

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Борис Л. Шивачев,
Институт по минералогия и кристалография "Акад. Иван Костов" – БАН,
адрес: ул. "Акад. Георги Бончев", бл. 107, 1113 София
член на научно жури утвърдено със заповед РД-38-90/20.02.2023г. на Ректора на
Софийски университет „Свети Климент Охридски“,

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен '**Доктор**' в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, докторска програма „Аналитична химия“

Автор: Вяра Николаева Велчева

Тема: „Некласически“ противотуморни препарати на основата на метални комплекси-синтез, структура и свойства

Научен ръководител: доц. д-р Галина Генчева, Факултет по химия и фармация, Софийски Университет (ФХФ-СУ)

Общо описание на представените материали

Представеният от Вяра Велчева комплект материали за придобиване на образователна и научна степен „доктор“, на хартиен носител и в електронен формат, е в съответствие с посочените изисквания в “Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“, чл. 67 (1), съгласно чл. 30(1) от ППЗРАСРБ. Също така, представените от Вяра Велчева доказателствени материали отговарят (и надхвърлят) посочените Минимални изисквани точки по групи показатели за придобиване на образователната и научна степен 'доктор' съгласно чл. 1(2), чл. 24(1) и чл. 25 от ППЗРАСРБ. Конкретно, Вяра Велчева е Бакалавър по „Компютърна Химия“, СУ „Св. Климент Охридски“ (2012 г.). През 2014 година завършва магистратура - Медицинска химия, Софийски университет, Факултет по химия и фармация. От 2015 година до сега работи като асистент Аналитична химия, ФХФ, СУ. Вяра Велчева е зачислена в редовна форма на докторантура по докторска програма „Аналитична химия“ към Катедра „Аналитична Химия“ на ФХФ-СУ на 01.02.2015 г. (професионално направление: 4.2. „Химически науки“). На основание чл.58 ал.2 от “Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски“, с решение 70-07-70/08.11.2017г. на ФС на ФХФ-СУ и заповед РД20.17 15 10.11.2017 на ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ редовната форма на обучение е

трансформирана в задочна форма на обучение. Вяра Велчева е отчислена с право на защита на 01.03.2018 г. (РД 20.606/21.032018). През периода на обучение Вяра Велчева е изпълнила изискванията на задължителното прилагане на кредитна система при подготовката на докторанти в ФХФ-СУ като успешно е положила изпити по езикова подготовка (Английски език) и изпит по специалността. В изпълнението на индивидуалния учебен план на Вяра Велчева учебната и преподавателска дейност включва дисциплините „Аналитична химия и методи за анализ“, „Аналитична химия I, II“ и „Инструментални методи за анализ II“ (от 2015 г. и понастоящем). Научната дейност включва участие с доклади на научни мероприятия в страната и на международни такива (общо 10), две специализации в България и три специализации в чужбина, както и участие в два научно-изследователски проекта (ФНИ ДН09/16 и СУ-НИС Договор 80-10-99/2022). Представените от Вяра Велчева публикации за изпълнение „Минимални изисквани точки по групи показатели за придобиване на образователната и научна степен 'доктор' съгласно чл. 1(1) ППЗРАС са две (2), и двете са в списания с импакт фактор (попадат в Q4 и Q1 квартали 37 точки при изискуеми 30), като и двете представените работи са по темата на дисертацията.

