

Р е ц е н з и я

от проф. Данка Петрова Обрешкова, дм, дфн

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ на **Николай Найчев Петков**
Област на висше образование: 7.Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.3. Фармация
Научна специалност: Фармацевтична химия и фармацевтичен анализ.

Маг. фарм. Николай Найчев Петков представя докторантски труд на тема: **КОМБИНИРАН ПОДХОД ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА МЕТАЛНИ КОМПЛЕКСИ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ** с научни ръководители: доц. д-р Диана Чешмеджиева и проф. дн Ивайла Панчева-Кадрева.

Маг. фарм. Николай Найчев Петков се е дипломирал през 2020 г. в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация като **магистър по фармация**. Също така има защитена магистърска степен по специалност **Екохимия**, магистърска програма **Медицинска химия** със среден успех от курса на обучение отличен 6 и успех от държавните изпити отличен 6 в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация. Този успех и от двете магистратури доказва изключителното усърдие и задълбоченост по време на университетското му обучение, което съвсем естествено прераства в трайни научни интереси.

Николай Петков е роден през 1996 г. Понастоящем работи като старши експерт към Агенция „Митници“-ЦМУ.

Бил е асистент в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация, катедра Аналитична химия, а в периода 2020-2023г. е работил в болничната аптека на ВМА София.

Докторският труд е разработен като задочна форма на обучение в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация, Катедра Фармацевтична и приложна органична химия, Лаборатория по Компютърна химия и спектроскопия в периода 2023-2025 г. под ръководството на доц. д-р Диана Чешмеджиева и проф. дн Ивайла Панчева-Кадрева.

*Темата на настоящия труд е актуална и внимателно подбрана. Актуалността произтича от това, че основният акцент в борбата с бактериалните инфекции е поставен върху откриването и разработването на нови биоактивни съединения с антибактериални свойства. Разпространението на щамове с множествена лекарствена резистентност (MDR) налагат спешна нужда от нови подходи. Традиционните антибиотици все по-често се оказват неефективни, както при класически бактериални инфекции, така и при такива свързани с онкологични заболявания, което води до неуспешно лечение и повишена смъртност. Това налага преосмисляне на стратегията, насочвайки усилията към алтернативни терапевтични цели. **Актуалността и значимостта** на научната проблематика в настоящия труд са свързани с непрекъснатото нарастване на инфекциите, причинени от резистентните щамове.*

Докторският труд на маг. фарм. Николай Петков е насочен към намаляване експозицията на канцерогени и мутагени като форма на профилактика. Цели се чрез някои структурни изменения да се променят важни характеристики на определени антинеоплазмни лекарства. Чрез похватите на координационната химия за синтез на комплекси с биологично активни молекули като лиганди се създава възможност за получаване на съединения с потенциално различни характеристики. Проучването в докторския труд цели изучаване на металорганични комплекси с фармакологична активност и ниска токсичност. В тази посока съвсем уместно са формулирани *целта и задачите, свързани със синтез и изследване на нови метални комплексни съединения с потенциално антинеопластично и противовъзпалително действие* с лиганди и доказване по експериментален и теоретичен път техния състав и строеж, както и да се проследи какви изменения претърпяват свойствата и биологичната активност на изходните лиганди в модифицираните структури на комплексните съединения.

Проследено е комплексообразуването на полиетерните йонофори *Monensin* и *Salinomycin* с представители на метални йони от различни групи – алкални, d-елементи и лантаноиди и се проучва ефектът на комплексообразувателите върху биологичните свойства на изходните антибиотици. Също така се проследява приложението на стирилови багрила като флуоресцентни маркери за визуализация на биологични обекти. Казаното до тук доказва както актуалността, така и точната идея на поставената *цел*.

