

Вх. №...67
Дата 28.02.2023

СТАНОВИЩЕ

от проф. дхн Иво Грабчев

Катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология“
Медицински факултет на СУ “Св. Климент Охридски”

на дисертационен труд
за получаване на образователната и научна степен „Доктор“
разработен от

Здравка Димитрова Петрова

редовен докторант в Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) – БАН, по професионално направление

4.3. Биологически науки и научна специалност: Морфология
на тема:

АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА КОМПЛЕКСИ НА Ru(II)/(III) С ШИФОВИ БАЗИ ПРИ ПОСТОЯННИ И ПЪРВИЧНИ ТУМОРНИ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ

Здравка Димитрова Петрова е родена на 21 ноември 1971 г. в гр. София. През 1989 г. тя завършила средното си образование в СМГ. Завършила е бакалавърска степен по “Управление на здравните грижи” (2000) и магистърска степен по “Обществено здраве и здравен мениджмънт” (2009) в Медицински университет гр. София. През 2017 г. допълнително е придобила образователно-квалификационната степен „Магистър“ по „Вирусология“ в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. През периода 01.01.2018 г. - 01.01.2021 г. е редовен докторант в Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей - ИЕМПАМ, Българска академия на науките с научен ръководител проф. Радостина Александрова

Разработеният от Здравка Петрова дисертационен труд е написан ясно, точно и прецизно. Той е значителен по обем и се състои от традиционните три главни части: Литературен обзор (54 стр.), Материали и методи (21 стр.) и Резултати и обсъждане (137 стр.). Изложен е на 254 стр., съдържа 106 фигури, 36 таблици и са цитирани 251 литературни източници.

Литературният обзор е доста подробен и е съсредоточен върху същността и значимостта на проблема с онкологичните заболявания. Дадена е обща характеристика на туморните образувания. Направен е анализ на равнището на заболеваемост и смъртност от онкологични заболявания по пол, региони в света а така също и в България. Задълбочено е разгледана специфика на заболеваемостта от карцином на гърдата и лекарствена резистентност при неговото лечение и основните лечебни стратегии и терапии, използвани в клиничната практика. Специално място е отделено на едно ново направление в медицинската практика при лечението на туморните образования, включващо така наречената персонализирана медицина и нейното място в наномедицината. Разгледани са азометиновите съединения (шифови

бази) с биологична и антитуморна активност и използването на рутениеви комплекси при терапия на туморни образования.

Литературният обзор показва много добра осведоменост на докторантката по дисертационната тема и той напълно отговаря на заглавието на дисертационния труд. Също така прави добро впечатление, че обзорът включва значителен брой литературни източници от последните няколко години, което показва актуалността и значимостта на провежданите от нея изследвания.

Базирайки се на задълбочения литературен преглед е формулирана основната задача на дисертационния труд, а именно: *Да се изследва влиянието на новосинтезирани комплекси [Ru(II)/(III)] с Шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия постоянни клетъчни линии и първични туморни култури и предизвиканите в тях цитопатологични промени.*

За изпълнението на тази задача докторантката си поставя седем основни задачи.

1. Определяне влиянието на изследваните вещества върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетките (ЦК50, ЦК90) от използваните като експериментални модели клетъчни системи;
2. Проследяване наличието на цитопатологични изменения в култивираните в присъствието на рутениеви съединения клетки;
3. Установяване типът клетъчна смърт, предизвикана от веществата при третираните клетки (апоптоза / некроза);
4. Изследване способността на изследваните съединения да предизвикат автофагия;
5. Изолиране първични клетъчни култури от тумори на пациенти с карцином на млечната жлеза, да се имунофенотипизират туморните клетки и да се проучи чувствителността им към антитуморни препарати и изследваните комплекси на рутений с шифови бази.
6. Идентифициране на клетъчни популации от туморни клетки със стволов фенотип в тъканни преби от инвазивен дуктален карцином на гърдата, както и при клетъчни линии (MCF7 и MDA-MB-231) чрез имухисто/имуцитохимично проследяване експресията на мембранные маркери (CD44 и CD24) и на цитоплазмено локализирания ензим ALDH1.
7. Проследяване на ефекта на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

Така дефинираната тема, цели и задачи на дисертационния труд са в една изключително актуална научна област, която в последните години се развива интензивно във връзка с търсенето на нови биологично активни вещества с висока антитуморна активност. Безспорен тук е приносът на научният ръководител, който е насочил докторантката към разработването на тази тематика, а приносът на самата нея е в прецизността и задълбочеността за нейното изпълнение.

По време на разработването на дисертационния труд като биологично активни вещества са изследвани осем рутениеви комплекси на азометинови производни, синтезирани в Румъния. *Ин витро* антитуморната активност на новите рутениеви комплекси е изследвана спрямо 6 туморни (5 човешки и 1 плъща: MCF-7, MDA-MB-231, Saos-2, HT29, LSR-SF-SR и HeLa) и 2 нетуморни човешки постоянни клетъчни линии (MCF-10A и Lep3).

