

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дхн Иво Грабчев

Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

на дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор на науките“
по професионално направление 4.2 *Химически науки*, „Биоорганична химия, химия на
природните и физиологично активни вещества”, 01.05.10

Автор: доц. д-р *Ваня Мантарева*, Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия, БАН

Тема на дисертационния труд: Фталоцианинови фотосенсибилизатори за фотодинамичен метод при лекарствена резистентност

1. Предмет на рецензиране

Представеният от доц. д-р *Ваня Мантарева* комплект материали е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ, БАН и отговаря на критериите за придобиване на научната степен „доктор на науките“ в съответствие със специфичните правила на ИОХЦФ по научната област 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.2. Химически науки, определени съгласно чл. 1а, ал. 2 от Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Изпълнението на изискуемите критерии се основава на:

Показател А: получена ОНС „Доктор“ (50 точки),

Показател Б: представен дисертационен труд за НС „Доктор на науките“ (100 точки),

Показател Г: Представен е списък с 21 научни труда, 18 (№ 2-16, 18, 20, 21), от които са публикации в списания с импакт фактор, една глава от монография (№ 1) на издателство Nova Science Publishers както и две публикации (№ 17 и № 19), които не са реферирани и индексирани в Web of Science или Scopus. Сумарният брой точки по този показател е (371 точки) при изискуеми 150 точки. Не са представени сведения за използване на тези публикации в други дисертационни трудове за придобиване на научната степен „Доктор на науките“.

Показател Д: Представен е списък с цитирания в научни издания, индексирани в световноизвестни бази данни.

Върху включените в дисертационния труд публикации са забелязани 128 цитирания (без автоцитати от всички автори), които се равняват на 256 точки.

По тези показатели доц. д-р Ваня Мантарева превишава минимални изисквания, включвайки в дисертационния си труд научни трудове и цитиранията на тези трудове, които сумарно дават 777 точки, при изискуеми 500 точки.

2. Кратки биографични данни

Доц. д-р Ваня Николова Мантарева е родена в гр. София. През 1990 год. се дипломира като инженер-химик в ХТМУ-София, след което през 1991 год. постъпва на работа като специалист-химик в ИОХЦФ. През периода 1995-1998 год. тя изработва и защитава дисертационен труд за придобиване на ОНС-доктор. През периода 1991-2014 год. работи последователно като химик и н.с. III-I ст., а през 2014 год. се хабилитира като доцент в същия институт. След защитата на докторската си дисертация доц. Мантарева специализира неколккратно в Институт по макромолекулна химия, Университета в Бремен, Германия (при проф. Дитер Вьорле); Университета в Луйфил, гр. Луйфил, Кентъки, САЩ (при проф. Алан Морган) и в Автономния университет в Мадрид, Испания в групата на проф. Томас Торес.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Разработеният от доц. Мантарева дисертационен труд е в една изключително интересна и актуална научна област, развиваща се интензивно през последните години, каквато е антибактериалната фотодинамична терапия. Този вид терапия се утвърди като клиничен метод с неспецифично и локално въздействие, с бърз ефект след прилагането му и без развитие на устойчивост на патогенните микроорганизми, поради особеностите на механизма на фотодинамично действие. Ето защо намирането на подходящи ефективни съединения, които да могат да се използват като фотосенсибилизатори е актуална научна област, не само с чисто фундаментален, но и с напълно приложен характер. От друга страна, все повече научни изследвания са насочени към оптимизиране на структурата на вече известни фотосенсибилизатори, с цел намиране на най-добрите физикохимични и фотобиологични свойства, които да имат принос върху ефекта на фотодинамичното действие.

Доц. Мантарева е формулирала основната цел на дисертационния си труд като обобщение на постигнатото до сега с оглед на установяване на ново научно познание в разработването и изучаването на фталоцианинови метални комплекси като фотосенсибилизатори с фотодинамична активност. Във връзка с това при разработването на дисертационния труд, целите са формулирани в 4 основни направления :

1. Разработване и изучаване на нови фталоцианинови производни, получени като комплекси на Lu(III), Sn(IV), Pd(II), Zn(II), Si(IV) и Ni(II) и със заместители от 1)

хромофорни групи; 2) биологично-активни съединения и 3) инхибитори за патогенни микроорганизми.