Ясно и конкретно са описани и поставените *задачи* в докторския труд, които включват изследване на взаимодействието на *Monensin* и/или *Salinomycin* с йони на Cs, Zn, Hg, Fe и Se, охарактеризиране на изолираните координационни видове чрез набор от модерни инструментални методи, молекулно моделиране чрез квантово-химични методи и молекулна динамика, както и да се проучи биологичната активност на структурно охарактеризираните комплекси срещу Gram-положителни аеробни микроорганизми и клетъчни линии. В тази посока се цели и изучаване на фотофизичните свойства на стирилови багрила и тяхната способност за визуализация на клетъчни структури.

Ще отбележа някои от по-значимите резултати в настоящия труд като напр. изследване на комплексообразователна способност на ***Monensin* с йони на Cs(I)**. Внимателно са проучени съществуващите литературни данни за координационните съединения на *Monensin* с йоните на Li, Na, K и Rb. Тъй като до момента поведението на йоните на Cs(I) спрямо *Monensin* не е проучено, усилията на автора са насочени към проучване на информация за координационните съединения на лиганда с металните катиони на алкалните елементи.

Доказва се, че *Monensin* взаимодейства с Cs^+ до образуването на диядрен комплекс $[Mon_2Cs_2]$, изследван с рентгенова дифракция, спектрални методи и елементарен анализ, и комплексът дисоциира в разтвор до $MonCs$, като това е доказано чрез NMR спектроскопия и е изследвано с методите на молекулярното моделиране.

При изследванията относно новосинтезирани комплекси особено важен момент е *изучаването на стабилността* им с оглед по-нататъшното им приложение. Поради това оценявам особено положително проучването на автора в тази посока, а именно изследване на взаимодействието на комплексообразувателите с O-атомите на *Monensin*, което вероятно е от значение за стабилността на изследваните комплекси. Поради тази причина е изследвано радиално разпределителната функция $G(r)$ на кислородните атоми на лиганда около металните йони. /Стойността на $G(r)$ е функция от йонния радиус на комплексообразувателя/. Резултатите показват, че всеки от металните йони се характеризира с определена стойност за разстоянието M-O за атомите, изграждащи първата координационна сфера на комплекси.

Средната стойност на инерчния радиус за всички изследвани комплекси в метанол, с изключение на MonNa, е доказана в тесния диапазон 4,50-4,70 Å, което е в съгласие с псевдоцикличната форма на антибиотика. При MonNa стойността е 5,10 Å и отразява „отворената структура“ на лиганда. Това би могло да бъде и обяснение за определената експериментално по-висока стойност на дифузионния коефициент на MonNa спрямо останалите алкални комплекси в MeOH. Данните съответстват на наблюдаваната до момента конформация на *Monensin* в пряка зависимост от използвания разтворител.

В метанол се образуват 13 междумолекулни H-връзки (MMBV) при MonNa и 10-12 при останалите алкални монензинати, което показва, че този параметър не позволява разграничение на „отворената“ от псевдоцикличната структура на лиганда в полярна среда. Данните доказват, че MMBV допринасят за нагъването на лиганда и имат принос в стабилизирането на цикличните структури на MonM в разтвор.

Направените изследвания доказват, че металният йон действа като център на стабилизация, тъй като, чрез координация с кислородните атоми, определя степента на компактност и допринася за заемането на енергетично изгодна конфигурация на целия комплекс. Показано е, че MonNa в метанол е най-динамичният и склонен към промяна в обема на кухината комплекс, докато координационните съединения на *Monensin* с по-големи катиони (MonK, MonRb, MonCs) запазват *стабилна* псевдоциклична структура, независимо от полярността на средата.

Изследвани са серия от системи, съдържащи MonNa и различни метални(II) соли. Интерес представляват координационните съединения с йони на Zn(II) или Hg(II) и тиоцианатни аниони, за които до момента не са известни структурни аналози. Взаимодействието на MonNa с Hg(SCN)₂ или (NH₄)₂[Zn(NCS)₄] в смесен разтворител MeCN:MeOH е довело до получаването на комплекси със състав [Hg(MonNa)₂(SCN)₂] и [Zn(MonNa)₂(NCS)₂], които са охарактеризирани чрез SCXRD, прахова рентгенова дифракция, IR спектроскопия.

