

Хабилитационна справка

на доц. дн Ваня Николова Мантарева

по научните трудове за конкурс за „професор“ по професионално направление
4.2. Химически науки, научна специалност 01.05.10. Биоорганична химия, химия на
природните и физиологично активни вещества, ДВ бр. 40/ 16.05.2025 г.

За участие в конкурса са приложени научни публикации и книга, които в по-голямата си част са публикувани след защитата на дисертация за научна степен „доктор на науките“ (2021 г.). Общ брой за конкурса - **27 научни труда** (показатели В и Г), като от тях **24 са публикациите** в Scopus. Издадена е **книга** по съдържание на дисертация за научна степен „доктор на науките“. Първи и единствен автор за кореспонденция - **11 научни труда**. Статиите от доклади на научни форуми (**9**) са публикувани в списание (*JOP*) и в поредица (*SPIE Proceed.*), които се индексират в Scopus. Списъкът съдържа и **2 публикации** в списания с импакт фактор от други бази данни. **Цитатите** за конкурса (**249**) са за периода от 2022 г. до юли 2025 г., избран така, че да няма повторение на цитати от други конкурси, които общо за всички научни трудове са **> 950** цитирания, с **H-индекс: 17** (Scopus) и **18** (вкл. и други бази данни).

Научните трудове за конкурса са публикувани в следните списания със съответния квартил за годината на публикуване (**Q, брой**): *Biomedicines*; *Gels*; *Int. J. Mol. Sci*; *Cancer Gene Ther.*, *Viruses* (**Q1, 5**), *Inorganics*; *Front. Biosci. - Landmark Ed.*; *Curr. Iss. Mol. Biol.*; *J. Mol. Struct.*; *J. Fluor.*; *J. of Biomed. Photonics & Eng.*, 2 (**Q2, 7**), *Bulg. Chem. Comm.*; *Sylwan – Eng.Ed.*, 2 бр. (**Q4, 3**), *SPIE Proceed. (SJR, 5)*, *J. of Physics: Conf. Series (SJR, 4)* и в списания само с импакт фактор - *J. Biomed. Discoveries* и *Arch. Biotech. Biomed.* (IF > 3, 2).

I. УВОД

Научната тематика на публикациите и авторската книга за конкурса може да се обобщи като целенасочено разработване и изучаване на свойствата на фоточувствителни съединения, като фотосенсибилизатори за метода *фотодинамична терапия* (ФДТ), както и за други приложения на базата на фотофизикохимични процеси. Природното явление „фотодинамично действие“ се наблюдава и прилага емпирично още от древността, като в съвременността ни е все така актуално за нови области на приложение, поради обстоятелствата и необходимостта възникващи при съвременните предизвикателства. ФДТ се състои в протичане, при оптимално подбрани условия, на каскадни фотофизични и последващи фотохимични процеси, като резултат от подходящо облъчване на фоточувствително съединение. При биологична мишена се наблюдава бърз, локален и щадящ организъма като цяло, терапевтичен ефект. Методът има характеристиките на неконвенционален и палиативен подход с основни приложения за биомедицината и екологията.

Фоточувствителните съединения за фотодинамичен метод се отличават с абсорбция в спектрален диапазон от видимата до близката инфрачервена област, характерна за съединения със силно спрегната ароматна структура. Съвременните светлинни източници напълно покриват изискванията за възбуждащото лъчение за ФДТ метода. Не на последно място по важност е оптималното насищане на средата с кислород. В резултат на физични взаимодействия и електронни преходи, протичащи след светлинното възбуждане на молекулата, се получават различни реактивни и кратко-живущи форми на кислорода. Механизмът с генериране на синглетен кислород е доказан като най-продуктивен и ефективен за последващо въздействие, като резултат от фотосенсибилизацията. При наличие на клетки - мишена, следват поредица от биологични механизми, които инициират промени в патогенните клетки, които водят до фотодинамичен терапевтичен ефект.

