет – Плевен.

**Рецензент:** проф. Тодор Георгиев Делигеоргиев, дхн, Химически факултет при СУ “Св. Климент Охридски”

Стефан Емилов Бояджиев е роден през 1956 г. в гр. Плевен, където получава средното си образование и е приет без конкурсен изпит в Химическия факултет на СУ. Висшето си образование завършва през 1981 г. с настоящата квалификационна степен “Магистър”, специалност “Органична химия”. Веднага след дипломирането си е назначен като специалист-химик в секция “Механизъм на органичните и ензимни реакции и органичен синтез” в Института по органична химия с център по фитохимия в БАН. Там се развива като “Научен сътрудник, III ст.” (1984-1988г.) и “Научен сътрудник, II ст.” (1988-1992 г.). През 1988 г. защитава дисертация и придобива образователната и научна степен “Доктор по химия” (тогава: “Кандидат на химическите науки”). Следва период на след-докторска специализация в Химическия факултет на Университета в Невада, гр. Рино (1989-1995 г.). Там работи до 2008 г., като получава званието “Доцент-изследовател” (1995-2008). Приет е като гост-преподавател, асистент (2008-2010 г.) в катедра “Химия и биохимия & Физика и биофизика” в МУ - Плевен. През 2010 г. получава научното звание “Доцент” в същата катедра, където работи до настоящия момент.

Предложеният ми за рецензия труд на С. Е. Бояджиев е написан на 183 страници, от тях 10 страници увод, 27 страници са посветени на литературен преглед, в който са включени частично и собствени резултати от изчисления, 104 страници – на собствени резултати и обсъждането им, 33 страници литературни източници. Дисертацията съдържа 21 схеми, 6 таблици (от които едната е изнесена като допълнение) и 53 фигури. Цитирани са 554 литературни източници, като много от тях са обединени под общи номера. Неразделна част от дисертацията е приложението към нея, което съдържа 394 страници – копия на 27 публикации, разгледани в дисертацията.

В увода си Стефан Е. Бояджиев е направил връзката между линейни тетрапироли, наричани „жлъчни пигменти”, и багрилата на живота – хем и хлорофил. Накратко е отбелязана важноста за медицината на билирубина, който е краен катаболитен продукт от хема.

Целта и задачите на дисертационния труд са поставени в ясна и много сбита формулировка и са описани много стегнато. Авторът подчертава липсата на литературни данни за оптично активни билирубинови аналози, което доказва новостта и актуалността на тематиката. Билирубинът не е оптично активен и известните резултати, преди изложените в дисертацията, се дължат на индуциране на оптична активност от друго съединение. Посочената цел на дисертацията има научно-фундаментален характер.

Литературният обзор е от три части, като в първата част се обосновава хипотезата за възможен конформационен контрол на хиралността на синтетични билирубини. В тази част са използвани литературни източници за предшестващи работи от други автори, както и с участието на докторанта. В следващите две части са включени многобройни източници за оптична активност на линейни тетрапироли и за индуцирана оптична активност на билирубини. В последната част е разгледан и механизмът на наблюдаваната индуцирана оптична активност в билирубин и теоретичните предпоставки за използване на метода на кръговия дихроизъм. По този метод Бояджиев бе един от заинтересуваните млади хора у нас работещ с доктор Н. Берова – негов учител в кръговия дихроизъм, която и понастоящем въпреки напредналата си възраст работи в Ню Йорк, САЩ.

Синтезът на основните за дисертацията съединения, ( $\alpha R$ ,  $\alpha'R$ )- и ( $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-диметилмезобилирубини, **40** и **36**, съответно, е постигнат по оригинални методики. И двете включват разделяне на енантиомерите на ранни монопиролови предшественици. Тяхната абсолютна конфигурация е доказана със сигурност с рентгеноструктурен анализ. По този начин е поставена сигурната основа за по-нататъшното тълкуване на данни от кръгов дихроизъм при използването му за установяване на конформационната предпочетеност на мезобилирубините в тези и следващите изследвания. Превръщането на оптично чистите монопироли в целевите мезобилирубини **36** и **40** е постигнато по адаптирани от литературата синтетични методи. Химичните реакции в тях не засягат стереогенните центрове и по този начин се доказва и абсолютната конфигурация на жълтите хромофорни дипиринони, сините мезобиливердини и съответните им мезобилирубини **36** и **40**.