Впечатление прави широката гама от разнообразни подходящи за целите на проучването модерни инструментални методи за анализ, в т.ч. и Раманова спектроскопия, включена в изследването на координирането на тиоцианатните лиганди, като са регистрирани Рамановите спектри на MonNa и съответните метални соли. Рамановият спектър на Hg(SCN)₂ се характеризира с наличието на шест ивици. В спектъра на (NH₄)₂[Zn(NCS)₄] се наблюдават две групи сигнали, които са отнесени съответно към амониевия катион и тетрадиоцианатоцинкатния анион. Към първата група принадлежат ивици, които се дължат на валентните трептения на връзките N-H на NH₄⁺, като, поради загуба на тетраедричната симетрия, се сменя израждането на енергиите на съответните преходи.

В хода на експерименталната работа, при използване на различни реакционни условия, е наблюдавано различно поведение на FeCl₃, като е получен диядрения комплекс [Fe(Mon)₂Cl]₂ и при смяна на условията са изолирани и триядрени оксо-комплекси на Monensin и Salinomycin – обект на разглеждане в настоящия докторски труд. Координационните съединения са с аморфен характер, поради което са охарактеризирани с набор от спектрални методи и елементен анализ. Предсказването на тяхната структура, съдържаща ядрото [Fe₃(μ₃-O)]⁷⁺ е осъществено чрез комбиниране на експериментални и теоретични подходи.

Въз основа на извършените анализи, при използване на богат набор модерни експериментални методи, е получена информацията за структурата на повечето комплекси: • във вътрешната координационна сфера на металните йони не участват молекули вода като лиганди (термичен анализ), но са координирани хидроксидни аниони

(UV/VIS спектроскопия); • антибиотиците търпят депротониране и действат като мостови лиганди (IR спектроскопия); • наблюдава се антиферомагнитно взаимодействие между металните центрове т.е. $\mu_3\text{-O}$ (EPR спектроскопия); • трите високоспинови железни йона са нееквивалентни и притежават асиметрично разпределение на електронната плътност (Мьосбауерова спектроскопия). Вероятната структура на получените комплекси се характеризира с геометрия, в която всеки йонофорен анион осъществява мостова връзка между два метални центъра чрез монодентатна карбоксилатна група и едновременно с това действа като бидентатен лиганд посредством хидроксилна група, разположена в срещуположния край на антибиотика. Киселините *Monensin* и *Salinomycin* взаимодействат с CeCl_3 в присъствие на органична база до получаването на комплекси със състав $[\text{CeL}_3]$. Новополучените съединения са анализирани със спектрални и термични методи, и елементен анализ.

Използваните в настоящата работа лиганди – *Monensin* и *Salinomycin* са с доказана активност спрямо различни видове паразити, микроорганизми и клетъчни линии. Серия новосинтезирани метални комплекси са наблюдавани за евентуална промяна в биологичните им свойства спрямо немодифицираните антибиотици, като е изследвана чрез различни експериментални подходи като • оценка на антибактериалната активност срещу Gram-положителни микроорганизми; • определяне на цитотоксичен ефект върху туморна клетъчна линия HeLa; • наблюдаване на морфологичните промени в клетки AUBЕК и/или HeLa, които са индуцирани от приложените антибиотици, чрез оптична и/или флуоресцентна микроскопия.

Тестваните координационни съединения показват, че се налага възможно най-подробно изпитване на съединенията срещу максимален брой микроорганизми.

Причина за различния отговор в изследването на новополучените комплекси спрямо отделните микроорганизми срещу едни и същи съединения може да се търси в разликите в строежа на клетъчната им стена, нейната дебелина и състав, както и в метаболитните им особености. От друга страна, повишената биоактивност на комплексите спрямо немодифицираните антибиотици отразява възможността те да преминават по-лесно през клетъчната мембрана, да индуцират промяна в мембрания й потенциал, както и да нарушават по-ефективно вътреклетъчната хомеостаза.

