

Отговори на въпроси и бележки, поставени от научното жури

към дисертационния труд на ас. Ерик Василев Димитров

Тема:

„Макромолекулен дизайн и синтетични стратегии за получаване на полимери с приложения за пренос и доставяне на биологично активни вещества и олигонуклеотиди“

Професионално направление 4.2. Химически науки
Научна специалност: Полимери и полимерни материали
София, 2026 г.

Уважаеми членове на Научното жури,

Благодаря за внимателния прочит на дисертационния труд, за направените бележки и за поставените въпроси.

По-долу представям отговорите си, групирани според становищата и рецензиите на членовете на журито.

1. Отговори на въпросите и бележките на проф. д-р Ивайло Димитров

Бележки

На Фигура 1.46 е представена схема за полимеризация на N,N-диметиламиноетилакрилат, а не на PDMAEMA, както е написано в подфигурния текст; формулата на звездовидния PCL на стр. 84 не е представена коректно; по-правилно би било хлорометилните групи в съ(полимерите) на стр. 132 да се отбележат като странични такива вместо „хлорни атоми в страничната си верига“; калиевият трет-бутоксид (стр. 137) е инициатор, а не катализатор; номерацията на повечето от фигурите в подраздел III.4.2 не отговаря на тази в текста; извод №3 се съдържа в предходния.

Отговор: Приемам направените забележки. Съответните места в текста са прегледани и необходимите корекции са отбелязани като допълнителна бележка към финалния вариант на дисертационното копие. Подфигурният текст към **Фигура 1.46** следва да бъде коригиран така, че да отразява полимеризацията на N,N-диметиламиноетилакрилат; формулата на звездовидния PCL е отбелязана за корекция; изразът относно хлорометилните групи е редактиран като „странични хлорометилни групи“; калиевият трет-бутоксид е коректно означен като инициатор, а номерацията на фигурите в подраздел **III.4.2** и съответните препратки в основния текст са съгласувани.

По отношение на извод №3 приемам направената забележка. В сегашния си вид той частично повтаря съдържание от предходния извод, което може да създаде впечатление за дублиране. Намерението беше да се акцентира върху различен аспект на получените резултати, но формулировката не го отразява достатъчно ясно. Поради това, редактирана версия на извод №3 е отбелязана в допълнителна страница, прикрепена към дисертационния труд, така че да се избегне припокриване и да се постигне по-ясно разграничаване на акцентите.

Въпрос 1

Полученият полимер-липиден конюгат DHP-PEEGE разтворим ли е в DMSO? При сравняването на ЯМР спектрите на конюгатите преди и след освобождаване на защитните групи е добре, когато е възможно, те да са снети в един и същ деутериран разтворител.

Отговор: DHP-PEEGE е разтворим в DMSO, включително в DMSO- d_6 . Съображението за използване на CDCl₃ при междинния защитен конюгат DHP-PEEGE беше свързано главно с по-добрата разделителна способност и по-прецизното калкулиране на интегралните отношения от протонните сигнали на DHP фрагмента и защитните етоксietiлови групи.

В DMSO- d_6 част от сигналите в областта на полиетерните протони се припокриват по-неблагоприятно, включително с остатъчния сигнал на водата в разтворителя, което затруднява анализа. След сваляне на защитните групи продуктът DHP-PG вече не е разтворим в CDCl₃ поради хидроксилните групи които водят до силно повишена хидрофилност, поради което спектърът е снет в DMSO- d_6 .

Съгласен съм, че когато разтворимостта го позволява, сравняването на спектри в един и същ деутериран разтворител е най-добрият подход. В конкретния случай смяната на разтворителя не затруднява основния структурен извод, тъй като се проследяват ясно изразени промени: намаляване или изчезване на сигналите на защитните етоксietiлови групи и поява на сигнал, съответстващ на хидроксилните групи след депротекцията.

