

Българска академия на науките
Институт по експериментална морфология, патология и
антропология с музей

ТАНЯ ДАНЧЕВА ЖИВКОВА

**ВЛИЯНИЕ НА КОМПЛЕКСИ НА МЕТАЛИ С РАЗЛИЧНИ
ЛИГАНДИ ВЪРХУ ПРЕЖИВЯЕМОСТТА И
ПРОЛИФЕРАТИВНАТА АКТИВНОСТ НА
ТУМОРНИ КЛЕТКИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за придобиване на образователна и научна степен

„Доктор”

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Морфология (шифър: 01.06.26)

Научен ръководител:

Доц. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

София, 2018 г.

Представеният Дисертационен труд е написан на 212 стр. и съдържа 75 фигури и 44 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 298 заглавия, от които 24 на кирилица и 274 на латиница.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена основно в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) - БАН. Част от изследванията са проведени в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” – БАН.

Металните комплекси са синтезирани и физикохимически охарактеризирани от доц. д-р Ивайла Панчева-Кадрева и проф. д-р Мариана Митева, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски (комплексите на монензин) и от д-р Даниела-Кристина Кулица, д-р Габриела Маринеску и проф. Луминица Патрон, Институт по физикохимия „Илие Мургulesку”, Румънска академия, Букурещ, Румъния (комплексите на шифови бази).

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, проведено (със заповед № РД -15-8 от 16.01.2018 г. на Директора на Института) на 18 януари 2018 г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 23 април 2018 г. от 14.30 часа в Заседателната зала на ИЕМПАМ-БАН (ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 25, София) на открито заседание на Научно жури, назначено със Заповед № РД-15-19 / 31.01.2018 г. на Директора на Института, в състав:

Председател на Научното жури - Доц. Радостина Александрова, доктор

Проф. д-р Радка Аргирова, д-р (Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда) – рецензент

Проф. д-р Ренета Тошкова, доктор (ИЕМПАМ-БАН) – рецензент

Проф. д-р Николай Лазаров, д-р (Медицински Университет, София) – становище

Проф. Рени Калфин, доктор (Институт по невробиология- БАН) – становище

Доц. Радостина Александрова, доктор (ИЕМПАМ-БАН) - становище

Материалите по защитата се намират на разположение на интересувашите се в Канцеларията на ИЕМПАМ-БАН (стая 209).

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своята сърдечна благодарност на моя научен ръководител доц. Радостина Александрова, доктор, която с безкрайната си любов, страст и енергия на учител ме привлече и запали към научната и изследователска работа. Изключително съм ѝ признателна, че през цялото време бе до мен, подкрепяше ме и съветваше и без нейната помощ настоящият дисертационен труд не би бил факт.

Благодаря на всички мои колеги и приятели от работния екип: ас. Лора Дякова, ас. Бойка Андонова-Лилова, Десислав Динев, д-р Абдулкадир Абудаллах, които много ми помагаша, подкрепяха ме морално и проявиха голямо разбиране и търпение през всичките години на разработване на дисертационния труд.

Специални благодарности изказвам към Ръководството на ИЕМПАМ-БАН - проф. д-р Димитър Кадийски, дмн, проф. Нина Атанасова, дбн, доц. Светлозара Петкова, доктор, проф. Машенка Димитрова, доктор, осигурили всички необходими условия за ползотворна изследователска дейност.

Благодаря на колегите от ИЕМПАМ-БАН за колегиалността и разбирането.

Сърдечно благодаря на проф. д-р Рени Калфин от Института по невробиология-БАН за ценните напътствия, отзивчивост и съвети по време на цялостната ми работа.

Благодаря на д-р Габриела Маринеску, д-р Даниела-Кристина-Кулица и проф. Луминица Патрон от Института по физикохимия „Илие Мургулеску” в Букурещ, Румъния за топлото им гостоприемство и приятелство, за ценните съвети и препоръки, които получих от тях, както и за предоставените ни за изследване метални комплекси с Шифови бази.

Благодаря на доц. д-р Ивайла Панчева и проф. дхн Мариана Митева от Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски” за предоставените ни за изследване монензин и неговите метални комплекси.

Искрена благодарност към проф. д-р Марин Александров от ИЕМПАМ-БАН и д-р Росен Спасов от Медицинския факултет на СУ «Св. Кл. Охридски», София за помощта им при провеждане на цитопатологичните и морфологични анализи.

Изказвам голяма благодарност към проф. Георги Милошев, доктор и доц. Милена Георгиева, доктор, от Института по молекулярна биология “Акад. Румен Цанев” – БАН, за оказаното съдействие при провеждането на молекулярно-биологичните тестове.

Искрено благодаря на членовете на Научното жури за отделеното време и ценните препоръки.

*Благодаря на моите скъпи родители, които винаги са вярвали в мен и са ме подкрепяли безусловно във всички мои начинания - **на тях посвеждавам настоящия дисертационен труд!***

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. Въведение.....	стр.6
II. Цел.....	стр.7
III. Задачи.....	стр.7
IV. Материали и методи.....	стр.8
IV.1. Материали.....	стр.8
IV.2. Методи.....	стр.12
V. Резултати.....	стр.12
A. Комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen).....	стр.12
B. Монензин и негови метални [Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II)] комплекси.....	стр.40
C. Диметилсулфоксид.....	стр.46
D. Антитуморни препарати.....	стр.47
VI. Обсъждане.....	стр.50
VII. Изводи.....	стр.57
VIII. Справка за приносите в дисертационния труд.....	стр.57
IX. Резюме (на български език).....	стр.59
X. Резюме (на английски език).....	стр.60
XI. Списък с цитирана литература.....	стр.61
XII. Списък с научни публикации по темата на дисертационния труд.....	стр.63
XIII. Цитирания.....	стр.64
XIV. Списък на изнесени научни съобщения по темата на дисертационния труд...	стр.65
XV. Професионални и научни награди по темата на дисертацията.....	стр.71
XVI. Благодарности към научно-изследователски проекти.....	стр.71

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА:

КК – Клетъчна култура
КОМ – Колонии-образуващ метод
МТТ – МТТ тест
НДКРБД – Недребноклетъчен рак на белия дроб
ФСБ, PBS – Фосфатно-солеви буфер
ФТС, FCS – Фетален телешки серум
ЦК₅₀ – Цитотоксична концентрация на веществото, която намалява с 50% преживяемостта на третираните клетки
ЦК₉₀ – Цитотоксична концентрация на веществото, която намалява с 90% преживяемостта на третираните клетки
ЦТЕ – Цитотоксичен ефект
ШБ – Шифова база
АО/PI – Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид
CisPt – Цисплатина
CV – Тест за оцветяване с кристалвиолет
CTRL – Контрола
Diald – 2,6 диформил крезол
DMSO – Диметилсулфоксид
HE – Оцветяване с хематоксилин и еозин
MDR – Multidrug resistance, Множествена лекарствена устойчивост
NR – Тест за включване на неутрално червено
SR-RSV – Rous sarcoma virus (Саркомен вирус на Раус) щам Schmidt-Ruppin
TB – Тест за определяне на клетъчна жизнестойност с помощта на трипаново синьо
Zn(II)/Ag(I) – Zn/Ag
Zn(II)/Au(I) – Zn/Au

І. ВЪВЕДЕНИЕ

Понятието „рак“ включва група от сродни комплексни заболявания, характеризиращи се с неконтролирана клетъчна пролиферация - клетките са нечувствителни към сигнали за контрол на растежа, делят се неограничено и избягват апоптозата. В допълнение, раковите клетки имат способност да инвазират в околните тъкани и / или да се разпространяват в други части на тялото, което често е фатално. Злокачествените новообразувания са втората причина за смърт след сърдечно-съдовите заболявания, а според Американското дружество по онкология (American Cancer Society, 2011) от 2010 г. заемат първото място. През 2012 г. в световен мащаб са били диагностицирани 14.1 милиона (в Европа са 3.4 милиона) нови случая, а рактът е причинил смъртта на 8.2 милиона (1.75 милиона в Европа) души. У нас броят на онкоболните е повече от 270 000 (увеличение с 60% за последните 14 години), като всяка година се регистрират около 35 000 новозаболели, а от ракови заболявания умират около 18 000 души. Направени прогнози сочат, че ако не бъдат предприети съответните действия, се очаква смъртните случаи от злокачествени новообразувания по света да продължат да нарастват, като ще достигнат 13.1 милиона през 2030 г. (около 70% увеличение).

Няколко са основните предизвикателства пред съвременната лекарствена терапия на злокачествените новообразувания: 1) хетерогенността на туморните клетки; 2) феноменът множествена лекарствена устойчивост; 3) нежеланите странични и токсични ефекти; 4) наличието на биологични бариери в организма; 5) раковите стволови клетки. Това налага непрекъснато търсене и въвеждане на нови, високоефективни и добре поносими агенти за лечение на раковите заболявания. Особено перспективни в това отношение са комплексите на метали с различни лиганди, включително шифови бази и йонофорни антибиотици, какъвто е монензинът. И това съвсем не е случайно.

Доказано е, че нарушеното равновесие в съдържанието на есенциални метали (каквито са цинкът, кобалтът, магнезият и манганът) при бозайниците води до повишена чувствителност към инфекциозни и злокачествени заболявания. Участвайки в регулацията на редица ключови физиологични процеси, тези елементи са модификатори на биологичния отговор. Тъй като са неотменна част от организма на хора и животни, се предполага, че са по-слабо токсични (в сравнение с платината например).

Добре известните от векове антимикуробни свойства на среброто и добрата му биологична поносимост са сред основните причини за възраждащия се интерес на съвременната наука към медицинското приложение на този метал. Но докато за антимикуробното действие на среброто е писано и говорено много, то неговата потенциална антитуморна активност е все още слабо проучена.

Целебната сила на златото е била известна и използвана още от старите китайски и арабски лекари живели 2500 г.п.н.е. и дори през XIX^{ия} век все още е било смятано за панацея. Ето и някои от основните причини, които обуславят изостреното внимание на съвременните учени и лекари към златото и неговите съединения: 1) Многогодишни наблюдения са показали, че при пациентите, приемали продължително време златни препарати за лечение на ревматоиден артрит (т.нар. хризотерапия), честотата на раковите заболявания е по-ниска; 2) Металът показва добра биологична поносимост, което се доказва от десетилетния опит с хризотерапията; 3) В своята III степен на окисление златото е изоелектронно и образува сходни по структура комплекси с Pt(II). Известно е, че платината (цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина) е първият и

единствен засега метал, навлязъл в клиничната онкология, а цисплатината е сред най-често прилаганите антитуморни препарати в момента.

Според специалистите шифовите бази (най-широко използваните химични съединения днес), и особено техните метални комплекси, могат да бъдат ценни съюзници в борбата с лекарствената устойчивост на микроорганизми и ракови клетки. Изключително полезна в това отношение е способността на тези съединения да атакуват едновременно повече от една молекулна мишена в клетката.

Монензинът е йонофорен полиетерен антибиотик, синтезиран от *Streptomyces cinnamonensis*. През последните години интересът към неговата биологична активност значително нараства, тъй като: 1) Монензинът участва в регулацията на редица важни физиологични функции, включително клетъчна смърт; 2) Намира широко приложение в животновъдството (за стимулиране на растежа и профилактика на кокцидиозата), което поставя въпроса за евентуалното му отношение към качеството и безопасността на храните и възможните последици за човека и околната среда; 3) Напоследък се появиха немалко публикации, съобщаващи за потенциалната антинеопластична активност на това съединение.

При предишни наши проучвания беше установено, че комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази - производни на 2,6-диформил крезол (Diald), притежават обещаващи антитуморни свойства в условия *in vitro*, като действието им е напълно сравнимо, а в някои случаи дори превишава, това на използваните в клиничната онкология лекарствени препарати цисплатина, 5-флуороурацил и даунорубицин.

II. Ц Е Л

Водени от желанието да продължим изследванията в тази област, при подготовката на представения дисертационен труд си поставихме за цел да проследим влиянието върху преживяемостта / пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински ракови клетки на две групи новосинтезирани съединения:

- Комплекси на Zn(II)/Au(I), Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen);
- Комплекси на Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II) и Zn(II) с йонофорния антибиотик монензин.

III. З А Д А Ч И

1. Да се определи влиянието на изследваните вещества върху **преживяемостта на клетките** (ЦК₅₀, ЦК₉₀) от използваните като експериментални модели туморни клетъчни линии;
2. Да се **сравни чувствителността** към изпитваните метални съединения на туморни и нетуморни клетки с еднакъв произход;
3. Да се проследи наличието на **цитопатологични изменения** в култивираните в присъствието на метални съединения туморни клетки, включително способността на веществата да предизвикват **увреждания (скъсвания) в ДНК** молекулите на третираните клетки;
4. Да се идентифицира типа на наблюдаваната **клетъчна смърт** (апоптоза, некроза);
5. Да се проучи ефектът на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да **образуват триизмерни (3D) колонии** в полутечна среда.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

IV.1. МАТЕРИАЛИ

1. Химикали и консумативи

Хранителната среда D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) и феталният телешки серум (ФТС) са закупени от Gibco-Invitrogen (Великобритания). Диметилсулфоксидът (DMSO), неутралното червено (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин хидрохлорид), кристал виолетът (трис (4 –(диметиламино)фенил) метилиум хлорид), трипановото синьо ((3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-диметилбифенил-4,4'-дийл)ди (1Z)хидразин-2-yl-1-илиден]бис(5-амино-4-охо-3,4-дихидронафтален-2,7-дисулфонова киселина)), акридин оранжът (3,6-акридиндиамин, N,N,N',N'-тетраметил-монохидрохлорид), пропидиевият йодид, трипсинът и антитуморният препарат цисплатина са получени от AppliChem (Германия), тиазол блу тетразолиум бромидът (MTT), NaCl, РНАаза А, стандартната и нискотопящата се агароза, както и агарът, са от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия), Na₂HPO₄ и NaOH са от Merck (САЩ, Канада), KCl е доставен от Riedel de Haen (Honeywell, Румъния), а KН₂PO₄ е от Reanal Labor (Унгария). Антибиотиците (пеницилин и стрептомицин) за клетъчно култивиране са от Lonza (Белгия). Всички останали химикали с висока степен на чистота са осигурени от местни доставчици. Реагентите (Annexin V Apoptosis Detection Kit) за идентифициране на типа клетъчна смърт – апоптоза или некроза, са произведени от фирмата ImmunoCRUZ (САЩ). Стерилната пластмасова посъда и филтрите (0.2 μm) за стерилизиране на среди и разтвори са доставени от Orange Scientific (Белгия).

2. Вещества

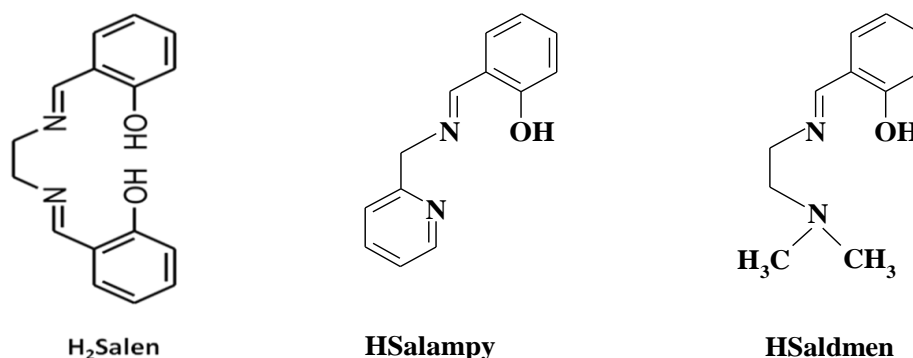
2.1. Метални комплекси

2.1.1. Комплекси на цинк, сребро и злато с лиганд шифова база

Изследвана беше биологичната активност (влияние върху клетъчна преживяемост / пролиферация) на шест новосинтезирани комплекса на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифова база Salen, Salampy или Saldmen (Фиг. 1, Табл. 1). Синтезирането и физикохимическото охарактеризиране на веществата е осъществено от колектива на проф. Луминица Патрон, Институт по физикохимия «Илие Мургулеску», Букурещ, Румъния.

Табл. 1. Комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с лиганд шифова база (Salen, Salampy, Saldmen)

Съкратено наименование	Формула	Молекулна маса (g/mol)
ZnSalenAu	[Zn ₃ (Salen) ₂ {(μ-Au(CN) ₂) ₂ }]	1226.71
ZnSalenAg	[Zn ₃ (Salen) ₂ {(μ-Ag(CN) ₂) ₂ }]	1048.51
ZnSalampyAu	[ZnSalampy(μ-Au(CN) ₂)]	525.61
ZnSaldmenAu	[ZnSaldmen(μ-Au(CN) ₂)]·H ₂ O	541.66
ZnSalampyAg	[ZnSalampy(μ-Ag(CN) ₂)]	452.56
ZnSaldmenAg	[ZnSaldmen(μ-Ag(CN) ₂)]·H ₂ O	452.56



Фиг. 1. Структурна формула на лигандите Salen, Salampy и Saldmen

Веществата бяха разтворени първоначално в диметилсулфоксид, след което разредени в хранителна среда. Крайната концентрация на DMSO в изходния разтвор (където концентрацията на съответното вещество е 1 mg/mL) беше 2%. Разтворите бяха съхранявани в хладилник при 4°C и използвани не по-дълго от 2 седмици след разтварянето им.

Лигандите Salampy и Saldmen не бяха изследвани поради невъзможността да бъдат получени като стабилни самостоятелни съединения.

2.1.2. Монензин и негови метални комплекси

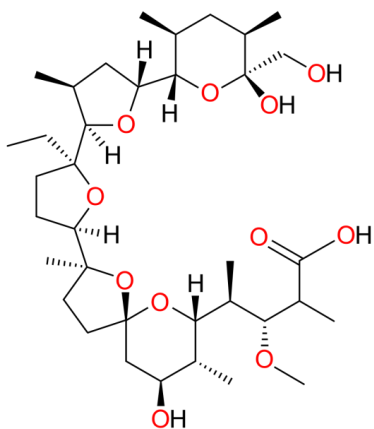
При проведените от нас експерименти бяха изследвани цитотоксичната / антипролиферативна активност на монензин (Фиг. 2А) и негови комплекси (Фиг. 2В) с обща формула $[M(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, където $M = \text{Mg}(\text{II}), \text{Ca}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II})$. Изпитваните вещества са представени в Табл. 2.

Съединенията са синтезирани и физикохимически охарактеризирани от колектив под ръководството на доц. д-р Ивайла Панчева и проф. дхн Мариана Митева, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“.

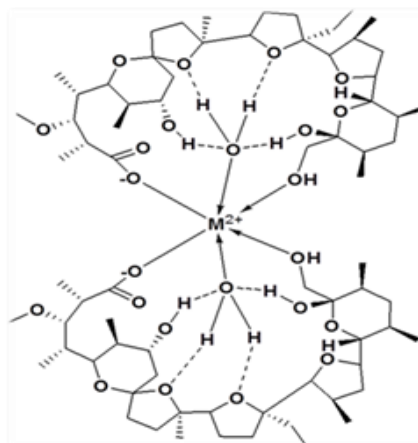
Табл. 2. Комплекси на Mg(II),Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II) и Zn(II) с монензин

Съкратено наименование	Формула	Молекулна маса (g/mol)
MonH	Монензин (Монензинова киселина)	688.90
MgMon	$[\text{Mg}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	1400.08
CaMon	$[\text{Ca}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	1415.86
MnMon	$[\text{Mn}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	1434.72
CoMon	$[\text{Co}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	1434.71
NiMon	$[\text{Ni}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	1434.47
ZnMon	$[\text{Zn}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	1441.16

Изпитваните вещества бяха първоначално разтворени в диметилсулфоксид, след което бяха разредени в хранителна среда и използвани веднага в проведените експерименти.



Фиг. 2 А.

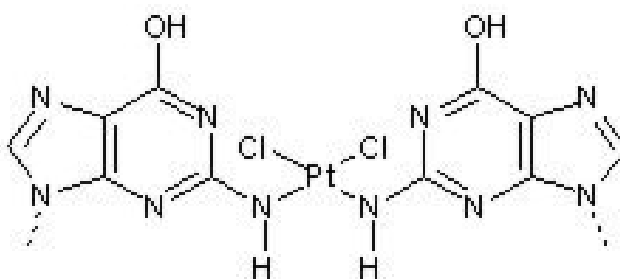


Фиг. 2 В.

Фиг. 2. Структура на монензин (А) и негови метални комплекси (В) с обща формула $[M(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, където $M = \text{Mg}(\text{II}), \text{Ca}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II})$
<http://www.addexbio.com/productdetail?pid=218>
 (Alexandrova et al., 2012)

2.2. Комерсиални антитуморни препарати

В част от проведените експерименти като положителна контрола беше включен и антитуморният препарат цисплатина (Фиг. 3). Работните разтвори бяха приготвени съгласно инструкциите на Фирмата-производител.



Фиг. 3. Цисплатина

(<http://proex.reitoria.unesp.br/informativo/WebHelp/2005/imagens/cancer01.jpg>)

3. Клетъчни култури

Клетъчните култури, използвани като моделни системи при провеждане на експериментите, са представени в Табл. 3.

Табл. 3. Клетъчни култури, използвани като моделни системи при проведените експерименти

Произход	Клетъчни култури	
	Туморни	Нетуморни
Човек	A549 – недребноклетъчен рак на белия дроб; MCF-7 – (ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , луминален тип A) рак на млечна жлеза; MDA-MB-231 – (ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻ , тройно негативен) рак на млечна жлеза HeLa – карцином на шийката на матката (съдържа човешки папиломен вирус тип 18 – HPV18); HepG2 – хепатоцелуларен карцином; ^a 8 MGBA – мултиформен глиобластом; ^b A 431 – плоскоклетъчен карцином и получени от нея субклонове с повишена експресия на гени, отговорни за множествена лекарствена устойчивост – A431-MDR1 (експресия на гена <i>mdr1, abcb1</i>), A431-MRP1 (експресия на гена <i>mrp1, abcc1</i>), A431-ABCG2 (експресия на гена <i>abcg2, bcpr</i>).	Lep 3 – ембрионални клетки от бял дроб
Плъх	^c LSR-SF-SR - трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с <i>Rous sarcoma virus</i> , щам <i>Schmidt-Ruppin</i> (клетките съдържат онкогена <i>v-src</i>);	
Пиле	^d LSCC-SF-Mc29 и полученият от нея клон E7 – трансплантируем хепатом у пиле, предизвикан с миелоцитоматозния вирус Mc29 (клетките експресират онкогена <i>v-myc</i>).	

ER = рецептор за естроген, PR = рецептор за прогестерон, HER2 = рецептор за епидермалния растежен фактор 2.

^aЛиния 8 MGBA е подарък от д-р Пержелова и проф. Честмир Алтанер от Института за изследвания върху рака в Братислава, Словакия (Perzelová et al., 1998).

^bКлетъчните линии A431, както и получените от нея клонове (A431-MDR1, A431-MRP1, A431-ABCG2), ни бяха любезно предоставени от проф. д-р Катлин Немет, Лаборатория по експериментална генна терапия, Институт по хематология и имунология, Национален медицински център, Будапеща, Унгария.

^cКлетъчна линия LSR-SF-SR е получена от д-р Ивайло Александров, двмн, и се поддържа в ИЕМПАМ-БАН (Александров, 1996) от колектива на доц. Радостина Александрова, доктор.

^dКлетъчната линия LSCC-SF-Mc29 и нейните клонове са създадени и охарактеризирани от доц. Р. Александрова, доктор. Според данните от проведените проучвания клетките от клон E7 не се отличават (по растежни свойства в култура, кариотип, провирусно съдържание, експресия на тумор-свързани антигени, туморогенен потенциал *in vivo*) от тези на изходната линия (Александрова, 2008).

Използваните клетъчни линии се съхраняват в Банката за клетъчни култури и вируси в ИЕМПАМ-БАН.

IV.2. МЕТОДИ

1. Работа с клетъчни култури

1.1. Клетъчно култивиране

1.2. Замразяване и размразяване на клетки

2. Определяне на клетъчна жизнест

2.1. Тест за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо - с електронен брояч (Invitrogentm, Countesstm, Automated Cell Counter)

2.2. Определяне влиянието на вещества върху клетъчната преживяемост

2.2.1. МТТ тест (MTT)

2.2.2. Тест за включване на неутрално червено (Neutral red uptake cytotoxicity assay - NR)

2.2.3. Оцветяване с кристалвиолет (CV)

3. Определяне на белтък по Брадфорд

4. Проучвания върху способността на веществата да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки

4.1. Влияние на вещества върху клетъчния монослой

4.2. Оцветяване на клетки с хематоксилин и еозин (HE)

4.3. Оцветяване на клетки с акридин оранж (АО) и пропидиев йодид (PI)

4.4. Изследвания върху способността на веществата да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите - *Single Cell Gel Electrophoresis* ("Comet assay") при неутрално рН (за доказване на двойноверижни скъсвания в ДНК) или алкално рН (за доказване на едноверижни скъсвания в ДНК)

5. Идентифициране типа на клетъчната смърт – апоптоза или некроза, чрез флоуцитометричен анализ със стандартен кит (ENZO Life Sciences, Anexin 5) съгласно указанията на Фирмата – производител

6. Изследване на влиянието на вещества върху 3D колонии-образуващата способност на туморни клетки (Колонии образуващ метод = КОМ)

7. Статистическа обработка на експерименталните данни

8. Обработка на снимковия материал

V. РЕЗУЛТАТИ

A. Комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen)

Изследваните съединения са представени във Фиг. 1 и Табл. 1 .