Първите клинично одобрени фотосенсибилизатори имат порфиринов тип структура (хематопорфиринов дериват, пречистената му форма „Фотофрин“ и протопорфирин IX (PPIX), като резултат от биосинтезата стартираща от аминокиселината - ALA) и се прилагат успешно за диагностика и терапия на тумори, включително и в клиники в нашата страна. Понастоящем ФДТ се развива с бързи темпове по проблеми, свързани с трите си компонента: фотосенсибилизатор, светлинни източници и пренос на лъчението, и подходи за насищане на средата с кислород. Понастоящем, ФДТ е все така във фокуса на научните предизвикателства, поради неспецифичност на въздействие на продуктите на фотосенсибилизация, както и поради спешната необходимост от различен механизъм на действие при бързо променящата се реалност на нарастваща лекарствена резистентност. Методът ФДТ се утвърждава като ефективна, съвременна терапия, без алтернатива при спешни животозастрашаващи състояния.

В насока синтеза на нови фотосенсибилизатори, продължава разработването на производни структури на базата на порфириновия пръстен, обобщени като порфириноидни съединения, както и на други нови фотоактивни съединения с различна от порфириновата структура. Всички те са дефинирани като второ и трето поколение фотосенсибилизатори. Последните резултати показват различна успеваемост на усилията на научната общност за минимизирането на основните недостатъци свързани с хидрофобната природа и разтворимостта, „транспорта“, натрупването и изчистването от клетки и органи, със селективността и тъмнинната токсичност, като основни проблеми при клинично одобрените фотосенсибилизатори.

Фталоцианините са числят към порфириноидните съединения, с така наречена „гъвкава“ структура за химични модификации, с уникални фотофизикохимични свойства и неограничен потенциал за приложения в много области. Важен е фактът, че тази научна тематика стартира като нова първо в лаборатория на ИОХЦФ-БАН успоредно със световните научни центрове, в началото на 80-те години на XX век и в резултат от тези първи изследвания се патентова порфириново производно за клинично приложение в туморната ФДТ за нашата страна. В следващите години се продължи с разработване на ново поколение фотосенсибилизатори на базата на фталоцианинови и нафталоцианинови производни, които да покриват изискванията на фотодинамичен метод с приложения за биомедицината.

II. Направления, резултати и приноси

1. Нови фталоцианинови комплекси като фотосенсибилизатори за ФДТ: синтез и фото- свойства. (В 1-6; Г5, Г7, Г15)

Получени са нови структури на фотосенсибилизатори за ФДТ на базата на фталоцианиновия пръстен и биологично-активни фрагменти като групи заместители. Фталоцианинови комплекси с катионни групи в непериферна позиция бяха получени по аналогия на периферните производни от предишната ни работа. За координиране са подбрани метални йони на паладий, никел, галий, цинк, алуминий и лутеций, с принос към прехода на молекулата към триплетно възбудено състояние. Новите комплекси, за разлика от предходни структури, се различават по позицията на заместителите - метилпиридилокси групи, които са в четирите непериферни позиции на пръстенната, симетрична фталоцианинова молекула. Правени са опити за получаване на непериферни окта- заместени фталоцианинови производни, но не бяха успешни. Като предимство на така получените фталоцианини, с осем периферни функционални групи, е химически еднозначната структура на съединенията, без позиционни изомери. Изборът на пиридилокси - група е обоснован от положителния заряд при N-атом след кватернизирание с метилйодид или метил сулфат, което променя и липофилната природа на фталоцианиновата молекула. Получени са катионни и хидрофилни фталоцианинови комплекси на паладий, никел, алуминий и със заместители от симетрично позиционирани метилпиридилокси групи на непериферна позиция. Следвани са синтетичните схеми за получаване на фталоцианинови комплекси с аналогични периферни заместители.

При синтеза на непериферно-заместени фталоцианини като комплекси бе приложена синтетична процедура с първоначално получаване на лиганда и следващо образуване на комплекса. Установихме, че при този подход получените комплекси са с по-високи добиви и чистота спрямо получените чрез директен синтез от мономери (динитрили), също и са необходими от по-малко химични реактиви за синтеза и пречистването. Изключение правят комплексите на лутеций и галий, които поради пространствено пречене, получаване на комплекс от лиганд е неефективно дори при „сурови“ реакционни условия.