Ефектът на антитуморната активност на новите съединения е проследен чрез използване на различни съвременни методи за анализ като: цитотоксични – оцветяване на клетките с тиазол блу (TB), неутрално червено (NR) и кристал виолет (CV), биохимични и цитологични (оцветяване с AO/PI) и др. Провеждани са както “краткосрочни експерименти” с монослойни култури (24-72 часа), така и дългосрочни експерименти с 3D колонии от туморни клетки (3D колонии-образуващ метод, с по-голяма продължителност). Проведени са изследвания за идентифициране на типа на клетъчната смърт –апоптоза и/или некроза. Също така е изследвана способността на тестваните съединения да оказват влияние върху формирането на 3D колонии. Всичко това показва, че докторантката успешно е усвоила и използвала тези биоаналитични методи, което несъмнено ще и бъде от полза и в следващите научни изследвания.

Основните резултати от разработването на дисертацията могат да се обединят както следва:

1. С помощта на комплексен подход, включващ краткосрочни и дългосрочни (с 3D колонии от туморни клетки) експерименти и методи с различни клетъчни мишени (молекули, органели) и механизми на действие, за пръв път е установено, че изпитваните Ru(II) и Ru(III) комплекси, намаляват в различна степен преживяемостта и/или пролиферативната способност на използваните като моделни системи туморни клетъчни култури. Комплексите на Ru(III) в по-висока степен намаляват преживяемостта и потискат 2D и 3D растежа на третираните клетки в сравнение с Ru(II) комплекси. И двата комплекса предизвикват апоптотичен тип клетъчна смърт, установена по цитоморфологичните изменения, експресия на фосфатидилсерин и свързването му с Annexin V при третираните постоянни клетъчни линии. Стимулираната от комплекси на Ru(III) в началните 3-24 часа автофагия завършва с клетъчна смърт

2. С най-висока цитотоксична / антитуморна активност се отличат комплексите RuSalpn и RuValdiamci, чиято ефективност превъзхожда или е сравнима с тази на утвърдените в клиничната онкологична практика препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин. Комплексът RuSalpn проявява най-силно изразен цитотоксичен ефект при клетките от линия MDA-MB-231 и HT29 и най-слаб при Saos-2, докато Ru Valdiamci показва най-висока ефективност при MDA-MB-231 и Saos-2 и най-ниска при нетуморните клетъчни линии Lep3 и MCF10. Комплексите RuValdiamci, Ru Salpn, Ru Salen, Ru Salphen проявяват селективен ефект спрямо туморните в сравнение с нетуморните клетъчни линии. Третирането с комплексите RuValen (10 µg/ml) и RuValphen (25 µg/ml) потиска миграционния капацитет на клетки от линия MDA-MB-231 (тройно негативен карцином на гърдата); RuValpn в концентрация 100 µg/ml е ефективен при клетъчни линии MCF7 (карцином на гърдата луминален тип А) и HT29 (колоректален карцином); Комплексите RuValphen и RuValpn в концентрация ≥ 25 µg/ml и RuValpnol и RuValdiamci ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) напълно инхибират миграционния капацитет на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR

Приносите от получените експериментални резултати имат както потвърдителен, така и приложен аспект. Получените оригинални научни резултати при изследване на цитотоксичната/ антитуморната активност на металните комплекси на новите рутениеви комплекси могат да се отнесат като принос в експерименталната онкофармакология, клетъчната/молекулната токсикология и медицинската химия.

В обобщение на казаното може да се заключи, че докторантката успешно се е справила с поставените задачи. В рамките на дисертационния труд е извършена достатъчна по количество и качество експериментална работа, която разкрива огромен потенциал за бъдещо развитие на тази изключително интересна и модерна тематика, както в посока на фундаментални изследвания, така и в посока на тяхното практическо реализиране.

Описаните в дисертационния труд резултати са оформени в 3 публикувани научни статии: Acta Morphologica et Anthropologica (2020), Trakia Journal of Sciences (2019), Proceedings of Academycs World international Conference, Krakow, Poland (2018). За актуалността на изследванията и получените добри резултати е показателен и фактът, че първата статия е цитирана един път от чуждестранни учени.

Здравка Петрова е била член на работните колективи на един научноизследователски проект, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ при МОН, на 2 договора за двустранно сътрудничество между БАН и сродни организации в чужбина (с Румъния и Литва), както и на 4 акции на Европейската програма за техническо сътрудничество COST. Участник е в Целевата група на проект BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017, финансиран по Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз, с тема: „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината“.

Докторантката успешно е взела необходимите изпити и всички документи са представени съгласно изискванията. Авторефератът отразява коректно и точно резултатите от дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представените резултати от разработената дисертация са актуални, много добре научно интерпретирани и могат да се отнесат към категориите новост за науката и обогатяване на съществуващите знания. Те напълно отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИЕМПАМ -БАН. Въз основа на изложеното до тук с убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на **Здравка Димитрова Петрова** и предлагам на уважаемите членове на научното жури да подкрепят присъждането ѝ на образователната и научна степен "ДОКТОР" по научната специалност Морфология, по професионално направление 4.3. Биологически науки.

22.02.2023 г

Изготвил становище:.....

prof. дхн И. Грабчев/