Проучванията бяха осъществени чрез провеждане на две групи експерименти:

- Краткосрочни – с продължителност до 72 часа, с растящи в монослой (2D) култури;

- Дългосрочни – от 16 до 45 дена, с триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

Приложен беше комплекс от методи с различни клетъчни / молекулни мишени и механизми на действие.

А.1. Краткосрочни тестове

А.1.1. Влияние върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки

А.1.1.1. Човешки и животински туморни клетки

Наред с МТТ теста (МТТ), приет за златен стандарт при провеждането на цитотоксични изследвания, влиянието на изпитваните метални комплекси и лиганда Salen върху преживяемостта и пролиферативната активност на третираните клетки беше определено и чрез метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV), а в някои случаи и чрез багрене с трипаново синьо (ТВ).

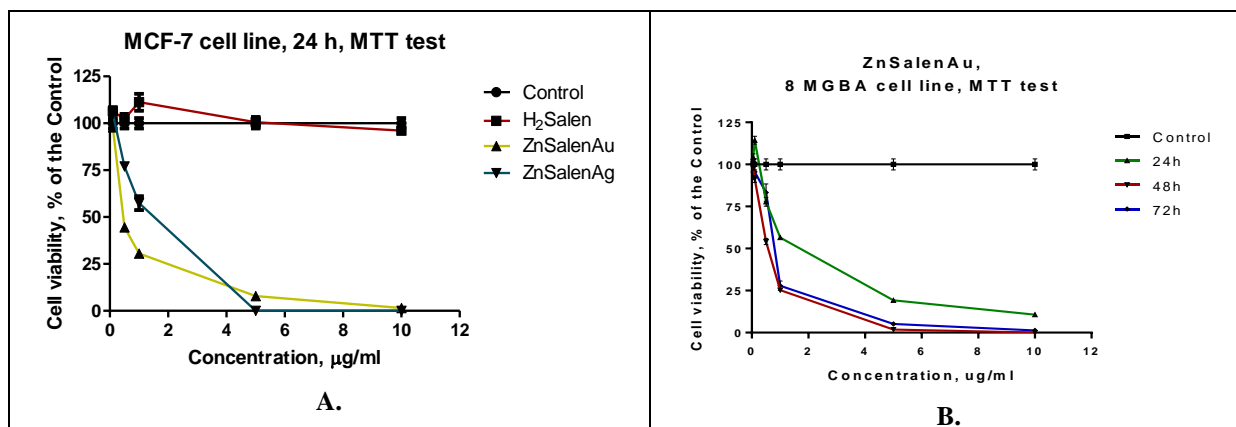
Изпитваните комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с ШБ бяха приложени в концентрации от 0.05 до 20 $\mu\text{g/ml}$ (до 50 $\mu\text{g/ml}$ при клетките от линия 8MGBA) в продължение на 24, 48 и 72 часа.

С получените данни бяха построени криви „концентрация-отговор“ – те бяха изготвени за всяко вещество, всяка клетъчна линия, всеки интервал на третиране (Фиг. 4-6). С тяхна помощ бяха определени ефективните концентрации на веществата – цитотоксична концентрация 50 (ЦК₅₀) и/или цитотоксична концентрация 90 (ЦК₉₀), които намаляват клетъчната преживяемост с 50% и 90%, респективно (Табл. 4-8). Въз основа на цитотоксичната/цитостатичната си активност изпитваните съединения бяха подредени в йерархични последователности (Табл. 26).

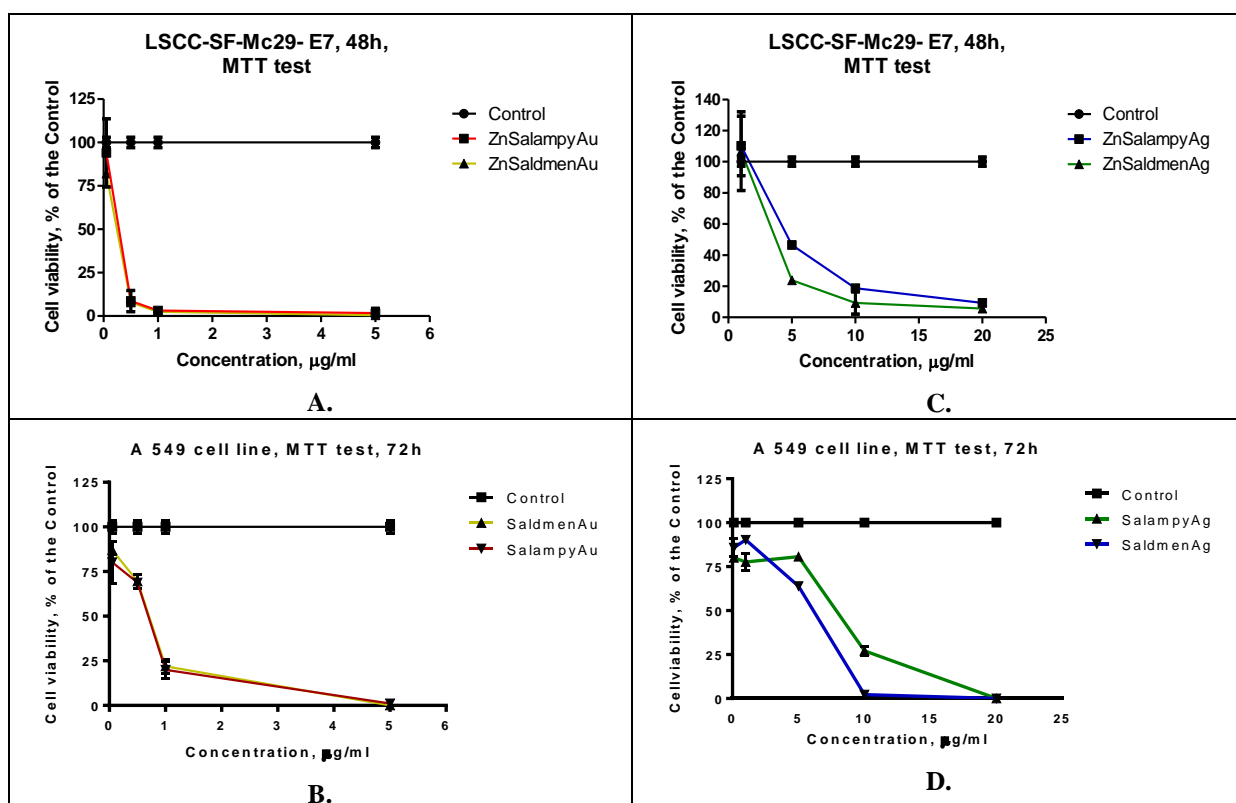
Поради силно изразената активност на веществата, бяха проведени отделни експерименти с по-кратка продължителност – 3 и 6 часа (при плъшите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR – Фиг. 7, Табл. 8), 12 и 18 часа (при човешките карциномни клетки от линия HeLa – Табл. 5).

С цел получаване на по-пълна информация за цитотоксичната/цитостатичната активност на съединенията, и по-специално за приблизителния период на „задействане на ефекта им“, както и за проява на евентуална „обратимост на ефекта“, бяха проведени и експерименти, при които съдържащата металните комплекси хранителна среда беше отстранявана и заменяна с немодифицирана среда на различни интервали от време – 3, 6 и 24 час, като преживяемостта беше отчетена на 72 час. Представените на Фиг. 8 и Табл. 8 резултати показват, че преживяемостта на плъшите саркомни клетки, култивирани в среда, от която металните комплекси са отстранени на 3-ия час е сравнително по-ниска в сравнение с останалите случаи. Тази зависимост се наблюдава при всички метални комплекси с изключение на ZnSalampyAg. С увеличаване на концентрацията, тази разлика се губи и при най-високите концентрации (5 $\mu\text{g/ml}$ при злато-съдържащите комплекси и 20 $\mu\text{g/ml}$ при тези, в чиито състав влиза сребро) процентът на преживелите клетки клони към нула.

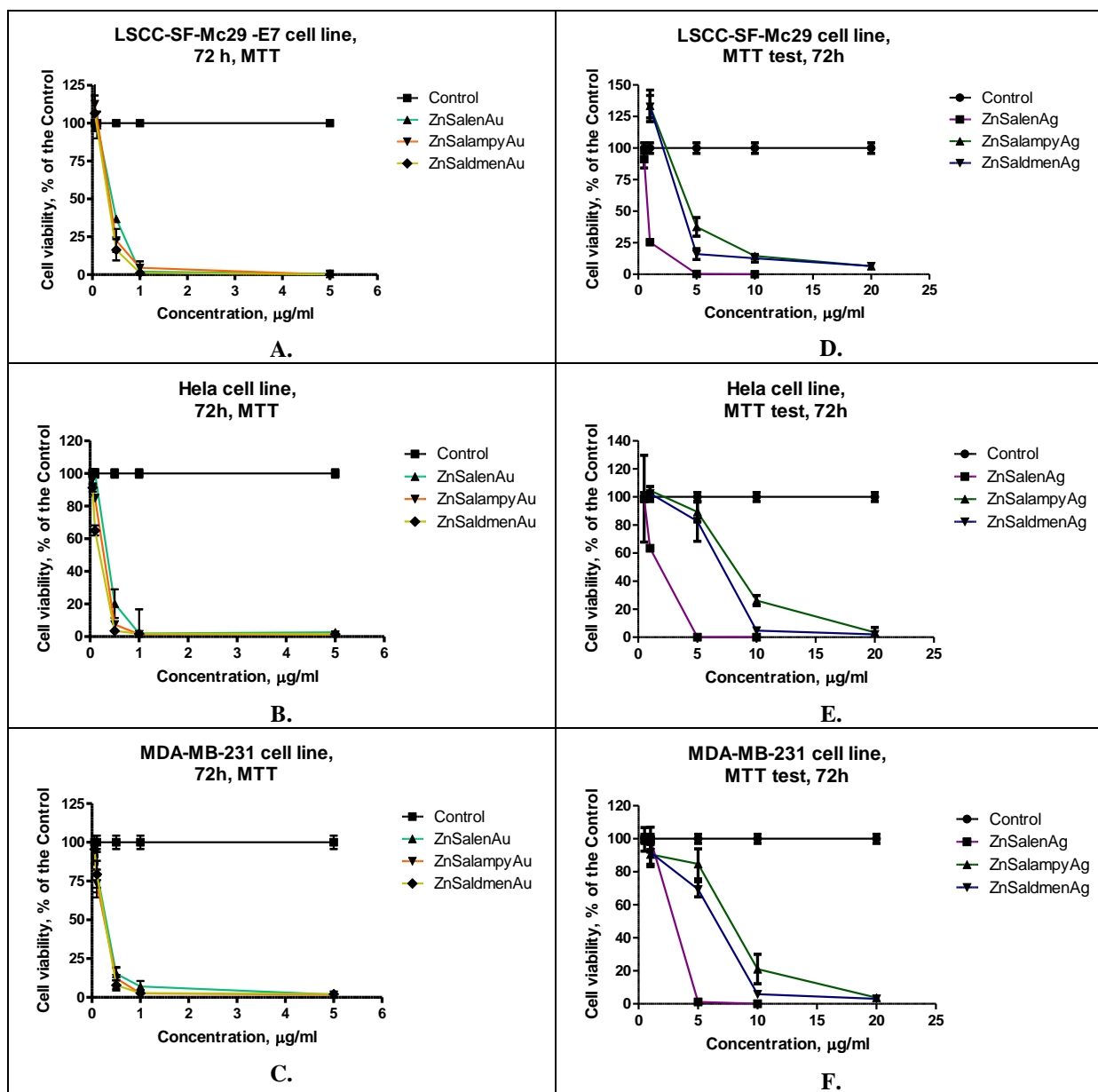
От друга страна, при сравняване на експерименталните данни за преживяемостта на плъшите саркомни клетки, получени на 3-ия и на 6-ия час (непосредствено след приключването на въздействието с веществата), с тези, получени на 72 час (в този случай съдържащата вещество среда е била сменена с немодифицирана на 3 и 6 час), се вижда, че процентът на живите клетки е по-нисък на 72-ия час. Това показва, че обратимост на ефекта на съединенията и пролиферация на клетките след отстраняването на металните комплекси от средата, не се наблюдава (Фиг. 8, Табл. 8).



Фиг. 4. Влияние на Salen и негови метални комплекси (ZnSalenAg, ZnSalenAu) (A) върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия MCF-7 (ER⁺, PR⁺, HER2⁻ луминален тип А рак на гърда у човек) след 24 часа на третиране. Ефект на ZnSalenAu (B) върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия 8MGBA (мултиформен глиобластом у човек) след въздействие в продължение на 24, 48 и 72 часа. Веществата са приложени в концентрации 0.1-10 µg/ml. Клетъчната преживяемост е определена чрез MTT тест.



Фиг. 5. Влияние на ZnSalampyAu, ZnSaldmenAu (A, B) и ZnSalampyAg, ZnSaldmenAg (C, D) върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия LSCC-SF-Mc29 - клон E7 (трансплантируем хепатом у пиле, предизвикан с миелоцитоматозния вирус Mc29) на 48^{ми} час (A, C) и клетки от линия A549 (недребноклетъчен рак на белия дроб у човек) на 72^{пи} час (B, D) от началото на въздействието. Веществата са приложени в концентрации 0.05– 5 µg/ml (при ZnSalampyAu и ZnSaldmenAu - A, B) и 0.5 - 20 µg/ml (при ZnSalampyAg и ZnSaldmenAg - C, D). Клетъчната преживяемост е определена чрез MTT тест.



Фиг. 6. Влияние на ZnSalenAu, ZnSalampyAu, ZnSaldmenAu, приложени в концентрации 0.05 – 5 µg/ml за 72 часа, върху преживяемостта / пролиферативната активност на клетки от линии LSCC-SF-Mc29 клон E7 (A), HeLa (B) и MDA-MB-231 (C). Ефект на ZnSalenAg, ZnSalampyAg, ZnSaldmenAg, приложени в концентрации 0.5 – 20 µg/ml за 72 часа, върху преживяемостта / пролиферативната активност на клетки от линии LSCC-SF-Mc29 клон E7 (D), HeLa (E) и MDA-MB-231 (F). Клетъчната преживяемост е определена чрез MTT тест.

Табл. 4 Цитотоксична активност 50 (ЦК₅₀, μM) и цитотоксична активност 90 (ЦК₉₀, μM) на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) при животински (пилешки и плъши) туморни клетки

Вещество	LSCC-SF-Mc29 - клон E7					LSR-SF-SR
	24h	48h	72h			48h
	MTT		MTT	NR	CV	MTT
Salen	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ZnSalenAu	0.34* (6.38)**	0.34 (2.36)	0.34 (0.73)	0.41 (0.73)	0.59 (н.о.)	0.61 (0.79)
ZnSalenAg	0.76 (3.81)	0.86 (3.91)	0.76 (3.34)	2.96 (4.39)	4.39 (н.о.)	0.75 (0.92)

Вещество	LSCC-SF-Mc29 - клон E7					LSR-SF-SR				
	24h	48h	72h			24h			48h	72h
	MTT		MTT	NR	CV	MTT	NR	CV	MTT	
ZnSalampy Au	0.51 (1.62)	0.53 (0.95)	0.76 (1.62)	0.76 (1.52)	0.61 (н.о.)	1.08 (7.93)	1.18 (1.83)	5.38 (н.о.)	0.84 (1.86)	1.6 (6.1)
ZnSaldmen Au	0.61 (1.66)	0.44 (0.90)	0.61 (1.29)	0.92 (1.66)	0.65 (н.о.)	1.31 (7.73)	0.31 (0.83)	2.77 (н.о.)	1.51 (5.83)	1.37 (1.83)
ZnSalampy Ag	15.02 (н.о.)	10.32 (44.19)	9.94 (35.13)	9.24 (18.65)	6.39 (н.о.)	18.3 (41.1)	16.15 (21.6)	17.08 (21.7)	13.30 (20.9)	15.22 (24.4)
ZnSaldmen Ag	9.50 (н.о.)	8.18 (21.88)	8.40 (30.90)	9.02 (11.05)	4.86 (н.о.)	14.8 (31.70)	5.94 (18.2)	14.36 (21.6)	9.99 (20.0)	14.63 (21.2)

MTT = MTT тест; NR = метод за оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет;

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (μM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50%, респективно >10%, при всички изпитвани концентрации (0.05 – 20 μg/ml).

Табл. 5. Цитотоксична активност 50 (ЦК₅₀, μM) и цитотоксична активност 90 (ЦК₉₀, μM) на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) при клетки от карцином на шийката на матката при човек

Вещество	HeLa						
	12h	18h	24h	48h	72h		
	MTT				MTT	NR	CV
Salen	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ZnSalenAu	0.52* (3.67)**	0.46 (2.64)	0.41 (н.о.)	0.23 (0.41)	0.28 (0.63)	0.80 (3.40)	2.94 (н.о.)
ZnSalenAg	3.13 (4.70)	2.99 (4.47)	2.89 (4.46)	2.59 (4.33)	1.76 (4.17)	2.04 (4.18)	2.83 (н.о.)

Вещество	HeLa						
	12h	18h	24h	48h	72h		
	MTT				MTT	NR	CV
ZnSalampyAu	-	0.76 (6.39)	0.63 (1.71)	0.57 (1.41)	0.53 (0.93)	0.42 (0.84)	0.42 (0.91)
ZnSaldmenAu	-	0.68 (3.51)	0.52 (1.13)	0.50 (1.11)	0.37 (0.83)	0.18 (0.78)	0.39 (0.89)
ZnSalampyAg	-	17.46 (39.84)	20.10 (41.1)	17.24 (32.70)	17.90 (38.0)	17.59 (21.68)	16.09 (34.48)
ZnSaldmenAg	-	14.36 (22.10)	15.67 (21.43)	15.69 (21.43)	15.69 (21.43)	15.73 (22.10)	15.53 (29.17)

MTT = MTT тест; NR = метод за оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет;

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (μM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50%, респективно > 10%, при всички изпитвани концентрации (0.05 – 20 μg/ml); (–) няма данни

Табл. 6. Цитотоксична активност 50 (ЦК₅₀, μM) и цитотоксична активност 90 (ЦК₉₀, μM) на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) при клетки от рак на гърдата при човек

Вещество	MCF – 7					MDA – MB -231				
	24h	48h	72h			24h	48h	72h		
	MTT		MTT	NR	CV	MTT		MTT	NR	CV
Salen	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ZnSalenAu	0.37* (3.74)**	0.27 (0.39)	0.24 (0.40)	0.37 (3.75)	0.17 (н.о.)	0.65 (3.85)	0.63 (2.32)	0.60 (2.85)	0.14 (0.35)	0.28 (н.о.)
ZnSalenAg	1.45 (4.09)	1.67 (4.16)	0.85 (3.81)	1.45 (4.08)	0.91 (н.о.)	2.55 (4.39)	2.70 (4.39)	2.86 (4.39)	2.77 (4.29)	3.72 (н.о.)

Вещество	MCF – 7					MDA – MB -231				
	24h	48h	72h			24h	48h	72h		
	MTT		MTT	NR	CV	MTT		MTT	NR	CV
ZnSalampy Au	0.63 (1.90)	0.21 (0.82)	0.17 (0.86)	0.10 (н.о.)	0.17 (н.о.)	0.82 (8.45)	0.88 (1.73)	0.48 (1.18)	0.55 (0.95)	0.68 (6.45)
ZnSaldmen Au	0.50 (1.68)	0.17 (0.78)	0.17 (0.79)	0.07 (н.о.)	0.17 (н.о.)	0.81 (7.85)	0.81 (1.66)	0.48 (0.89)	0.42 (0.87)	0.60 (5.18)
ZnSalampy Ag	5.79 (14.20)	6.78 (н.о.)	7.07 (17.41)	12.15 (н.о.)	7.73 (н.о.)	16.69 (35.1)	18.65 (36.2)	17.0 (36.5)	14.67 (21.0)	17.63 (н.о.)
ZnSaldmen Ag	6.08 (10.30)	5.92 (10.65)	5.86 (10.65)	5.77 (10.56)	6.50 (н.о.)	12.82 (20.7)	16.35 (22.1)	14.43 (21.4)	11.67 (19.1)	16.68 (44.2)

MCF-7 - ER⁺, PR⁺, HER2⁻ луминален тип А рак на млечна жлеза при човек;
MDA-MB-231 - тройно негативен рак на млечна жлеза при човек;

MTT = MTT тест; NR = метод за оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет;

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (μM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50%, респективно > 10%, при всички изпитвани концентрации (0.05 – 20 μg/ml).

Табл. 7. Цитотоксична активност 50 (ЦК₅₀, μМ) и цитотоксична активност 90 (ЦК₉₀, μМ) на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) при клетки от недребноклетъчен рак на белия дроб (A549) и мултиформен глиобластом (8 MGBA) у човек

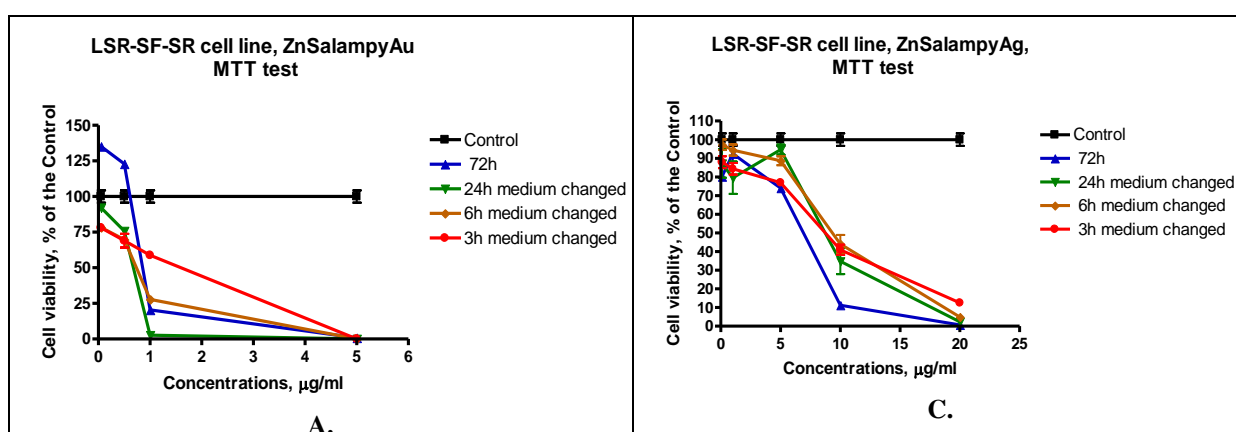
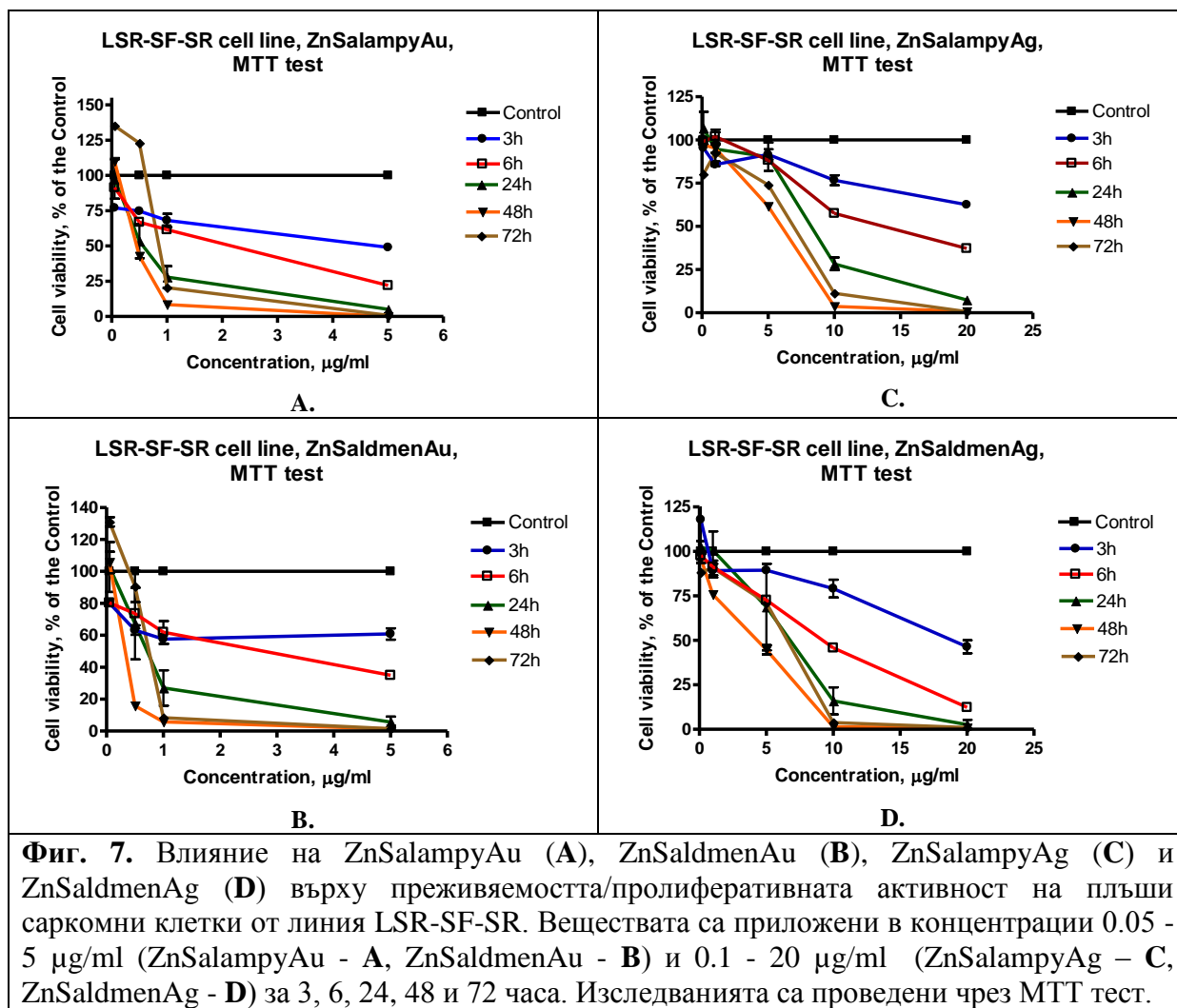
Вещество	A 549		8 MGBA		
	48h	72h	24h	48h	72h
	MTT		MTT		
Salen	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ZnSalenAu	2.50 * (3.91)**	2.54 (7.60)	1.34 (8.15)	0.45 (2.89)	0.65 (3.34)
ZnSalenAg	6.46 (8.90)	7.32 (9.54)	2.74 (4.49)	2.75 (4.35)	3.19 (4.48)