Условно наречената втора серия фталоцианинови производни бяха получени като комплекси на лутеций със заместители от биологично-активни въглехидратни групи (галактопираноза и галактоза) в непериферни позиции свързани с етерна връзка. Успешна синтетична схема е директната циклотетрамеризация за координиране на лутециевия йон. Комплекси на цинк със заместители от липидни фрагменти (местранол) бяха получени чрез директен синтез (кипене, катализатор DBU) или индиректно, от лиганда след добавяне на $Zn(OAc)_2$ или $ZnCl_2$ без изолиране на междинен продукт. В този случай бе приложена клик реакция за свързване на комплекса към функционалната група (местранол или галактоза) през триазолен пръстен. Като фокус при координирането с лутециев йон е получаването на мономолекулни комплекси в по-висок процент от състава на суровия продукт. Двойни структури (double-decker) от свързани фталоцианинови пръстени през лутеция не са подходящи като ФДТ – сенсибилизатори.

С методите на UV-vis спектроскопията са изследвани абсорбционните и флуоресцентни свойства на комплекси и конюгати на фталоцианина. Фотофизичните параметри, като спектър, позиция на абсорбционния максимум, молекулна абсорбируемост (екст. коефициент), флуоресцентен спектър при различни спектри на възбуждащото лъчение, и при различни разтворители, квантов добив и време на живот на флуоресценция. Всички те са изследвани в сравнителен аспект и показват надеждни свойства за ФДТ приложения. За сравнение при изучаване на свойствата на периферно заместени производни бяха получени и аналогичните комплекси на цинк, които да бъдат използвани като стандарти при изучаване на фото- свойствата на новите фталоцианинови комплекси. С оптимални свойства се отличават комплексите на паладий (Pd^{2+}), на базата на основните фото-физикохимични характеристики, като квантов добив на триплетното възбудено състояние на молекулата респ. на генерирания синглетен кислород. Фотохимичните свойства, които са от значение за ФДТ, като фотостабилност и квантов добив на синглетен кислород, показаха най-високи стойности при комплексите на лутеций и паладий. Важно е да се знае, че изследванията на фоточувствителни съединения като фталоцианините - нестабилни в кислородна среда при облъчване вкл. и с интензивна дневна светлина - не следват стандартните условия на експерименти за изучаване на оптичните характеристики на съединенията.

2. Природни фотосенсибилизатори за фотодинамичен метод: (1) производни на кобаламина - свойства и приноси; (2) антрахинони за ФДТ?

2.1. Кобаламини: фото- физикохимични и биологични свойства. (3В, 12Г)

Кобаламинът е общоизвестен като витамин B12 и се характеризира със сложна молекулна структура на базата на коринов (corrin) пръстен и на молекулни фрагменти от дезоксиаденозил или метилна група в аксиална позиция на кобалта, което е характерно за природните производни, както и диметилбензимидазол. Този молекулен фрагмент се повтаря и при четирите познати структури на кобаламина. Функцията на кобаламини в терапията на тумори е добре изучена и се прилагат клинично при туморната химиотерапия. Ефектът се дължи на повишено натрупване на приложените терапевтици в туморните клетки по механизъм включващ рецепторна биомолекула (CD320). От друга страна, съгласно литературни данни е установено, че дефицита на B12 повишава риска от развитие на тумори. Изследванията ни показаха, че кобаламинът има положителен принос за ФДТ.