Въпрос 2

Сферичните нуклеинови киселини предполагат наличие на гъсто и радиално разположени олигонуклеотидни вериги по повърхността на частиците. При представеното получаване на липозомни СНК синтезираните нуклеолипиди представляват около 2 mol% от състава на липозомите. Това достатъчно ли е частиците да проявяват характерните свойства на СНК? Извършвани ли са сравнителни изследвания на липозомните СНК и на тези, получени чрез самоасоцииране на нуклеолипид?

Отговор: 2 mol% нуклеолипид изглежда като ниска стойност, ако се разглежда само като молен процент от общия липиден състав. При везикуларните частици обаче по-информативният параметър е реалният брой олигонуклеотидни вериги върху една частица и тяхната повърхностна плътност.

В разглежданите системи 2 mol% нуклеолипид съответстват на хиляди олигонуклеотидни вериги върху една частица. За липозомните СНК, получени от *DHP-(EO)₇-DNA*, са определени средно 3430 ± 92 олигонуклеотидни вериги на частица, а за липозомните СНК от *DHP-(AGE)₃-DNA* - около 3880 ± 194 вериги на частица. Това показва, че дори при 2 mol% се формира изразена олигонуклеотидна корона.

Допълнително, за системата *DPPC/Chol/DHP-(EO)₇-DNA* е определена повърхностна плътност около 0,031 вериги/nm². Тази стойност е под изчислената критична плътност за преход към напълно разтегната *brush* конформация, но е в област, в която сходни SNA системи проявяват характерни свойства. Следователно за разглеждания случай е по-точно да се каже, че веригите формират достатъчно плътна SNA-подобна обвивка. Увеличаване на съдържанието на нуклеолипид вероятно би повишило повърхностната плътност и би довело до по-разтегната конформация на веригите, което би представлявало интерес на бъдещи изследвания.

Наличието на характерни за СНК свойства е подкрепено експериментално чрез няколко наблюдения: по-силно отрицателен ζ -потенциал спрямо контролни липозоми, добра колоидна стабилност, повишена устойчивост към нуклеази спрямо свободния олигонуклеотид и клетъчна интернализация без използване на трансфекционен агент.

2. Отговори на въпросите на проф. д-р инж. Райна Бряскова

Въпрос 1

В дисертационния труд на отделни места се наблюдава използване на терминология от англоезичната научна литература („терминирание“, „терминален“, „абстракция“, „интегриране“, „инкорпориране“ и др.), въпреки наличието на утвърдени български научни еквиваленти.

Отговор: Приемам забележката. В областта на полимерната и биоорганичната химия често се използва терминология, възприета директно от англоезичната литература, но това не отменя необходимостта от максимална езикова прецизност в дисертационен труд на български език.

Бележка 2

Литературният обзор е добре структуриран и достатъчно подробен, но на отделни места представянето на литературните данни има по-скоро описателен характер. Включването на по-задълбочен сравнителен анализ между различните синтетични подходи и по-ясно открояване на техните предимства и ограничения би засилило критичния характер на обзорната част.

Отговор: Обзорът е изграден широко, тъй като дисертацията обединява няколко синтетични платформи - полимеризация, постполимеризационна функционализация, *клик* конюгиране, получаване на нуклеолипиди и самоасоцииране на амфифилни макромолекули. Това обяснява по-описателния характер на някои части.

Същевременно съм съгласен, че критичният анализ може да бъде допълнително засилен чрез по-ясно сравнение на синтетичните подходи според критерии като контрол върху молекулната маса и архитектурата, необходимост от метален катализатор, условия за пречистване, мащабируемост и влияние върху последващото самоасоцииране. Именно тези критерии определят избора на конкретен подход за всяка група системи. По-задълбоченото разглеждане на тези аспекти в рамките на настоящия дисертационен труд обаче би могло да наруши обемния баланс на изложението, поради което те са коментирани в степен, съобразена с основния фокус на работата.