За по-голямата част от новосинтезираните координационни съединения в докторския труд е показана по-висока активност (по-ниска стойност на MIC) спрямо тестваните микроорганизми в сравнение с немодифицираните антибиотици. Също така е съобразена и стехиометрията на тестваните съединения. За тази цел е изчислен коефициентът $R = \text{MIC}_{\text{Йонофор}}/\text{MIC}_{\text{Комплекс}}$, който е обвързан с количеството на йонофора (mol , $\text{p}10\text{p}$) в съответния комплекс. Изчислена е минимална инхибираща концентрация (MIC, μM) на *Monensin*, *Salinomycin* и техните координационни съединения.

Изследвана е и способността на част от новосинтезираните съединения да потискат клетъчната пролиферация на клетки от човешки произход. Активността на изходните антибиотици и комплексите е оценена върху туморна клетъчна линия HeLa. Резултатите са отчетени чрез методи, основаващи се на измерване на оптичната плътност с три багрила с различна проникваемост в клетките. Преживяемостта на клетъчна линия HeLa е определена на тестваните съединения и техният ефект е оценен спектрофотометрично, след третиране, като екстинкцията е правопрпорционална на преживяемостта. Резултатите показват следните данни: • металните соли са нетоксични в изследвания концентрационен интервал с изключение на $(\text{NH}_4)_2[\text{Zn}(\text{NCS})_4]$ при МТТ-теста. • обект на действие на йонофорите и техните координационни съединения в клетката вероятно са лизозомите, в по-слаба степен - хроматинът в ядрото. •

съединенията, чиято цитотоксичност е еднозначно определена като по-добри потенциални антипролиферативни агенти спрямо $\text{MonH}\times\text{H}_2\text{O}$ и SalH , са съответно $[\text{Zn}(\text{MonNa})_2(\text{NCS})_2]$ и $[\text{Fe}_3(\mu_3\text{-O})(\text{Sal})_3(\text{OH})_4]$.

Изследвани са и три новосинтезирани стирилови багрила – две, съдържащи хинолиново ядро (N1/N2), и едно с бензотиазолово (N3). Оценени са техните фотофизични свойства в разтвор – самостоятелно и при взаимодействие с различни биомолекули. Въздействието им върху клетъчни култури е охарактеризирано с цел потенциалното им приложение за визуализиране на клетки.

Проследени са промените, които настъпват в спектралното поведение на багрилата при взаимодействието им с различни макромолекули от биологичен произход: DNA (ДНК), RNA (РНК), LPS (липополизахарид) и HSA (човешки серумен албумин).

За серията изследвани багрила се налага изводът, че търпят най-съществени промени до достигане на концентрация на нуклеиновите киселини от порядъка на 10 μM . Това е благоприятствано от кулоновите взаимодействия между отрицателно заредения фосфатен скелет и положително заредените катионни багрила.

