

**Авторска справка за приносите на научните трудове  
на доц. д-р Ивайла Недялкова Панчева-Кадрева**

за участие в конкурс за академична длъжност „професор“,  
професионално направление 4.2. Химически науки  
(Аналитична химия)

Общият списък на научните публикации, на които съм автор или съавтор, съдържа 53 работи, от които 33 са в реферирани международни издания, 19 – в нереферирани списания, сборници с редактор / издателство и един автореферат. Цитиранията на тези публикации (към 04.07.2020 г.) без самоцитатите на всички съавтори са 336 (251 по Scopus). Индекс на Хирш (с изключени самоцитати) – 9.

За участие в настоящия конкурс са представени 22 публикации, които не са използвани при защитата на дисертацията ми за ОНС „доктор“ (2001) и конкурса за доцент във ФХФ на СУ (2011). Публикациите включват 19 статии в реферирани списания с импакт-фактор и квантил, и 3 научни съобщения в пълен текст в сборници с редактор / издателство (период 2011-2020 г.). Върху тези публикации са забелязани 40 цитата (28 в Scopus). За целите на конкурса са включени общо 69 цитирания след заемане на длъжността „доцент“. Представен е и хабилитационен труд на тема “Многообразието в свойствата на природния антибиотик Монензин”.

След 2011 г. текущи резултати от научноизследователската ми дейност са представени под формата на 46 съобщения (20 устни доклади и 26 постера; 16 на национални и 30 на международни научни форуми).

Изследванията, отразени в научните трудове за рецензиране, тематично могат да се отнесат към направленията (био)координационна и биоаналитична химия.

## **1. (Био)Координационна химия**

### **1.1. Комплекси на природни биологично активни вещества**

Полиетерните йонофори са природни антибиотици, продуцирани от *Streptomyces spp.* Използват се широко във ветеринарната медицина като кокцидиостатици и притежават разнообразни химически свойства / биологична активност.

Йонофорът Салиномицин натрий взаимодейства с йони на Cd(II) и Pb(II) до образуването на  $[Cd(Sal)_2(H_2O)_2]$  и  $[Pb(Sal)(NO_3)]$ . При комплексообразуването се наблюдава извличане на натриевите йони от кухнята на антибиотика. Установен е различен начин на

координиране на Салиномицин в двата комплекса – бидентатно с йони на Cd(II) и полидентатно с йони на Pb(II). И в двете структури се наблюдава координация на водни молекули в кухината на антибиотика. Образоването на Салиномицинантни комплекси с йони(II) на тежки метали създава предпоставки за изследване на потенциалната антидотна активност на лиганда в случай на хронични / остри интоксикации, които могат да възникнат в животновъдството (**публикация 1**).

Освен с йони на тежки метали, Салиномицин натрий координира и двузарядните метални йони на Mn(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II). В тази връзка са получени липозомни формулировки на база стерично стабилизираните DPPC:CHOL:DSPE-PEG-2000 състави на липофилните комплекси на Салиномицин с йони на Na(I), K(I), Mn(II), Co(II) и Ni(II) чрез филмова хидратация при различни молни съотношения лекарство-DPPC. Комплексите и липозомните Салиномицинати проявяват цитотоксичност при три човешки туморни клетъчни линии, като включването на липозомни агенти потенцира ефекта на лиганда. Експериментите показват, че липозомните състави са удачен преносител на неутрални комплекси на Салиномицин с моно- и двузарядни катиони (**публикация 4**).

В изследвания с антибиотика Монензин киселина са изолирани неутрални комплекси с тризарядните метални йони на La, Nd и Gd, които са охарактеризирани с редица спектрални техники (IR, ESI-MS, FAB-MS, EPR, SRCD). Предполагано е, че три лиганда координират през карбоксилатен йон и хидроксилна група, разположени в двата края на структурата на антибиотика до образуването на комплекси със състав  $[Ln(\text{Mon})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ . Водните молекули заемат кухината на Монензин по аналогия с доказани структури с двузарядни метални йони. Допълнително, чрез кръгов дихроизъм със синхротронно лъчение, е наблюдавано образуването и на заредени комплексни частици, което зависи от молното съотношение метал-лиганд (**публикации 17, 22**).