Въпрос 3

В дисертационния труд са приложени два различни подхода за получаване на DHP функционализирани нуклеинови киселини: азид-алкин циклоприсъединяване и фотоиндуцирана тиол-ен клик реакция. Кои фактори определят избора на конкретния синтетичен подход? Определя ли се той единствено от използваните функционални групи, или се влияе и от други фактори като условията на реакцията, стабилността на олигонуклеотидите и характеристиките на крайните продукти? Може ли да бъде направено кратко сравнение между двата подхода?

Отговор: Двата подхода не са използвани като механично дублиране, а като две комплементарни стратегии за получаване на един и същ клас молекули - DHP-функционализирани олигонуклеотиди. Целта беше да се покаже, че концепцията не е ограничена до една конкретна функционална група, един линкер или един тип модифициран олигонуклеотид. Ако само един метод беше използван, можеше да се твърди, че полученото поведение е специфично за конкретния линкер или конкретната реакция. Прилагането на два независими медно-свободни подхода показва, че основният дизайн DHP-липидомиметичен остатък, свързан с олигонуклеотидна верига е достатъчен за получаване на везикуларни СНК-подобни структури, а дизайнът е синтетично гъвкав. Сходството в резултата не прави втория подход излишен; то валидира концепцията.

Изборът на конкретен синтетичен подход се определя не само от наличните функционални групи, но и от практическата достъпност на модифицираните субстрати, реакционните условия, стабилността на олигонуклеотидите и изискванията към пречистването на крайните продукти. И двата подхода са медно-свободни, което е важно предимство при работа с олигонуклеотиди. Азид-алкин циклоприсъединяването предлага висока хемоселективност и добре дефинирано свързване, но изисква предварително въвеждане на подходящи азидни и циклоалкинови функционалности. Фотоиндуцираната тиол-ен реакция, от своя страна, може да бъде по-удобна от синтетична гледна точка поради по-лесната достъпност на субстратите, бързото протичане на реакцията и потенциално по-добрата приложимост при мащабиране. Нейно ограничение е необходимостта от UV облъчване, което в отделни случаи може да наложи по-внимателен избор на субстрат, разтворител и реакционни условия.

Следователно двата подхода не се конкурират директно, а разширяват синтетичния обхват на използваната стратегия и показват, че получаването на DHP-

функционализирани олигонуклеотиди може да бъде постигнато чрез различни реакционни пътища.

3. Отговори на въпросите на доц. д-р Георги Грънчаров

Бележка

В глава III.4.2. от „Резултати и обсъждане“ има несъответствие между номерирането на фигурите в основния текст и това в самите фигури на дисертацията, което затруднява прочита ѝ.

Отговор: Приемам напълно бележката. Несъответствието е от редакционен характер и не засяга експерименталните резултати, тяхната интерпретация или изводите от съответния раздел.

Номерирането на фигурите в раздел III.4.2. и съответните препратки в основния текст са прегледани и необходимите корекции са отбелязани в допълнителната страница, която е прикачена към финалния вариант на дисертационното копие.

4. Отговори на въпросите на проф. д-р Елена Василева

Въпрос 1

Смятате ли, че определените молекулни маси, представени в Таблица 1 (стр. 105) и Таблица 2 (стр. 116), дават основание да считате, че получените молекули са полимерни? Има ли причина да спрете до тези молекулни маси, т.е. защо не сте опитали с например двойно по-големи такива?

Отговор: Да, считам, че получените съединения могат коректно да бъдат разглеждани като нискомолекулни полимери. Основанията за това са стойностите на молните маси (над 2500 g/mol) и това, че молекулите са изградени от повтарящи се мономерни звена.

Изборът на сравнително близки молни маси на хидрофилните полимерни сегменти е направен целенасочено. Основната цел беше да се изследва влиянието на природата и архитектурата на полимерната верига при сравним размер на хидрофилния блок. Ако масите се различаваха значително, самата молна маса щеше да се превърне в допълнителна променлива и би затруднила разграничаването на ефекта на химичната структура от ефекта на масата.