В литературата не бяха открити проучвания за кобаламини като фотосенсибилизатори, което е в основата на нашите проучвания. Свойствата на кобаламина бяха изследвани в условия, които се прилагат при охарактеризиране на фоточувствително съединение. Оценката на съединенията за фотобезопасност при неспецифични стандартни условия, като спектър на светлинния източник и лъчеви дози (360-960 nm, Helios-iO; 10 J/cm²), показаха широк концентрационен диапазон на нетоксичност (< 1000 μ M) за кобаламини при третираните ембрионални клетки (BALB 3T3). Получените резултати показаха фотобезопасност на двете форми на кобаламина (циано- и хидрокси- кобаламин) в широк концентрационен диапазон. Изследванията на ФДТ - ефекта на кобаламини сам по себе си и в условия на ФДТ с фталоцианинови комплекси бяха проведени *in vitro* с туморни клетъчни линии (MCF-7 и MDA-MB-231) и за сравнение върху здрави моделни клетки

(MCF-10A). Приложените Zn(II)-фталоцианини (3ZnPc & 4ZnPc), които се различават по позицията на четирите групи - заместители за еднакви други условия на експеримента, като концентрации и параметри на светлинно облъчване (LED 660 nm; 50 J/cm² и 100 mW/cm²), показаха зависимост от структурните особености на комплексите. Приносът на кобаламина е в намаляване на тъмнинната токсичност на основния фотосенсибилизатор (3ZnPc), както и на фототоксичността и при двата вида моделни клетъчни линии (туморни и нормални клетки). Беше установено, че наблюдаваният ефект е в резултат от селективно натрупване в туморните клетки, с наблюдаван ефект на защита (екраниране) към приложеното лъчение.

Основният извод от условно наречената кобаламин - зависима ФДТ е, че се постига положителен ефект на намаляване на общата токсичност на основния фотосенсибилизатор (ZnPcs), с подобрена селективност, което е предпоставка за последващо минимизиране на основни недостатъци и странични ефекти при биологични обекти.

2.2. Антрахинони от растителен произход: налични резултати и перспективи за разработване на нови фотосенсибилизатори. (4Г)

Зеленият подход във всички област на съвременността ни, се очертава като потенциален способ и в развитието на фотодинамичния метод. С фокус върху компонентите му - фоточувствително съединение и спектър на лъчението – се разработва т. нар. „зелен ФДТ“ метод. Понастоящем няма клинично одобрени изолирани от растения фотосенсибилизатори, с изключение на хиперицина (*Hypericum perforatum*, жълт кантарион), който след многогодишни изследвания е на етап пред- и клинични проучвания за ФДТ. В по-общ обхват, фотосенсибилизатори от растителен произход имат добра научна основа, в предвид наличната литературата за терапевтичните им свойства са необходими по-задълбочени изследвания на фото-свойствата. Бъдещето е на природните съединения от различни източници, като база за развитие на нови структури фотосенсибилизатори за целите на метода ФДТ. По темата, в лабораторията се работи със съединения с антрахинонова структура, като началните резултати са докладвани на специализиран научен форум (6th PDT Congress).

3. Конюгати на фталоцианинови комплекси с протеини и ензими: фото-свойства и ФДТ ефекти. (2В, 4В, 14Г)

Получени и охарактеризирани са физични конюгати на базата на фталоцианини с биологично-активен протеин (колагенов хидролизат) и ензим (α -хемотрипсин), като нативни и с физиологична функционалност биомолекули, и с възможности на преносна система. И двата вида конюгати са изучени при физиологични условия за формиране и стабилност на двойните структури и в допустими за следващи приложения концентрационни диапазони. Наблюдаваните взаимодействия са в резултат на липофилно - хидрофилната природа на молекулите, на заряда. Доказана е стабилност на конюгатите в неутрална среда (pH 7.4-7.8). Установени са фотофизичните им свойства и процес с пренос на енергия от биомолекулата на базата на аминокиселините триптофан и тирозин към фталоцианина със спектър на флуоресценция в далечната червена област (> 690 nm), подходяща и за целите на диагностиката и ФДТ. Получените конюгати с хемотрипсин и с

колагенов хидролизат са охарактеризирани в сравнителен аспект със съдържащите ги чисти фталоцианинови комплекси (GaPc1 & GaPc2) за фотобезопасност (BALB 3Т3) и за биологична фотодинамична активност при *in vitro* условия върху туморна и нормални клетъчни линии (SH4 спрямо HaCaT, BJ).