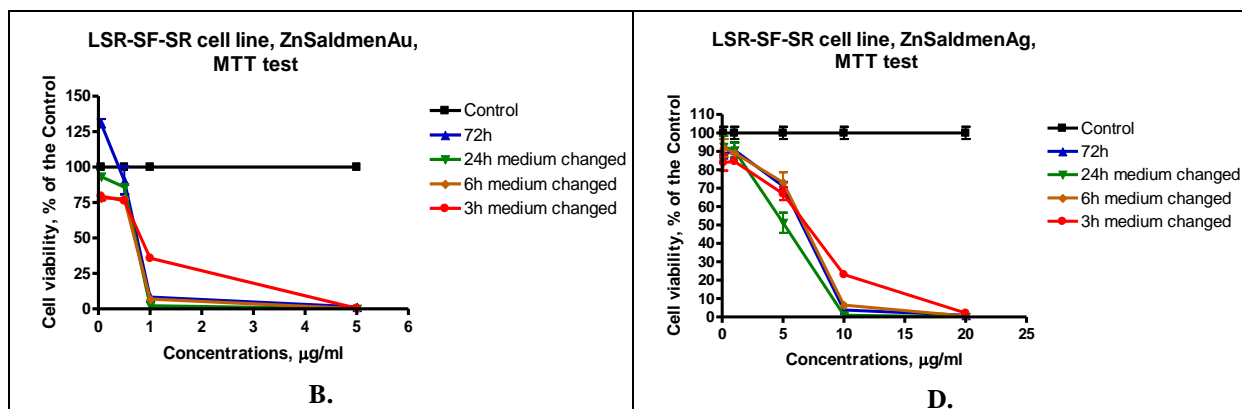
Вещество	A 549		8 MGBA		
	48h	72h	24h	48h	72h
	MTT		MTT		
ZnSalampyAu	3.35* (н.о.)**	1.31 (5.73)	-	-	0.61 (1.08)
ZnSaldmenAu	4.87 (н.о.)	1.31 (5.90)	-	-	0.44 (0.83)
ZnSalampyAg	30.93 (41.98)	17.41 (36.42)	-	-	63.20 (102.97)
ZnSaldmenAg	16.15 (21.68)	13.55 (20.75)	-	-	12.66 (20.17)

MTT = MTT тест;

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (μМ), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50%, респективно >10%, при всички изпитвани концентрации (0.05 – 50 μg/ml); (-) – няма данни





Фиг. 8. Влияние на ZnSalampyAu (A), ZnSaldmenAu (B), ZnSalampyAg (C) и ZnSaldmenAg (D) върху преживяемостта/пролиферативната активност на плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF(SR). Комплексите са приложени в концентрации 0.05 - 5 µg/ml (ZnSalampyAu - A, ZnSaldmenAu - B) и 0.1 - 20 µg/ml (ZnSalampyAg - C и ZnSaldmenAg - D) за 3, 6, 24 (след изтичане на този интервал от време културалната среда е сменена с немодифицирана с вещества хранителна среда) и 72 часа, след което преживяемостта на клетките е определена на 72^{ия} час с МТТ тест.

Табл. 8. Цитотоксична активност (ЦК₅₀ и ЦК₉₀) на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази при плъщи саркомни (LSR-SF-SR) клетки

Вещество	LSR-SF-SR						
	3h		6h		24h		72h
	Без смяна на среда ^d	Смяна на среда ^a	Без смяна на среда ^e	Смяна на среда ^b	Без смяна на среда ^f	Смяна на среда ^c	Без смяна на среда
ZnSalampyAu	9.51* (н.о.)**	3.10 (8.20)	4.10 (н.о.)	1.39 (6.58)	1.08 (7.93)	1.31 (1.83)	1.60 (6.10)
ZnSaldmenAu	н.о.	1.55 (7.20)	5.13 (н.о.)	1.29 (1.81)	1.31 (7.73)	1.33 (1.75)	1.37 (1.83)
ZnSalampyAg	н.о.	19.40 (н.о.)	30.40 (н.о.)	20.80 (41.20)	18.30 (41.10)	19.10 (38.90)	15.20 (24.40)
ZnSaldmenAg	41.70 (н.о.)	15.50 (35.40)	20.40 (н.о.)	14.90 (21.50)	14.80 (31.70)	11.20 (20.10)	14.60 (21.20)

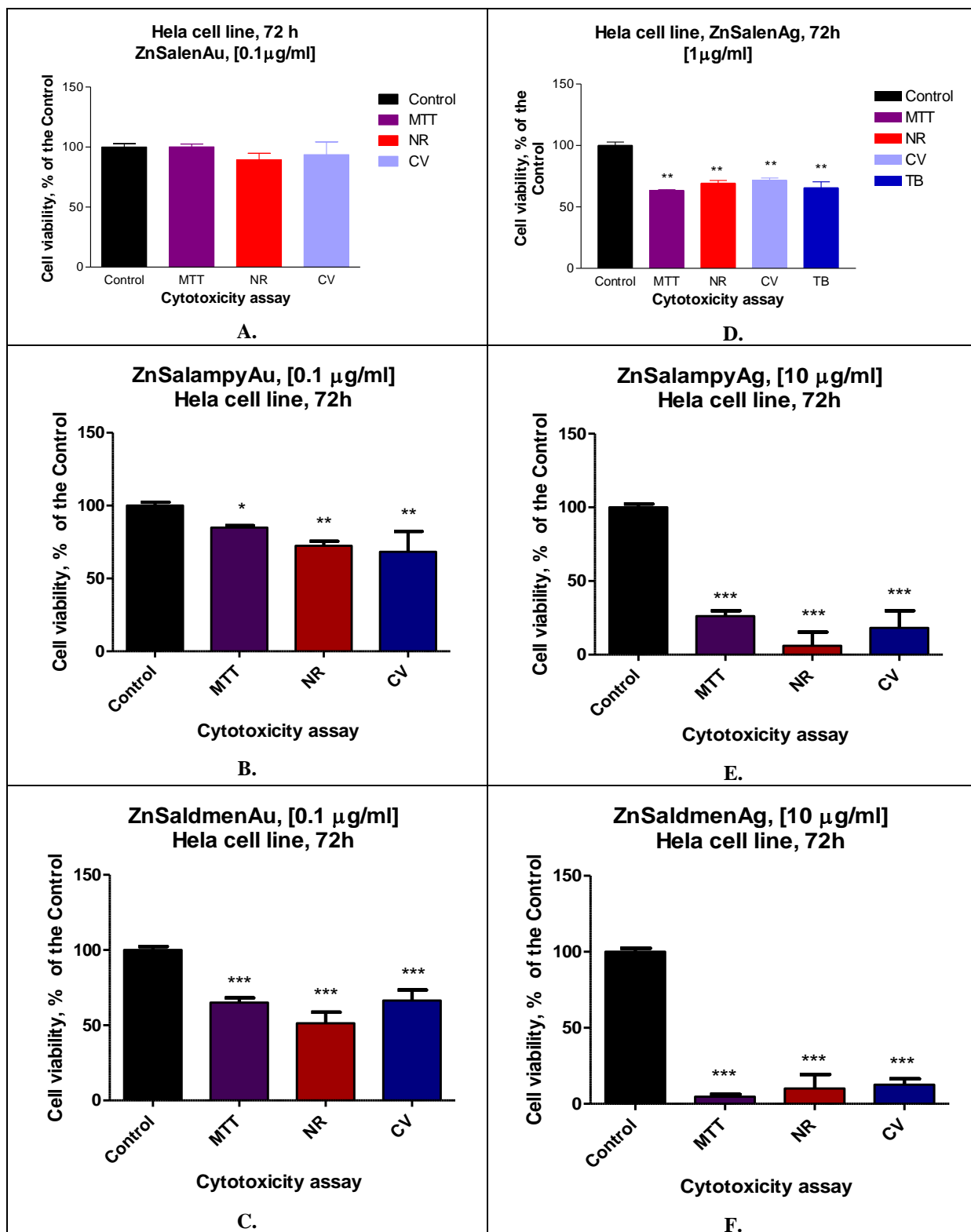
Изследването е проведено чрез МТТ тест.

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (µM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола;

С^{a, b} и ^c са отбелязани случаите, при които процентът на живите клетки спрямо контролата е определен на 72 час, но съдържащата вещество среда е била заменена с немодифицирана на 3, 6 или 24 час, съответно;

С^{d, e} и ^f са отбелязани случаите, при които клетките са култивирани в присъствие на вещества и преживяемостта им спрямо контролата е определена на на 3, 6 или 24 час, съответно;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50%, респективно >10%, при всички изпитвани концентрации (0.05 – 20 µg/ml).

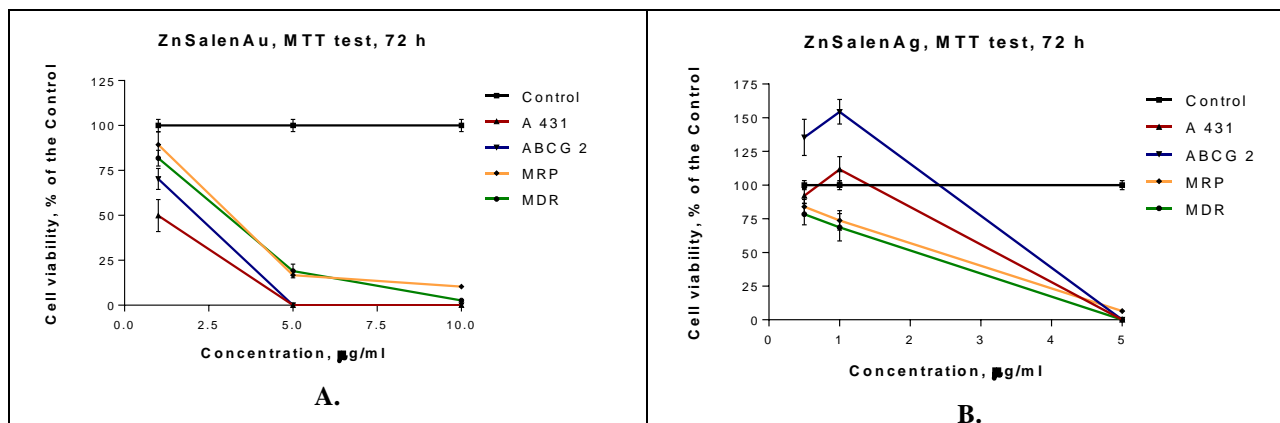


Фиг. 9. Влияние на ZnSalenAu (приложен в концентрация 0.1 μg/ml - **A**), ZnSalampyAu (0.1 μg/ml - **B**), ZnSaldmenAg (0.1 μg/ml - **C**), ZnSalenAg (1 μg/ml - **D**), ZnSalampyAg (10 μg/ml - **E**) и ZnSaldmenAg (10 μg/ml - **F**) върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от цервикален карцином при човек (HeLa) след въздействие в продължение на 72 часа.

Изследванията са проведени чрез МТТ тест (МТТ), метод за включване на неутрално червено (NR), оцветяване с кристал виолет (CV) и техника на оцветяване с трипаново синьо (ТВ). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

А.1.1.2. Чувствителни и характеризиращи се с множествена лекарствена устойчивост човешки туморни клетки

Проведени бяха проучвания върху цитотоксичната/цитостатичната активност на някои от изпитваните съединения при клетки от плоскоклетъчен карцином у човек (линия А431) и получените от нея клонове, характеризиращи се с множествена лекарствена устойчивост – А431-MDR1, А431-MRP1 и А431-ABCG2 (Табл. 3). Получените резултати са представени на Фиг. 10; Табл. 9.



Фиг. 10. Влияние на ZnSalenAu (А) и ZnSalenAg (В) върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от линия А431 (плоскоклетъчен карцином у човек) и получените от него клонове (А431-MDR1, А431-MRP1, А431-ABCG2), които се характеризират с множествена лекарствена устойчивост. Комплексът е приложен в концентрации 1-10 µg/ml (А) и 0.5 – 5.0 µg/ml (В) за 72 часа. Проучването е проведено чрез МТТ тест.

Табл. 9. Цитотоксична активност (ЦК₅₀ и ЦК₉₀) на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази върху човешки туморни клетки от линии А431 и нейните клонове

Клетъчна линия	ZnSalenAu	ZnSalenAg
А431	0.98 (3.42)*	3.10 (4.38)
А431-MDR1	2.46 (6.28)**	2.06 (4.24)
А431-MRP1	2.67 (8.15)	2.28 (4.46)
А431-ABCG2	2.16 (3.60)	3.82 (4.58)

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (µM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола. Изследването е проведено чрез МТТ тест, интервалът на третиране е 72 часа.

А.1.1.3. Човешки нетуморни клетки

Данни за влиянието на изпитваните комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) върху преживяемостта и/или пролиферативната активност на човешки нетуморни клетки от линия Lер 3 са получени чрез МТТ тест (МТТ), тест за включване на неутрално червено (NR), оцветяване с кристал виолет (CV) и техника на оцветяване с трипаново синьо (ТВ). Резултатите са систематизирани на Фиг. 11 и Табл. 10.

Табл. 10. Цитотоксична концентрация 50 (ЦК₅₀) и цитотоксична концентрация 90 (ЦК₉₀) на комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) при човешки ембрионални клетки от бял дроб (клетъчна линия Lep 3)

Вещество	Lep 3				
	24h	48h	72h		
	MTT		MTT	NR	CV
Salen	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ZnSalenAu	0.11* (0.09)**	0.08 (0.06)	0.08 (0.06)	0.13 (0.1)	0.79 (0.64)
ZnSalenAg	3.61 (3.44)	3.20 (3.05)	3.82 (3.64)	2.00 (1.9)	0.80 (0.76)

Вещество	Lep 3				
	24h	48h	72h		
	MTT		MTT	NR	CV
ZnSalampyAu	1.18 (3.84)	0.86 (1.83)	0.57 (0.91)	0.57 (0.88)	0.67 (н.о.)
ZnSaldmenAu	0.79 (3.25)	0.66 (1.57)	0.52 (0.87)	0.52 (0.85)	0.63 (н.о.)
ZnSalampyAg	28.81 (41.67)	30.27 (41.76)	18.96 (38.0)	28.73 (40.88)	23.75 (43.09)
ZnSaldmenAg	19.89 (38.80)	17.83 (33.59)	17.35 (21.88)	15.98 (20.99)	20.55 (41.76)

MTT = MTT тест; NR = метод за оцветяване с неутрално червено; CV = оцветяване с кристал виолет;

*ЦК₅₀ и **ЦК₉₀ (в скоби) – концентрациите (µM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50%, респективно 10%, при всички изпитвани концентрации (0.05 – 20 µg/ml).

На Фиг. 11 и Табл. 11 са представени сравнителни данни за чувствителността на използваните като моделни системи клетъчни култури към цитотоксичното действие на металните комплекси с шифови бази.

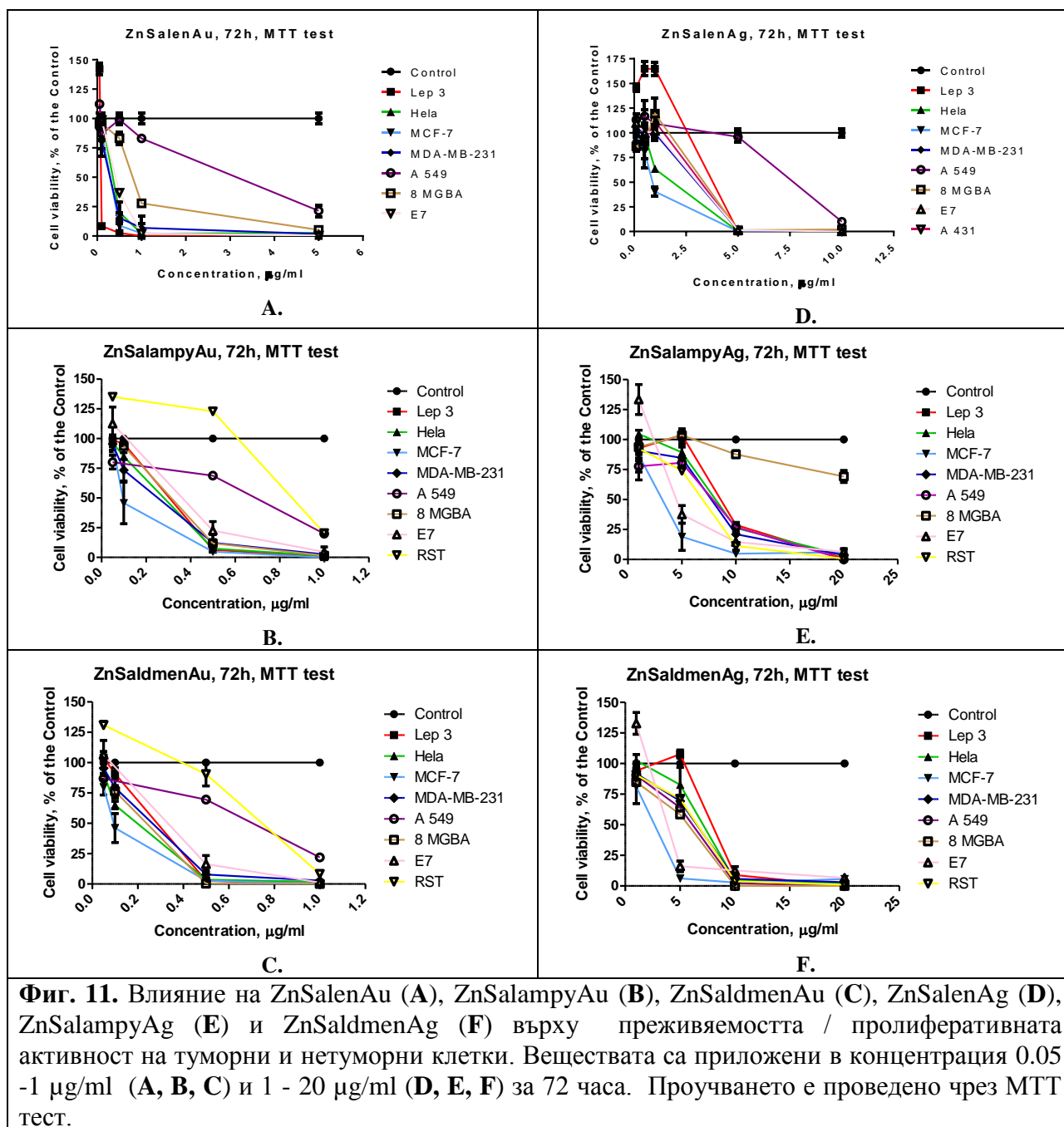


Табл. 11. Йерархични редове, отразяващи чувствителността на използваните като експериментални модели туморни и нетуморни клетъчни линии към цитотоксичното действие на изпитваните комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази

	Време на третиране (ч.)	Йерархичен ред
ZnSalenAu	24	Lep3 > LSCC-SF-Mc29(E7) > MCF-7 > HeLa > MDA-MB-231 > 8MGBA
	48	Lep3 > HeLa = MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > 8MGBA > LSR-SF-SR = MDA-MB-231
	72	Lep3 > MCF-7 > HeLa > LSCC-SF-Mc29(E7) > MDA-MB-231 = 8MGBA > A431 > A549
ZnSalenAg	24	LSCC-SF-Mc29(E7) > MCF-7 > MDA-MB-231 > 8MGBA > HeLa > Lep3
	48	LSR-SF-SR > LSCC-SF-Mc29(E7) > MCF-7 > HeLa > MDA-MB-231 = 8MGBA > Lep3 > A549
	72	LSCC-SF-Mc29(E7) > MCF-7 > HeLa > MDA-MB-231 > A431 = 8MGBA > Lep3 > A549
ZnSalampyAu	24	LSCC-SF-Mc29(E7) > MCF-7 = HeLa > MDA-MB-231 > LSR-SF-SR > Lep3
	48	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > HeLa > LSR-SF-SR = Lep3 = MDA-MB-231 > A549
	72	MCF-7 > MDA-MB-231 = HeLa > Lep3 = 8MGBA > LSCC-SF-Mc29(E7) > A549 > LSR-SF-SR
ZnSaldmenAu	24	MCF-7 = HeLa > LSCC-SF-Mc29(E7) > Lep3 = MDA-MB-231 > LSR-SF-SR
	48	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > HeLa > Lep3 > MDA-MB-231 > LSR-SF-SR > A549
	72	MCF-7 > HeLa > MDA-MB-231 = 8MGBA = Lep3 > LSCC-SF-Mc29(E7) > A549 > LSR-SF-SR
ZnSalampyAg	24	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > MDA-MB-231 > LSR-SF-SR > HeLa > Lep3
	48	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > LSR-SF-SR > HeLa > MDA-MB-231 > Lep3 > A549
	72	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > LSR-SF-SR > MDA-MB-231 = A549 = HeLa > Lep3 > 8MGBA
ZnSaldmenAg	24	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > MDA-MB-231 LSR-SF-SR > HeLa > Lep3
	48	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > LSR-SF-SR > HeLa = MDA-MB-231 = A549 > Lep3
	72	MCF-7 > LSCC-SF-Mc29(E7) > 8MGBA > A549 > LSR-SF-SR = MDA-MB-231 > HeLa > Lep3

Йерархичните редове са построени въз основа на концентрациите (определени с МТТ тест), в които изпитваните съединения намаляват процента на живите клетки спрямо контролата с 50% (ЦК₅₀, µМ). Те започват с клетъчната линия, проявила най-висока чувствителност (т.е. тази, при която ЦК₅₀ е с най-ниска стойност).