Предпочетената конформация на **36** и **40** е доказана експериментално чрез комбинация на ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) и кръгов дихроизъм (CD) и е била подкрепена с молекулномеханични изчисления. Данните от  $^1\text{H}$ -ЯМР на тези съединения свидетелстват за наличие на ненарушени вътрешномолекулни водородни връзки, при сравнение с литературни данни за ахирални аналози. Използвани са ЯМР измервания на  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  ефект на Overhauser (протон-протонен ефект на Оверхаузер -  $n\text{Oe}$ ), които подкрепят наличието на плоски дипиринони в *син*-(*Z*)-конформация и доказват силно предпочитание към *M*-хирална конформация на ( $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-**36** и *P*-хирална конформация на ( $\alpha R$ ,  $\alpha'R$ )-**40**. Излишъкът от *M*- или *P*-хиралния конформер в билирубини е установен със спектроскопия на кръгов дихроизъм, която е използвана често и в следващите изследвания. Получените CD спектри са много интензивни и се дължат на екситонно взаимодействие между двата дипиринона. Известно е, че разположението в пространството на техните електрични диполни момента на преходите е свързано по неемпиричен начин със знаците на експериментално наблюдаваните CD ефекти. От интензивния отрицателен екситонен куплет, характерен за ( $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-**36**, авторът показва значителната конформационна предпочетеност на *M*-хиралния конформер, а от също толкова интензивния положителен екситонен куплет за ( $\alpha R$ ,  $\alpha'R$ )-**40** – конформационната му предпочетеност към *P*-хиралния конформер. В Таблица 1, дадена като допълнение, са сравнени CD данните в три разтворителя, които са тълкувани във връзка със способността на молекулите разтворител да участват и/или разрушават типичните за билирубин вътрешномолекулни водородни връзки. С тези изследвания се доказва, че вътрешномолекулни стерични отблъсквания са отговорни за силно изместване на конформационното равновесие в тези билирубинови аналози.

В следващата глава Ст. Бояджиев разглежда оптично активни аналози, в които отсъстват карбоксилни групи или те са модифицирани с цел да се изучи влиянието на

конформационната стабилизация чрез вътрешномолекулни водородни връзки. Такива връзки отсъстват в съединението (*S, S*)-**42** и подобните му **47** и **48**. При тях  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  nOe са много слаби, а интензивността на CD е само 10-15% от измерената за **36** и **40**. В редица съединения, съдържащи само една верига с терминална карбоксилна група, интензивността на CD също е понижена. В диметилския естер на **36** и в съответния бис-диметиламид **67** също се вижда съществено намаление на CD ефектите, но в първичен (**65**) и вторичен (**66**) бис-амиди те се запазват интензивни. В последните две съединения предпочетената конформация е стабилизирана с вътрешномолекулни водородни връзки, за разлика от третичния бис-диметиламид (**67**). Заключение е, че приносът на вътрешномолекулното водородно свързване в билирубин и производните му е съществен за реализиране на една силно предпочетена хирална конформация. В тази част на дисертацията прави впечатление химичната реакция, по която авторът е синтезирал структурно несиметрични жлъчни пигменти, труднодостъпни по други методи.

Насочвайки се в противоположна посока, Ст. Бояджиев изследва възможността да се измести напълно  $M \rightleftharpoons P$  конформационното равновесие. За целта са получени съединения с четири конформационно-направляващи метилови групи, **73-76**. Абсолютната конфигурация на един техен възлов предшественик е доказана с рентгеноструктурен анализ. В **75** всички 4 метилови групи действат в синхрон в стремежа си да ориентират молекулата към *M*-хирална конформация, докато в **76**  $\alpha$ -метиловите групи предпочитат *P*-хирална конформация, а  $\beta$ -метиловите групи се стремят да ориентират рубина към *M*-хирална конформация. Съдейки по интензивността на CD спектрите се оказва, че усилване действието на четирите метилови групи не се реализира. От CD спектрите следва също изводът, че при балансирано влияние на един  $\alpha$ -заместител, действащ стерично в противовес на  $\beta$ -заместител с еднаква големина,  $\alpha$ -заместителят има преимущество при насочването към предпочетената конформация.

