

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема: „**Медни(II) комплекси на природните антибиотици монензин, лазалоцид, тилозин и тилмикозин**“

на **Радослава Димитрова Стамболийска**

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ по професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност Аналитична химия

от **доц. д-р Нели Николова Минчева-Пенева**, Минно-геоложки университет „Св. Иван Рилски“, член на научното жури, назначено със заповед № РД-38-136/02.03.2022 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“

Радослава Димитрова Стамболийска е завършила Бакалавърска и Магистърска степен по Екохимия през 2011 и 2013 г., съответно, във Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Кл. Охридски“. През 2017 година е зачислена като задочен докторант към катедра Аналитична химия на същия факултет, с научен ръководител проф. д-р Ивайла Панчева-Кадрева, а на 15.12.2021 г. е отчислена с право на защита. Представила е всички необходими документи по процедурата за присъждане на ОНС доктор.

Представената ми за рецензия дисертация отразява работата на докторанта в Лабораторията по Биокоординационна и Биоаналитична химия (ЛББХ) към ФХФ при СУ „Св. Климент Охридски“. Представено е изследване на координационната способност на полиетерните йонофори монензин и лазалоцид, както и на макролидните антибиотици тилозин и тилмикозин с йоните на Cu(II) при различни реакционни условия. След изолиране на новополучените комплекси, те са структурно охарактеризирани чрез разнообразни физико-химични методи и квантово-химични изчисления. Изследвана е микробиологичната активност на някои от получените комплекси и изходните лиганди срещу Грам(+) аеробни микроорганизми.

Дисертацията съдържа 98 страници, 10 таблици, 47 фигури, цитирани са 142 литературни източника. Изложението е точно и ясно, с логическа последователност и коректен научен стил. Работата е добре структурирана и съдържа увод, литературен обзор, цели и задачи, експериментална част, резултати и дискусия, направени са изводи и са подчертани приносите на кандидата. Целите и задачите са конкретно поставени и изпълнени. Експерименталната част е подробна и систематично следва поставените задачи.

В литературния обзор са разгледани спектъра на действие, характеристиките и приложението на макролидните и полиетерните антибиотици във ветеринарната медицина. Показана е структурата на природните полиетерни йонофори, обяснено е тяхното антибактериално действие, както и комплексообразователните им свойства.

Прави впечатление, че през последните години в ЛББХ към ФХФ, се работи интензивно върху изследване на комплексните съединения на полиетерните йонофори с дву- и тризарядни метални йони, а настоящата дисертация е част от това обширно изследване. Сравнението на биологичната активност на антибиотика монензин и на неговите комплекси с едно-, дву- и тризарядни метални йони, показва че в много случаи активността на комплексите е по-висока, което е мотивация за продължаване и разширяване на изследванията върху металните комплекси на монензина. Лазалоцид е другият антибиотик използван от докторанта, чиито комплекси също привличат вниманието с възможността да образуват димерни и полимерни структури. От представителите на макролидните антибиотици в работата са използвани природния тилозин и полусинтетичния тилмикозин. Комплексообразователните свойства на широко използваните макролидни антибиотици еритромицин, кларитромицин, азитромицин с редица двузарядни метални йони са добре изследвани, докато комплексни съединения с ветеринарните препарати тилозин и тилмикозин липсват в литературата, което прави задачите залегнали в дисертацията твърде актуални и интересни. Докторантът много добре познава наличните литературни данни, ясно очертава връзката между строежа на комплексите и тяхното биологично действие, и на тази основа изгражда своите изследователски цели и задачи.

Според мен, изследванията и получените резултати в дисертацията могат да се обобщят в две групи:

1. Изследване на условията за синтез и определяне на структурата на комплекси на $Cu(II)$ с полиетерни йонофорни антибиотици (монензин и лазалоцид).