Направен е изводът, че комплексите на багрила N1- N3 с различни биомолекули са чувствителни по отношение на киселинността на средата, което би могло да намери приложение при визуализацията на клетки от различен произход – поради различната пропускливост на клетъчната мембрана. С цел изследване на потенциалното приложение на багрилата, те са приложени върху здрава (AUBЕК) и туморна (HeLa) клетъчни линии. Резултатите от описаната в докторския труд работата могат да се обобщят както следва: Синтезирана е серия от комплекси на полиетерните йонофори *Monensin* и/или *Salinomycin* с Cs(I), Zn(II), Hg(II), Fe(III), Ce(III) и Ce(IV), които са охарактеризирани чрез монокристална и прахова рентгенова дифракция, спектрални и термични методи, елементарен анализ, молекулно моделиране, включващо молекулна динамика и квантовохимични изчисления, с цел изясняване на структурните и енергетичните характеристики на някои от комплексите. Изследвани са антибактериалната и антипролиферативната активност на синтезираните съединения и резултатите са сравнени с тези за немодифицираните антибиотици. Антибактериалният ефект е оценен срещу Gram-положителни аеробни микроорганизми. За изследване на антипролиферативната активност са използвани туморна клетъчна линия от рак на шийката на матката (HeLa) и нормална клетъчна линия от бъбрек на говежди ембрион (AUBЕК). Изследвана е комплексобразователна способност на *Monensin* с йони на Cs(I). *Monensin* взаимодейства с Cs(I) до образуването на диядрен комплекс $[\text{Mon}_2\text{Cs}_2]$ (1e), изследван с рентгенова дифракция, спектрални методи и елементарен анализ. Цезиевият комплекс представлява първият описан пример за хомометално диядрено координационно съединение на *Monensin* с йон на алкален елемент. Получени и подробно охарактеризирани са структурите на два хетероядрени смесено-лигандни комплекса на MonNa с йони на Hg(II) и Zn(II) — съответно $150 [\text{Hg}(\text{MonNa})_2(\text{SCN})_2]$ и $[\text{Zn}(\text{MonNa})_2(\text{NCS})_2]$. Синтезирани и охарактеризирани са координационни съединения на двата антибиотика с йони на церий в различни степени на окисление — Ce(III) и Ce(IV). Новополучените съединения са анализирани чрез спектрални и термични методи, както и посредством елементарен анализ. Комплексите на Ce(III) $[\text{CeL}_3]$ са изградени от два „циклични“ и един „разгънат“ лиганди, като и трите карбоксилатни групи са координирани бидентатно към металния йон. Ефективността на немодифицираните антибиотици и техните новосинтезирани комплекси срещу аеробни Gram-положителни бактериални щамове е оценена чрез определяне на тяхната минимална инхибираща концентрация. Съединенията, при които цитотоксичността е еднозначно определена и които могат да бъдат разглеждани като по-обещаващи

антипролиферативни агенти, в сравнение с $\text{MonH} \times \text{H}_2\text{O}$ и SalH , са $[\text{Zn}(\text{MonNa})_2(\text{NCS})_2]$ и $[\text{Fe}_3(\mu_3\text{-O})(\text{Sal})_3(\text{OH})_4]$.

Научни приноси на дисертационния труд:

Изолирани и охарактеризирани са **11 нови координационни съединения** (7 на *Monensin* и 4 на *Salinomycin*), като изясняването на тяхната структура и свойства е с фундаментален научен характер и обогатява познанията в координационната химия на йонофорите: • *За първи път е синтезирано и описано в литературата хомометално диядрено координационно съединение на Monensin с йон на алкален елемент $[\text{Mon}_2\text{Cs}_2]$.* • Получени и охарактеризирани са смесено-лигандни комплекси на MonNa с йони на $\text{Zn}(\text{II})$ или $\text{Hg}(\text{II})$, включващи тиоцианатни лиганди, за които към момента не са известни структурни аналози. *Триядрените оксо-комплекси на Monensin и Salinomycin са първите по рода си* такива, съдържащи йонофорен лиганд, като за изясняване на структурата им е използвана комбинация от експериментални спектрални техники и квантово-химични изчисления. • *За първи път са изследвани комплекси на церий и в двете му степени на окисление*, които са с различна структура и състав в зависимост от реакционните условия. Част от получените резултати са и с *приложен характер*: • Предложен е начин за определяне на свързването при координационните съединения на *Monensin*, основан на съотношението между трансмисията на ивиците за асиметрично и симетрично трептене на карбоксилатния анион и максимума на ивицата за неговото деформационно трептене. • Установено е, че включването на някои метални йони в структурата на йонофора потенцира действието на антибиотика. • Изследвано е приложението на нови, рН чувствителни, багрила за оценка на клетъчната морфология. Разработена е процедура за изследване на клетки чрез добавянето на киселина, която блокира РЕТ ефекта.