Научните изследвания, описани в представената ми за рецензиране дисертация, засягат областта на противотуморни лекарства и лекарствени препарати, област с интензивно провеждани фундаментални изследвания през последните десетилетия, но без ясно изразен пазарно-икономически ефект, т.е. не е достигнато необходимото фундаментално познание, което да се реализира в индустрията. Това прави актуалността на дисертационния труд безспорна. Бих искал да отбележа също, че изследванията, отразени в дисертацията на докторантката Вяра Велчева, са естествено съчетани с работата ѝ като асистент в Катедра „Аналитична Химия“ на ФХФ-СУ, по идея и под ръководството на доц. д-р Галина Генчева.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд, разработен от Вяра Велчева, обхваща 115 страници с включени 75 фигури, 7 таблици и 5 схеми (без да се броят номерираните страници „ 8. Списък на научните публикации, 9. Участия в научни конференции, и Приложения III-IV свързани с дисертационния труд“ – 116-125 стр.). Цитирани са 124 литературни източника. Дисертационният труд е оформен класически и съдържа следните глави: 1. **Увод**, 2. **Литературен обзор**, 3. **Цели и задачи** на дисертацията, 4. **Експериментална част**, 5. **Резултати и обсъждане**, 6. **Изводи**, (и **Заклучение**) и завършва с раздела за 7. **Литература**.

Литературният обзор е структуриран в четири части. Първата част е 1.1. „Механизъм на действие и резистентност на платиновите лекарства“. Интересно е, че тук се говори за

цисплатин, Pt(II)- комплекси, комплекси на Pt(IV), хидролизни химични видове на цисплатин, Pt-ДНК-адукти и координиране на цисплатин към ДНК (общо на около две страници). Ако приемем, че посоченият механизми на действие - „апоптозен път“ – е валиден, то остава въпросът защо не е засегната резистентността? Освен цисплатин, не са посочени други лекарства, не е отразено развитието им (на платиновите лекарства) във функция от резистентност, видове тумори и т.н.. Според мен, тази част (2.1.) следва да включва най-малкото информация и за други платинови лекарствени аналози (карбо-, неда-оксалил- платин ... и т.н., някои от тях споменати по-надолу в дисертацията).

Втората част на литературния обзор (2.2) е „Връзка структура-активност и Влияние на структурните фактори върху ефективността на лекарствата на основата на платинови комплекси“. Разделена е на три подчасти, напускащи лиганди, носещи лиганди и структура на комплекса. Първо е обърнато внимание на противотуморните свойства във функция от напускащите лиганди, т.е. „Cl“: влиянието на електроотрицателността на лиганда, разположението (cis/trans) на лигандите, моно и полидентатността на лиганда, вида и размера/дължината на въглеродородния скелет. Правилно е посочено, че резултатните моно- и ди- заместени платинови аква комплекси следва да се третират като активни. При „2.2.2. Носещи лиганди“, т.е. азот координиращите, подходът е аналогичен. Направен е сравнителен анализ на влиянието на вида на заместителя, размера на въглеродородния скелет (стерично пречене), възможността за формиране на водородни връзки с ДНК базите и т.н., отново спрямо регистрираните противотуморни свойства. При „2.2.3 Структура на комплекса“ Вяра Велчева е наблегнала на два фактора: плоско-квадратната координация и възможността за взаимодействие на комплекса с тиолсъдържащи биомолекули. Тук, според мен, има два липсващи елемента. Не е направено сравнението на структура-активност на комплекси на Pt(II) и Pt(IV). Втората забележка касае липсата на изведени стойности за структурните елементи, свързани с активността, които ще се използват за постигането на целите на дисертацията .

Третата част от Литературния преглед (2.3) е свързана със „Стратегии при моделиране на „некласически“ противотуморни препарати“, като се прави ясно разграничение между Pt(II) и Pt(IV) комплекси с акцент върху последните. На практика, тази част прави обзор на противотуморни вещества на основата на Pt(IV) комплекси, аксиално свързани лиганди, редукция до активни Pt(II) аналози и т.н.. Помпозното „Стратегии при моделиране на „некласически ...“ може да се редактира, за да съответства на текста, защото не е разписана нито една „стратегия“.