В резюме, резултатите показаха: (1) на порядък по-ниски стойности на основните фотофизикохимични параметри спрямо тези за чистите фталоцианини; (2) намалена цитотоксичност за конюгираните фталоцианини и при двата вида биомолекули; (3) ФДТ-ефект е наблюдаван при по-високи концентрации на фталоцианините, респективно и фототоксичност; (4) конюгатът с хемотрипсин показва по-ниска токсичност при нормални кератиноцитни клетки и (5) основен принос към ФДТ метода са получените стойности за фототерапевтичен индекст (PIF) и селективност (SI) за конюгатите в сравнение с ефекта при прилагане на чисти фталоцианинови съединения.

4. Разработване на фотодинамичния метод с фталоцианини за социално-значими заболявания (1-2В, 4-5В, 7В, 2Г, 4Г, 6-9Г)

4.1. Антимикробна фотодинамична терапия

Фотодинамичната терапия е утвърден метод за ефективно инактивиране на патогенни бактерии, особено в настоящата реалност на нарастваща мултилекарствена резистентност. Проведени са изследвания с Pd(II) vs. Zn(II) комплекси на фталоцианина при щама *Aeromonas hydrophila*, като клинични изолати - чувствителен и резистентен към антибиотици. Резултатите показаха ефект на пълно инактивиране с Pd(II) - комплекс при концентрации > 5μM, независимо от чувствителността на щама. Установено бе, че наблюдавания ефект на фотодинамичното въздействие се дължи на неспецифичност и в натрупването на съединенията в изследваните бактериални клетки в суспензии с различна плътност. С флуоресцентен метод беше оценено количествено натрупването на комплексите в бактериални клетки. Резултатите бяха потвърдени и от проби на бактериални биофилми. Изследвания за фотодинамично инактивиране на Грам (–) щам на *Flavobacterium hydatidis*, която е причина за огромни загуби в рибните стопанства беше проведено Pd(II) фталоцианини с различна позиция на функционалните групи. В резултат от тези изследвания беше установено, че периферно заместените комплекси показват пълно инактивиране при по-ниски концентрации в сравнение с периферно заместените им аналози.

4.2. Фотодинамична инактивация на вируси

Приложението на фотодинамичния метод за инактивация на вируси стана много актуално със здравната криза, причинена от последната пандемия. Нашият принос по темата е в проследяване на ефективността на ФДТ при различни условия на взаимодействието вирус – клетна гостоприемник. Изследванията провеждани в ИМикБ-БАН потвърдиха, че ФДТ е надежден и еднозначен метод за инактивиране на вирусите с обвивка за всички етапи на заразяване на клетките-гостоприемник в експериментални условия.

4.3. Фотодинамична терапия при тумори

Първото утвърдено приложение на ФДТ като терапевтичен метод е при тумори с клинично одобрените порфиринови фотосенсибилизатори в края на миналия век. За период от 25 г. от тогава, антитуморната ФДТ се развива и е все така актуална, поради природата на механизма на въздействие, изключващ развитие на резистентност. Изследванията с т. нар. трето поколение фотосенсибилизатори имат за фокус преноса, селективността, изчистването от тъкани и клетки и токсичността на новите структури.

Наблюдението относно позицията на заместителите и токсичността на фталоцианина беше потвърдено и при ФДТ изследвания с туморни клетки. Експериментите на клетъчни култури показаха, че периферно заместените проявяват по-висока токсичност спрямо периферно заместени комплекси върху различните туморни и нормални клетъчни линии. Изследванията публикувани от доклади на научни мероприятия (13-20 Г) съдържат приложението на ФДТ метода при туморни модели *in vivo*. Получените резултати са благодарение на сътрудничества с различни университети в Русия. Личният ми принос при тези изследвания е в синтеза на нови фотосенсибилизатори и като идеи за тяхното прилагане като протоколи за работа.