A.1.2. Способност на изпитваните метални (Zn(II)/Ag(I), Zn(II)/Au(I)) комплекси с шифови бази да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки

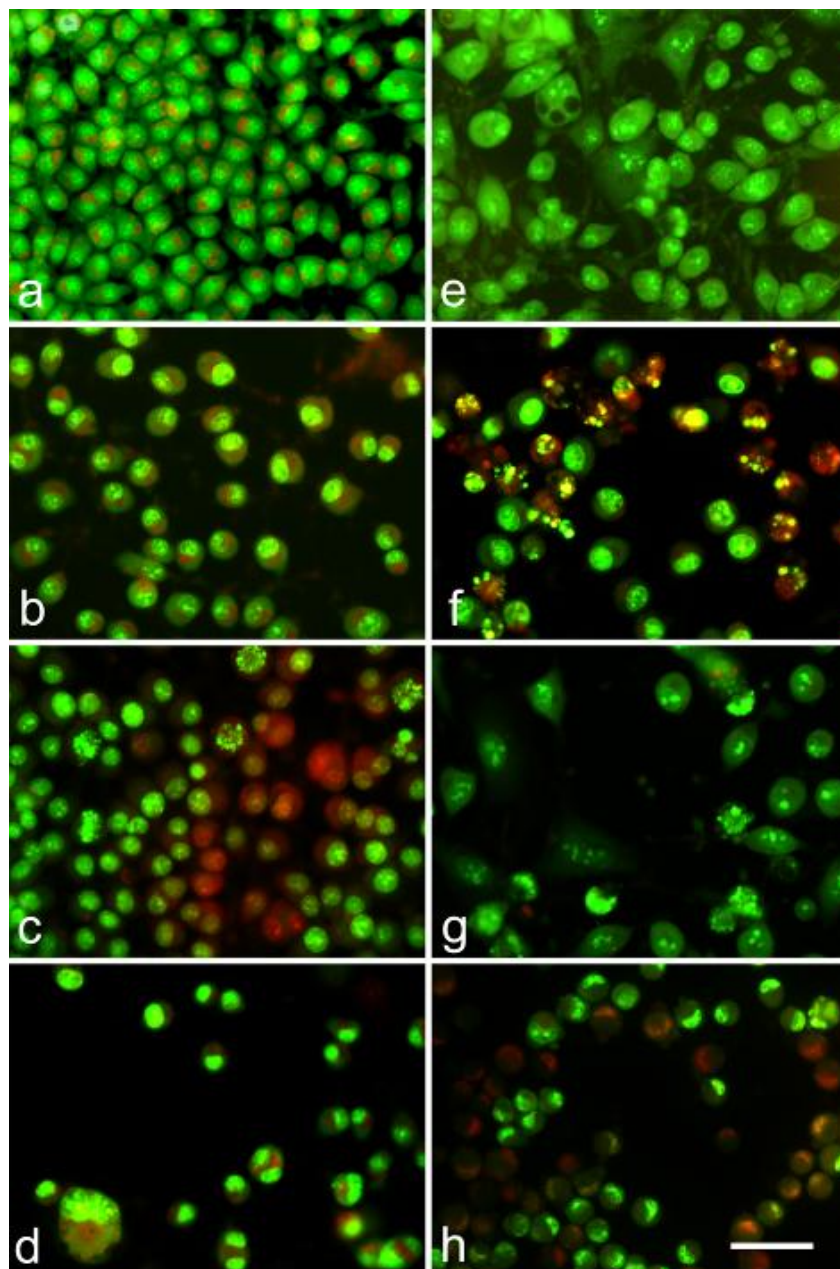
A.1.2.1. Светлинно-микроскопски изменения, наблюдавани в третиран с метални комплекси клетъчни култури

В хода на експерименталната работа с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss, Jena) ежедневно беше проследявано състоянието на клетъчните култури и образувания от тях монослой, за да бъде избегната опасността от разпространение на случайно възникнали инфекции (такива не бяха констатирани), да бъдат своевременно изключени пробите с неравномерен клетъчен растеж поради технически грешки при засяването на клетките (не бяха забелязани) и да бъде отчетено наличието на евентуален цитотоксичен ефект (ЦТЕ), предизвикан от изследваните съединения.

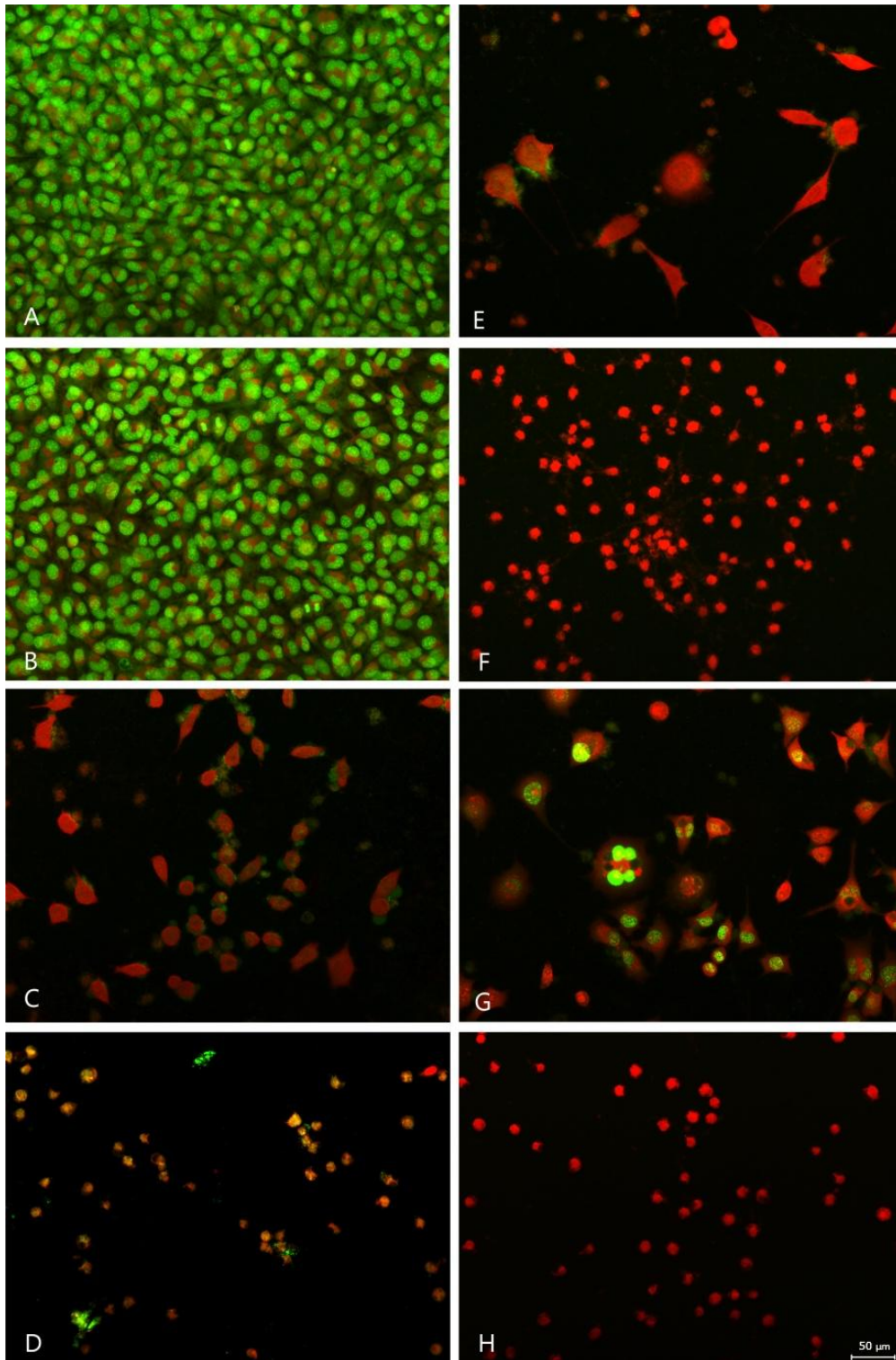
Под влияние на по-високите концентрации на изпитваните вещества беше наблюдаван цитотоксичен ефект, изразяващ се в изоставане в клетъчния растеж и намаляване броя на клетките, поява на окръглени и/или вакуолизирани клетки, отлепване на клетките от повърхността на подложката (дъното на ямката в плаката за клетъчно култивиране). В тези случаи културалната среда оставаше малиново-червена на цвят (алкално рН) за разлика от оцветената в оранжево контрола (кисело рН), което най-вероятно се дължи на потискането на обменните процеси в третираните клетки, както и на намаляване на общия брой на клетките. В повечето случаи проявата на цитотоксичния ефект се усилваше с удължаване продължителността на третирането.

A.1.2.3. Цитопатологични изменения наблюдавани след двойно оцветяване с акридин оранж и с пропидиев йодид

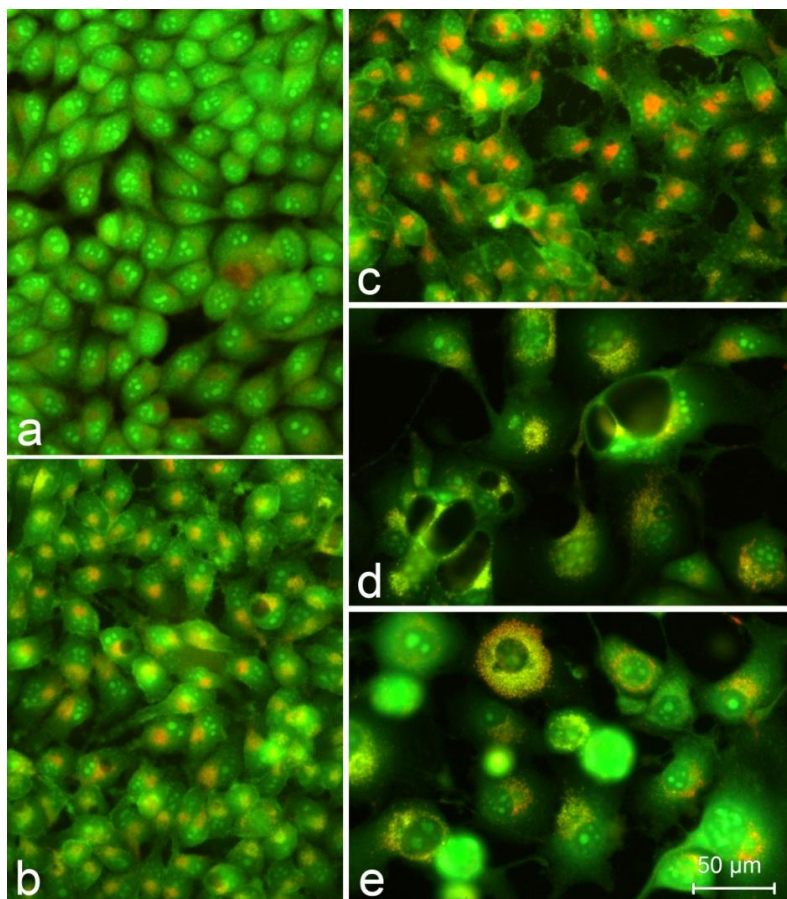
Проведеното двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI) показва наличие на цитопатологични изменения в култивираните в присъствие на изпитваните комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази клетки, включително намаляване на общия брой на клетките и морфологични белези, характерни за ранни и/или късни стадии на апоптоза. Получените резултати са представени на Фиг. 12-14.



Фиг. 12. Плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR след оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид – нетретирани (a); култивирани в продължение на 24 часа в присъствие на ZnSaldmenAu – 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (b); ZnSalampyAu – 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (c); ZnSalampyAu – 1 $\mu\text{g/ml}$ (d); ZnSaldmenAg – 5 $\mu\text{g/ml}$ (e); ZnSaldmenAg – 10 $\mu\text{g/ml}$ (f); ZnSalampyAg – 10 $\mu\text{g/ml}$ (g); ZnSalampyAg – 20 $\mu\text{g/ml}$ (h). Отчетлива загуба на клетки при всичките третирани проби (b - h). Набъбнали и окръглени клетки (b). Множество апоптотични клетки с фрагментиран хроматин на ядрата (c). Значителна загуба на клетки, апоптотични клетки с кондензиран хроматин в ядрата (d). Преобладават живите клетки, които са уголемени, някои с вакуолизирана цитоплазма (e). Доминират мъртвите апоптотични клетки, изцяло пикнотизирани и с фрагментирани ядра (f). Запазените клетки са набъбнали, откриват се и живи апоптотични с фрагментирани ядра (g). Живи клетки и мъртви апоптотични клетки – пикнотични, окръглени с кондензиран хроматин (h). Бар = 50 μm .



Фиг. 13. Цитопатологични изменения при клетки от линия MDA-MB-231 (тройно негативен рак на млечна жлеза у човек), третирани с комплекси на Zn/Au и ZnAg с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen). Нетретирани клетки - Контрола (A); клетки от линия MDA-MB-231 след въздействие в продължение на 72 часа с 10 $\mu\text{g/ml}$ Salen (B); 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalenAu (C); 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalenAg (D); 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalampyAu (E); 5 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalampyAg (F); 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ZnSaldmenAu (G); 7.5 $\mu\text{g/ml}$ ZnSaldmenAg (H). Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Бар = 50 μm .



Фиг. 14. Оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид на клетки от линия HeLa (цервикален карцином при човек) Пълен монослой от нетретиранни клетки от линия HeLa с бледозелена флуоресценция на ядрата и ярко жълто-зелени нуклеоли, значително по-светлозелена флуоресценция на цитоплазмата, включваща фокални перинуклеарни струпвания от лизозоми с грануларна оражево-червена флуоресценция (**a**); Клетки от линия HeLa, култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 10 $\mu\text{g/ml}$ Salen (**b**); 1 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalenAu (**c**); 1 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalenAg (**d**); 5 $\mu\text{g/ml}$ ZnSalenAg (**e**). Уедрени лизозомни гранули и клетки с вакуолизация на цитоплазмата (**b** и **c**). Значима загуба на клетки при (**d**) и (**e**), клетъчна пикноза и клетки с големи цитоплазмени вакуоли (**d**) и окръглени пикнотични клетки (**e**). Бар = 50 μm .

А.1.2.4. Увреждания в ДНК молекулите на третираните клетки (Генотоксичен ефект)

С помощта на Кометно изследване при алкално рН беше проучена способността на металните комплекси с ШБ да предизвикват едноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните плъщи саркомни клетки (клетъчна линия LSR-SF-SR). Веществата бяха приложени в концентрации 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$ (за комплексите на Zn/Au), и 10 и 20 $\mu\text{g/ml}$ (за комплексите на Zn/Ag) за 3 и 24 часа. Получените резултати са обобщени в Табл. 12 и Фиг. 15. Те показват, че всички изпитвани съединения оказват генотоксичен ефект, който се проявява още на 3^{ия} час от въздействието им. Доказателство за това е увеличаването на броя на кометите (Фиг. 15) и удължаването на

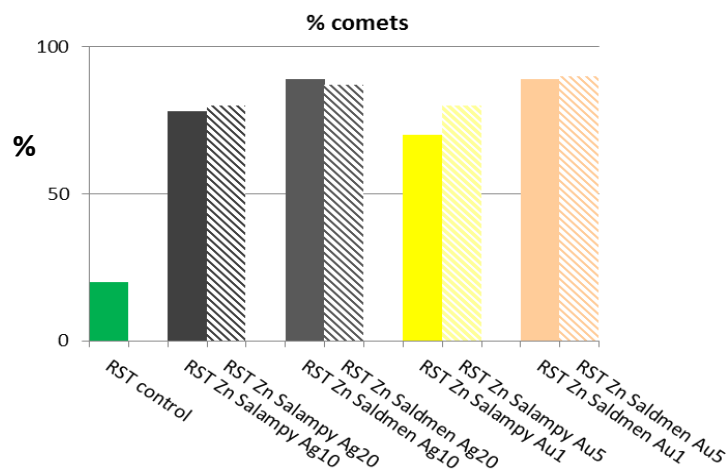
опашката им (Табл. 12) при третираните клетки в сравнение с контролите. Представителни фигури на комети от култивирани в присъствие на метални комплекси с Шифови бази клетки от линия LSR-SF-SR са показани на Фиг. 17.

Генотоксичният ефект на комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с Шифовите бази Salampy и Saldmen беше доказан и при клетки от тройно негативен рак на гърдата при човек (линия MDA-MB-231). Веществата бяха приложени за 24 часа в две концентрации: едната отговаряща на определената с МТТ тест ЦК₅₀ за същия интервал от време (24 час), а втората – по-висока, при която процентът на живите клетки е около 30-40% (Фиг. 16).

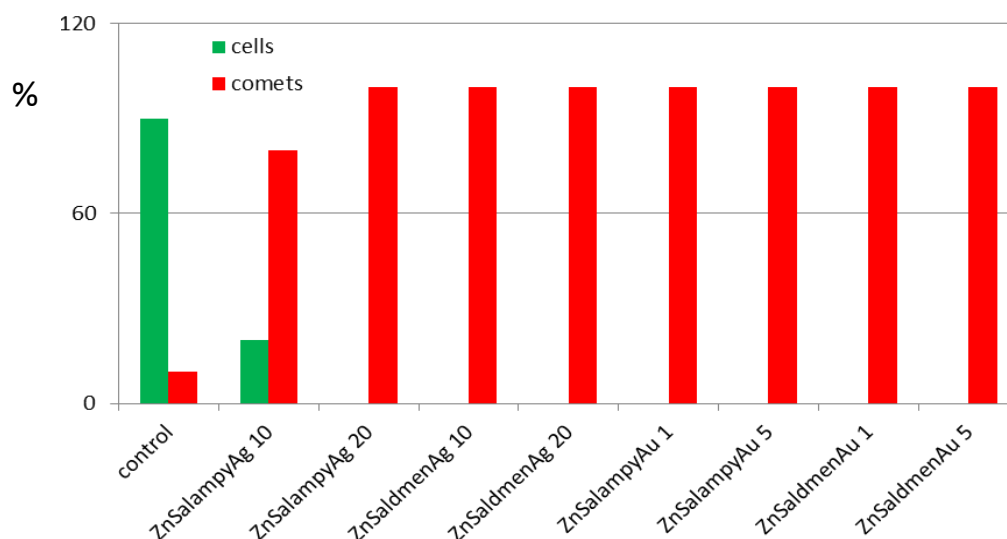
Табл. 12. Генотоксичен ефект на комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази при плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR

Вещество	Концентрация, µg/ml	Дължина на опашката на кометите
Контрола	0	302.5 ± 10.4 (100)*
Zn Salampy Ag	10	496.9 ± 57.2 (164.1)
Zn Salampy Ag	20	457.5 ± 48.8 (151.2)
Zn Saldmen Ag	10	470.8 ± 32.8 (155.6)
Zn Saldmen Ag	20	435.2 ± 19.0 (143.9)
Zn Salampy Au	1	421.81 ± 14.0 (139.4)
Zn Salampy Au	5	476.6 ± 10.9 (157.6)
Zn Saldmen Au	1	413.3 ± 13.6 (136.6)
Zn Saldmen Au	5	482.9 ± 9.3 (159.6)

* Дължина на опашката на кометата в процент спрямо контролата, която е приета за 100%. Резултатите са изразени в **MEAN ± SEM**. Изследването е проведено чрез алкален вариант на Кометен тест. Плъшите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR са култивирани в продължение на 3 часа в присъствие на метални (Zn/Ag, Zn/Au) комплекси с шифови бази (Salampy, Saldmen). Количествената оценка на дължината на кометите е направена с помощта на автоматизиран софтуер CometScore.

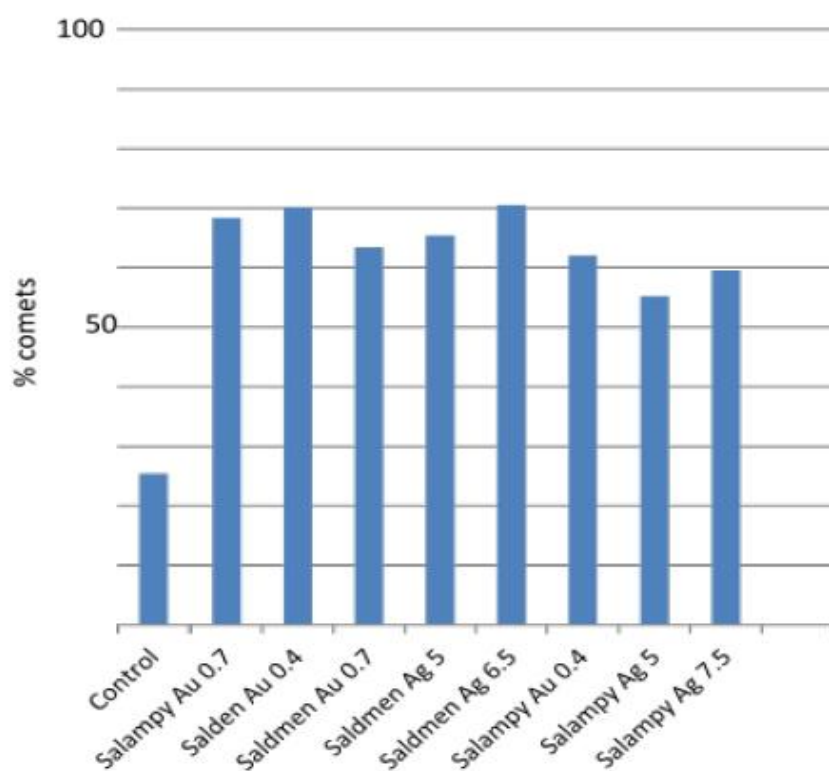


Фиг. 15 А.

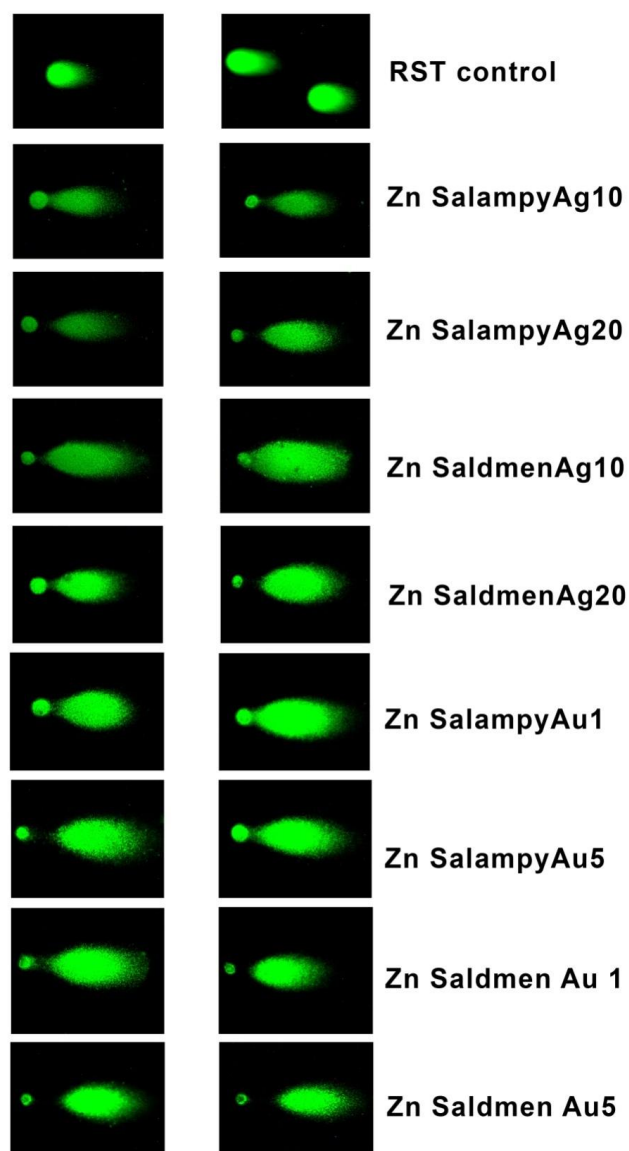


Фиг. 15 В.

Фиг. 15. Процент комети, наблюдавани след култивиране в продължение на 3 (Фиг. 15 А) и 24 (Фиг. 15 В) часа на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR в присъствие на метални (Zn/Ag и Zn/Au) комплекси с шифови бази (Salampy, Saldmen). Изследването е проведено чрез Кометен тест при алкално рН. Цифрата след наименованието на комплекса показва концентрацията му в $\mu\text{g/ml}$.



Фиг. 16. Процент комети, наблюдавани след култивиране в продължение на 24 часа на клетки от тройно негативен рак на гърдата при човек (линия MDA-MB-231) в присъствие на метални (Zn/Ag, Zn/Au) комплекси с шифови бази (Salampy, Saldmen). Изследването е проведено чрез Кометен тест при алкално рН. Цифрата след наименованието на комплекса показва концентрацията му в $\mu\text{g/ml}$.

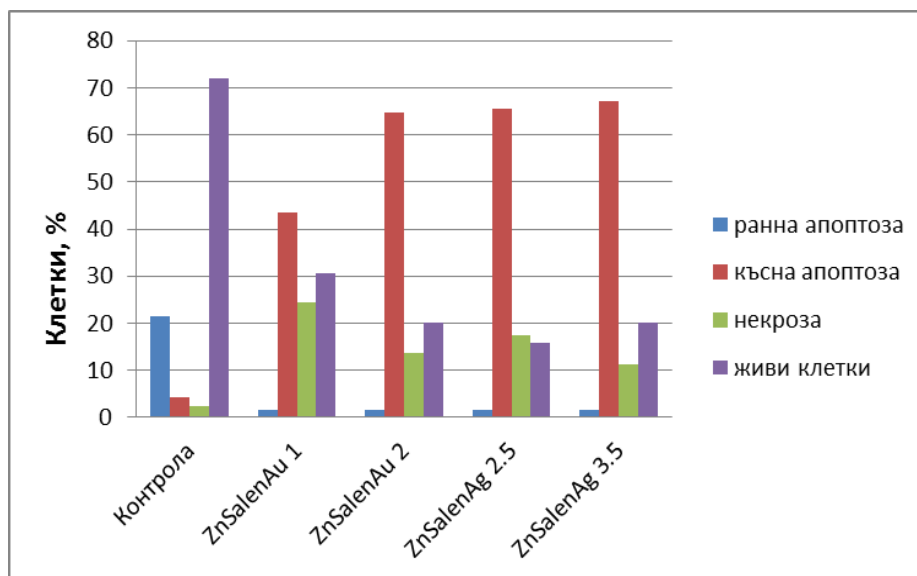


Фиг. 17. Представителни фигури на комети, получени след третиране на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR с нарастващи концентрации на метални (Zn/Ag, Zn/Au) комплекси с шифови бази (Salampy, Saldmen) и последващ анализ за генотоксичност с Кометен тест при алкално рН. Цифрата след наименованието на комплекса представлява концентрацията му в $\mu\text{g/ml}$, RST = LSR-SF-SR.