В **направление 1.1**, Ивайла Панчева е предложила стратегия относно получаването на комплексните видове, участвала е в охарактеризирането на новите съединения, в дискусиата върху получените резултати и тяхната интерпретация, както и в изготвянето на ръкописите.

### **1.2. Биологична активност на метални комплекси на природни антибиотици**

Известно е, че включването на метални йони в структурата на биологично активни вещества много често потенцира ефекта на некоординирания лиганд. В тази връзка е изследвана биологичната активност на Монензин киселина и комплексите ѝ с двузарядни йони на биометалите Ca, Mg, Co, Mn, Ni, Zn е срещу култивирани човешки клетъчни линии от мултиформен глиобластом (8MGBA), рак на белия дроб (A549), на гърдата (MCF-7), на

шийката на матката (HeLa) и на черния дроб (HepG2) и нетуморната човешка ембрионална клетъчна линия Hep3, както и срещу трансплантируеми вирус-индуцирани туморни линии при пиле (хепатома) и плъх (саркома). По-късно комплексите на Монензин с йони на La(III) и Nd(III) са тествани срещу клетъчни линии от рак на гърдата и трансплантируем сарком при плъх. Краткотрайните експерименти в монослойни адхезивни клетки са извършени чрез МТТ-тест, включване на неутрално червено, оцветяване с кристал виолет. Дългосрочните експерименти включват образуване на колонии и оцветяване с акридин оранж / пропидиев йодид. От получените резултати е установено, че всички съединения намаляват значително жизнеспособността и пролиферацията на третирани клетки по времево- и концентрационно-зависим начин, като металните(II)/(III) комплекси са по-ефективни от некоординирания лиганд (**публикации 2, 3, 17, 20**).

Способността на комплексите на Монензин с двузарядни йони на биометалите Ca, Mg, Co, Mn, Ni, Zn да потискат видимо растежа на бактериални клетки е оценена срещу Грам-положителния анаеробен бактериален щам *Clostridium perfringens spp.* Въпреки, че Монензинатните комплекси притежават сходна структура, тяхната активност варира в широк диапазон срещу изследваната бактериална култура, като в повечето случаи новополучените съединения са с по-добра *in vitro* активност от киселата форма на антибиотика (**публикация 6**).

В експерименти *in vivo* при мишки е оценена и острата токсичност на структурно охарактеризирани комплекси на Монензин и Салиномицин с йони на Na(I), Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Zn(II). Експерименталните данни показват, че комплексите на Салиномицин с Ca(II) и Mg(II) са с най-висока токсичност сред тестваните съединения. След предварителна оценка на биохимичните показатели на оцелелите животни, е заключено, че не се наблюдават значителни промени в рамките на тридневно третиране с йонофорните антибиотици и техните комплекси (**публикация 8**).

Макролидният антибиотик Тилозин реагира с Cu(II) йони до образуването на два типа комплекси в зависимост от реакционните условия: моноядрен ( $[\text{Cu}(\text{Tyl})_2]$ ) и диядрен ( $[\text{Cu}_2\text{Tyl}_2\text{X}_2]$ ,  $\text{X} = \text{Cl}^-, \text{NO}_3^-$ ). Биологичните тестове показаха, че Тилозин и неговите комплекси са сравнително нетоксични съединения при бели мъжки ICR мишки. Оценените *in vitro* антибактериална и SOD-имитираща способност, сочат, че комплексите, като цяло, са перспективни агенти от некоординирания антибиотик Тилозин база (**публикация 21**).

В направление 1.2, Ивайла Панчева е участвала в дизайна на биологичния експеримент, в подбора на условията при експерименти *in vitro* и *in vivo*, в интерпретацията на получените резултати и в изготвянето на ръкописите.