До същия извод се достига и от изследването на по-елегантните ( $\alpha S, \beta' S$ )-**77** и ( $\alpha R, \beta' S$ )-диметилмезобилирубин (**78**). Техният синтез е постигнат чрез използване на един рацемичен и един оптично чист дипиринон в окислителна кондензация на сместа им. Получените от **76** и **78** резултати са предпоставката, която води до по-обширно изследване на аналози с различен стеричен размер на един  $\alpha$ -заместител в мезобилирубин. Постигнат е синтезът на 16 моделни съединения от този тип, в осем от които заместителите на  $\alpha$ - и на  $\beta$ -позициите действат в противоположни посоки при избора на хиралността на пигмента. От Схеми 8, 11 и 12, както и от Схема 3 в автореферата, прави впечатление прилагането на естерни енолати в реакции на *N*-незащитени пирони, което е синтетична новост и е била обект на отделна статия (цитат 209a). Относителният стеричен размер на редица заместители е определен като е използвана амплитудата на CD ефектите. Изведеният ред на относителния стеричен размер, обаче, не съвпада напълно с известния от литературата ред, определен от ЯМР на циклохексанови производни.

Докторантът е намерил необичайно силно влияние на алифатни амини върху конформацията на разгледаните мезобилирубини. Както показват CD спектрите и nOe експериментите, молекулната хиралност е обърната в присъствие на амини.

В серия тетрапирони и в техни синтетични предшественици, които съдържат *орто*-карбоксифенилов заместител са получени данни за атропизомерия. Конформационната хомогенност с преобладаване на *анти*-изомера на мезобилирубина с този тип заместване се дължи на вътрешномолекулно водородно свързване в

неполярен разтворител. Отслабването на това свързване в полярни разтворители води до поява и на *син*-изомер.

Пространствената форма на няколко макроциклични естера на биливердина, с напълно спрегната  $\pi$ -система и спирална, порфиринов-подобна конформация е била изучена с помощта на CD и MM изчисления. Тези съединения, за разлика от рубините, не са показали съществена конформационна селекция.

В процеса на работата по линейните тетрапириколи, д-р Стефан Е. Бояджиев е отбелязал атипични ЯМР и хироптични характеристики на дипиринони със свободна карбоксилна група, но не и на съответните естери. За тяхното обяснение е предложен нов модел за димеризация на тези хромофорни половини в билирубина. Новостта се състои в извеждане в 3D пространството на двата дипиринона, които преди тази работа са били разглеждани и доказани от други автори в подобни съединения като намиращи се в една равнина. Предложеният модел за формиране на димери се подкрепя от ЯМР и от CD данните от различни разтворители и от намаляването на интензивността на CD при разреждане, както се очаква при равновесие мономер  $\rightleftharpoons$  димер.

В последната глава по дисертацията докторантът разкрива атропизомерия в сравнително просто построени пиролови съединения. Оказва се, че в литературата не се срещат често примери за затруднено въртене около  $sp^3 - sp^2$  C-C връзка, каквото е разкрито в тези пириколи. Въпреки отбелязаните затруднения, авторът е изолирал индивидуални (или високо-обогатени) атропизомери от 9 съединения и с тях е провел измервания на динамичен ЯМР при различни температури. От тези данни са изчислени кинетичните и термодинамичните параметри за атропизомеризация, показани в Таблица 6. Изводът е, че при нарастване на размера на заместителя при стереогенния въглерод нараства бариерата за атропизомеризация. Когато присъства и вицинален четвъртичен въглероден атом, атропизомерите са стабилни при стайна температура.