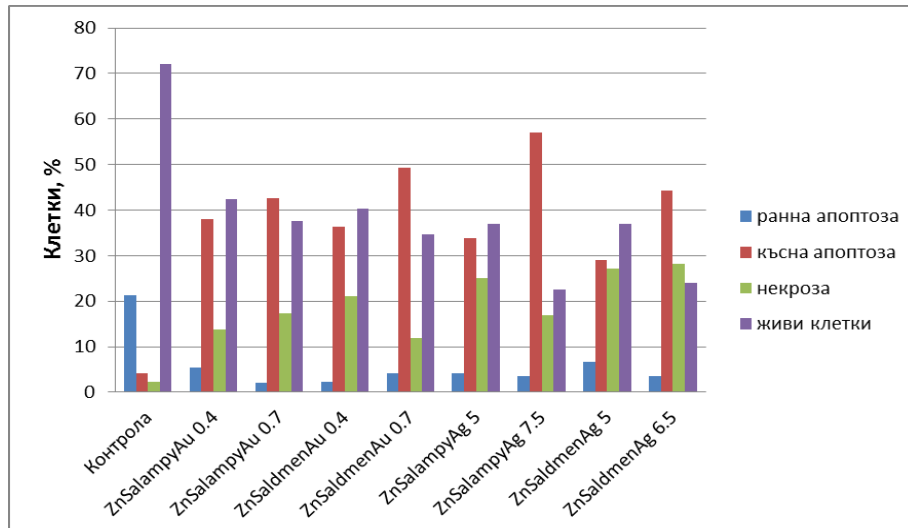
А.1.3. Идентифициране типа на клетъчната смърт (апоптоза, некроза)

Идентифицирането на типа на клетъчната смърт (апоптоза или некроза) е направено със стандартен кит (ENZO Life Sciences, Annexin 5) съгласно указанията на Фирмата – производител. Получените резултати са представени на Фиг. 18 и показват способността на изпитваните съединения да предизвикват апоптоза (предимно) и некроза в култивираните в тяхно присъствие клетки от линия MDA-MB-231 (тройно негативен рак на гърдата у човек). Веществата са приложени за същия период на въздействие (24 часа) и в аналогични концентрации (IC_{50} и по-висока концентрация, при която клетъчната преживяемост е 30-40% спрямо контролата според данните от

проведения МТТ тест), както при определянето на генотоксичния ефект (Виж т. А.1.2.4.). В третираните с ZnSalenAu и ZnSalenAg проби се наблюдава значително намаляване на процента на живите клетки (15 – 30%) за сметка на увеличения процент клетки в късна апоптоза (43 – 67%) и некроза (11-24%). Апоптотичният ефект на ZnSalenAu се усилва с нарастването на концентрацията (Фиг. 18 А). Увеличаване на процента на клетките в късна апоптоза (30-57%) и некроза (12-28 %) и редуциране на живите клетки беше установено и при комплексите на Salampy и Saldmen (Фиг. 18 В).



Фиг. 18 А.



Фиг. 18 В.

Фиг. 18. Идентифициране типа на клетъчна смърт в култивирани в продължение на 24 часа в присъствие на метални (Zn/Ag, Zn/Au) комплекси с шифови бази (Salen – Фиг. 18 А; Salampy и Saldmen - Фиг. 18 В) клетки от линия MDA-MB-231 (тройно негативен рак на гърдата у човек). Изследването е проведено със стандартен кит ENZO Life Sciences, Anexin 5, съгласно указанията на Фирмата – производител). Цифрата след наименованието на комплекса показва концентрацията му в $\mu\text{g/ml}$.

A2. Дългосрочни експерименти

Влияние на метални (Zn(II)/Ag(I), Zn(II)/Au(I)) комплекси с шифови бази върху 3D колонии-образуващата способност на туморни клетки

Изследвано беше влиянието на изпитваните съединения върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда. Веществата бяха приложени в концентрации от 0.05 до 20 $\mu\text{g/ml}$. В контролните ямки първите видими, добре оформени колонии, състоящи се от по 10-15 клетки бяха наблюдавани на 4-5^{ия} ден след началото на експеримента при клетките от линии LSCC-SF-Mc29 - клон E7 и LSR-SF-SR, и на 7-8^{ми} ден - при човешките туморни клетки от линии HeLa, MCF-7 и MDA-MB-231. При отчитането на резултатите с «липса на колонии» бяха означавани случаите, при които в съответната ямка беше установена липса на клетки или наличие на единични клетки. Присъствието на струпвания от 2-3 клетки не беше приемано като «пълна липса на колонии», поради потенциалната възможност тази клетки да продължат растежа си след по-дълъг период на култивиране.

A2.1. Трансформирани с вирус животински туморни клетки

Птичи хепатомни клетки от линия LSCC-SF-Mc29 - клон E7

Растежът на птичите хепатомни клетки в полутечна среда (в присъствие и в отсъствие на вещества) беше проследен в продължение на 40 дена. Установено беше, че комплексите на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази потискат напълно способността на клетките от линия LSCC-SF-Mc29 - клон E7 да образуват 3D колонии, когато са приложени в концентрации $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$ (ZnSalenAu), $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ (ZnSalenAg, ZnSalampyAu, ZnSaldmenAu) и $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ (ZnSalampyAg, ZnSaldmenAg). Лигандът Salen не прояви потискащ ефект в нито една от изпитваните концентрации.

Плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF-SR

Получените резултати при плъшите саркомни клетки са обобщени в Табл. 13 и Фиг. 19.

Табл. 13. Влияние на комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази върху 3D колонии-образуващата способност на плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF-SR

Вещество	Концентрация, $\mu\text{g/ml}$	Брой колонии в зрително поле
Контрола	0	> 30
ZnSalampyAg	1	12.8 \pm 0.9
	5	1.7 \pm 0.3
	10	1.7 \pm 0.3
	20	2.8 \pm 0.5
ZnSalampyAu	0.05	10.7 \pm 0.7
	1	1.0 \pm 0.8
	5	1.3 \pm 0.7
	10	0.8 \pm 0.5
ZnSaldmenAg	0.5	13.3 \pm 0.9
	1	9.0 \pm 1.0

	5	1.3 ± 0.6
	10	1.5 ± 0.9
ZnSaldmenAu	0.05	6.8 ± 0.3
	0.5	0.8 ± 0.3
	1	1.3 ± 0.5
	5	1.0 ± 0.4

Резултатите са отчетени на 14^{ти} ден, като във всяка ямка са наблюдавани най-малко 4-5 независими зрителни полета с помощта на инвертен светлинен микроскоп Carl Zeiss (Jena), при увеличение x10.

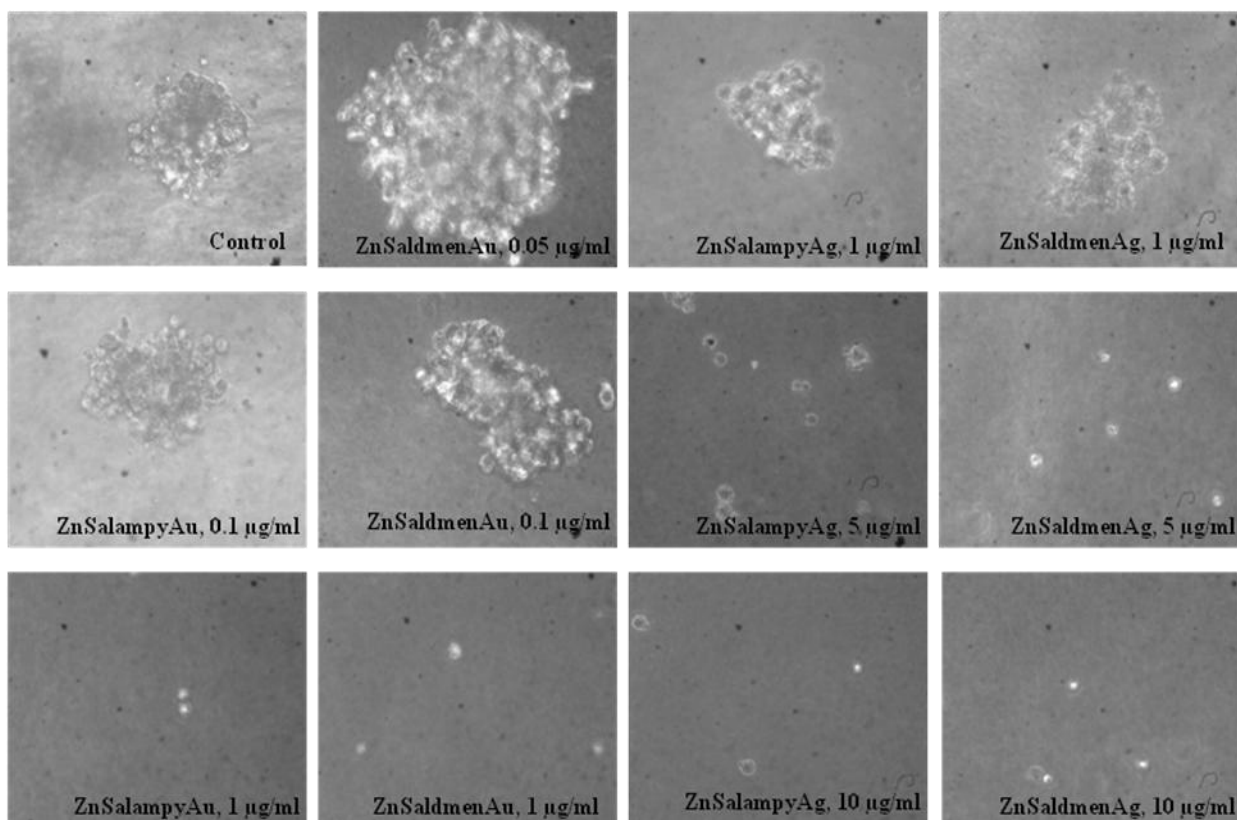


Фиг. 19. 3D колонии-образуващ тест с плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF-SR - 24-ямкова плака с полутечна среда, в която клетките са култивирани 14 дена в отсъствие (Контрола = К) и в присъствие на комплекси на Zn/Ag и Zn/Au с шифовите бази Salampy и Saldmen. В контролните (К) ямки цветът на средата е оранжево-жълт (кисело рН) поради активните пролиферация и метаболизъм на туморните клетки. Под влияние на изпитваните вещества броят на клетките е силно намален, пролиферацията им е потисната и колонии не се образуват, поради което цветът на средата, особено при по-високите концентрации, е червен (алкално рН).

А.2.2. Постоянни клетъчни линии от неоплазии при човек (клетъчни линии HeLa, MCF-7 и MDA-MB 231)

Клетки от карцином на шийката на матката у човек (линия HeLa)

Проследяването на растежа на клетките от линия HeLa продължи 25 дена. На 23^{ия} ден колонии не бяха открити при клетките, култивирани в присъствие на ZnSalenAu, ZnSalenAg, ZnSalampyAu, ZnSaldmenAu (в концентрация $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$), ZnSaldmenAg (в концентрация $\geq 5 \mu\text{g/ml}$), ZnSalampyAg (в концентрация $\geq 10 \mu\text{g/ml}$). На Фиг. 20 са показани клетки, култивирани в полутечна среда в отсъствие (Контрола) и в присъствие на изпитваните съединения. Растящите при наличие на Salen колонии не се отличаваха по форма, брой и размер от тези в нетретираните контроли.



Фиг. 20. Триизмерни (3D) колонии в полутечна среда, образувани от човешки карциномни клетки от линия HeLa, култивирани в продължение на 22-23 ден в отсъствие (Контрола) и в присъствие на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) шифови бази; Микроскоп Olympus CK40, камера CAM 2800-XP, 40 х.

Клетъчни линии от рак на гърдата у човек

В контролните ямки при линия MDA-MB-231 бяха наблюдавани малки колонии от по 6-8 клетки още на 4-5^{ти} ден, за разлика от линия MCF-7, където такива колонии бяха забелязани 2-3 дена по-късно. Резултатите от 3D колонии образувания метод при клетки от линии MCF-7 и MDA-MB-231, култивирани в полутечна среда в отсъствие и в присъствие на метални комплекси с шифови бази, са представени в Табл. 14. На 32^{ия} ден 3D колонии от клетки от линия MCF-7 не бяха забелязани в случаите на въздействие с ZnSalampyAu, ZnSaldmenAu (в концентрация $\geq 0.05 \mu\text{g/ml}$) ZnSalenAu (в концентрация $\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$), ZnSalenAg (в концентрация $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$). Колонии, макар и с по-малък брой и размер в сравнение с контролата, бяха наблюдавани при клетките, култивирани в присъствие на ZnSalampyAg и ZnSaldmenAg.

Клетките от тройно негативен рак на гърдата (MDA-MB-231) проявиха по-висока устойчивост към инхибиращото действие на веществата. Пълна липса на колонии беше установена само под въздействие на ZnSalampyAu и ZnSaldmenAu, в концентрация $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ (Табл. 14).

Самостоятелно приложен, лигандът Salen не проявява потискаща способност върху 3D растежа на клетките и от двете линии – MCF-7 и MDA-MB-231 (Табл. 14).

Табл. 20. Влияние на комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифова база (Salen, Salampy, Saldmen) върху способността на клетки от рак на млечна жлеза у човек да образуват 3D колонии в полутечна среда

Комплекс	Концентрация (µg/mL)	MCF-7	MDA-MB-231
Контрола	0	Големи, компактни колонии 30-50/поле	> 50/поле, компактни колонии
Salen	0,1; 0,5; 1;5; 10	> 30 бр./поле	> 30 бр./поле
ZnSalenAu	0.1	Колонии липсват	Единични колонии в цялата ямка
	0.5		Наблюдават се отделни струпвания от по 2-3 клетки и единични клетки
	1		
	5		
	10		
ZnSalenAg	0.1	12 - 15 бр./поле	> 30 бр./поле
	0.5	Единични колонии от по 5-6 клетки; единични клетки	Има колонии, ~25 бр. / поле
	1		малки колонии, 8-10 /поле
	5		Колонии липсват; единични клетки
	10		
ZnSalampyAu	0.05	Колонии липсват	> 30 бр./поле
	0.1		Наличие на големи и компактни колонии ~ 10 бр./поле
	0.5		Колонии липсват; единични клетки
	1		
	5		
ZnSaldmenAu	0.05	Колонии липсват	Единични колонии
	0.1		Колонии липсват; единични клетки
	0.5		
	1		
	5		
ZnSalampyAg	0.5	= К (> 30 бр./поле)	> 30 бр./поле
	1		Големи компактни колонии, 8-10/поле; наличие на струпвания от по 2-3 клетки
	5	Малки колонии, 4-5/поле	Струпвания от по 2-3 клетки по 3-4/ поле
	10	Малки колонии, 2-3/поле	
	20		

ZnSaldmenAg	0.5	= К (> 30 бр./поле)	> 30 бр./поле
	1	10-15 колонии/поле	Големи компактни колонии, 10-15/поле;
	5	Единични малки колонии	Струпвания от по 2-3 клетки по 3-4/ поле
	10		
	20		

К = контрола; поле = зрително поле;

Резултатите са отчетени на 32^{pn} (MCF-7) и 33^{tn} (MDA-MB-231) ден, като във всяка ямка са наблюдавани най-малко 4-5 независими зрителни полета с помощта на инвертен светлинен микроскоп Carl Zeiss (Jena), при увеличение x10.

В. Влияние на монензин и негови метални [Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II)] комплекси върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки

Веществата бяха приложени в концентрации 0.5, 1, 5, 10 и 25 µg/ml за 24, 48 и 72 часа.

Проучванията за оценяване влиянето на изпитваните съединения върху култивираните в лабораторни условия туморни клетки бяха осъществени чрез провеждане на две групи експерименти:

- Краткосрочни – с продължителност до 72 часа, с растящи в монослой (2D) култури;
- Дългосрочни – траят 14-16 дена, с триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

В.1. Краткосрочни експерименти

В.1.1. Проучвания върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни и нетуморни клетки

Получените резултати са обобщени в Табл. 15-18, 23 и 26 (за туморните клетки) и Табл. 19 (за нетуморните клетки). На Фиг. 21 са представени сравнителни данни за чувствителността на човешките туморни и нетуморни клетки към цитотоксичния ефект на монензина и неговите метални комплекси.

Табл. 15. Цитотоксична активност 50 (ЦК₅₀, µM) и 90 (ЦК₉₀, µM) на монензин и неговите метални [Mg(II), Ca(II), Mn(II), и Co(II)] комплекси при птичи хепатомни (LSCC-SF-Mc29) клетки

Метод, Интервал на третиране	Цитотоксична концентрация (ЦК), µM				
	MonH	MgMon	CaMon	MnMon	CoMon
МТТ, 48 h, ЦК₅₀	3.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1
МТТ, 72 h, ЦК₉₀	6.2 ± 0.3	7.1 ± 0.3	3.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.9 ± 0.2

МТТ = МТТ тест

Табл. 16. Цитотоксична активност 50 ($ЦК_{50}$, μM) на монензин и неговите метални [Mg(II), Ca(II), Mn(II), и Co(II)] комплекси при плъщи саркомни (LSR-SF-SR) клетки

Метод, Интервал на третиране	Цитотоксична концентрация 50 ($ЦК_{50}$, μM)				
	MonH	MgMon	CaMon	MnMon	CoMon
MTT, 24 час	22.0 \pm 1.0	14.0 \pm 0.6	7.1 \pm 0.5	10.0 \pm 0.4	12.0 \pm 0.8
MTT, 48 час	4.6 \pm 0.4	4.5 \pm 0.4	2.2 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	5.3 \pm 0.3
MTT, 72 час	4.4 \pm 0.3	5.1 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.3
NR, 48 час	3.6 \pm 0.2	5.3 \pm 0.3	2.0 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1
NR, 72 час	4.4 \pm 0.3	5.2 \pm 0.4	1.9 \pm 0.2	2.1 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1

MTT = MTT тест; NR = метод за включване на неутрално червено

Табл. 17. Цитотоксична концентрация 50 ($ЦК_{50}$, μM) на монензин и неговите метални комплекси при клетки от човешките туморни линии 8MGBA, MCF-7 и HeLa, определена чрез MTT тест

Клетъчна линия Вещество	8MGBA			MCF-7			HeLa		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Монензин	> 36	13.1	10.4	20.0	3.6	< 0.7	23.6	7.1	3.3
[Mg(Mon)₂(H₂O)₂]	16.8	3.5	3.4	Н.о.	Н.о.	1.0	10.3	2.9	3.9
[Ca(Mon)₂(H₂O)₂]	> 18	5.7	3.5	Н.о.	Н.о.	3.1	11.4	4.6	2.5
[Mn(Mon)₂(H₂O)₂]	> 18	6.8	5.5	12.6	2.7	1.5	8.2	6.6	2.4
[Co(Mon)₂(H₂O)₂]	> 17	6.4	4.7	13.6	2.2	< 0.3	11.3	3.2	1.8
[Ni(Mon)₂(H₂O)₂]	> 17	2.8	2.1	7.7	> 17	5.6	> 17	2.8	0.7
[Zn(Mon)₂(H₂O)₂]	> 17	2.8	1.4	> 17	> 17	9.7	> 17	2.8	1.4

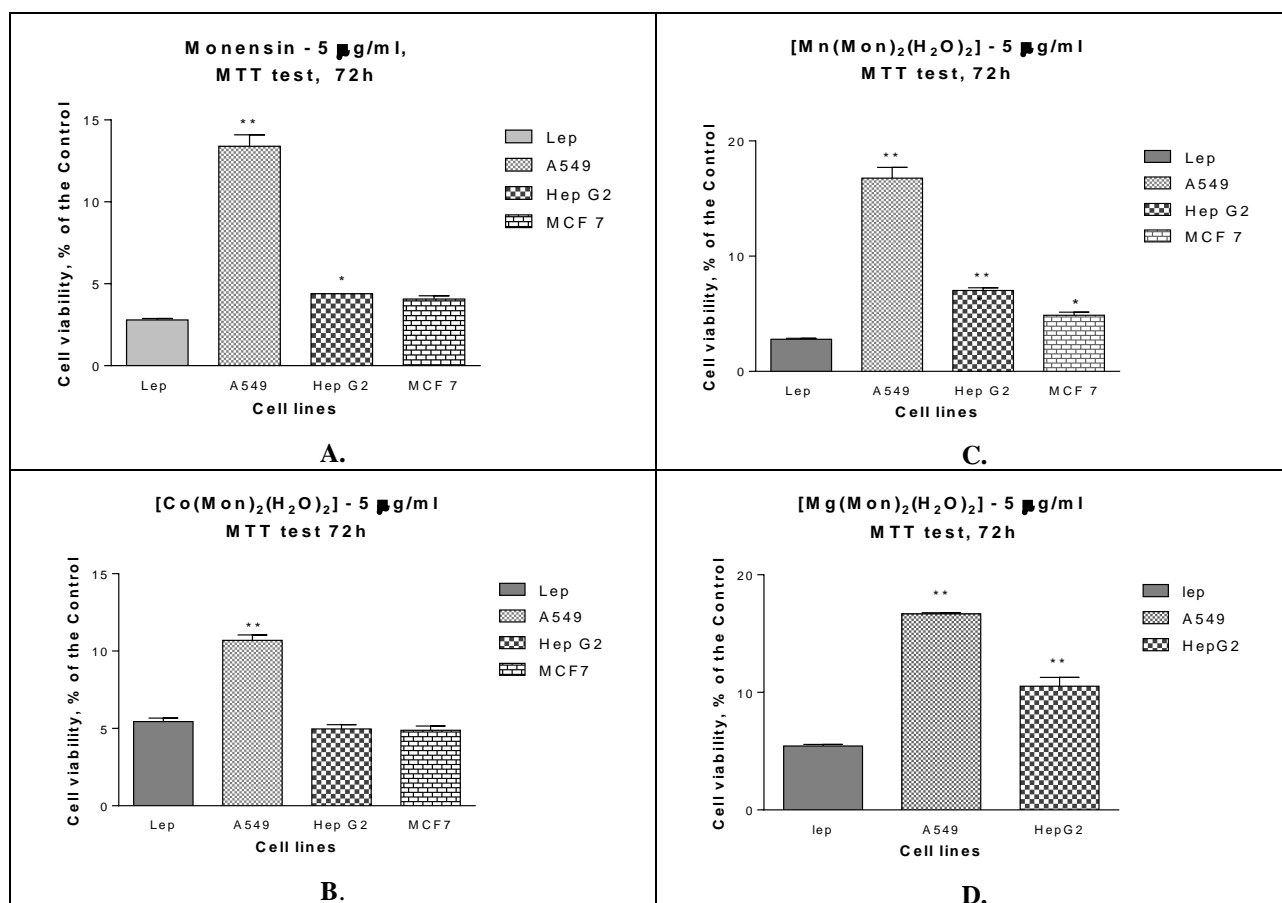
Н.о. - не е определено

Табл. 18. Цитотоксична концентрация 50 ($ЦК_{50}$, μM) на монензина и неговите метални комплекси при клетки от човешките туморни линии A 549 и HepG2, определена чрез MTT тест

Клетъчна линия Вещество	A 549			HepG2		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Монензин	6.5	4.8	< 0.7	< 0.7	< 0.7	< 0.7
[Mg(Mon)₂(H₂O)₂]	4.0	1.5	< 0.4	< 0.4	< 0.4	0.8
[Ca(Mon)₂(H₂O)₂]	4.0	1.4	< 0.4	1.7	1.0	< 0.4
[Mn(Mon)₂(H₂O)₂]	3.8	2.1	1.3	< 0.3	< 0.3	< 0.3
[Co(Mon)₂(H₂O)₂]	3.4	2.0	< 0.3	2.0	< 0.3	< 0.3

Табл. 19. Цитотоксична концентрация 50 (ЦК₅₀, μM) на монензин и неговите метални комплекси при човешки нетуморни клетки от линия Lep 3, определена чрез МТТ тест

Клетъчна линия Вещество	Lep 3		
	24 h	48 h	72 h
Монензин	15.1	< 0.7	< 0.7
[Mg(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	10.7	< 0.4	< 0.4
[Ca(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	9.9	< 0.4	< 0.4
[Mn(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	8.4	< 0.3	< 0.3
[Co(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	7.6	< 0.3	< 0.3
[Ni(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	> 17	2.8	2.8
[Zn(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	> 17	2.8	2.8



Фиг 21. Влияние на монензин (А) и негови комплекси с Со(II) (В), Мn(II) (С) и Mg(II) (D) върху преживяемостта / пролиферативната активност на клетки от човешки туморни (A549, HepG2, MCF-7) и нетуморни (Lep3) линии. Веществата са приложени в концентрация 5 μg/ml за 72 часа. Проучването е проведено чрез МТТ тест.

В.1.2. Влияние на монензин и негови метални комплекси върху общото белтъчно съдържание на третираните клетки

Изследвано беше и влиянието на монензина и неговите комплекси с Mn(II) и Mg(II), приложени в концентрация 10 µg/ml за 72 часа, върху общото съдържание на белтък в третираните клетки от линия A549 (недребноклетъчен рак на белия дроб у човек). Количеството на белтъка беше определено по метода на Брадфорд. Получените данни са представени в Табл. 20.