По-големи молни маси, например двойно по-високи, вероятно биха изместили хидрофилно-хидрофобния баланс в посока на прекалено силно изразен хидрофилен характер. Това би променило параметъра на опаковане, критичната концентрация на самоасоцииране и морфологията на агрегатите, а в някои случаи би могло да затрудни интеркалирането или стабилното участие на липидомиметичния фрагмент в мембраноподобни структури. Обратно, твърде ниски молни маси биха довели до поведение, по-близко до това на олигомерни повърхностноактивни вещества, при което ефектът на полимерната функционализация би бил по-слабо изразен.

Въпрос 2

В Таблица 3 (стр. 117) за проба DHP-PETEGA са представени резултати за дифузионните коефициенти, получени след моно- и двуекспоненциално апроксимиране. Второто апроксимиране дава две стойности. Какво означава това? Свързано ли е с възможна втора популация от частици?

Отговор: Двуекспоненциалното апроксимиране означава, че затихването на ЯМР сигнала в DOSY експеримента за DHP-PETEGA не се описва достатъчно добре с една-единствена дифузионна компонента. По-добро описание се получава, когато сигналът се представи като сума от две компоненти – по-бавна и по-бърза.

По-бавната компонента е най-информативна за основния DHP-PETEGA конюгат. При нея стойностите за DHP и PETEGA фрагментите са сравнително близки – около $2,3 \times 10^{-10}$ и $1,96 \times 10^{-10}$ m²/s. Това подкрепя извода, че двата фрагмента са ковалентно свързани и дифундират като части от една макромолекула.

По-бързата компонента не следва да се тълкува директно като доказателство за втора популация наночастици. Ако тя отразява реален допълнителен дифузиращ вид, по-вероятно е той да бъде свързан с по-нискомолекулна фракция или с по-къси конюгатни молекули, тъй като такива видове биха имали по-висок дифузионен коефициент. Едно възможно обяснение е молекулно-масовото разпределение на PETEGA веригата. PETEGA е съставена от сравнително малък брой мономерни звена, но всяко от тях има относително висока молна маса. Поради това разлика от няколко мономерни звена, например между вериги с 11 и 15 звена, води до съществена разлика в молекулната маса и хидродинамичния обем на отделните конюгатни молекули. При наличие на дисперсност това може да доведе до разпределение на дифузионните коефициенти, което при математическото апроксимиране се описва по-добре с две ефективни компоненти.

Допълнително влияние може да има различната локална подвижност на отделни фрагменти или по-сложно релаксационно поведение на системата.

Важно е да се подчертае, че DOSY характеризира молекулната дифузия в органичен разтворител и предоставя информация за поведението на системата при тези условия. Следователно двете стойности отразяват две дифузионни компоненти в ЯМР сигнала, които описват дифузионните свойства на изследваните видове, без сами по себе си да дават пряка информация за структурната организация на системата в други среди.

Въпрос 3

Фигура 3.42 (стр. 118): преходът при DHP-РАА (б) е по-рязък, отколкото при DHP-PG (а). В дисертацията се отбелязва, че „Характерът и ширината на този преход зависят от природата, дължината и архитектурата на полимерната верига, свързана с липидомиметичния фрагмент.“ За този конкретен случай какви според Вас са причините за тази разлика?

Отговор: Разликата най-вероятно се дължи на съчетанието между химичната природа на полимерния блок и начина, по който той влияе върху кооперативността на самоасоцирането.

DHP-PG съдържа неутрален, силно хидрофилен полиетерен блок с множество хидроксилни групи. При него преходът от унимери към агрегати протича по-плавно, защото хидратацията на *PG* сегмента и липсата на изразен електростатичен бариерен ефект позволяват постепенно формиране на хидрофобни домени с нарастване на концентрацията.