Като положителен момент от разработването на настоящия докторски труд отчитам факта, че докторантът самостоятелно е изработил описаните проучвания, което, освен широкия обхват на познания, е особено полезно за бъдещото му развитие, поради работа и боравене с модерна апаратура, използвана за синтез и охарактеризиране на новополучените съединения. Всичко това го оформя като изграден специалист с трайни научни интереси в областта на фармацевтичната и медицинска химии и фармацевтичен анализ. Доказателство за това са и научните публикации, които представя.

Докторският труд *Николай Найчев Петков* на тема: **КОМБИНИРАН ПОДХОД ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА МЕТАЛНИ КОМПЛЕКСИ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ** съдържа общо 164 страници, онагледен е с 98 фигури и 31 таблици, а цитираните литературни източници са 197, от които 25 са от последните 5 години.

Наукометрия:

Представени са **4 Научни публикации, свързани с докторската работа в научни списания с висок IF и една в процес на подготовка**. В четири от работите докторантът е **първи автор**, което е доказателство за неговия основен принос.

1. **Petkov N.**, Ivanova A., Nedyalkova M., Simova S., Dorkov P., Ugrinov A., Pantcheva I. Unusual caesium monensinate A: crystallographic evidence for the formation of dinuclear coordination species in the solid state. **Chem. Eur. J.** 31(18) (2025) e202404453.
2. Pantcheva I., **Petkov N.**, Encheva E., Kolev S., Tsanev A., Dorkov P., Ugrinov A., Heteronuclear Complexes of $\text{Hg}(\text{II})$ and $\text{Zn}(\text{II})$ with Sodium Monensinate as a Ligand. **Molecules** 29(13) (2024) 3106.

3. **Petkov N.**, Tadjer A., Cherkezova-Zheleva Z., Paneva D., Stoyanova R., Kukeva R., Dorkov P., Simova S., Pantcheva I. Synthesis, spectral characterization and structural modelling of di- and trinuclear iron(III) monensinates with different bridging patterns. **Inorganics** 12(4) (2024) 114.
4. **Petkov N.**, Pantcheva I., Ivanova, A., Stoyanova, R., Kukeva, R., Alexandrova, R., Abudalleh, A., Dorkov, P. Novel cerium(IV) coordination compounds of monensin and salinomycin. **Molecules** 28(12) (2023) 4676.
5. **Petkov N.**, Cheshmedzhieva D., Vasilev A. Styryl hemicyanines with PET-modulated emission for cellular visualization (публикацията е в процес на подготовка).

Представени са и **7 Участия в конференции**, от които две участия с устни доклади и пет с постери.

Авторефератът напълно покрива дисертационния труд.

Докторската работа **КОМБИНИРАН ПОДХОД ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВОТА НА МЕТАЛНИ КОМПЛЕКСИ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ** е много добре структурирана, написана и онагледена.

Докторският труд, както и авторефератът са оформени грижливо, старателно и с отлично техническо качество.

Представените от докторанта материали във връзка с докторския труд са прецизно подредени и пълни и напълно покриват Националните изисквания, както и тези на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, необходими за присъждане на образователната и научна степен „**Доктор**“. Представена е таблица, от която е видно, че са налице необходимият брой точки.

Докторантът **маг. фарм. Николай Найчев Петков** напълно отговаря на изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане академични длъжности в МУ-София.

Заклучение: Това е една сериозна разработка в областта на проучването и **ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВОТА НА МЕТАЛНИ КОМПЛЕКСИ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СЪЕДИНЕНИЯ**. Извършена е необходимата и достатъчна експериментална работа, както и теоретични изводи. Научните приноси са с теоретичен и научно-приложен характер и повишават съществуващите знания в съответната област, като при това имат и потенциалното приложение в практиката. Предлагам да се присъди образователната и научна степен „**Доктор**“ на **маг. фарм. Николай Найчев Петков**. Оценката ми е убедено **ПОЛОЖИТЕЛНА**.

(Проф. Данка Обрешкова, дм, дфн)