

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Ивайла Недялкова Панчева,
Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация,
член на научното жури със заповед РД-38-128/20.02.2020

на дисертационния труд, представен от редовен докторант
Николета Мирославова Кирчева за присъждане на ОНС „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.2. Химически науки, специалност „Теоретична химия“,

Тема на дисертационния труд: **„Теоретично изследване на механизма на
терапевтично действие на абиогенния метален катион галий(III)“**
научен ръководител: проф. дхн Годор Дудев

Николета Мирославова Кирчева е завършила Факултета по химия и фармация при СУ „Св. Кл. Охридски“: през 2013 г. придобива ОКС „бакалавър“, специалност „Химия“, а през 2015 г. - ОКС „магистър“, специалност „Медицинска химия“. В периода 02.2017-02.2020 г. е редовен докторант в катедра „Фармацевтична и приложна органична химия“, където разработва дисертационен труд в специалност „Теоретична химия“ под ръководството на проф. дхн Годор Дудев. От началото на 2020 г. Николета Кирчева е асистент в Институт по оптически материали и технологии „Акад. Йордан Малиновски“, БАН.

Дисертационният труд на тема **„Теоретично изследване на механизма на терапевтично действие на абиогенния метален катион галий(III)“** е структуриран както следва:

- Съдържание (2 стр.)
- Увод и цел на дисертацията (2 стр.)
- Литературен обзор (36 стр.), съдържащ два основни раздела. В първата част е направен преглед на свойствата на йоните на Ga(III) във връзка с потенциалното им приложение в антитуморната и антибактериалната терапия. Представени са основни хипотези за механизма на действие, свързани с Fe-съдържащи биологично активни вещества, обект на възможна галиева атака. Вторият раздел разглежда особеностите

и приложението на квантово-химичните изчислителни методи с акцент върху неемпиричните, ТФП и тези, отчитащи ефекта на разтворителя.

- Резултати и обсъждане (44 стр.) - представени са изчислителните протоколи, резултатите и дискусията за ролята на Ga(III) в антитуморната и антибактериалната терапия.
- Изводи (1 стр.)
- Използвана литература (8 стр.) – цитирани са 144 литературни източника, голяма част от които са след 2010 г.
- Дисертацията е илюстрирана с 36 фигури, 4 таблици и 58 уравнения.

Актуалност на изследването: Тематиката, в която е насочен дисертационният труд на докторант Н. Кирчева, е особено навременна предвид широко разпространените към днешна дата заболявания в световен мащаб, дължащи се на резистентни микробиални инфекции и онкологични проблеми от различен произход.

Основните насоки в изследванията на докторанта са свързани с теоретични аспекти относно приложението на абиогенния метален йон Ga(III) в терапията на споменатите заболявания. Въпреки теоретичния характер на разработката, получените данни са изключително полезни и имат потенциална сфера на приложение, защото „осветляват“ редица фактори, които е необходимо да бъдат отчетени при използването на галиеви съединения като биологично активни вещества.

На база на известното в литературата докторантът очертава основната идея на труда си – а именно – да изследва конкуренцията между Ga(III) и Fe(III) йони въз основа на известни сходства / разлики в свойствата и координационното поведение на двата метални йона. Като обект на изучаване са избрани моделни (и в някои случаи – реални) биологични системи, при които е възможно заместването на Fe(III) йони с Ga(III) и последващо нарушаване на металната хомеостаза в целевите клетки.

От гледна точка на дизайн на експеримента, смятам, че моделите са обмислени и впоследствие - реализирани много сполучливо. Две са основните направления, в които Н. Кирчева провежда систематични изследвания, използвайки разнообразни квантово-химични изчислителни методи:

А – Потенциално приложение на Ga(III) в антитуморната терапия;

Б - Потенциално приложение на Ga(III) в антибактериалната терапия.

По отношение на направление **A** и въз основа на задълбочения анализ на известното до момента, е изказана хипотезата, че йоните на Ga(III) могат да се „намесят“ в метаболизма на раковите клетки, повлиявайки преноса на Fe(III) посредством протеина трансферин (Tf – **A1**), и / или посредством дезактивиране на вътреклетъчния ензим РНР (рибозонуклеотид редуктаза), като последното може да бъде реализирано чрез два отделни (независими) механизми (**A2-1** / **A2-2**).

В тази връзка първоначално е проведено изследване (**A1**), което подлага на анализ свойствата на редица лиганди, влизащи в състава на активните центрове на Tf и РНР. Това са неутрални или анионни лиганди, за които е изследван афинитетът им да комплексообразуват с йони на Fe(III) / Ga(III) в зависимост от условията, при които протича даденият процес. Отчетени са редица фактори като киселинност на средата, произход, заряд и брой на донорните атоми. Впоследствие са конструирани разширени моделни системи, които отразяват особеностите на активните центрове на изследваните биологични лиганди, имайки предвид конкретните групи, участващи в координационни връзки с металния център.