Последната част от увода е озаглавена „ 2.4 Координационна способност на лиганда all-cis-2,4,6- триаминоциклохексан-1,3,5-триол“. Разделът започва с поставените изисквания към лиганда: 1) да се координира полидентатно, ... предпоставка за различен

механизъм на действие; 2) да има структура, сходна със структурите на биомолекули, за да се благоприятства възприемането на лекарството от организма; 3) да бъде подходящ лиганд за изискванията, наложени от природата на платина в степен на окисление +4, С оглед на факта, че има раздел SAR, би следвало този раздел да завърши с подобно заключение/изискване. Лигандът *taci* е подробно изучен, като част 1-ва е от 1992 г. а последната част, която откривам е от 2005 година, 1,3,5-Triamino-1,3,5-trideoxy-cis-inositol, a Ligand with a Remarkable Versatility for Metal Ions. Part XIII. В сравнение с предходните части обзорът, засягащ *taci*, е подходящ по размер и насоченост за целите на дисертацията.

Считам, че направеният обзор би следвало да завършва с някакви изводи (заключение), на които да се базират поставените „Цели и задачи“ на дисертацията. Твърдението в началото на раздела „моделирането на комплекс, който да се характеризира с висока противотуморна активност и едновременно с това- ниска обща токсичност, е сложна задача, която, въпреки огромния брой научни изследвания, все още остава нерешена“, на практика поставя въпроса за целесъобразността на научното изследване, зависещо от късмета.

За мен „Целта“ на дисертацията е неясно формулирана. Как е възможно „носещите“ лиганди да са част от тридентатен лиганд? Предложен е само един носещ лиганд – *taci*. „Да се предложи структура ...“ би следвало освен предлагането на хартия, в целите да залегне и експерименталното доказване на такъв тип съединение“.

При изброяването на задачите, необходими за постигане на Целта, е желателно да се посочи с какви методи/техники, способности... ще се извършат изследванията и да се аргументира изборът им. В направения литературен обзор липсват препратки към методи, като използваните ЯМР, Масспектрометрия, XRD анализ, Например, как и коя техника ще бъде използвана за получаване на „стабилни“ комплекси на лиганда *taci* с Pt(IV), избраните методи за охарактеризиране на новосинтезираните комплекси в твърда фаза и в разтвор са ЕПР, ТГА, ТЕМ, ЛА-ИСП, защото, при оценката на антипролиферативните отнасяния на комплексите има ли значение дали ще се използва монокристал, поликристален образец или аморфен такъв....? Желателно е Целта и задачите да се преработят.

В дисертацията Вяра Велчева е избрала подход, чрез който първо да представи протоколите за получаване и характеристиката на получените материали – както биологични, така и физикохимични (4. Експериментална част) и след това да представи и дискутира резултатите (5.), за да завърши с обобщение на по-важните резултати (Изводи и заключение). Така избраният подход позволява лесно да се провери изпълнението на задачите и постигането на заложената цел.

Експериментална част (4.) започва с използваните апаратни Методи, след което е описано получаването на комплексите **1A B C**, **2 A B C D** и **3**, подходът за изучаване свойствата

на комплексите във воден разтвор, влияние на редуциращи агенти върху стабилността, оценка на цитотоксични свойства, метода COMPARE и завършва с *in vitro* нефротоксичност. Като цяло разделът е стегнато написан и представя коректно подходите. Имам следните забележки и коментари, основно свързани с частта, в която съм специалист. С оглед на почтеност към бъдещи студенти, докторанти е коректно да се отбележат неточностите и при възможност да се поправят.

При описанието на Рентгеноструктурен анализ трябва да се има предвид, че кристалите и структурите не са анализирани („Структурата на 2С и 2D са анализирани“), а събирането на дифракционните данни е осъществено на посочените апарати (дифрактометри). „Анализът на събраните дифракционни данни“, определяне на елементарна клетка, кристалографска система и пространствена група е извършен с програмата Arx2, данните са експортирани във формат за работа с ShelX и структурите на съединенията „са решени с ShelXT (Intrinsic Phasing) (102) и рафинирани (оптимизирани) с ShelXL“.