### 1.3. Комплексообразуване на йонофорни антибиотици в разтвор

Методът на кръговия дихроизъм (CD / SRCD) разкрива перспективи при изследването на малки молекули, чиято конформация се повлиява значително при комплексообразуване с метални йони. Поради тази причина са проведени изследвания с Монензин и комплексите му с едно- и дву-зарядни метални йони, които показваха, че:

- CD спектрите на лиганда (киселина) и в присъствието на йони на Li(I), Na(I), K(I), Rb(I), Ag(I), Et<sub>4</sub>N<sup>+</sup> в метанол са много чувствителни към координиращите катиони и могат да бъдат използвани за тяхното различаване. Знакът и интензитетът на CD-ивичите значително варират в изследваните съединения въпреки сходната им кристална структура. Компютърното моделиране, базирано на теорията на функционала на плътността (DFT) и модела на имплицитния разтворител, предполага, че твърдото състояние на структурата на Монензин се запазва до голяма степен и в разтвор. Времево-зависимата теория на функционала на плътността (TDDFT) не позволява сравнение на теоретичните и експериментални спектри поради тяхната ограничена точност, но показва, че спектралните промени са резултат от комбинация от малки конформационни промени в лиганда при свързване на едностранните катиони и пряко участие на електрони от металния йон в електронните преходи на Монензин (**публикация 11**);

- в зависимост от молното съотношение метал-лиганд Монензинатният анион образува неутрални и положително заредени комплексни видове с двузарядните метални йони Ca, Mg, Co, Mn, Ni, Zn, Cd. Експерименталните данни показват, че координирането на двузарядни метални йони към Монензинатния анион значително повлиява SRCD спектъра на лиганда, и то по различен начин. Въз основа на серия от експерименти с кръгов дихроизъм са изчислени разпределението на частиците, индивидуалните спектри на двата комплексни вида, както и техните условни стабилитетни константи. Оценен е и относителният афинитет на Монензин да координира изследваните двузарядни метални йони (**публикация 18**).

- афинитетът на Монензин да взаимодейства с едностранни метални катиони е оценен с помощта на функционала на теорията на плътността (DFT), комбинирана с изчисленията на поляризуемия континуум (PCM). Анализирани са ефектите на различни фактори, които могат да доведат до образуването на комплекси между Монензинатния А анион и метални йони от

групи IA и IB. Конкуренцията между Na(I), възприет като референтен йон, и еднозарядните метални катиони, е оценена чрез свободната енергия на Гибс за заместване на свързания с лиганда Na(I) йон с неговите конкурентни йони Li(I), K(I), Rb(I), Cs(I), Cu(I), Ag(I) и Au(I). Изчисленията показват, че намаляването на размера на катионите, придружено с увеличаване на „приемащата“ им способност, повишава селективността на металните йони към донорните атоми на лиганда. Полиетерният йонофор се свързва селективно с йони на Na(I) в полярни разтворители, но лигандът може да стане селективен по отношение на йоните на Li(I) или Cu(I) в разтворители с по-ниска полярност (**публикация 19**).

В **направление 1.3**, Ивайла Панчева е моделирала условията на експеримента, регистрирала е кръгово-дихроичните спектри в конкретните системи, участвала е в интерпретацията на резултатите и в изготвянето на ръкописите.

#### **1.4. Метални комплекси на ацетилхолинестеразни реактиватори**

Ацетилхолинестеразата (ACE) е ензим, чиято активност се блокира от действието на фосфор-органични съединения, вкл. и бойни отровни вещества, но може да бъде възстановена чрез използването на подходящи реактиватори. Оценена е координационната способност на серия от оксим-съдържащи реактиватори на ACE - BT-07 (K005), BT-08 (K033), BT-07-4M (K074) и Обидоксим, да взаимодействат с йони на Pd(II) и Pt(II). Установено е, че образуването на комплексни видове протича по-бързо с йони на Pd(II), отколкото с йони на Pt(II). Тестът за *in vitro* реактивация на инхибирана с параоксон мозъчна ацетилхолинестераза от плъхове (Обидоксим) показва, че новите комплексни частици са със значително по-ниска активност от некоординирания лиганд. Липсата на реактивираща способност вероятно се дължи на стабилността на комплексите в разтвор, както и на депротонирането на оксимните групи на лиганда, необходими за възстановяване на ензимната активност (**публикации 9, 13**).

В **направление 1.4**, Ивайла Панчева е участвала с методически насоки в дизайна на експериментите, интерпретацията на получените резултати и в изготвянето на ръкописите.