Намерено е, че:

- Йонът на Ga(III) не може да измести Fe(III) от активния център на трансферин (дълбоко разположен джоб, съхранен от протеинова обвивка, способен да свързва селективно йони на Fe(III)), но би могъл да се координира в протеина към други подходящи донорни групи, особено такива с експозиция към полярни разтворители.

- Свързан в комплекс с трансферина, Ga(III) може да се отдели при значително по-ниско рН в сравнение с йоните на Fe(III), което от своя страна би му позволила конкуренция за координиране към РНР, свръхекспресиран при ракови клетки.

Установените зависимости в направление **A1** очертават условията, при които една вероятна галиева атака би била ефективна при лиганди, пренасящи нативния йон на Fe(III).

В направление **A2** докторантът разглежда особеностите на ензима РНР както по отношение на инхибирането му от йони на Ga(III) (**A2-1**), така и спрямо потенциала на абиогенния метален йон да се свързва със субстрати на РНР, а именно – GDP и CDP (**A2-2**).

В активния си център РНР съдържа два йона на Fe(III), свързани под формата на диядрен комплекс (**A2-1**). Докторантът изследва възможността за получаване на алтернативни структури при заместване на единия нативен център с Ga(III) йони, а

именно конфигурации, съдържащи комбинацията $\text{Fe(III)}_1\text{-Ga(III)}_2$ или $\text{Ga(III)}_1\text{-Fe(III)}_2$. В хода на анализа е установено, че абиогенният метален йон може да измести и двата ферийона от структурата на РНР, но с предпочитание към втория РНР-свързващ център ($\text{Fe(III)}_1\text{-Ga(III)}_2$). Заместването на йоните на Fe(III) (редокс-активен) с тези на Ga(III) (редокс-неактивен) директно блокира активния център на РНР и предотвратява протичането на ензимна реакция.

Втората възможност за потискане действието на РНР е по индиректен механизъм чрез повлияване свойствата на неговите субстрати (**A2-2**). В това направление Н. Кирчева оценява комплексообразователната способност на GDP и CDP да координират йони на Ga(III) чрез пирофосфатните си донорни групи. Детайлно са анализирани възможните моно- (β, β) и ди-ядрени ($\alpha\text{-}\alpha, \beta\text{-}\beta, \alpha\text{-}\beta$) Ga(III) -съдържащи структури. Установено е, че независимо от произхода на базата (GDP / CDP), монодентатната координация в позиция β е предпочитана пред тази в α ; по отношение на бидентатния начин на действие на лигандите най-изгодна е конфигурацията $\alpha\text{-}\beta$. И в двата случая комплексообразуването се благоприятства в среда от полярен разтворител. Въпреки, че пуриновата / пиримидиновата база не участва директно в координационна връзка с металния център, е отчетено, че структурите на GDP са по-стабилни от тези на CDP поради образуването на множество водородни връзки от различен произход. Комплексообразуването на Ga(III) със субстратите на РНР повлиява както структурата на нуклеотид дифосфатите, така и тяхната свободна концентрация. И двата фактора се отразяват на действието на ензима – първият осигурява неразпознаваемост на субстрата от активния център, вторият намалява количеството субстрат, необходимо за протичане на ензимната реакция.

Получените в направление **A2** резултати показват, че обект на потенциална галиева антиракова терапия е и ензимът РНР, чиято активност би могла да бъде повлияна по директен (структурен ефект) и / или индиректен (субстратен ефект) механизми.

В направление **Б** докторант Н. Кирчева разглежда възможността за повлияване на металната хомеостаза на бактериални клетки чрез включването на абиогенния метален йон в специфичната структура на сидерофорите – клас съединения с ясно изразен афинитет към свързване с йони на Fe(III) . Отново е изследвана серия единични лиганди, които изграждат активните центрове на сидерофорите. Установено е, че във вода лигандите проявяват близка селективност по отношение на нативния и абиогенния

метални йони, докато в кисела среда или в присъствието на неполярен разтворител преимуществото е в полза на йоните на Fe(III).

Интерес представляват резултатите, получени при анализа на комбинирани структури, в които отношението метал – лиганд е 1: 2. Разгледани са две основни групи – с (PHEN) и без (неPHEN) фенолатен йон, като е установено, че образуваните Fe(III) комплекси са силно податливи на атаката на абиогенния метален йон. Основна причина за този ефект е геометрията на фери-структурите, която е по-напрегната от тази в съответните координационни съединения на Ga(III). Афинитетът на смесените лиганди към комплексообразуване с Ga(III) нараства в следния ред: PHEN > неPHEN (акс, екват H₂O) > неPHEN (акс, акс H₂O).