DHP-РАА, обратно, съдържа полиакрилова киселина, която във водна среда е частично или значително йонизирана в зависимост от рН. Отрицателно заредените карбоксилни групи водят до електростатично отблъскване и стабилизиране на унимерното състояние при ниски концентрации. След достигане на концентрация, при която хидрофобните взаимодействия между *DHP* фрагментите започнат да доминират, асоцирането протича по-кооперативно и преходът изглежда по-рязък.

Това тълкуване е съгласувано и с данните за ζ -потенциала: агрегатите на *DHP-РАА* имат значително по-отрицателен ζ -потенциал в сравнение с *DHP-PG*, което показва съществен принос на заредената *РАА* корона. Следователно по-резкият преход при *DHP-РАА* може да се обясни с преход от електростатично стабилизирани унимери към агрегати, стабилизирани от заредена хидрофилна обвивка.

5. Отговор на бележката на проф. дхн Владимир Димитров

Бележка

Бих изказал лично мнение, което почива на основни принципи и установени механизми в органичната химия. Ерик Димитров използва в експерименталната работа т.н. клик-реакция. В литературната част на дисертацията е разгледал основни реакции, които са обозначени като „клик“. Оставам с впечатление, че дисертанта залага много на термина „клик“ и приложимостта му за основни реакции в органичната химия. Бих препоръчал „клик химията“ да се разглежда преди всичко като концепция и подход, който кореспондира с т.н. „биоортогонални методи“. Най-общо казано една реакция може да се обозначи като „клик“, ако е бърза, с висок добив, може да се извършва във вода (или биологична среда) и да не се образуват токсични странични продукти. Например, циклоприсъединителната реакция на Дилс-Алдер (както и някои други) не би трябвало да се обозначава като „клик“. Само в определени случаи на прилагане на подходящи субстрати, като електронно бедни диени (тетразини и триазини) и електронно богати напрегнати циклични системи с двойна или тройна връзки, циклоприсъединителната реакция протича съгласно клик-концепцията. Не считам, че дисертанта е допуснал грешки, но бих посъветвал за всяка нова терминология да се отчитат границите на приложимост.

Отговор: Приемам напълно бележката и съм съгласен, че терминът „клик химия“ трябва да се използва внимателно, с ясно отчитане на границите на неговата приложимост. В дисертационния труд терминът е използван основно в контекста на високоефективни, селективни и модулни реакции за свързване на сложни молекулни

фрагменти, като в експерименталната част са приложени конкретни реакции, широко възприети в литературата като *клик*-подходи.

Съгласен съм също, че *клик* химията има много тясна връзка с биоортогоналните методи, особено когато се прилага за модификация на биомолекули или в биологична среда. Бих направил уточнението, че понятията „*клик* химия“ и „биоортогонална химия“ кореспондират помежду си, но не се припокриват напълно. *Клик* химията е по-широка синтетична концепция, основана на модулност, висока ефективност, селективност, меки условия и лесно пречистване, докато биоортогоналността поставя допълнително изискване реакцията да протича селективно в присъствие на биологични функционални групи, без да ги засяга. В този смисъл много биоортогонални реакции са и *клик* реакции, но не всяка *клик* реакция непременно е биоортогонална в строгия смисъл на понятието.

Напълно съм съгласен, че реакцията на Дилс-Алдер не трябва да бъде обозначавана като „*клик*“ в общия случай, тъй като тя обхваща много широк набор от диени и диенофили със силно различаващи се реактивоспособности, условия и добиви. По-коректно е като *клик*-подходи да се разглеждат само определени варианти на циклоприсъединителни реакции, при които са изпълнени основните критерии на *клик*-концепцията – висока скорост, селективност, висок добив и съвместимост с меки условия.

Следователно приемам бележката като важно терминологично прецизиране. В бъдещо представяне на тази част бих подчертал по-ясно, че не всяка реакция от даден тип следва автоматично да се нарича „*клик*“, а само онези нейни реализации, които изпълняват критериите на *клик*-концепцията в конкретния синтетичен или биоконюгационен контекст.