## **2. Биоаналитична химия**

### **2.1. Свойства на фосфолипаза A<sub>2</sub>, изолирана от Випоксин**

Токсичната субединица на хетеродимерния невротоксин Випоксин, изолиран от българската усойница *Vipera ammodytes meridionalis*, е секретирания фосфолипаза A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), която притежава широк спектър от свойства.

Способността на sPLA<sub>2</sub> да катализира хидролизата на естествени и изкуствени субстрати е оценена в присъствие на нативния Ca(II) йон и подобните му двузарядни катиони Mg, Sr, Ba, Cd. Хидролизата на естествените глицерофосфолипиди протича в най-висока степен, когато ензимът се активира от калциеви йони, докато хидролизата на изкуствения субстрат се улеснява от метални йони, притежаващи йонни радиуси, по-големи от Ca(II), като Sr(II) и Ba(II). Тези резултати предполагат, че освен свойствата на металните катиони, е необходимо да се отчетат производът и координационната способност на „главата“ на липидите. Чрез флуоресцентен анализ е установено, че промените в конформацията настъпват по време на координацията на метални йони в каталитичния център на sPLA<sub>2</sub> преди последващата хидролиза. Направен е изводът, че етапът, ограничаващ скоростта в каталитичния цикъл, не е достатъчен за оценка на всички фактори, влияещи върху хидролизната активност на sPLA<sub>2</sub>, изолирана от випоксин (**публикация 5**).

Хемолитичната активност на sPLA<sub>2</sub> е изследвана в присъствието на наситени (палмитинови) и ненаситени (олеинови) мастни киселини. Установено е, че олеиновата киселина повишава хемолитичната активност на sPLA<sub>2</sub> в зависимост от концентрацията в сравнение с ефекта на палмитиновата киселина и контролите. Добавянето на хепарин към суспензия от червени кръвни клетки (RBC), съдържаща sPLA<sub>2</sub> или смес от sPLA<sub>2</sub> и съответната мастна киселина, води до инхибиране на хемолитичната активност. Ефектът на sPLA<sub>2</sub> върху морфологията на RBC предизвиква образуването на ехиноцити, което предполага, че RBC е евентуална мишена, атакувана от sPLA<sub>2</sub> субединицата на випоксин. Випоксиновата sPLA<sub>2</sub> инхибира (дозо-зависимо) агрегацията на тромбоцитите, когато арахидоновата киселина и колагенът са използвани като индуциращи агенти (**публикация 7**).

В **направление 2.1**, Ивайла Панчева е участвала в интерпретацията и обсъждането на резултатите и изготвянето на ръкописите.

## **2.2. Оралната течност като обект на изследване в съдебната токсикология**

Оралната течност (ОТ) е комплексен течен секрет, който може да се взима безболезнено, бързо и неинвазивно от ниско обучени лица. В последно време ОТ е обект на внимание от страна на клиничните и съдебните токсиколози поради използването ѝ като алтернативен биологичен образец на кръвта, който може да осигури оценка на експозицията на наркотици при злоупотреба.

Първоначално са изследвани редица параметри на ОТ, които биха могли да послужат като маркери за нейната идентичност / разреждане. Получените данни показват, че протеиновият профил и  $\alpha$ -амилазната активност могат да бъдат използвани като маркери за

идентичност на пробите ОТ, докато нивата на креатинин могат да служат като индикатор за разреждане / стабилност на оралната течност. Оценени са и условията на съхранение на ОТ (температура, период, стабилизатори), т.к. е установено, че те повлияват концентрацията на креатинин (**публикация 10**).

Впоследствие, изследванията са насочени към сухото орално петно, което, аналогично на сухото кръвно петно, може да се използва като подходяща проба за съхранение и транспортиране, както и за елиминиране на ензимно и хидролизно разграждане на анализите. Оптимизирана е процедура за извличане на наркотици от оралната течност и съответното сухо петно, както и е оценена приложимостта на техниката за сухи петна с цел откриване на забранени субстанции. Приложимостта на протокола е потвърдена чрез използване на проби орална течност, предоставени от субекти, потвърдили скорошната употреба на забранени субстанции. Резултатите показаха, че лекарствена злоупотреба може да бъде оценена чрез техниката на сухото петно, която е обещаваща алтернатива на течната проба (**публикация 12**).