В изречението „Всички неводородни атоми са оптимизирани с 3 пространствени координати и 6 неизотропни параметъра на отместване, известни още като термални елипсоиди“; има два вида оптимизация: на координатите (3 пространствени координати) и на термалните елипсоиди. Какво отразява оптимизирането на термалните елипсоиди? Колко параметъра (3 + 6 или друго) се оптимизират при атомите, намиращи се в частни позиции?

Изказът „за **подобряване решението** за комплекс **1A** и **3** е използвана функцията SQUEEZE“ е непълен/некоректен. С употребата на SQUEEZE евентуално се подобряват структурни индикатори, чрез отчитане на дифракцията на неподредеността на разтворителя, т.е. на теория SQUEEZE, без да засяга основния структурен мотив, премахва електронната плътност в кухините/порите на структурата, дължаща се на разтворител (solvent).

При описването на получаването на комплексите т. 4.4-4.6 никъде не е посочен добивът. Откъде е известно наличието на шест молекули вода в т.4.6 [Pt(taci)(taci-4H₂CO₂)]·6H₂O? Описанието на получаването на 1B и 1C 2B , 2C 2D е минималистично.

В резултати и дискусия, са описани изследвания на дисертантката по темата, проведени в няколко направления: получаване на комплекси taci-Pt(IV) и тяхната характеристика в разтвор и кристална форма с ИЧ, ЯМР, РСА, изследване стабилността на комплексите във воден и фосфатно буфериран разтвор и оценка на биологични противотуморни/ нефротоксичност свойства на получените комплекси. Разделът започва с изследване на протонираната кристална форма на taci (H₃taci)SO₄Cl и характеризиране на

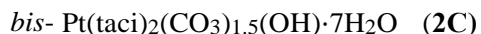
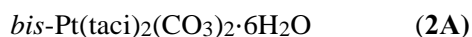
молекулната структура на $\text{taci} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ във воден разтвор, както и формите, под които съществува при различна „киселинност“ на средата. Тук основният извод е за съществуването на taci и още три негови карбаматни форми при $\text{pH} \sim 7.0 - 8.0$, както в разтвор, така и в твърда фаза. Имам следният въпрос относно протонираната форма на taci , $[\text{H}_3\text{taci}]^{3+}$: с каква инструкция на ShelX са „работени“ водородните атоми при азотните атоми?

Последващото получаване на различни комплекси между Pt(IV) и taci е осъществено посредством контрол на молното отношение $\text{Pt} : \text{taci}$ и киселинността на реакционната среда. Първо е получен $\text{fac-}[\text{Pt}(\text{taci})\text{I}_3]\text{I} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, който дехидратира и се получава $\text{fac-}[\text{Pt}(\text{taci})\text{I}_3]\text{I}$. При прекристализиране от диметил формамид (DMF) на $\text{fac-}[\text{Pt}(\text{taci})\text{I}_3]\text{I} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ се получава $\text{fac-}[\text{Pt}(\text{taci})\text{I}_3]\text{I} \cdot 2\text{DMF}$. Решени са кристалните структури и на трите комплекса 1ABC, при които един лиганд taci – координира към Pt, а координационната сфера се допълва от I. В дисертацията кристалните структури са детайлно описани.

В 4.4 комплексът 1A е даден като трихидрат $\text{fac-}[\text{Pt}(\text{taci})\text{I}_3]\text{I} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, докато в П1 е 1.9 хидрат. В текстът е три хидрат „Следователно, изчисленият брой водни молекули в елементарната клетка на кристала е 24 (по 3 молекули вода за всяка молекула комплекс). „ Кое е вярното?

Описанието на Фигура 26. е “ИЧ- спектър на $\text{taci} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, записан в таблетка KBr”, като в текста фигурира „ в спектъра могат да се отнесат и ивици, доказващи присъствието на карбаматни форми.“. Би следвало описанието да се редактира.