2. Намиране на нови синтетични и възпроизводими подходи с цел, получаване и на други съединения извън групата на фталоцианина.

3. Изследване на основни химични, физикохимични и фотобиологични свойства на фталоцианинови производни с известни и с разработени нови специфични подходи за фотоактивни съединения с оптични свойства като фталоцианини.

4. Намиране на връзката между молекулна структура и фотодинамичната активност при устойчиви патогенни микроорганизми.

4. Познаване на проблема

От литературния преглед личи, че доц. Мантарева познава много добре състоянието на изследванията в областта на фотодинамичната терапия и използването на фталоцианиновите като фотосенсибилизатори, при патогени с изразена лекарствена устойчивост. В литературния преглед е обърнато основно внимание на използването на фталоцианидите като фотосенсибилизатори в биомедицината от първите появили се изследвания в литературата до днес. Разгледано е приложението на метода на фотодинамична терапия, като нов ефективен подход, използван в клиничната практика и ролята на светлината за генериране на активни реактивоспособни частици. Особено внимание е обърнато на в борбата с устойчиви микроорганизми спрямо прилаганите в клиничната практика антибиотици, което в последните години се превръща в основен световен проблем. С увереност може да се каже, че цитираните в дисертационния труд материали са правилно и коректно интерпретирани.

5. Методика на изследването

Методите на изследване в дисертационния труд могат да се групират в три основни насоки: синтез на нови фталоцианинови производни и техни метални комплекси, фотофизично и фотохимично охарактеризиране на получените съединения, и *in vitro* микробиологични изследвания спрямо грам-положителни и грам-отрицателни бактерии и гъбичен щам от рода *Candida*.

Използваните като фотосенсибилизатори фталоцианинови съединения са фотоактивни и техните функционални характеристики са определени, чрез спектрални методи за анализ като абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, време на живот във възбудено състояние с което са получени добре интерпретирани резултати при решаване на поставената цел в дисертационния труд.

Подбрани са моделни патогенни микроорганизми като грам-положителни и грам-отрицателни бактерии и *Candida* гъбички за доказване на фотодинамичната активност на изследваните съединения.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 203 страници и е онагледен с 63 фигури, 27 схеми и 14 таблици. Използвани са 367 литературни източника. В него са отразени изследванията на доц. Мантарева върху синтеза, функционалните свойства и фотодинамичната активност на нови фталоцианини и техни метални комплекси през периода 2015-2020 год.

Изследванията на доц. Мантарева са иновативни и притежават както фундаментален, така и научно-приложен характер.

При описанието на дисертационния труд е използвана класическата схема, която по мое мнение е по-подходяща повече за ОНС „Доктор“, включваща три глави:

Първата глава е *Литературен обзор* (31 стр. с цитирани 157 литературни източника, където накратко са показани основните структури фталоцианини, използвани при изследване на фотодинамичната терапия, същността на метода и приложението му при третиране на устойчиви патогени спрямо използваните в клиничната практика антибиотици.

Втората глава, която има монографичен характер, е основната и най-съществената в дисертационния труд е *Резултати и дискусия*. Тя обхваща 108 страници и са цитирани 205 литературни източника. В тази глава са описани основните схеми и методи за получаване на катионни фталоцианинови комплекси със заместители в непериферни и периферни групи, комплекси на силиция с аксиални групи, Zn(II) фталоцианини с биологично-активни групи на база аминокиселини, въглехидрати, стерол и парабени. Описано е и получаването на хибридни структури, съдържащи хидрофобни фталоцианини и титанов диоксид или полимерни четки. Детайлно са изследвани основните фотофизични характеристики на синтезираните съединения, включително и времето на живот във възбудено синглетно състояние, като важен показател определящ фотодинамичните процеси. Третата част обхваща изследванията, свързани с доказване фотодинамичната активност на синтезираните съединения спрямо грам-положителни (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*) и грам-отрицателни (*Pseudomonas aeruginosa*) бактерии и гъбичен щам (*Candida albicans*), които изследвания са проведени съвместно с колеги от Института по Микробиология, БАН.