III. Научно-изследователска работа за следващите 5 години

1. Устойчиви, зелени подходи при синтеза: разработване и развитие на „зелен метод“ за получаване на фталоцианини

През последните години в научната литература е добре документиран синтез на фталоцианини с използване на „зелени методи“. С редица предимства, пред останалите описани зелени методи е използването на „екологични разтворители“. Най-прилагани са ниско-токсичните разтворители, йонните течности и дълбоко-евтектични смеси. При микровълново облъчване разтворителят е в минимално количество. Икономическият ефект също не е маловажен от „зелените“ подходи, тъй като имат ниска себестойност в сравнение с другите методи за синтез на фталоцианини. На базата на досега постигнатото, намеренията ни са близките години е да въведем тези разтворители в лабораторната ни практика.

2. Проучвания на екзозомите (LncRNA) и на матричните металопротеази (ММП), като естествена мишена в туморната терапия (проект с Китай)

Матричните металопротеази (ММП) са добре изучени, като съпътстващи формирането на тумори и метастазирането им. В клиничната практика ММП-и се използват и като точен показател за ранно откриване при някои видове тумори, както и като подходяща мишена за разработване на инхибитори за туморната терапия. Структури на нискомолекулни съединения за инхибиране на каталитичния център на ММП показват ефективност само в експериментални условия. Задача за бъдещата ни изследователска работа е изследване на механизма на въздействие на фотосенсибилизатори и на ФДТ метода върху активността на туморно насочените ММП-те (24 на брой). Понастоящем, по проблема има противоречиви и взаимоизключващи се наблюдения. Използвайки модела „орган-върху-чип“ ще бъдат изследвани нови фталоцианинови комплекси за ФДТ метода.

3. Природни фотосенсибилизатори, като основа за структурни модификации, анализи и изследване на свойствата им за целите на ФДТ (нов проект)

Основните насоки за научно-изследователската работа в областта на природните фотосенсибилизатори за ФДТ накратко могат да се опишат със следните научни направления: (1) проучвания на природни антрахинони за ФДТ; (2) получаване на структурни аналози на природните антрахинони; (3) изследвания върху възможните приложения на представители на двете групи антрахинонови съединения за различни фотодинамични приложения.

В заключение, всички провеждани през последните години научни изследвания, като част от научно – изследователската дейност са фокусирани върху трето поколение фотосенсибилизатори за метода ФДТ. Разработваните фотосенсибилизатори са на базата на фталоцианиновата пръстенна молекула с възможни периферни, непериферни и аксиални позиции на функционалните заместителни групи. Получени са фталоцианинови комплекси на различни метали, като показали най-добър ефект за ФДТ метода са комплексите на лутеций, паладий и галий, изучени в сравнителен аспект със същите съединения като лиганди и като комплекси на цинка. Заместителите са функционални групи - катионни и биологично-активни, и рецепторно ориентирани, както и специфични за патогенни микроорганизми или туморните клетки. Получени са стабилни при физиологични условия физични конюгати на фталоцианини с нативни биомакромолекули на протеин и ензим, подходящи за преноса на фотосенсибилизатора до клетките - мишена. Като задача за бъдещата ни работа в синтеза е въвеждането на ниско-токсични „зелени“ разтворители. Лечебни свойства на природните антрахинони, получени от растения са добре изучени за туморната химиотерапия. Изследванията им като природни фотосенсибилизатори са в начален етап на проучванията ни за антивирусни фотодинамични приложения.

Развитието на метода ФДТ за нови актуални медицински приложения е добре отразено в досегашната ни работа. Методът е перспективен и за предстоящи нови предизвикателства. Така например, ФДТ се очертава с принос в опазване на околната среда, с приоритет за пречистване на природни водоизточници, опазване на реколтата от химично замърсяване и минимизиране на антибиотичното третиране в животновъдните стопанства, особено при защитата на агро-културите от вредители, неповлияващи се от стандартните химични методи.

01.07.2025 г.

доц. дн Ваня Мантарева