Следва описание на получените комплекси $\text{bis-}[\text{Pt}(\text{taci})_2]^{4+}$ т.е. два лиганда taci запълват координационната сфера на Pt (т.е. шестте йодидни йона от изходната платинова сол са заместени от две молекули лиганд):



Получаването на комплекси завършва с $[\text{Pt}(\text{taci})(\text{taci-}_4\text{H}_2\text{CO}_2)] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3). За разлика от fac- и bis- комплексите, където платината координира само с азотни центрове от taci , при 3 координационният полиедър е PtO_2N_4 . Това е така, защото две от amino групите на taci са „карбаматни“.

Комплексите 1A и 2A са охарактеризирани и с $^{15}\text{N-}$ и $^{13}\text{C-}$ твърдофазен CP-MAS ЯМР и инфрачервена спектроскопия.

Молекулната структура, процесите на хидролиза, стабилността на комплексите 1А, 2А са изучени във воден разтвор при различни условия с ЯМР спектроскопия. При 1А и 2А във водни разтвори съответно с рН ~5.0 ~9.5 координацията на двата комплекса се осъществява през amino групите на лиганда.

Масата (съставът) на комплексите 1А и 2А в разтвор е получен и от масспектрометричен анализ. Записаните масспектри на пресни водни разтвори на комплекс 1А и 2А и на свободния лиганд *taci* (за сравнение) са в съответствие с ЯМР данните и кристалните структури.

Проведени са експерименти на системата K_2PtI_6 -*taci* във воден разтвор с рН 8.0 - 8.5 с оглед на изясняване на получения $[Pt(taci)(taci_{-4H}2CO_2)]$. С помощта на $1H$ - $1H$ COSY и $1H$ - $13C$ HSQC двумерни техники, сигналите са отнесени към два комплексни вида $[Pt(taci)(taci_{-4H}2CO_2)]$ и *bis*- $Pt(taci)_2(CO_3)_2$, т.е. в реакционната системата има лиганд *taci* и варианти на *taci*-карбамати.

Изследвана е стабилността на комплексите fac - $[Pt(taci)I_3]^+$ и $[bis-Pt(taci)_2]^{4+}$ във воден разтвор, във функция от времето и рН (стаяна температура в рамките на 5 дни). При престояване на комплекс fac - $[Pt(taci)I_3]^+$ във воден разтвор (рН ~ 5.5) протичат процеси на хидролиза, заместване на йодидни лиганди с H_2O или ОН- група.

При рН на разтвора 3.0; 7.4 или 8.5 процесите на хидролиза при fac - $[Pt(taci)I_3]^+$ са сходни – при рН ~3.0 преобладава форма с две ОН групи, при рН 7 хидролизните продукти с една или две ОН групи и комплекса са в съотношение ~ 1:1:1.

При $[bis-Pt(taci)_2]^{4+}$ 1H - ЯМР- спектри на 1-5 ден (рН ~ 3.0; 7.4, 8.5 и 9.5) не регистрират промяна, т.е. не се предполага процес на хидролиза.

При подкисляване на разтвор, съдържащ $[Pt(taci)(taci_{-4H}2CO_2)]$, се наблюдава превръщане до стабилния при тези условия $[bis-Pt(taci)_2]^{4+}$.

Процесите на хидролиза на комплекс fac - $[Pt(taci)I_3]^+$ във фосфатно буферирана среда и 37 °С са значително ускорени в сравнение с „водните“ разтвори. Веднага след разтваряне на комплекса се формира h1, като h2 е основен продукт след 12 часа при рН 3, но се регистрира след 24 час про рН 7.4.