Третата глава е озаглавена *Експериментална част*. В нея са дадени използваните материали, апаратура, техника, рецептури за получаване на съединенията, тяхното охарактеризиране. По мое мнение тази част е абсолютно излишна за такъв дисертационен

труд, тъй като това детайлно е описано в публикуваните научни трудове и е минало през съответните компетентни рецензенти на съответните списания.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

В дисертационния труд на доц. Мантарева са отразени нейните научни изследвания през проследените пет години върху синтеза и функционалните свойства на нови фталоцианинови съединения и техни метални комплекси с цел използването им като фотосенсибилизатори при антибактериална фотодинамична терапия с потенциално биомедицинско приложение. Ето защо оценявам получените в дисертационния труд резултати, освен като значими теоретични и експериментални постижения, така също и с висок потенциал за практическо приложение.

Основните научни постижения получени, при разработването на дисертационния труд, могат да бъдат групирани като:

- I. Получени са 40 нови фталоцианинови производни и техни метални комплекси, като наред с традиционни цинкови и силициеви йони за първи път са използвани йони на лутеций, калай, паладий и никел с цел получаване на високо ефективни фотосенсибилизатори. При 16 от металните комплекси пиридилокси или кватернизирани метилпиридилокси групи са разположени в периферни и непериферни позиции на пръстената молекула. При 24 от получените нови съединения има различни заместители като: аминокиселини (тирозин, фенилаланин, аргинин и лизин), въглехидрати (галактопираноза), стерол (естрадиол), метил-, етил-, пропил- и бутил парабени. Описано е получаването и са изследвани свойствата на хибридни структури с титанов диоксид и с полимери.
- II. На базата на известни химични реакции са разработени оригинални синтетични схеми, като са предложени нови реакционни условия за получаване на нови метални комплекси, както и на биоконюгатите на фталоцианинови комплекси на цинка със следните молекулни групи като заместители:
 - а) с аминокиселини, свързани през аминоксенокси група чрез амидна връзка;
 - б) с въглехидрати и парабени, чрез директно свързване с етерна връзка;
 - с) с въглехидрати и стероли, свързани през азидоетокси група триазолен пръстен.

За получаването на новите съединения са използвани оригинални подходи като:

- а) свързване на биоактивната молекула като функционална група към фталонитрила на 3- или 4- позиция и следваща циклотетрамеризация до фталоцианин;
- б) свързване към четири или осем от възможните периферни и непериферни позиции на пръстената фталоцианинова молекула;