Табл. 20. Влияние на монензин и негови комплекси с Mn(II) и Mg(II) върху преживяемостта на клетките от линия A549 и общото съдържание на белтък в тях

Вещество	Клетъчна преживяемост, % от контролата	Белтъчно съдържание, % от контролата
MonH	18.1 ± 0.5	17.1
Mn-Mon	11.0 ± 0.1	30.8
Mg-Mon	25.9 ± 0.4	24.7

Клетъчната преживяемост е определена чрез МТТ тест, а съдържанието на белтък в клетките по метода на Брадфорд. Веществата са приложени в концентрация 10 µg/ml за 72 часа.

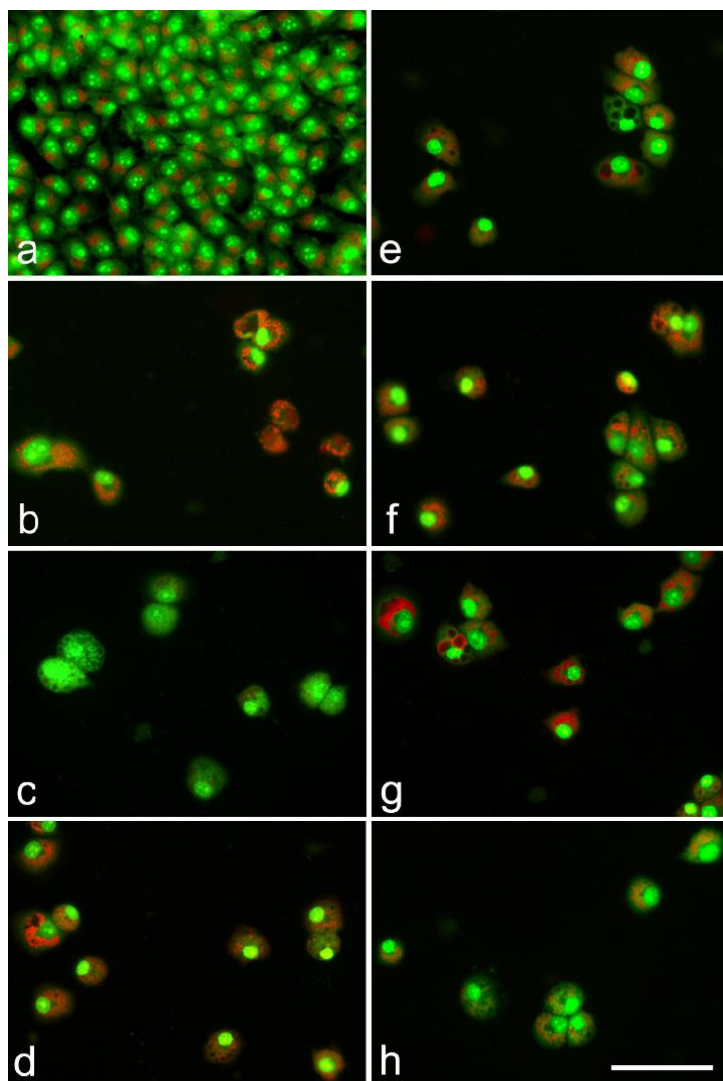
В.1.3. Способност на монензин и негови метални комплекси да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки

В.1.3.1. Светлинно-микроскопски изменения, наблюдавани в третираните с монензин и негови метални комплекси клетъчни култури

Под влияние на изпитваните вещества, приложени в концентрации 5, 10 и 25 µg/ml, с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss, Jena) в използваните като моделни системи клетъчни култури беше наблюдаван цитотоксичен ефект, изразяващ се в изоставане в клетъчния растеж (видимо намален брой на клетките в сравнение с контролата), поява на окръглени и/или вакуолизирани клетки, отлепване на клетките от повърхността на подложката, малиновочервен цвят (индикатор за алкално рН) на културалната среда.

В.1.3.2. Цитопатологични изменения в третираните с монензин и негови метални комплекси клетки, наблюдавани след двойно оцветяване с пропидиев йодид и акридин-оранж

Чрез двойно оцветяване с пропидиев йодид и акридин-оранж в третираните с изпитваните вещества (5 µg/ml = 7 µM при монензина; 10 µg/ml = 7 µM при металните комплекси, 72h) клетки беше визуализирано наличието на цитопатологични изменения, характерни както за ранни, така и за късни стадии на клетъчна смърт (апоптоза) (Фиг. 22).



Фиг. 22. Пълен монослой от нетретирани клетки от линия HeLa (карцином на шийката на матката при човек) с бледозелена флуоресценция на ядрата при ярко жълто-зелени нуклеоли, значително по-светлозелена флуоресценция на цитоплазмата, включваща фокални перинуклеарни струпвания от лизозоми с грануларна оражевочервена флуоресценция (**a**); Клетки от линия HeLa на 72-я час след третиране с 5 µg/ml монензин (**b**); 10 µg/ml Mon-Mg (**c**); 10 µg/ml Mon-Ca (**d**); 10 µg/ml Mon-Mn (**e**); 10 µg/ml Mon-Co(**f**); 10 µg/ml Mon-Ni (**g**); 10 µg/ml Mon-Zn; (**h**). Значима загуба на клетки при всичките третирания, докато наличните клетки са набъбнали, с пикнотични ядра и кондензация на хроматина. Допълнително се констатират уедрени лизозомни гранули, диспергирани перинуклеарно и из цялата цитоплазма (**b** и **f**), сливане на лизозомите и вакуолизация на цитоплазмата (**f** и **e**), загуба на лизозоми и вакуолизация на цитоплазмата (**c**, **d**, **g** и **h**), едри вакуоли в цитоплазмата при значимо разширяване на лизозомалните акумулации (**d**, **g** и **h**). Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Бар = 50 µm.

В.1.3.3. Увреждания в ДНК молекулите на третираните клетки (Генотоксичен ефект)

Проведена беше електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Кометно изследване) при неутрално рН, за да бъде проверена способността на монензина и неговите метални [Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II) и Zn(II)] комплекси да

предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки. Изследването беше осъществено с клетки от линия HeLa (цервикален карцином у човек), а изпитваните съединения бяха приложени в концентрации 5 µg/ml (7 µM) за монензина и 10 µg/ml (7 µM) за металните комплекси за 72 часа. Получените резултати са представени в Табл. 21.

Табл. 21. Преживяемост и наличие на двойноверижни скъсвания в ДНК молекулата при клетки от цервикален карцином на човек (HeLa) третирани с монензин и негови метални комплекси, приложени в концентрация 7 µM за 72 часа

Вещество	Клетки с двойно верижни скъсвания в ДНК молекулата (“Комети”) ^a , % спрямо контролата	Клетъчна преживяемост ^b , % спрямо контролата
Монензин	67 +/- 0.8	30 +/- 1.0
[Mg(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	84 +/- 0.1	36 +/- 2.0
[Ca(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	76 +/- 0.6	33 +/- 2.0
[Mn(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	49 +/- 2.0	29 +/- 2.0
[Co(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	68 +/- 0.9	27 +/- 1.0
[Ni(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	84 +/- 0.2	11 +/- 0.2
[Zn(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	68 +/- 1.0	8 +/- 0.2

^a – способността на веществата да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулата на третираните клетки беше определена чрез електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Кометно изследване) при неутрално рН;

^b – клетъчната преживяемост беше определена чрез МТТ тест.

В2. Дългосрочни експерименти

Влияние на монензин и негови метални комплекси върху 3D колонии-образуващата способност на туморни клетки

С помощта на колонии-образуващ метод (КОМ) беше проследено влиянието на монензина и неговите метални комплекси върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда. Получените резултати (отчетени на 16^{ия} ден) са обобщени в Табл. 22-23 и показват добро съвпадение с данните от проведения преди това МТТ тест (Табл. 23).

Табл. 22. Влияние на монензин и негови метални комплекси върху способността на туморните клетки да образуват 3D колонии в полутечна среда

Вещество	Клетъчна линия		
	A549	8MGVA	HeLa
Монензин	≥ 14.5	≥ 10.9	≥ 18.1
[Mg(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	≥ 8.9	≥ 5.3	≥ 17.1
[Ca(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	≥ 7.1	≥ 7.1	≥ 5.3
[Mn(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	≥ 7.0	≥ 7.0	≥ 5.3
[Co(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	≥ 7.0	≥ 5.3	≥ 5.3

[Ni(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	Н.д.	≥ 10.5	≥ 3.5
[Zn(Mon) ₂ (H ₂ O) ₂]	Н.д.	≥ 5.2	≥ 3.5

* В таблицата са представени ефективните концентрации (в μM) на изпитваните вещества, в които те потискат напълно способността на туморните клетки да образуват 3D колонии в полутечна среда; Н.д. - няма данни.

Табл. 23. Йерархични редове на монензина и неговите метални комплекси според тяхната цитотоксичност и/или антипролиферативна активност, определени чрез МТТ тест (МТТ) и колонии-образуващ метод (КОМ)

Клетъчна линия	Метод	Интервална третиране	Йерархичен ред
А 549	МТТ	72 часа	CaMon = MgMon = CoMon > MonH > MnMon > Cisplatin
	КОМ	16 дена	CaMon = MgMon = CoMon > MnMon > MonH
8МГВА	МТТ	72 часа	ZnMon > NiMon > MgMon = CaMon > CoMon > MnMon > MonH
	КОМ	16 дена	ZnMon = MgMon = CoMon > CaMon = MnMon > NiMon > MonH
HeLa	МТТ	72 часа	NiMon > ZnMon > CoMon > MnMon = CaMon > MonH > MgMon > Cisplatin
	КОМ	16 дена	NiMon = ZnMon > CaMon = MnMon = CoMon > MgMon > MonH

Йерархичните редове започват с проявилото най-висока цитотоксична / антипролиферативна активност съединение и продължават в низходящ ред.

С. Диметилсулфоксид

Изпитваните съединения бяха разтворени първоначално в малък обем диметилсулфоксид, след което бяха разредени в хранителна среда. В Табл. 24 е представена концентрацията на DMSO в крайните работни разтвори на веществата. Добавен към културалната среда в концентрации аналогични на тези в разтворите на изпитваните съединения, диметилсулфоксидът в концентрации < 2.0% не доведе до съществени разлики в преживяемостта на клетките спрямо контролата.

Табл. 24. Съдържание на разтворителя (Диметилсулфоксид) в работните разтвори на изпитваните съединения

Метални комплекси на Mg(II), Ca(II), Mn (II), Co(II), Ni(II) и Zn(II) с монензин	
Концентрации, μg/ml	% DMSO
0.5	0.05
1	0.1
5	0.5
10	1
25	2.5

Метални комплекси на Zn/Au, Zn/Ag с лиганди Salen, Salampy и Saldmen	
Концентрации, µg/ml	% DMSO
0.05	0.0001
0.1	0.0002
0.5	0.001
1	0.002
5	0.01
10	0.02
20	0.04
50	0.1

D. Антитуморни препарати

При някои от проведените от нас проучвания като положителна контрола беше използван утвърденият в клиничната практика антитуморен препарат цисплатина (CisPlatin). Той беше приложен в концентрации 0.1 - 30 µg/ml за 24, 48 и 72 часа, а влиянието му върху клетъчната преживяемост е определено чрез МТТ тест и метод за включване на неутрално червено. Получените резултати са обобщени в Табл. 25, 26.

Табл. 25. Влияние на цисплатина върху преживяемостта / пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и плъши туморни и нетуморни клетки

Препарат	Клетъчна линия	MTT			NR		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
Цисплатина (Cisplatin)	LSR-SF-SR	н.о.	14.60* (100.00)**	3.20 (29.66)	н.о.	22.13 (92.10)	10.73 (44.73)
	HeLa	н.о.	88.26 (н.о.)	8.00 (100)	н.о.	63.66 (н.о.)	8.93 (85.4)
	MCF-7	8.90 (н.о.)	2.93 (30)	-	н.о.	н.о.	-
	MDA-MB-231	2.43 (8.43)	-	-	-	-	-
	A549	н.о.	11.7 (н.о.)	7.67 (32.00)	24.70 (69.3)	27.30 (н.о.)	55.30 (91.30)
	8MGVA	2.77 (50.46)	0.80 (23.00)	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
	Lep-3	90.00	29.66 (99.33)	35.33 (95.66)	88.33 (н.о.)	29.66 (98.1)	56.66 (н.о.)

В таблицата са представени концентрациите, в които (според проведените МТТ тест и NR метод) цисплатината намалява с 50% (*ЦК₅₀, µM), съответно с 90% (**ЦК₉₀, µM) преживяемостта на третираните клетки;

С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50% при всички изпитвани концентрации (0.1-30 µg/ml); (-) - няма данни

Табл. 26. Йерархични редове на цисплатина и метални комплекси с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) и монезин, отразяващи способността им да намаляват преживяемостта на третираните туморни клетки

Клетъчна линия LSCC - SF- Mc29		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
48	MTT	ZnSalenAu > ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > ZnSalenAg > CaMon = MnMon > CoMon > MonH > MgMon > ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > Salen
72	MTT	ZnSalenAu > ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu = ZnSalenAg > MnMon > CoMon > CaMon > MonH > MgMon > ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > Salen
Клетъчна линия LSR-SF-SR		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
24	MTT	ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > CaMon > MnMon = CoMon > MgMon = ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > MonH > Cisplatin > Salen
48	MTT	ZnSalenAu > ZnSalenAg > ZnSalampyAu > ZnSaldmenAu > CaMon = MnMon > MgMon > MonH > CoMon > ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > Cisplatin > Salen
72	MTT	ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > CaMon = MnMon > Cisplatin > MonH > CoMon > MgMon = ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > Salen
Клетъчна линия HeLa		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
24	MTT	ZnSalenAu > ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > ZnSalenAg > MnMon > MgMon > CoMon = CaMon > ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > MonH > NiMon ≥ ZnMon ≥ Cisplatin > Salen
48	MTT	ZnSalenAu > ZnSaldmenAu ≥ ZnSalampyAu > ZnSalenAg > NiMon = ZnMon ≥ MgMon > CoMon > CaMon > MnMon > MonH > ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > Cisplatin > Salen
72	MTT	ZnSalenAu > ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > NiMon > ZnMon > ZnSalenAg > CoMon > MnMon = CaMon > MonH > MgMon > Cisplatin > ZnSaldmenAg > ZnSalampyAg > Salen
Клетъчна линия MCF - 7		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
24	MTT	ZnSalenAu > ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > ZnSalenAg > ZnSalampyAg > ZnSaldmenAg > NiMon > Cisplatin > MnMon > CoMon > ZnMon > MonH > Salen
48	MTT	ZnSaldmenAu > ZnSalampyAu > ZnSalenAu > ZnSalenAg > CoMon

		$\geq \text{MnMon} > \text{Cisplatin} > \text{MonH} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{NiMon} = \text{ZnMon} > \text{Salen}$
72	МТТ	$\text{ZnSaldmenAu} = \text{ZnSalampyAu} > \text{ZnSalenAu} \geq \text{CoMon} > \text{MonH} > \text{ZnSalenAg} > \text{MgMon} > \text{MnMon} > \text{CaMon} > \text{NiMon} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{ZnMon} > \text{Salen}$
Клетъчна линия MDA-MB-231		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
24	МТТ	$\text{ZnSalenAu} > \text{ZnSaldmenAu} = \text{ZnSalampyAu} > \text{Cisplatin} > \text{ZnSalenAg} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{Salen}$
48	МТТ	$\text{ZnSalenAu} > \text{ZnSaldmenAu} \geq \text{ZnSalampyAu} > \text{ZnSalenAg} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{Salen}$
72	МТТ	$\text{ZnSaldmenAu} = \text{ZnSalampyAu} > \text{ZnSalenAu} > \text{ZnSalenAg} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{Salen}$
Клетъчна линия 8 MGBA		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
48	МТТ	$\text{ZnSalenAu} > \text{Cisplatin} > \text{ZnSalenAg} = \text{ZnMon} = \text{NiMon} > \text{MgMon} > \text{CaMon} > \text{CoMon} = \text{MnMon} > \text{MonH} > \text{Salen}$
72	МТТ	$\text{ZnSaldmenAu} > \text{ZnSalampyAu} = \text{ZnSalenAu} > \text{ZnMon} > \text{NiMon} > \text{ZnSalenAg} = \text{MgMon} = \text{CaMon} > \text{CoMon} > \text{MnMon} > \text{MonH} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{Salen}$
Клетъчна линия A 549		
Време на третиране (ч.)	Метод	Йерархичен ред
48	МТТ	$\text{CaMon} = \text{MgMon} > \text{MnMon} = \text{CoMon} > \text{ZnSalenAu} > \text{ZnSalampyAu} > \text{ZnSaldmenAu} > \text{ZnSalenAg} = \text{MonH} > \text{Cisplatin} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{Salen}$
72	МТТ	$\text{CaMon} = \text{MgMon} = \text{CoMon} > \text{MonH} > \text{MnMon} = \text{ZnSaldmenAu} = \text{ZnSalampyAu} > \text{ZnSalenAu} > \text{ZnSalenAg} = \text{Cisplatin} > \text{ZnSaldmenAg} > \text{ZnSalampyAg} > \text{Salen}$

МТТ = МТТ тест; Йерархичните редове са построени въз основа на концентрациите, в които намаляват преживяемостта на клетките с 50% (ЦК₅₀/μМ). Те започват с проявилото най-висока цитотоксична активност вещество (т.е. това, чиято ЦК₅₀ е с най-ниска стойност).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Едно от най-големите предизвикателства пред съвременната медико-биологична наука е необходимостта от създаване на нови, високоефективни и добре поносими лекарствени препарати за терапия на раковите заболявания. Откриването на антитуморните свойства на цисплатината, а по-късно на карбоплатината и оксалиплатината, насърчи усилията на учените към търсенето и на други метали и метални съединения с изразено антинеопластично действие и отвори нова страница в развитието на фармацевтичната химия. Резултатите не закъсняха и през последните години бяха публикувани множество съобщения за редица метални комплекси, проявяващи обещаваща антитуморна активност *in vitro* и/или *in vivo*, някои от които стигнаха до клинични изпитвания (Galanski et al., 2003; Desoize, 2004; Alexandrova, Nikolova, 2004; Ndagi et al., 2017; Ringhieri et al., 2017).

При изпълнението на задачите, поставени в представения Дисертационен труд, бяха изследвани цитотоксичните свойства при туморни и нетуморни клетки с човешки и животински произход на 12 новосинтезирани съединения: а) шест комплекса на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) (Табл. 1); и б) шест комплекса на Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II) и Zn(II) с монензин (Табл. 2).

Приема се, че определено въздействие (например с химични съединения) оказва токсичен ефект върху култивирани в лабораторни условия клетки ако възпрепятства прикрепването им към подложката, предизвиква промени в морфологията им, потиска растежните им свойства (цитостатично, антипролиферативно действие) или причинява гибелта им (Horvath, 1980).

VI.1. Цитотоксични и антипролиферативни свойства на изследваните метални комплекси

Получените от нас резултати показаха, че всички изпитвани метални съединения значително намаляват преживяемостта и пролиферативната активност на използваните като експериментални модели ракови клетки, предизвиквайки в тях характерни цитопатологични изменения, приложени в определени концентрационни граници - 0.05-20 $\mu\text{g/ml}$ (при комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) и 1 - 25 $\mu\text{g/ml}$ (при металните комплекси на монензина). Ефектът на веществата нараства с увеличаване на концентрацията и времето на третиране.

Антитуморното им действие беше доказано с различни цитотоксични (МТТ, NR, CV), молекулярно-биологични (електрофореза на единични клетки в агарозен гел – т.нар. Кометно изследване), биохимични (определяне на съдържанието на общ белтък в клетката) и цитологични (оцветяване с АО/PI, хематоксилин и еозин) методи, както в “краткосрочни тестове” с монослойни култури (3-72 часа), така и в “дългосрочни изпитвания” с 3D колонии от ракови клетки (колонии-образуващ тест, от 14-16 до 30-45 дена).

Сравнителният преглед на данните (Табл. 26) показва, че активността на част от металните комплекси и от двете групи превъзхожда тази на използвания като положителна контрола антитуморен препарат цисплатина. Това се забелязва най-добре при клетките от линии LSR-SF-SR (сарком у плъх) и HeLa (карцином на шийката на матката у човек), при които определената на 24 и 48 час ЦК₅₀ (в μM) на всички

изследвани съединения (с изключение на лиганда Salen) е по-ниска от тази на цисплатината. За сравнение, при човешките глиобластомни клетки от линия 8MGВА на 24 час от началото на въздействието, единствено ZnSalenAu превъзхожда ефекта на цисплатината.

С най-силно изразено цитотоксично / цитостатично действие се отличават комплексите CaMon (при линия A549) и ZnSalenAu, ZnSalampyAu и ZnSaldmenAu (при останалите моделни клетъчни системи), като активността им превишава тази на цисплатината.

Добре изразената способност на изследваните комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази да понижават клетъчната преживяемост / пролиферативна активност ни насърчи да потърсим отговор на следните два въпроса: 1) Каква е минималната продължителност на въздействието, достатъчно за проява на цитотоксичен ефект; и 2) Обратим ли е ЦТЕ. Проучването, осъществено с клетки от линия LSR-SF-SR (плъши саркомни клетки) показва, че преживяемостта им намалява значително още на 3 - 6 час от началото на третирането (Фиг. 7, Табл. 8). Проведеният кометен тест при алкално рН доказва наличието на едноверижни скъсвания в ДНК на плъшите саркомни клетки култивирани 3 часа в присъствието на изпитваните комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази (Фиг. 15; Табл. 12). Този резултат не е изненадващ, тъй като е известно, че първите белези за настъпваща апоптоза могат да бъдат наблюдавани 2-4 часа след предизвикването ѝ (Saraste, 1999).

Отстраняването на веществата от хранителната среда, в която са култивирани клетките в продължение на 3, 6 и 24 часа и заменянето ѝ с немодифицирана хранителна среда до отчитането на клетъчната преживяемост с МТТ тест на 72 час, показва липса на обратимост на цитотоксичния ефект (Фиг. 8, Табл. 8). Най-вероятно след първоначалния „контакт“ между веществото и клетката, при който се „отключва каскадата на цитотоксичния му ефект“, по-нататъшното му присъствие в хранителната среда не е необходимо. Липсата на „обратимост на ефекта“ на изпитваните съединения и от двете групи се потвърждава и при проведените дългосрочни експерименти – до 14-16 дена (при металните комплекси на монензина) и до 30-45 дена (при металните комплекси с шифови бази). Те показаха, че всички изследвани метални комплекси потискат (макар и в различна степен) способността на раковите клетки да образуват 3D колонии в полутечна среда.

VI.2. Съпоставимост на резултати, получени чрез различни изследователски техники

VII.2.1. Клетъчна преживяемост, установена чрез различни цитотоксични тестове

Съпоставянето на експерименталните данни (напр. Табл. 4-6; Фиг. 9), получени чрез едновременно провеждане при равни условия на различни методи – МТТ тест (МТТ), метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV), а в някои случаи и багрене с трипаново синьо (ТВ), показва наличието на добра съпоставимост между тях. Тук е мястото да припомним, че МТТ, NR, CV и ТВ имат различни мишени и механизми на действие. МТТ тестът се основава на способността на митохондриалния ензим сукцинат дехидрогеназа да редуцира 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиев бромид (МТТ) до формазан и е приет за «златен стандарт» при определянето на цитотоксична активност на вещества. Алкалното багрило неутрално червено прониква в киселите органели на клетката и е показател за

целостта на лизозомите, а вероятно и на апарата на Голджи. Кристал виолетът оцветява ядрото и получените чрез този метод по-високи стойности в някои от случаите може да бъдат обяснени поне отчасти с наличието на двуядрени или делеящи се клетки. Трипановото синьо (както и пропидиевият йодид) прониква в клетките само през нарушена цитоплазмена мембрана.

VI.2.2. Клетъчна преживяемост и съдържание на общ белтък в клетката

Представените в Табл 20 резултати показват добро “съвпадение” между данните за преживяемостта на третираните клетки от линия А549 (установена на 72 час с МТТ тест) и определеното при същите условия общо съдържание на белтък в тях. Все пак, не бива да забравяме, че общото съдържание на белтък в клетките отразява не само броя (респективно преживяемостта и пролиферацията) им, но и интензивността на техния (белтъчен) метаболизъм, както и състоянието, в което се намират. Най-вероятно то се повлиява (в една или друга посока) и от наличието на стресови фактори, какъвто несъмнено е и въздействието с ксенобиотици (в случая метални съединения).

VI.2.3. Клетъчна преживяемост и наличие на увреждания в ДНК молекулите

Корелация се забелязва и при данните за клетъчната преживяемост от една страна и наблюдаваните „комети” (клетъчни ядра с едно- или двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите) от друга (Табл. 12, Фиг. 7). Кометното изследване се отличава с висока чувствителност и е в състояние да „улови” най-ранни промени в целостта на ядрената ДНК, които все още не може да бъдат регистрирани с други цитотоксични тестове. Генотоксичността е присъща на голям брой широко използвани в клиничната онкология антитуморни препарати, сред които цисплатина, доксорубицин, циклофосфамид и блеомицин. Този фактът съвсем не е изненадващ, като се вземе предвид техният механизъм на действие, но насочва вниманието на специалистите към разработване на стратегии за съвместното им прилагане с антимутагенни фактори (Gentile et al., 1998).