Биологичната активност на fac - $[Pt(taci)I_3]^+$ и $[bis-Pt(taci)_2]^{4+}$ е осъществена по отношение на серия човешки туморни клетъчни линии (HL-60 , HL-60/Dox , HL-60/CDDP , LAMA-64 , SKW-3 , MDA-MB-231 , SAOS-2 , T-24) с МТТ- тест и референт *Cis*-DDP. Активността на fac - $[Pt(taci)I_3]^+$ е сравнима с тази на референта, като за HL-60/CDDP и SAOS-2 линии следва да се повтори и евентуално срещу друг референт.

Дисертацията е написана стегнато с оптимално количество илюстрационен материал. Поставените задачи са изпълнени на ниво. Получени са седем нови комплекса на Pt(IV), които допълват серията на лиганда tac_1 . Структурите на новополучените комплекси са доказани, както в твърдо състояние, така и в разтвори, с помощта на монокристална рентгенова дифракция, едномерни и двумерни ЯМР техники и са подкрепени с ИЧ и Мас спектри. Установено е, че две от изследваните съединения притежават противотуморни свойства, сравними с използвания референт. Направен е и опит за установяване на връзката между структурата на съединенията и биологичната им активност.

Основните приноси и достойнства на дисертацията са:

- проведени са системни и задълбочени изследвания в една съвременна конкурентна област: получаване на антитуморни вещества;
- получени са нови, оригинални научни и научно-приложни резултати: комплекси на Pt(IV) с лиганда tac_1 ; с вариации в координационната сфера;
- материалите са охарактеризирани с подходящи съвременни методи – ЯМР, рентгеноструктурен анализ, ИЧ спектроскопия, масспектрометри; получените резултати се коментират адекватно;
- изследвана е стабилността на комплексите във функция от време, рН и температура;
- с изследването на биологичната активност, противотуморни свойства на част от получените комплекси се достига до пълен цикъл включващ получаване, характеристика и свойства (приложение);
- очертана е перспективна възможност за потенциалното им приложение и възможност за продължаване на изследванията;
- Резултатите са отразени в две публикации.

Авторефератът, на български, отразява съдържанието на дисертацията. Обемът и разнообразието на актуалните научни изследвания, задълбоченото и сведущо обсъждане на резултатите и оригиналността на приносите ми дават основание да дам на дисертационния труд на Вяра Николаева Велчева положителна оценка.

Критични забележки и препоръки

В дисертацията, в опит да се избегнат повторения, се употребяват синоними. Считаю, че при научните работи употребата на синоними (химикали, молекули, съединения,

продукти и др.) води до двусмислие и е по-удачно да се използва многократно правилният термин (или само един термин).

Употребата на термина „дисордер“ е неправилна и следва да се замени с неподреденост.

Препоръчвам и навсякъде “Н- връзки” или „Н-“ да се смени с водородни връзки (С–Н...О, възприето е D–Н...А).

„ORTEP представяне на кристална структура“ Съкращението на ORTEP произлиза от Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot. На Фигурите където няма всички елипсоиди е препоръчително да се премахне т.е. „Представяне на фрагмент от кристална структура показващ координацията на А) тасі – метал А б) ...“

На Фигура. 2 са посочени 2 kJ/mol. Как е получена (откъде е взета) тази стойност при условие че само О-Н...О е от порядък 4 до 40 kJ/mol?

Как избрахте лиганда тасі; кои други лиганди, поне на хартия, анализирахте, с какво тасі ги превъзхождаше?

Направените коментари и поставените въпроси са уточняващи и не омаловажават постигнатите и дискутираните от Вяра Велчева резултати.

В заключение, дисертационният труд на Вяра Велчева съдържа научни, научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), на ППЗРАСРБ и “Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски”. Дисертационният труд показва, че Вяра Велчева притежава теоретични познания и професионални умения при получаването на нови комплекси, тяхната физико-химична характеристика и изследването на биологичните им свойства, като демонстрира качества и умения за провеждане на научни изследвания.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Вяра Николаева Велчева в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. „Химически науки“ и докторска програма „Аналитична химия“.

21 април 2023 г.

Рецензент:

Проф. д-р Борис Шивачев