Комплексообразуването между $Cu(II)$ и монензин в разтвор е проследено чрез метода на кръговия дихроизъм с източник на синхротронно лъчение, като е установено, че се получава само един вид комплекс. След неговото изолиране в твърда фаза, начина на координация на лиганда и състава на комплекса са доказани чрез IR, ^{13}C NMR, EPR и UV-vis спектроскопия. Спектрите показват монодентатно свързване на органичната молекула чрез кислородния атом на карбоксилатния йон към $Cu(II)$ центъра. За доказване

на координационното обкръжение на металния йон и геометрията на комплекса са проведени изследвания посредством теорията на функционала на плътността (DFT), като е оптимизирана структурата и са определени дължините на връзките и валентните ъгли в хромофорната единица, както и са изчислени енергиите на абсорбционните преходи и EPR параметрите. След интерпретиране на данните е обобщено, че е получен моноядрен меден комплекс от типа $[\text{Cu}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, в който два монензинатни аниона са свързани бидентатно чрез два O-атоми от депротонираната карбоксилна група и от хидроксилната група, а другите две места в координационната сфера на металния йон се заемат от 2 водни молекули разположени аксиално. Структурата на комплекса допълнително се стабилизира от вътрешномолекулни водородни връзки.

Вторият изучен комплекс на полиетерните йонифори е меден(II) лазалоцидат, $[\text{Cu}(\text{Las})_2]$, чиято структура е предположена въз основа на данните от IR, NMR и EPR спектроскопия и сравнение с литературни източници.

2. Изследване на условията за синтез, определяне на структурата и свойствата на комплекси на Cu(II) с макролидни антибиотици (тилозин и тилмикозин).

При взаимодействие на Cu(II) йони и лиганда (тилозин или тилмикозин) са получени четири типа комплексни съединения, в зависимост от реакционните условия (водна/неводна среда, съотношение M:L, вид на изходната медна сол). Двата антибиотика имат сходна структура и сходни координационни свойства, така че образуват аналогични комплекси. Във водна среда и излишък на лиганда (спрямо металния йон) се получават моноядрени медни комплекси ($[\text{CuL}_2]$). В среда от ацетон и молно съотношение M:L=1:1 се образуват диядрени комплекси ($[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{NO}_3)_2]$ $[\text{Cu}_2(\text{HL})_2\text{Cl}_4]$), които се различават по аниона (NO_3^- или Cl^-), произхождащ от изходната медна сол. Полиядрени комплекси се получават при голям излишък на медните йони (спрямо лиганда), отново в неводна среда (ацетон) и от CuCl_2 като изходно медно съединение. Характерна особеност на получените медни моноядрени и диядрени комплекси на тилозин/тилмикозин е начина на координация на макролитичния лиганд, който се координира към металния център чрез N- и O- донорни атоми от микаминозилния пръстен от молекулата на антибиотика, а 16-членния тилактонов цикъл остава непроменен. Множество спектроскопски данни (UV-vis, ^1H и ^{13}C NMR, EPR) са събрани и анализирани за определяне на структурата на комплексите. Определени са коефициентите на моларна абсорбируемост на двата лиганда и на техните моноядрени

комплекси, които имат сходни абсорбционни спектри. Квантово-химичните изчисления за моделната система на хромофора $[\text{CuN}_2\text{O}_2]$ от моноядрените комплекси, както и доброто съответствие между изчислени и експериментални параметри са в подкрепа на предложената структура.

Диядрените Cu(II) комплекси на тилозин и тилмикозин биват два вида – сини и зелени, според съдържащите се в тях нитратни и хлоридни аниони, съответно. Изучени са техните електронни спектри в етанол и ацетон, определени са екстинционните коефициенти на лигандите и комплексите. За определяне на състава на комплексите е използван методът на Жоб и е намерено съотношение $\text{M:L} = 1:1$, а комбинирането с данните от елементарен анализ и ивиците в електронните спектри води до извода, че съединенията имат състав $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{NO}_3)_2]$ и $[\text{Cu}_2(\text{HL})_2\text{Cl}_4]$. За да се получи информация за структурата на комплексите са измерени EPR и $^1\text{H NMR}$ спектри, както и са проведени квантово-химични изчисления. Доказано е, че нитратните йони действат като мостови лиганди между двата Cu(II) центъра, а двата макролида са свързани бидентатно чрез микаминозатните фрагменти. При зелените комплекси два хлоридни аниона свързват мостово металните центрове, другите два хлоридни йона са терминално разположени, а микаминозите са бидентатно координирани чрез N- и O- атоми. Интересно е заключението от EPR спектроскопията, че наблюдавания сигнал се дължи на примеси от моноядрени частици, получени от дисоциацията на диядрените, тъй като последните се очаква да са EPR неактивни.