VI.2.4. Краткосрочни тестове с 2D монослойни култури и дългосрочни експерименти с 3D колонии от туморни клетки

Доказана беше способността на изпитваните от нас метални комплекси да инхибират способността на туморните клетки да образуват триизмерно растящи (3D) колонии в полутечна среда.

Резултатите за всяка клетъчна линия бяха обобщени чрез провеждане на минимум три независими експеримента.

Получените данни несъмнено представляват интерес, тъй като подсказват устойчив във времето (ефектът на веществата беше проследен в продължение на 14-16 дена при комплексите на монензин, до 30-45 дена при комплексите с ШБ) антитуморен ефект на изследваните метални комплекси. Освен това, триизмерно растящите колонии имат редица предимства пред класическите и широко използвани монослойни култури (Драганов, 2004). В същото време обаче, липсата на 100% инхибиране на растежа на клетките и наличието дори на единични колонии от малък брой клетки, може да е израз на способността на отделни клетки да „избягат” от цитотоксичното действие на изследваните съединения. Известно е, че на подобни устойчиви и/или „спящи“ ракови клетки до голяма степен се дължи появата на рецидиви и метастази, както и последващата смърт на пациентите.

Това е причината, поради която за пълна «липса на колонии» бяха приети случаите, в които не се забелязват или се откриват само единични клетки.

Получените резултати за пореден път доказват, че при изучаване на потенциалната цитотоксична способност на веществата трябва да се използва комплекс от методи, регистриращи промените в различни клетъчни молекули и органели, както и основаващи се на различни принципи. Подобни проучвания биха позволили получаването на по-цялостна представа за цитотоксичното действие на изследваното химично съединение и биха подпомогнали изясняването на неговите мишени в клетката, както и предполагаемия механизъм на действие.

VI.3. Клетъчно-специфичен отговор

При проведените експерименти беше наблюдаван клетъчно специфичен отговор, който се изрази в различна степен на повлияване на отделните клетъчни линии в присъствие на тестираните вещества. Така например, птичите хепатомни клетки от линия LSCC-SF-Mc29 - клон E7 проявиха най-висока чувствителност към цитотоксичното/цитостатичното действие на ZnSalenAg (24 и 72 час, Табл. 11), докато клетките от линия MCF-7 (луминален тип А рак на гърдата у човек) - към ZnSalampyAg, ZnSalampyAu, ZnSaldmenAg и ZnSaldmenAu. Висока чувствителност на птичите хепатомни клетки (LSCC-SF-Mc29) беше наблюдавана и спрямо други вещества – комплекси на метали с аминокиселини, манихови бази, друг тип шифови бази и др. (Александрова, 2008; Абудаллах, 2014). Тя би могла да се дължи и на експресията на съдържащите се в тези клетки *gag-тус* онкоген – известно е, че продуктите на гените от семейство *тус* изпълняват редица (често противоречиви в зависимост от конкретните условия) биологични функции, включително повишаване на чувствителността към апоптоза (Lee, Reddy, 1999). Забелязва се по-високата устойчивост на клетките от линия MDA-MB-231 (тройно негативен рак на гърдата у човек) спрямо тези от линия MCF-7 (луминален тип А рак на гърдата у човек). Най-вероятно това е израз на по-високата агресивност на клетките от линия MDA-MB-231, за които се знае, че съдържат мутантна форма на гена p53. В същото време луминалният тип А рак на гърдата се характеризира с добра прогноза, а клетките от линия MCF-7 съдържат дивия тип p53.

Сравнително висока устойчивост към изпитваните съединения проявиха клетките от недребноклетъчен рак на белия дроб (линия A549). Известно е, че тези клетки експресират циклооксигеназа-2 (COX-2), но не и COX-1 (Tsubouchi et al., 2000). В литературата е съобщено за наличие на евентуална връзка между активността на COX-2 и експресията на гена *mdr-1*, чийто продукт (т.нар. Р-гликопротеин) е отговорен за „изпомпването“ на ксенобиотиците вън от клетката (Sorokin, 2004).

Именно съществуването на клетъчно-специфичен отговор е причината при провеждането на проучвания за определяне на биологична активност на вещества да се използват като моделни системи набор от клетъчни култури, както и различни изследователски методи и техники.

VI.4. Сравняване чувствителността на туморни и нетуморни клетки с еднакъв произход към цитотоксичното действие на изпитваните вещества

Известно е, че едно от основните изисквания към антитуморните препарати е действието им да е насочено главно към злокачествено трансформираните, а не към

нормалните клетки на организма (Ламбев, 2010). Изпитването на потенциалната антитуморна активност на различни новополучени химични агенти остро поставя въпроса за избор на най-подходяща контрола при определяне на селективността на действието им. Безспорно, идеалният вариант е експериментите да бъдат проведени не с една, а с комплекс от контроли, включващ задължително нормални диплоидни клетки от същия тип орган или тъкан, от които са получени съответните туморни линии, както и култури от костно-мозъчни, чернодробни и бъбречни клетки. Осигуряването и използването на подобни култури от човешки произход е силно затруднено, а в някои случаи невъзможно. Ето защо при проведените от нас експерименти бяха използвани нетуморни клетки (ембрионални фибробласти от линия Lер-3), чиято чувствителност беше сравнена с тази на човешките ракови клетки от използваните като моделни системи линии. Прави впечатление, че като цяло човешките нетуморни клетки показват висока чувствителност към цитотоксичното / цитостатичното действие на изпитваните вещества. Обяснението на този феномен може да е свързано с: 1) Различния произход на тези линии – от една страна получени от злокачествени новообразувания клетки, селектирани в хода на туморната прогресия да оцеляват при неблагоприятни условия, а от друга – отличаващи се с висока чувствителност ембрионални клетки; 2) Макар да нямат туморен произход и поведение, клетките от линията Lер-3 (получена от ембрионална тъкан) притежават доста от характеристиките на злокачествено трансформирани клетки, а именно - висока пролиферативна активност, по-ниска степен на диференциация в сравнение с нормалните клетки на зрелите организми, експресия на ембрионални антигени; 3) Напълно е възможно в хода на адаптирането на клетките към лабораторни условия да са настъпили различни биохимични, генетични и морфологични изменения, които да дават отражение върху тяхната (химио)чувствителност. Ембрионалните човешки фибробласти като цяло проявяват по-висока устойчивост по отношение на комплексите на Zn(II)/Ag(I) в сравнение с тези на Zn(II)/Au(I) (Табл. 26). Клетките от линия Lер-3 показват най-ниска чувствителност, сред всички използвани като моделни системи клетъчни култури, по отношение на ZnSaldmenAg (24, 48 и 72 час).

Интерес предствлява сравняването на данните, получени с лииии A549 (недребноклетъчен рак на белия дроб) и Lер-3 (получена от ембрионален бял дроб). Раковите белодробни клетки са по-чувствителни към цитотоксичното действие на ZnSalampyAg (72 час) и ZnSaldmenAg (48 и 72 час) (Табл. 11).

Включването на характеризиращи се с висока цитотоксичност агенти в системи за насочено доставяне (например липозоми и други наночастици) прави възможно приложението им в клиничната практика (Александрова и др., 2013).

VI.5. Разтворимост на вещества / Роля на разтворителя

Изпитваните от нас две групи съединения (комплекси на метали с шифови бази и с монензин) са неразтворими във водна среда, поради което първоначално бяха разтворени в диметилсулфоксид (Табл. 24). От една страна диметилсулфоксидът не е нормална съставка на телесните течности и проявява редица стрнични ефекти. От друга страна обаче е известно, че DMSO спада към т.нар. диференциращи агенти, улавя хидроксилни радикали, проявява локално обезболяващо действие, спомага за преодоляване на токсичната реакция в мястото на венозно вливане на антитуморни препарати при химиотерапия (т.нар. екстравазация) и др. Това е един от най-честите разтворители за различни водно-неразтворими субстанции (Santos et al., 2003).

Във връзка с нашето изследване трябва да бъдат споменати следните факти: 1) Металните комплекси с шифови бази проявяват своята цитотоксична активност в

концентрации ($\leq 20 \mu\text{g} / \text{mL}$), в които съдържанието на разтворителя DMSO е пренебрежимо ниско ($\leq 0.04\%$); 2) В много случаи се установява, че ефективните концентрации (IC_{50} , IC_{90}) на MonH и неговите комплекси са $< 5 \mu\text{M}$, стойност, съответстваща на $\approx 3.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ (в случая на MonH) и $\approx 7 \mu\text{g} / \text{mL}$ (в случаите на металните комплекси с монензин). Простите изчисления показват, че когато изследваните съединения първоначално се разтварят в DMSO до концентрация от $1 \text{ mg} / \text{mL}$, в разтвори, където концентрацията на веществото е $3.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ или $7.25 \mu\text{g} / \text{mL}$, количеството на DMSO е само 0.35% и 0.70% съответно; 3) Водонерастворимите съединения са подходящи за включване в системи за доставяне на лекарства, каквито са липозомите и други типове наночастици - това е една от най-обещаващите нови стратегии за прицелна терапия на раковите заболявания (Александрова и сътр. 2013).

VI.6. Връзка между състава/структурата на веществата и тяхната биологична активност

До момента зависимостта между структурата/състава на изпитваните съединения и тяхната биологична (антитуморна) активност (което изисква приложение на специфични софтуерни програми и специалисти в областта на т. нар. QSAR анализ) не е анализирана в детайли. Проведените от нас експерименти показваха, че: 1) в повечето случаи съдържащите злато (I) комплекси на Salen, Salampy, Saldmen проявяват по-висока цитотоксичност в сравнение със сребърните си аналози. Приложен самостоятелно, лигандът Salen не намалява преживяемостта и/или пролиферативната активност на третираните клетъчни култури; 2) монензинът проявява силно изразена цитотоксична / цитостатична активност, която като цяло е по-ниска от тази на металните комплекси.

Прави впечатление, че комплексите на Zn(II)/Au(I) с различни лиганди (Salen, Salampy, Saldmen) проявяват близък цитотоксичен профил на 72 час при клетките от линии LSCC-SF-Mc29 - клон E7 (Фиг. 6 A), HeLa (Фиг. 6 B) и MDA-MB-231 (Фиг. 6 C). Това най-вероятно е израз на значението на метала (в случая Au(I)) за цитотоксичното действие на изпитваните съединения. За сравнение, комплексите на Zn(II)/Ag(I) с отделните шифови бази проявяват различна активност (Фиг. 6 D, E, F).

При предишни наши проучвания беше изследвана цитотоксичната активност на комплекси на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази, които са производни на 2,6-диформил крезол (diald) – Aery, Ampy и Dmen, при клетки от линии LSCC-SF-Mc29, LSR-SF-SR и HeLa (Абудаллах, 2014). Сравнителният преглед на тези експериментални данни с представените в настоящия дисертационен труд резултати показва, че с най-силно изразена способност да намалява преживяемостта и/или пролиферацията на плъщите саркомни клетки (LSR-SF-SR) се отличава комплексът ZnAmpyAu, а при човешките карциномни клетки от шийката на матката (HeLa) най-висока ефективност проявява ZnSalenAu, следван от ZnSaldmenAu, ZnSalampyAu и ZnAmpyAu (последните два комплекса са с много близка цитотоксична активност).

Друг въпрос, който провокира интерес и заслужава да бъде обсъден, е дали (и как) наличието на биометалния (II) йон влияе върху цитотоксичните / цитостатичните свойства на некоординираната монензинова киселина (монензин). Наличието на някои вариации в антинеопластичните свойства на съединенията (с обща формула $\text{M}(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2$], където $\text{M} = \text{Mg}(\text{II}), \text{Ca}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II})$), които имат сходна химична структура, може да се обясни с поне две причини: 1) влиянието на металните (II) йони - Mg (II), Ca(II) Mn(II), Co(II), Ni(II) и Zn(II) – известно е, че тези елементи изпълняват различни роли в биологичните системи; и 2) клетъчно

специфичният отговор - клетъчните линии, използвани като експериментални модели при изследванията, са получени от различни хистологични типове тумори. Нещо повече, поради така наречения феномен „туморна хетерогенност“, всеки тумор / всяка туморна клетъчна линия притежава индивидуални биологични характеристики и поведение (Alexandrova, 2001). Трябва да се отбележи и това, че изпитваните от нас метални комплекси на монензина проявяват по-силно изразени антитуморни свойства от съответните метални (II) соли (данните не са представени в раздел „Резултати“). В предишни проучвания е установено, че металните комплекси на монензина, които са обект на изследване в представения дисертационен труд, проявяват антимикробно действие по отношение на Грам-положителни аеробни и анаеробни бактерии (Pancheva et al., 2008, 2010a, 2010b), превъзхождащо това на самостоятелно приложена лиганд (монензин).

Получените от нас резултати още веднъж показват, че «биологичното поведение» на металните комплекси се обуславя не просто от присъствието, респ. отсъствието, на определен компонент (метален катион, лиганд), но и от структурата на комплекса и взаимното повлияване на изграждащите го единици.

VI.7. Механизъм на действие

Известни са различни механизми, отговорни за антинеопластичните свойства на веществата: 1) Влияние върху микротубулите; 2) Потискане дейността на топоизомеразите; 3) Алкилиране на ДНК; 4) Понижаване синтеза на ДНК; 5) Потискане на белтъчния синтез; 6) Инхибиране активността на липооксигеназата; 7) Влияние върху имунната система (Ancuceanu, Isidor, 2004).

До момента са описани различни механизми, обуславящи антитуморната активност на златните съединения, а именно: потискане активността на ензима тиоредоксин редуктаза (Trx R); свързване с ДНК молекулата и предизвикване на конформационни промени; увреждане на митохондриите; инхибиране на ензима циклооксигеназа (Nobili et al, 2011).

Известно е, че монензинът ефективно потиска пролиферацията на човешки туморни клетки, което се обяснява (поне в известна степен) със способността му да предизвиква промени в рН и съдържанието на АТФ; ранни митохондриални увреждания и енергиен дефицит; спиране на клетъчния цикъл (във фаза G1 / G1-M) и апоптоза (свързана с изменения в експресията / активността на Вах, каспаза-3, каспаза-8 и митохондриалния трансмембранен потенциал) и / или некроза (Park et al., 2002a, 2002b, 2003a, 2003b, 2003c; Souza et al., 2005).

Напълно възможно е един или повече от описаните механизми да обуславят цитотоксичните / антипролиферативните свойства на изследваните метални комплекси.

Получените от нас резултати показват, че съединенията на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази, както и тези на монензина, представляват интерес за експерименталната онкология и онкофармакология и изследванията в тази област трябва да бъдат продължени и задълбочени. Това не само ще допринесе за изучаването на биологичните активности на шифовите бази, йонофорните антибиотици и техните метални комплекси, но и ще помогне на учените да намерят най-подходящата формула на евентуален бъдещ антитуморен препарат.

VII. ИЗВОДИ

1. Изпитваните съединения предизвикват цитопатологични изменения и значително намаляват преживяемостта и/или пролиферативната активност на използваните като експериментални модели клетъчни култури, като в голяма част от случаите са по-ефективни от широко прилагания в клиничната онкология антитуморен препарат цисплатина. Наблюдаваното въздействие е време- и концентрация-зависимо.
2. Комплексите на Zn(II)/Au(I) с шифовите бази Salen, Salampy и Saldmen имат по-силно изразен цитотоксичен ефект в сравнение с аналогичните комплекси на Zn(II)/Ag(I). Лигандът Salen не намалява преживяемостта / пролиферативната активност на култивираните в негово присъствие клетки.
3. Като цяло, цитотоксичното/антипролиферативното действие на комплексите на метали [Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II)] с монензин превъзхожда това на самостоятелно приложението йонофорен антибиотик.
4. Установено беше наличието на клетъчно-специфичен отговор, който най-вероятно се дължи на различните биологични характеристики на злокачествените новообразувания, от които са получени моделните клетъчни линии, както и на феномена «хетерогенност на туморните клетки».
5. Нетуморните клетки от линия Hep-3 проявяват също висока чувствителност към токсичния ефект на изпитваните съединения.
6. С най-силно изразени цитотоксични / цитостатични свойства се отличават комплексите CaMop (при линия A549) и ZnSalenAu, ZnSalampyAu и ZnSaldmenAu (при останалите моделни клетъчни системи), което е потвърдено в краткосрочни (до 72 часа, с монослойни култури) и дългосрочни (от 14 до 45 дена, с 3D колонии от ракови клетки) експерименти чрез използване на методи с различни клетъчни / молекулни мишени и механизми на действие.

VIII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални приноси

1. Получени са оригинални данни за влиянието на 12 новосинтезирани съединения: шест комплекса на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen) и шест комплекса на Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II) с полиетерния йонофорен антибиотик монензин, върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки с човешки и животински произход.
2. Доказано е, че комплексите CaMop (при линия A549) и ZnSalenAu, ZnSalampyAu и ZnSaldmenAu (при останалите моделни клетъчни системи) проявяват най-силно изразено цитотоксично и цитостатично действие върху култивирани в лабораторни условия злокачествено трансформирани клетки, като активността им превъзхожда тази на широко използвания в съвременната клинична практика антитуморен препарат цисплатина.
3. За пръв път е доказана способността на монензина да потиска растежа на култивирани в лабораторни условия клетъчни линии от трансплантируеми тумори (хепатом у пиле и сарком у плъх), предизвикани с птичи левкозни и саркомни

ретровируси, съдържащи онкогените *v-myc* (при клетъчна линия LSCC-SF-Mc29) и *v-src* (при клетъчна линия LSR-SF-SR), чиито клетъчни аналози участват в патогенезата на голям брой неоплазии у човека и животните.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е антинеопластичната активност на монензина по отношение на човешки клетъчни линии, получени от мултиформен глиобластом и неоплазии на белия дроб, гърдата, шийката на матката и черния дроб.

Приноси с приложен характер

1. Разработен, оптимизиран и приложен е комплексен подход за изучаване на антинеопластичните свойства на комплекси на метали с шифови бази и йонофорни полиетерни антибиотици върху клетъчни линии, получени от човешки и животински тумори с различна етиология и произход, включващ методи с различни молекулни/клетъчни мишени и механизми на действие, краткосрочни и дългосрочни експерименти, монослойни (2D) култури и триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

IX. Резюме

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

на тема: „Влияние на комплекси на метали с различни лиганди върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки:

на задочен докторант – асистент Таня Данчева Живкова
ръководител: доц. Радостина Ивайлова Александрова, доктор
секция „Патология”, Институт по експериментална морфология, патология и
антропологи с музей – БАН

Ракът е една от водещите причини за заболяемост и смърт в световен мащаб, като според данни на СЗО през 2012 г. са диагностицирани 14.1 милиона нови случаи, а неоплазии са причинили смъртта на 8.2 милиона души. Доскоро смятани за втората по честота причина за настъпване на смърт или трайно инвалидизиране след сърдечно-съдовите заболявания, според доклад на Американското дружество по онкология от 2010 г. злокачествените новообразувания вече заемат първото място. Очаква се смъртните случаи от рак по света да продължат да нарастват, като ще достигнат 13.1 милиона през 2030 г. (увеличение с около 70%). Сред основните предизвикателства, затрудняващи успешното им лечение са хетерогенността на туморните клетки, (множествената) лекарствена устойчивост, страничните и токсични ефекти, наличието на биологични бариери (например кръвно-мозъчната бариера), раковите стволови клетки. Това налага търсенето (и въвеждането) на нови агенти с висока антитуморна активност и добра биологична поносимост.

Целта на дисертационния труд беше да се изследва влиянието върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни клетки с човешки и животински произход на две групи новосинтезирани съединения: 1) Комплекси на Zn(II)/Au(I) и Zn(II)/Ag(I) с шифови бази (Salen, Salampy, Saldmen); 2) Комплекси на полиетерния йонофорен антибиотик монензин (Mon) с обща формула $M(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2$, където $M = \text{Mg}(\text{II}), \text{Ca}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II})$. Като моделни системи бяха използвани 1) Клетъчни линии, получени от едни от най-често срещаните и/или характеризиращи се с висока степен на злокачественост / агресивност неоплазии при човек: недребноклетъчен рак на белия дроб (A 549), ER⁺ PR⁺ HER2⁻ луминален тип А рак на гърда (MCF-7), ER⁻ PR⁻ HER2⁻ тройно негативен рак на гърда (MDA-MB-231), карцином на шийката на матката (HeLa), хепатоцелуларен карцином (HepG2) и мултиформен глиобластом (8MGBA); 2) Клетъчна линия A431 - плоскоклетъчен карцином при човек, и получени от нея субклонове с повишена експресия на гени, отговорни за множествена лекарствена устойчивост – *abcb1 (mdr1)*, *abcc1 (mrp1) or abcg2 (bcrp)*; 3) Линии LSR-SF-SR (сарком у плъх, предизвикан със саркомния вирус на Раус, щам Шмидт-Рупин - SR-RSV) и LSCC-SF-Mc29 (хепатом у пиле, предизвикан с миелоцитоматозни вирус Mc29), чиито клетки съдържат / експресират съответно онкогените *v-src* и *v-myc*; 4) Клетъчна линия Lep-3 - нетуморни ембрионални фибробластоидни клетки от бял дроб на човек.

Проучванията бяха проведени чрез методи с различни клетъчни/молекулни мишени и механизми на действие, като: МТТ тест, метод за включване на неутрално червено, багрене с кристалвиолет, оцветяване с трипаново синьо, метод на Брадфорд, двойно оцветяване с хематоксилин и еозин, двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид, електрофореза на единични клетки в агарозен гел („Кометно

изследване”) и Annexin V/FITC метод (краткосрочни тестове за 3-72 часа, с монослойни култури) и колонии-образуващ метод (дългосрочен тест – до 14 - 45 дена, с 3D колонии от ракови клетки).

Получените от нас резултати показваха, че: 1) Металните комплекси, приложени в концентрации от 0.05 - 20 $\mu\text{g/ml}$ значително намаляват преживяемостта и/или пролиферативната активност на туморните клетки, както и способността им да образуват 3D колонии в полутечна среда. Наблюдаваният ефект е време- и концентрация-зависим; 2) Комплексите на Zn(II)/Au(I) с шифовите бази Salen, Salampy и Saldmen имат по-силно изразен цитотоксичен ефект в сравнение с аналогичните комплекси на Zn(II)/Ag(I). Лигандът Salen не намалява преживяемостта / пролиферативната активност на култивираните в негово присъствие клетки; 3) Като цяло, самостоятелно приложеният йонофорен антибиотик монензин проявява по-слабо изразено цитотоксично/антипролиферативно действие от неговите метални комплекси; 4) Установено беше наличието на клетъчно-специфичен отговор, който най-вероятно се дължи на различните биологични характеристики на злокачествените новообразования, от които са получени използваните като моделни системи клетъчни линии, както и на феномена "хетерогенност на туморните клетки"; 5) Нетуморните клетки от линия Hep-3 проявяват също висока чувствителност към токсичния ефект на изпитваните съединения; 6) С най-силно изразени цитотоксични / цитостатични свойства се отличават комплексите CaMon (при линия A549) и ZnSalenAu, ZnSalampyAu и ZnSaldmenAu (при останалите моделни системи).

X. Summary

of PhD thesis

„Influence of metal complexes with different ligands on viability and proliferation of cancer cells”

PhD student: Tanya Dancheva Zhivkova, MSc

Supervisor: Assoc. Prof. Radostina Ivaylova Alexandrova, MSc, PhD

Department of Pathology, Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum, Bulgarian Academy of Sciences

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide with approximately 14 million new cases and 8.2 death cases in 2012, according to the WHO. Malignant neoplasms are the second cause of death, after heart diseases, and it is estimated to rank first beginning with 2010 (American Cancer Society, 2011). World cancer deaths are expected to rise, reaching 13.1 million in 2030 (about 70% increase). Among the main obstacles preventing successful treatment of cancer diseases are tumor heterogeneity phenomenon, (multi) drug resistance of cancer cells, side and toxic effects, the presence of biological barriers (for example blood brain barrier), cancer stem cells. That is why there is an urgent need to search for effective new anticancer agents with good biological tolerance.

The aim of our study was to evaluate the effect of 12 newly synthesized metal complexes with different ligands on viability and proliferation of cultured animal and human cells.

Two groups of compounds were investigated: i) Zn(II)/Au(I) and Zn(II)/Ag(I) complexes with Schiff bases (Salen, Salampy or Saldmen) and ii) monensic acid (Mon) and its biometal(II) complexes $[M(\text{Mon})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ($M = \text{Mg, Ca, Mn, Co, Ni, Zn}$).