Реална система, която онагледява проведените анализи, е сидерофорът преацинетобактин, посредством който докторантът потвърждава възможността за ефективна галиева атака в активния център на лиганда чрез изместване на свързаните Fe(III) йони. Така конструираният „Троянски кон“ би могъл ефективно да наруши металната хомеостаза в бактериални клетки и да доведе до тяхната намалена пролиферация и потиснат растеж.

Приноси на дисертационната разработка:

Антитуморна терапия:

A1 – преносът на Fe(III) йони посредством транспортния белтък трансферин не се повлиява директно от присъствието / участието на Ga(III), но се повлиява индиректно чрез освобождаването на Ga(III) йони във вътреклетъчното пространство при определени условия;

A2-1 – след навлизане на йоните на Ga(III) във вътреклетъчното пространство е възможно инхибиране на РНР (значително експресиран при туморни клетки)

A2-2 – наличието на Ga(III) би могло да намали вътреклетъчната концентрация на субстратите, необходими за реализиране на ензимната реакция с участие на РНР, но също така и да промени тяхната структура, превръщайки я в неразпознаваема за действието на ензима.

Антибактериална терапия:

Б – възможността за използване на „Троянски кон“ под формата на Ga(III)-съдържащи сидерофори изглежда реалистична за третирането на бактериални инфекции, особено резистентни на ефекта на доказали се във времето антибиотици.

В обобщение на представените изследвания и постижения, смятам, че докторант Николета Кирчева е постигнала и двете цели, заложи в ОНС „доктор“:

Образователна цел – докторантът се е запознал в детайли с редица квантово-химични методи, оценил е тяхната приложимост и ги е приложил адекватно съобразно особеностите на изследваните системи;

Научна цел – маг. Николета Кирчева надгражда познанията в областта на галий(III)-базираната терапия чрез оценка на редица фактори, които биха се отразили на ефективността на абиогенния метален йон в реалните условия на бактериални инфекции и онкологични заболявания. Освен това тя дефинира и някои специфики, които трябва да се вземат предвид при въвеждането на Ga(III) в терапията на споменатите заболявания.

По отношение на качеството и количеството на извършените изследвания нямам забележки. Смятам, че за целите на изследването реакционните системи са достатъчно добре разгледани и изчисленията върху избраните представителни конфигурации са оптимизирани и логично проведени.

Във връзка с представените резултати и дискусия, възникват въпросът „Възможно ли е галиевият ефект в терапията на ракови заболявания и бактериални инфекции да се дължи на способността на някои Ga(III)-съдържащи съединения да притежават каталитичен ефект и по този начин да повлияят вътреклетъчната хомеостаза по съвсем различен механизъм?“

Позволявам си да отправя и една конкретна забележка към цялостното изложение в дисертационния труд, а именно - терминът „метал“ да бъде заменен с „метален йон“. В допълнение нивото на дисертационния труд би се повишило значително чрез корекция на редица технически грешки.

Въпреки зададения въпрос и направените забележки, не омаловажавам приносите, получени в резултат на настоящия дисертационен труд.

Въз основа на гореизложеното преценявам дисертационния труд на маг. Николета Кирчева като нейно лично дело и напълно отговарящ на изискванията и препоръчителните наукометрични критерии за присъждане на образователната и научната степен "доктор". Авторефератът представя в сбита и ясна форма най-същественото от дисертационния труд.

Трябва да се отбележи, че докторант Н. Кирчева защитава при условията на предишния Закон за придобиване на научна степен, но едновременно с това изпълнява и изискванията на действащия ЗРАСБ и правилника за неговото приложение.

В тази връзка представените от **Николета Мирославова Кирчева** дисертационен труд и автореферат са в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение (ППЗРАСРБ), Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Кл. Охридски“ и препоръчителните критерии на ФХФ за придобиване на научна степен.

Общата справка за активността на докторант Николета Кирчева съдържа следните факти:

- Съавтор на 4 научни публикации по тематиката на дисертационния труд, 3 от които вече са отпечатани (общо 7 забелязани цитати);
- Съавтор в 8 съобщения, представени на специализирани научни форуми и школи;
- Участник в реализацията на 4 научно-изследователски проекти;
- Член на Комисия, разработила и утвърдила правилата за кандидатстване по програмата на МОН „Млади учени и постдокторанти“.

В заключение, оценката ми за представения от маг. Николета Кирчева дисертационен труд на тема „Теоретично изследване на механизма на терапевтично действие на абиогенния метален катион галий(III)“, е изцяло положителна и с настоящата рецензия изразявам дълбокото си убеждение, че трудът отговаря на възприетите в Закона за развитие на академичния състав в Република България изисквания за присъждането на образователна и научна степен „доктор“.

Убедено препоръчвам на членовете на почитаемото Научно Жури да гласуват положително и да присъдят на маг. Николета Мирославова Кирчева образователната и научната степен „доктор“ в професионално направление 4.2. Химически науки, специалност „Теоретична химия“.

София, април 2020 г.

доц. д-р Ивайла Панчева-Кадрева