Изследвана е антибактериалната активност на моно- и диядрените комплекси на тилозина и тилмикозина. Установено е, че Cu -тилмикозинат показва по-ниска минимална инхибираща концентрация отколкото свободния лиганд, което го прави обещаващо съединение за бъдещи изследвания.

От представените в дисертацията резултати става ясно, че проведените изследвания имат както фундаментален, така и приложен характер. От една страна, събрани и анализирани са голям обем от данни за координационната способност на биологично активни вещества, съдържащи O- и N- донорни атоми и комплексите им с Cu(II) йони. От друга страна, важно е потенциалното приложение на металните комплекси като терапевтични средства. Сред тестваните комплекси като антибактериални агенти, се откроява моноядрения Cu(II) комплекс на тилмикозина, който показва по-добри антибактериални свойства от некоординирания антибиотик, и изследванията с него биха могли да бъдат задълбочени и разширени.

Научните приноси са много добре формулирани от кандидата и отговарят напълно на получените резултати, които се отличават с високо ниво на новост и оригиналност. Това от своя страна говори за значимостта на извършените от докторанта научни изследвания.

В допълнение, образователният аспект на дисертацията също трябва да се отбележи. Докторантката е придобила умения за лабораторна работа по синтез, изолиране и охарактеризиране на комплексни съединения, по провеждане на микробиологични експерименти. Тя е използвала разнообразни методи за анализ на нови материали като UV-vis, IR, EPR, NMR, Mass спектроскопия, термогравиметричен анализ, квантово-химични изчисления. Участвала е в интерпретирането и обсъждането на данните, в разпространението на резултатите на научни форуми и публикуване на научни статии. Посредством всичко това, тя е повишила своите теоретични познания в областта на координационната химия и е изградила способност за провеждане на самостоятелни научни изследвания.

Част от резултатите представени в дисертацията са публикувани в две научни статии в международни издания: *Transition Metal Chemistry* (IF 1.588, Q3) и *Compt Rend Acad Bulg Sci* (IF 0.41, Q2). А още една статия е в процес на подготовка за публикуване. Четири научни съобщения под формата на 3 постера и 1 устен доклад са представени на международни научни конференции в страната и чужбина.

Общото ми впечатление от дисертацията е много добро, нямам съществени забележки, с изключение на техническите грешки в текста на дисертацията и на автореферата. Въз основа на направения преглед на дисертацията, бих задала следните въпроси към докторанта:

1. Известно ли е от литературата, която сте ползвали, каква е причината 16-членните макролиди, каквито са тилозина и тилмикозина, да се прилагат само във ветеринарната медицина и дали това е свързано със структурата и свойствата на тези съединения?

2. Възможно ли е от EPR данните за диядрените комплекси на тилозин/тилмикозин (обозначени като 5-6 и 7-8) да се докаже, че сигнала се дължи на примеси? Наблюдавани ли са EPR сигнали с различен интензитет, което да се свързва с неконтролирано образуване на примеси от моноядрен комплекс. Какво показва сравнение на EPR спектрите на моноядрен и диядрен комплекс при едни и същи условия?

3. В дисертацията е казано, че „... *B. Cereus* би могъл да предизвика леко неразположение (при неправилно боравене с бактериалния щам по време на експеримента), изразяващо се в стомашно-чревен дискомфорт и диария, които отшумяват в рамките на 6-8 часа.“. В този смисъл, какви мерки за безопасност бяха взети при експерименталната работа? Какъв тип ламинарен бокс за биологични материали използвахте при микробиологичните изследвания?

В заключение, дисертацията представя едно систематично, пълно и обширно научно изследване, в което са изпълнени поставените задачи и са постигнати научните и образователни цели. Авторефератът отразява правилно съдържанието на дисертацията. Представените документи съответстват на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и препоръчителните изисквания за придобиване на научни степени във ФХФ на СУ“Св. Кл. Охридски“. Всичко това ми дава основание за положителна оценка на дисертацията и мога убедено да препоръчам на уважаемите членове на научното жури да гласуват за присъждането на образователната и научна степен „доктор“ на г-жа Радослава Стамболийска.

28.04.2022 г.

София

(доц. д-р Нели Минчева)