- III. Създадена е оригинална опитна установка за провеждане на експериментални изследвания в светлинния спектър и са намерени основни оптични физикохимични характеристики на новите фталоцианинови производни. Получените резултати на основните фотофизични (на абсорбция и флуоресценция) и фотохимични (генериране на синглетен кислород и за фотостабилност) свойства доказват потенциала на разработените нови фотосенсибилизатори за биомедицински приложения с фотодинамичен метод.
- IV. Чрез флуоресцентна спектроскопия е разработен метод за фармакокинетични изследвания, базиращ се на химична екстракция и измерване на интензивността на флуоресцентния сигнал с количествено определяне на натрупването, задържането и изчистването за фталоцианинови съединения, което се дължи на дълговълновата флуоресцентна емисия ($> 680 \text{ nm}$), която не се припокрива с клетъчната флуоресценция. Чрез този метод е установено относително високо натрупване при устойчиви Грам (+) и Грам (-) патогенни бактерии, и за гъбичен щам на *Candida albicans*, както и при образувани патогенни биофилми. Освен това е доказана селективност на натрупване, с количествено нарастване без преразпределение в клетъчните мембрани при спектър на облъчване 365 nm и 635 nm .
- V. Със синтезираните съединения са проведени *in vitro* фотобиологични изследвания с патогенни микроорганизми, и е определен допустимия концентрационен интервал за прилагане на фталоцианиновите производни ($0.1 - 20 \mu\text{M}$), допустимите лъчеви дози ($12 - 60 \text{ J.cm}^{-2}$) и оптимална енергия на облъчване ($50 - 100 \text{ mW.cm}^{-2}$) без да се наблюдава термичен или друг страничен ефект в резултат на облъчването със светлината. Разработената методика е приложима и за изследвания на фотодинамичната ефективност на други фотосенсибилизатори и за други патогенни микроорганизми, за определяне на ефективността на инактивиране.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Цялостната научна продукция на доц. д-р Ваня Мантарева включва 61 научни статии. По данни на *Scopus*, тези трудове са цитирани общо 699 пъти (без автоцитатите от всички автори), със $h \text{ index} = 14$. В дисертационния труд за придобиване на научната степен „Доктор на науките“ за включени 21 научни труда, публикувани в периода между 2015 г. и 2020 г. 18 от тях са публикации в научни списания, реферирани и индексирани в световноизвестните бази данни *Web of Science* и *Scopus*, един труд е глава от книга на *Nova Science Publishers*, и два труда са публикации в издания с *SRJ*. Използваните от доц. Мантарева публикации не повтарят тези, публикувани във връзка с придобитата от нея образователна и научна степен „Доктор“ и хабилитирането ѝ като доцент. Съгласно

приложената справка, статиите участващи в описанието на дисертационния труд са цитирани 128 пъти. Това показва актуалността на изследваната тематика и много добрия международен отзвук на изследванията, като се има предвид сравнително краткия пет годишен срок.

Всичките 21 научни труда включени в дисертационния труд са с интердисциплинаен характер, което е свързано участието на колективи от специалисти в различни научни области, като в голяма част от тях участват нейни чуждестранните партньори. В 6 от публикациите доц. Мантарева е първи, а в 13 тя е кореспондиращ автор, включително и в главата от книга. Това недвусмислено показва значителния принос на дисертантката в представените разработки. Разпределението на научните трудове по квартали е както следва: Q1 - 6, Q2 - 3, Q3 - 6, Q4 - 3 и 2 са в SJR списания.

Също така е приложен и списък с участие в 12 международни научни конференции с изнесени лично от доц. Мантарева доклади. Девет от тях са проведени в чужбина и три в България.

10. Автореферат

Авторефератът отразява точно и ясно получените при разработването на дисертацията резултати и е направен според изискванията на правилника на Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия и БАН.

11. Критични забележки и препоръки

Новите съединения и техните метални комплекси са идентифицирани с ИЧ, МАС и ¹H ЯМР спектроскопия. Защо не са охарактеризирани и с ¹³C ЯМР спектроскопия, при положение, че разтворите са били направени?

Неправилно са използвани някои научни термини, макар и добили популярност, като: деривати, вместо производни; резистентност вместо устойчивост и др.

12. Лични впечатления

Нямам конкретни лични впечатления от доц. д-р Ваня Мантарева

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Като се има предвид, актуалността и значимостта на провежданите от доц. д-р Мантарева научни изследвания, препоръчам да продължат изследванията в тази научна област и при търсенето на нови хромофорни системи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените

материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИОХЦФ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че дисертантът доц. д-р Ваня Мантарева **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност 4.2 Химически науки, „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества” като **демонстрира** качества и умения за провеждане на изследвания с получаване на оригинални и значими научни приноси.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „Доктор на науките“** на доц. д-р Ваня Мантарева по професионално направление 4.2. Химически науки, „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”.

02.08.2021г.

Рецензент:

(проф. дхн Иво Грабчев)