В **направление 2.2**. Ивайла Панчева е участвала в интерпретацията и обсъждането на резултатите и изготвянето на ръкописите.

### **2.3. Анестетици и психоактивни вещества**

Интересен случай от практиката е разследването на предполагаемо самоубийство с пропофол (силно сънотворно), което е много рядък пример за собственоръчното прилагане на този анестетик поради изключително бързия му физиологичен ефект. Токсикологичният скрининг на проби от кръв и урина доказва само наличието на пропофол и лидокаин, въпреки многобройните празни опаковки от различни лекарства, открити на местопрестъплението. Пропофолът е определен количествено във всички налични биологични проби. Токсикологичните резултати и тези от аутопсията потвърдиха, че смъртта е причинена от респираторна недостатъчност поради предозирание на пропофол, приложен в кратък период от време. Решаващ фактор за интерпретация на данните се оказва преразпределението на анестетика след смъртта, характеризиращо се с бързо натрупване на лекарството в тъканите (**публикация 14**).

Синтетичните канабиноиди (СК) са нови психоактивни вещества, наречени "легална" алтернатива на канабиса. Техните структури се различават от тези на  $\Delta^9$ -тетрахидроканабинол (ТНС), но имитират биологичния му ефект. На "черния" пазар СК се появяват напръскани върху "билкови смеси", предназначени за пушене. Добре известно е, че СК са по-мощни агонисти на канабиноидните рецептори (CB1 / CB2) в човешкото тяло от ТНС

и притежават разностранна и тежка токсичност. Извършен е анализ на пет иззети от органите на реда „билкови смеси“. Установено е, че те съдържат синтетичния канабиноид 5F-ADB (5F-MDMB-PINACA), който е идентифициран чрез газова хроматография-мас спектрометрия и е потвърден с ядрено-магнитен резонанс (**публикация 15**).

По-късно е разследван и фатален случай на 18-годишен мъж, пушил СК от няколко месеца, като е приел свръхдоза през последните 48 часа от живота си. Резултатите от аутопсията разкриват синдром на остър респираторен дистрес. Както токсикологичният анализ на проби от кръв и урина от починалия, така и химическият анализ на иззетата „билкова смес“, показва наличие на два СК - 5F-ADB и FUB-AMB. При хистологичното изследване се наблюдават тежки и необратими промени в морфологията на белия дроб, водещи до исхемично увреждане на всички вътрешни органи и тъкани. Настоящият случай може да бъде дискутиран като пример за индуцирана от наркотици и свързана с наркотици смърт, в резултат на остра интоксикация с 5F-ADB и FUB-AMB, както и от систематична употреба на двата синтетични канабиноида (**публикация 16**).

В **направление 2.3**. Ивайла Панчева е взела участие в дискусията на случаите, обобщаването на резултатите и изготвянето / редакцията на ръкописите.

Представените за рецензиране научни трудове са резултат от сътрудничество с колеги от ФХФ-СУ „Св. Климент Охридски“, български екипи от ФФ-МУ-София (Г. Момеков), ИЕМПАМ с музей (Р. Александрова), ИОХ-ЦФ - БАН (Л. Антонов), ИОХ - БАН (Р. Стоянова, Е. Жечева), „Биовет“-Пещера (П. Дорков) и чуждестранни научно-изследователски групи от Япония (К. Osakada), Унгария (В. Gyurcsik), Чехия (Р. Bour).

**Част от изследванията са проведени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“:**

“Полиетерни йонофорни антибиотици: предизвикателство към координацията им с метални йони за модифициране на техните терапевтични свойства” (ДО-02-84/2008), ръководител проф. д-р Мариана Митева

“Нови оксим-съдържащи съединения и техните метални комплекси като реактиватори на холинестеразата” (ДДВУ-02-78/2010), ръководител доц. д-р Ивайла Панчева

“Нови хоризонти за природните йонофорни антибиотици (Хоризонти & Йонофори)” (КП-06-Н29-3/2018), ръководител доц. д-р Ивайла Панчева

август 2020 г.