В заключение авторът излага основните обобщения от проведените изследвания, които имат значение за транспорта на билирубина *in vivo* и за фототерапията на жълтеница у новородените. Тези изводи са посочени също и в автореферата на дисертацията.

Към докторанта имам следните забележки и въпроси:

- на стр. 58 и следващата Схема 6 не е показана възможността за разделяне на крайните продукти, ако редукцията се проведе в смес от мезобиливердините **34**, **35** и **49**.

- каква е синтетичната стойност на показаната в Схема 10 реакция на «размесване» на молекулните половини, при която от един билирубин се получават две сходни съединения?

Тези забележки не намаляват отличното ми впечатление от този труд и мога да заявя, че той съответства напълно на изискванията за една дисертация за присъждане на степента „доктор на науките“.

В обобщение на казаното до тук мога да посоча, че в дисертационния труд е описана голяма по обем синтетичната и експериментална работа, както и широко използване на модерни методи за характеризирание и анализ на органични съединения. Първостепенно място сред тези методи за изследване стереохимията на оптично активните мезобилирубини има кръговият дихроизъм. Докторантът успешно се е справил с трудната, по мое мнение, синтетична работа и работата по пречистване на тези сложни и не много стабилни съединения. Приложението към дисертацията, което съдържа копия на 27-те статии разгледани в дисертацията показва, че твърде голям брой нови съединения са надеждно охарактеризирани с елементарен анализ,  $^1\text{H}$ -ЯМР,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР

спектри и абсорбционни спектри, а където е било възможно - и с рентгеноструктурен анализ.

Статиите по дисертацията са публикувани в международни списания с общ импакт фактор 88.77 и са били цитирани от други автори общо 217 пъти, което говори за важността и актуалността на избраната тематика. По тези критерии и особено по броя статии, включени в дисертационния труд, Стефан Е. Бояджиев надхвърля значително изискванията в Приложение 1 към правилника на ЗРАСРБ в Медицински Университет - Плевен.

Авторефератът е написан ясно и кратко като отразява правилно приносите на дисертационния труд.

Научните приноси на дисертационния труд трябва да се отнесат към **приноси с фундаментален характер и съществено обогатяване на съществуващите знания с нови факти, с елементи на новост и провокиращи нови насоки за бъдещи изследвания.**

Накрая искам да споделя и мое лично впечатление. Според мен д-р Стефан Бояджиев е отдаден на химията, което в днешно време не се среща често и трябва да говори много какъв специалист е той. Многозначително е, че той не тръгва по пътя на най-малкото съпротивление (той има тази възможност според закона) за да има основание да придобие в последствие научното звание професор (разбира се ако желае). Убеден съм, че неговото присъствие във Факултет по Медицина в Медицински Университет – Плевен ще повиши нивото на преподаване на съвременна химия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертацията на доц. Стефан Емилов Бояджиев е посветена на интересни и актуални проблеми в областта на стереохимията на оптично активни линейни тетрапироли и техни синтетични предшественици - вердини, дипиринони и пироли. По модерни или нови методики са синтезирани и са описани голям брой нови за литературата съединения. Целевите, крайни съединения са изследвани подробно на високо научно равнище, като при това са съчетани най-съвременните методи за анализ на органични съединения. Безспорен е личният принос на докторанта към получените резултати, които са обсъдени аналитично и достатъчно критично. Отправените забележки в никакъв случай не понижават извънредно високата научна стойност на дисертационния труд, която се доказва от публикуването на неговите изследвания в реномирани специализирани списания и от високата цитируемост на публикуваните работи. При неговото разработване, авторът е показал способности на компетентен изследовател, който умело може да използва съвременни методи за синтез, пречистване и прилагане на разнообразни спектроскопски методи на високо равнище.

Въз основа на изложената от мен положителна оценка, напълно убедено ще гласувам „Да”, на доц. доктор Стефан Емилов Бояджиев да бъде присъдена научната степен “Доктор на науките” по научната специалност 01.05.03 – “Органична химия”.

София, 19.05.2011 г.

Рецензент: .....  
/проф. дхн Т. Делигеоргиев/