As model systems we used: i) some of the most common and/or aggressive human malignancies: non small cell lung cancer (A549), ER⁺ PR⁺ HER2⁻ luminal A breast cancer (MCF-7), triple negative breast cancer (MDA-MB-231), cervical carcinoma (HeLa), liver cancer (HepG2) and glioblastoma multiforme (8 MGBA); ii) drug sensitive and resistant cells - human squamous cell carcinoma cell line A431 and its clones expressing *abcb1 (mdr1)*, *abcc1 (mrp1)* or *abcg2 (bcrp)* gene; iii) virus-transformed rat sarcoma (LSR-SF-SR) and chicken hepatoma (LSCC-SF-Mc29) cells, that contain / express v-src or v-myc oncogene respectively. The non-tumor human embryonic (Lep 3) cells were also tested. The investigations were carried out by short-term experiments (3 h – 72h, with monolayer cultures) and long term experiments (up to 40-45 days, with 3D colonies of cancer cells) using methods with different molecular/cellular targets and mechanisms of action such as MTT test, neutral red uptake cytotoxicity assay, crystal violet staining, trypan blue dye exclusion technique, Bradford protein assay, double staining with hematoxylin and eosin, double staining with acridine orange and propidium iodide, single cell gel electrophoresis (Comet assay), annexin V/FITC assay and 3D colony-forming method.

The results obtained reveal that applied at concentrations of 0.05 to 20 µg/ml for 3 - 72h the examined metal compounds decreased significantly viability and proliferation of the treated cells as well as their ability for 3D growth in semisolid medium in a time- and concentration-dependent manner. In most cases their activity is higher than that of one of the most widely used in clinical practice antitumor agent cisplatin.

Zn(II)/Au(I) complexes with Schiff base ligand Salen, Salampy and Saldmen were more effective cytotoxic and cytostatic agents than Zn(II)/Ag(I) complexes with the same ligands. The ligand Salen did not show cytotoxic / antiproliferative potential.

Generally, the metal [Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II)] complexes of monensin exhibit more pronounced cytotoxic / antiproliferative activity as compared to the ionophore antibiotic, applied independently.

Cell specific response was observed due to different origin of cells, histological type of cancers and tumor heterogeneity.

Non-tumor Lep 3 cells were also sensitive to the cytotoxic action of the compounds that could be explained by their embryonic nature and high proliferation rate.

CaMon (in A549 cell line) and ZnSalenAu, ZnSalampyAu and ZnSaldmenAu (in the other model systems) showed the most pronounced cytotoxic/antiproliferative properties.

XI. Списък на цитираната литература

1. Абудаллах А. Влияние на метални съединения (Zn, Zn/Au, Zn/Ag, V) върху растежа на трансформирани с вирус туморни клетки *in vitro* и *in vivo*. Дисертационен труд за присъждане на ОНС «Доктор», София, 2014 г.
2. Александров, И. Механизми на регресия на саркоми, индуцирани с вирус на Раус”. Дисертационен труд за присъждане на научната степен Доктор на науките, София, 1996 г.
3. Александрова, Р. Изолиране, характеризиране и приложение на постоянни клетъчни линии от предизвикан с вирус Mc29 трансплантируем хепатом у пиле. Дисертационен труд за присъждане на ОНС «Доктор», София, 2008 г.

4. Александрова Р., Т. Живкова, Л. Дякова, П. Митренга, М.А. Мазгалджи, О. Александров, Р. Стоянова, В. Кульчицкий. Нанотехнологиите в диагностиката и терапията и на раковите заболявания. *Studia Oncologica. Reviews in oncology*, 2013, 2, 27-50. Издателство „Парадигма”, ISSN: 1313-7115.
5. Драганов, М. Клетъчни култури. Теория и техники. ИК „ВАП”, 2004.
6. Ламбев, Ив., К. Симеонова. Противотуморни антинеопластични лекарства. Фармакология – учебник за студенти по медицина. Ред. Ив. Ламбев и Н. Бяджиева. Второ издание. Медицинско издателство „Арсо”, София, 2010, стр. 478-486.
7. Alexandrova R. Tumour heterogeneity. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 4/6, 2001, 57-67.
8. Alexandrova R., E. Nikolova. Metals as potential anticancer agents. *J. Bulg. Acad. Sci.*, 2004, 1, 19-23. ISSN: 0007-3989
9. Alexandrova R., T. Zhivkova, M. Alexandrov, G. Miloshev, M. Georgieva, I. Pantcheva, M. Mitewa. Cytostatic and cytotoxic properties of monensic acid and its biometal (II) complexes against human tumor / non-tumor cell lines. *Cent. Eur. J. of Chem.*, 10 (5), 2012, 1464 – 1474.
10. Ancuceanu, R.V., V. Istudor. Pharmacologically active natural compounds for lung cancer. *Altern. Med. Rev.*, 9, 2004, 402-419.
11. Desoize, B. Metals and metal compounds in cancer treatment. - *Anticancer Res.*, 24, 2004, 3-18.
12. Galanski M., V.B. Arion, M.A.Jakuper, B.K.Keppler. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr. Pharm. Des.*, 9, 2003, 2078-2089.
13. Gentile J.M., S. Rahimi, J. Zwiesler, G. J. Gentile, L. R. Ferguson. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, 402 (1-2), 289-298.
14. Horvath S. Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. *Toxicology*, 1980, 16, 59 -66.
15. Lee C. M., E.P. Reddy. The v-myc oncogene. *Oncogene*, 1999, 18, 2997 – 3003.
16. Ndagi U., N. Mhlongo, M.E. Soliman. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2017, 11, 599-616.
17. Nobili S., E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2011, 11(10), 940-52.
18. Pantcheva I. N., M. Io. Mitewa, W. S. Sheldrick, I. M. Opperl, R. Zhorova, P. Dorkov. First divalent metal complexes of the polyether ionophore Monensin A: X-ray structures of [Co(Mon)₂(H₂O)₂] and [Mn(Mon)₂(H₂O)₂] and their properties. *Curr. Drug Discov. Techn.*, 2008, 5(2), 154-161.
19. Pantcheva I. N., R. Zhorova, M. Mitewa, S. Simova, H. Mayer-Figge, W. S. Sheldrick. First Solid State Alkaline-Earth Complexes of Monensic A Acid: X-ray Crystal Structure of [M(Mon)₂(H₂O)₂] (M = Mg, Ca), Spectral Properties and Cytotoxicity against Gram-Positive Bacteria. *BioMetals*, 2010a, 23(1), 59-70.
20. Pantcheva I. N., J. Ivanova, R. Zhorova, M. Mitewa, S. Simova, H. Mayer-Figge, W. S. Sheldrick. Nickel(II) and Zinc(II) Dimonensinates: Crystal Structure, Spectral Properties and Bactericidal Activity. *Inorg. Chim. Acta*, 2010b, 363, 1879-1886.
21. Park W.H., E.S. Kim, C.W. Jung, B.K. Kim, and Y.Y. Lee, Monensin-mediated growth inhibition of SNU-C1 colon cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Intern. J. Oncology*, 2003a, 22(2), 377-382.

22. Park W.H., C.W. Jung, J.O. Park, K. Kim, W.S. Kim, Y.H. Im, M.H. Lee, W.K. Kang, and K. Park, Monensin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest or apoptosis. *Intern. J. Oncology*, 2003b, 22(4), 855-860.
23. Park W.H., E. S. Kim, B. K. Kim, and Y. Y. Lee, Monensin-mediated growth inhibition in NCI-H929 myeloma cells via cell arrest and apoptosis, *Intern. J. Oncology*, 2003c, 23(1).
24. Park W.H., J. G. Seol, E. S. Kim, W. K. Kang, Y. H. Im, C. W. Jung, B. K. Kim, and Y. Y. Lee, Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Brit. J. Haem.*, 2002b, 119(2), 400-407.
25. Park W.H., M.S. Lee, K. Park, E.S. Kim, B.K. Kim, and Y.Y. Lee, Monensin-mediated growth inhibition in acute myelogenous leukemia cells via cell cycle arrest and apoptosis, *Intern. J. Cancer*, 2002a, 101(3), 235-242.
26. Perzelová A., I. Máčiková , P. Mráz , I. Bízik, J. Steno. Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. *Neoplasma*, 1998,45(1), 25-29.
27. Ringhieri P., G. Morelli, A. Accardo. Supramolecular Delivery Systems for Non-Platinum Metal-Based Anticancer Drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2017, 34(2):149-183. doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2017016936.
28. Santos N.C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva, and C. Saldanha, “Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects,” *Biochem. Pharm.*, 2003, 65 (7), pp. 1035-1041.
29. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.*, 1999, 24(3),189-95.
30. Sorokin A. Cyclooxygenase-2: potential role in regulation of drug efflux and multidrug resistance phenotype. *Curr. Pharm. Des.*, 2004, 10(6), 647-57.
31. Souza A.C., Mitochondrial damage as an early event of monensin-induced cell injury in cultured fibroblasts L929. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2005, 52(5), 230-7.
32. Tsubouchi Y., S. Mukai, Y. Kawahito, R. Yamada, M. Kohno, K. Inoue, H. Sano. Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.*, 20(5A), 2000, 2867-72.

ХІІ. Списък с научни публикации по темата на дисертационния труд

I. Публикации в чуждестранно научно списание, в чуждестранен тематичен сборник или в наше научно списание с международен статут

1. Alexandrova R., **T. Zhivkova**, M. Alexandrov, G. Miloshev, M. Georgieva, I. Pantcheva, M. Mitewa. Cytostatic and cytotoxic properties of monensic acid and its biometal (II) complexes against human tumor / non-tumor cell lines. *Cent. Eur. J. of Chem.*, 10 (5), 2012, 1464 – 1474, ISSN 1895-1066 print, ISSN 1644-3624 online, **IF 1.329 (2013)**

2. Pantcheva I., R. Alexandrova, **T. Zhivkova**, M. Mitewa. In vitro activity of biometal(II) complexes of monensin against virus-induced transplantable animal tumors. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **27** (2), 2013, 3703 – 3708, ISSN 1310-2818, **IF 0.379 (2013)**

II. Публикации на доклад в пълен текст в материали от българско научно мероприятие

1. Alexandrova, R., **T. Zhivkova**, A. Abudalleh, L. Dyakova, G. Marinescu, D.-C. Culita, L. Patron. The many faces of gold compounds. In the Proceedings of Xth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and natural Products, 17 – 19 November, 2015, Sofia, Bulgaria, p. 67-71. Edited by: Dimitar Kadiysky and Radostina Alexandrova. ISSN 2367-5683
2. Александрова, Р., А. Абудалех, **Т. Живкова**, Л. Дякова, Б. Андонова-Лилова, О. Александров. Накратко за среброто и неговата биологична активност. Сборник с публикации от VII^{ма} Работна среща на тема: „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания”, 16-18 май 2016 г., София, България, стр. 154-164. Под редакцията на: Dimitar Kadiysky and Radostina Alexandrova. ISSN 1314-9091. <http://www.iempam.bas.bg/>

III. Публикации на доклад в пълен текст в материали от чуждестранно научно мероприятие или в материалите на международно научно мероприятие у нас

1. **Zhivkova T.**, D. Salkova D., I. Pantcheva-Kadreva, M. Mitewa, R. Alexandrova. What do we (not) know about monensin? The VIth Edition of the Symposium with International Participation “New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials”- 8-9 November 2012, Timisoara, Romania, pp. 11-15. Edited by: Simona Gabriela Muntean and Ramona Tudose. ISSN 2065 - 0760

XIII. Цитирания

Публикация:

Alexandrova R., **T. Zhivkova**, M. Alexandrov, G. Miloshev, M. Georgieva, I. Pantcheva, M. Mitewa. Cytostatic and cytotoxic properties of monensic acid and its biometal (II) complexes against human tumor / non-tumor cell lines. *Cent. Eur. J. of Chem.*, 10 (5), 2012, 1464 – 1474, ISSN 1895-1066 print, ISSN 1644-3624 online, **IF 1.329 (2013)**

Цитирана от:

1. Smithrud, David., Xiaoyang Wang, Pheruza Tarapore, Shuk-mei Ho. Crown Ether Host-Rotaxanes as Cytotoxic Agents. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2013, 4 (1), pp 27–31.
2. Fukushima T., Taniguchi E, Yamada H., Kato K., Shimizu A., Nishiguchi Y., Onozato M., Ichiba H., Azuma Y. Anti-proliferative effect of Fe(III) complexed with 1-(2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)-4-aminosalicylhydrazone in HepG2 cells. *BioMetals*, 2015, 28(4), 669-677.
3. Amolegbe, S.A. C.A. Akinremi, S. Adewuyi, A. Laval, M.O. Bamigboye, J.A. Obaleye. Some nontoxic metal-based drugs for selected prevalent tropical pathogenic diseases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2017, 12 (1), 1-18.

Публикация:

Pantcheva I., R. Alexandrova, **T. Zhivkova**, M. Mitewa. In vitro activity of biometal(II) complexes of monensin against virus-induced transplantable animal tumors. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **27** (2), 2013, 3703 – 3708, ISSN 1310-2818, **IF 0.379** (2013)

Цитирана от:

4. Amolegbe, S.A. C.A. Akinremi, S. Adewuyi, A. Laval, M.O. Bamigboye, J.A. Obaleye. Some nontoxic metal-based drugs for selected prevalent tropical pathogenic diseases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2017, 12 (1), 1-18.

XIV. Списък на изнесени научни съобщения по темата на дисертационния труд

I. Доклад пред научен семинар на Първичното научно звено

Участие в Научен семинар II по проект BG051PO001-3.3.06-0048/04.10.2102 г. – ОП „Развитие на човешките ресурси” :

Тема на доклада: Монензинът и неговите метални комплекси – нова надежда за лечение на раковите заболявания?

II. Доклад пред научни мероприятия в страната

1. Alexandrova, R., **T. Jivkova**, D. Ivanov, P. Borisova, I. Pancheva, M. Mitewa. Monensin: effect on viability and proliferation of human tumor cells. Anniversary Scientific Conference 15 Years Trakya University (with International participation). 21 May 2010, Stara Zagora, Bulgaria – доклад
2. **T. Zhivkova**, R. Alexandrova, M. Aleksandrov, M. Georgieva, G. Miloshev, I. Pantcheva, M. Mitewa. Monensin and its complexes: a new chance to fight cancer. VIIIth National Oncology Congress with International Participation, November 10-13th, 2011, Sofia, Bulgaria – доклад
3. **Zhivkova T.**, Dyakova L., Farkas G., Marinescu G., Culita D.-C., Patron L., Alexandrova R. Effect of Zn/Ag and Zn/Au complexes with Schiff bases Saldmen and Salampy on viability and proliferation of human lung and breast cancer cells. First Youth Biomedical Workshop with International Participation “Experimental Oncology and Tissue Engineering”, 28-29 July, 2015, Sofia, Bulgaria - доклад
4. Alexandrova R., **T. Zhivkova**, A. Abudalleh, L. Dyakova, B. Andonova-Lilova, D. Ivanov, R. Kalfin, M. Kirilova, G. Miloshev, M. Alexandrov, I. Pantcheva, M. Mitewa. Briefly about antitumor properties of the veterinarian antibiotic monensin. Научна конференция с международно участие „Традиции и съвременност във ветеринарната медицина”, Факултет по ветеринарна медицина към Лесотехническият университет, 24-25 ноември 2011, София, България - постер
5. **Zhivkova T.D.**, Dyakova L.V., Mitrenga P., Georgieva M., Miloshev G., Culita D.-C., Marinescu G., Patron L., Alexandrova R. Zn/Au and Zn/Ag complexes with salen decrease viability and proliferation of human tumor cells. The VIIth Meeting with International Participation, Vaccines, Viruses and Contemporary Cancer Treatment, 25-26 October 2013, Telecommunication University Endoscopic Center, Medical University - Pleven, Bulgaria - постер

6. Abudalleh A., **Zhivkova T.**, Dyakova L., Vladov I., Alexandrov M., Alexandrova R.. Double staining with acridine orange and propidium iodide in oncopharmacology investigations. First Youth Biomedical Workshop with International Participation “Experimental Oncology and Tissue Engineering”, 28-29 July, 2015, Sofia, Bulgaria. - постер
7. Alexandrova R., **Zhivkova T.**, Dyakova L., Abudalleh A., Dinev D., Kalfin R., Marinescu G., Culita D.-C., Patron L., Tudose R., Costisor O., Nemet K.. Metal complexes in the fight against drug resistant cancer cells. XIth Congress of Bulgarian Society of Physiological Sciences with International Participation, 57 (3), 9-11 October 2015, Plovdiv, Bulgaria, Folia Medica, p. 51-52. ISSN 0204-8043 (print); 1314-2143 (online) - постер
8. R. Alexandrova, **T. Zhivkova**, L. Dyakova, I. Pantcheva, M. Miteva. Effect of monensin on viability and proliferation of virus-transformed tumor cells. Vth Workshop on Biological Activity of Metals and Metal Compounds with Satellite Symposium “Advanced Matherials in Biology and Medicine: Challenges and Perspectives, 24-25 November, 2010, Sofia, Bulgaria, p. 6-7; <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
9. **Живкова Т.**, Р. Александрова, И. Панчева, М. Митева. Monensin against cancer. VIth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, November 28-30, 2011, Sofia, Bulgaria, p. 57 <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
10. **Tanya Zhivkova**, Lora Dyakova, Pavel Mitrenga, Radostina Alexandrova, Dana-Cristina Culita, Daniela Marinescu, Luminita Patron. Multidrug resistant cell lines as experimental models in biomedical research. Vth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 7-9 April 2014, Sofia, Bulgaria. – доклад; ISSN: 1314-9091. <http://www.iempam.bas.bg/>
11. **T. Zhivkova**, A. Abudalleh, L. Dyakova, P. Mitrenga, R. Kalfin, G. Semovski, M. Alexandrov, D. Culita, G. Marinescu, L. Patron, R. Alexandrova. Application of multidrug resistant tumor cells in the search of new agents with promising anticancer activity. VIth Морфологични дни, 6-8 юни 2014, София, България. - доклад
12. Radostina I. Alexandrova, P. Mitrenga, Reni E. Kalfin, **Tanya D. Zhivkova**, Lora V. Dyakova, Elena-Maria Mosoarca, Ramona Tudose, Otilia Costisor, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Katalin Nemet. Cytotoxic and antiproliferative effects of metal complexes in multidrug resistant cells. VIIth Национален Конгрес по Фармакология, Плевен, България, 17-19 октомври, 2014. - доклад
13. Radostina Alexandrova, **Tanya Zhivkova**, Abdulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Pavel Mitrenga, Ivo Grabchev, Ogo A. Ogo, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu. In the world of zinc. IXth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, 26-28 November 2014, Sofia, Bulgaria. ISSN 2367-5683. <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
14. Radostina Alexandrova, Lora Dyakova, **Tanya Zhivkova**, Pavel Mitrenga, Marin Alexandrov, Reni Kalfin, Ramona Tudose, Elena-Maria Mosoarca, Otilia Costisor, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Katalin Nemet Katalin Nemet, Jan Stenvang. Metal complexes and drug resistant cancer cells. IXth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, 26-28 November 2014, Sofia, Bulgaria; ISSN 2367-5683. <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
15. **Tanya Zhivkova**, Lora Dyakova, Abedulkadir Abudalleh, Radostina Alexandrova. Cell cultures as experimental models for lung cancer. VIth Workshop on Experimental

- Models and Methods in Biomedical Research, 12-14 May 2015, Sofia, Bulgaria; ISSN: 1314-9091, <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
16. Elena Manlieva, **Tanya Zhivkova**, Lora Dyakova, Reneta Toshkova, Abedulkadir Abudalleh, Desislav Dinev, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Four newly synthesized complexes with Schiff bases – influence on viability and proliferation of virus-transformed cancer cells. VIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 12-14 May 2015, Sofia, Bulgaria; ISSN: 1314-9091, <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
 17. **Zhivkova T.**, Abudalleh A., Dyakova L., Georgieva M., Miloshev G., Simeonov N., Patroniou G., Pantcheva I-K., Mitewa M., Alexandrova R.. Biometal complexes decrease significantly viability and proliferation of human cervical cancer cells. Vth Юбилейна научна конференция на тема: „Комплексно поведение при тумори в малкия таз”, 19-21 юни, 2015, Пранец, Oncologia, 2, 2015, p. 7, ISSN: 0369-7649 - доклад
 18. **Tanya Zhivkova**, Radostina Alexandrova. Gold compounds as antitumor agents. Xth Workshop on Biological Activity of Metals, Metal Compounds and Natural Products, 17-19 November 2015, Sofia, Bulgaria; ISSN: 2367-5683, <http://www.iempam.bas.bg/> - доклад
 19. Александрова Р., Б. Андонова- Лилова, **Т. Живкова**, А. Абудалех, Ж. Коюмджян- Иванова, Л. Дякова, Д. Иванов., Р. Калфин, М. Александров, И. Пантчева-Къдрева, М. Митева, О. Costisor, L. Patron. Evaluation of cytotoxic activity of metal compounds by combined administration of different experimental methods. Семинар по екология, 28 – 29 април 2011, София, България - постер.
 20. **Tanya Zhivkova**, Pavel Mitrenga, Lora Dyakova, Milena Georgieva, George Miloshev, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Effect of Zn/Au and Zn/Ag Complexes with Salen on viability and proliferation of virus-transformed animal and human cells. The VIIIth Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products”, Sofia, Bulgaria, 27-29 November 2013; ISSN: 2367-5683, <http://www.iempam.bas.bg/> - постер.
 21. **Tanya D. Zhivkova**, Abdulkadir M. Abudalleh, Lora V. Dyakova, Pavel Mitrenga, Milena Georgieva, George A. Miloshev, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Radostina I. Alexanderova. Zn/Au and Zn/Ag complexes with promising antitumor activity in vitro. VIIth Национален конгрес по фармакология, Плевен, България 17-19 октомври 2014 - постер.
 22. **Tanya Zhivkova**, Desislav Denev, Pavel Mitrenga, Abdulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Marin Alexandrov, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Effect of Zn/Au and Zn/Ag with Saldmen and Salampy on viability and proliferation of human tumor cell lines. IXth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, 26-28 November 2014, Sofia, Bulgaria; ISSN: 2367-5683, <http://www.iempam.bas.bg/> - постер.
 23. **Tanya Zhivkova**, Delka Salkova, Radostina Alexandrova. Recent data about biological activity of Monensin. IXth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, 26-28 November 2014, Sofia, Bulgaria; ISSN: 2367-5683, <http://www.iempam.bas.bg/> - постер.
 24. Radostina Alexandrova, **Tanya Zhivkova**, Abedulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Desislav Dinev, Boyka Andonova-Lilova. Briefly about some cytotoxicity assays. VIth

- Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 12-14 May 2015, Sofia, Bulgaria; ISSN: 1314 – 9091, <http://www.iempam.bas.bg/> - постер.
25. Alexandrova R., Abudalleh A., **Zhivkova T.**, Dinev D., Simeonov N., Gavrilov I., Marinescu G., Culita D.-C.. Zn/Ag and Zn/Au with 2,6 – diformyl-p-cresol or Salen complexes significantly reduce viability and proliferation of human breast cancer cells. Anniversary Scientific Conference “Science for Health”, 20-22 May 2015, Plovdiv. Folia Medica, Medical University – Plovdiv, 57(1), p. 162. ISSN: 0204-8043(Print); 1314-2143(Online) - постер.
 26. **Zhivkova T.**, Pantcheva I, Mosoarca E.-M., Tudose R., Costisor O., Nemet K., Mitewa M., Alexandrova R.. Metal complexes decrease viability and proliferation of cultured human non-small cell lung cancer cells. Anniversary Scientific Conference “Science for Health”, 20-22 May 2015, Plovdiv. Folia Medica, Medical University – Plovdiv, 57(1), p. 163. ISSN: 0204-8043(Print); 1314-2143(Online) - постер.
 27. **Zhivkova T.**, Dyakova L., Georgieva M., Miloshev G., Marinescu G., Culita D.-C., Patron L., Alexandrova R. Influence of Zn/Ag and Zn/Au complexes with Schiff bases Salampy and Saldmen on viability and proliferation of virus-transformed rat sarcoma cells. 55 Years Anniversary Conference of the Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, 5-6 October 2015, Sofia, Bulgaria, p. 78. - постер.
 28. Radostina I. Alexandrova, **Tanya Zhivkova**, Abdulkadir M. Abudalleh, Lora Dyakova, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron. The many faces of gold compounds. Xth Workshop on Biological Activity of Metals, Metal Compounds and Natural Products, 17-19 November 2015, Sofia, Bulgaria; ISSN: 2367-5683, <http://www.iempam.bas.bg/> - постер.
 29. **Zhivkova T.**, Dyakova L., Georgieva M., Abudalleh A., Toshkova R., Miloshev G., Marinescu G., Culita D.-C., Manlieva E., Patron L., Alexandrova R.. Zn/Ag and Zn/Au complexes with Salampy and Saldmen significantly decrease viability and proliferation of animal virus-transformed cancer cells. Младежка научна конференция „Климентови дни”, 18-20 ноември 2015 г., Биологически факултет, СУ „Климент Охридски”, София, България, Сборник с резюмета, стр. 47 - постер.
 30. Радостина Александрова, Абдулкадир Абудаллах, **Таня Живкова**, Лора Дякова, Бойка Андонова-Лилова, Десислав Динев, Орлин Александров. Накратко за среброто и неговата биологична активност. VIIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 16-18 May, 2016, Sofia, Bulgaria; ISSN: 1314-9091, <http://www.iempam.bas.bg/> - постер.
 31. **Tanya Zhivkova**, Radoslav Fedeev, Lora Diakova, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Zn/Ag and Zn/Au complexes with Schiff bases as effective cytotoxic and antiproliferative agents against virus-transformed rat sarcoma cells. Първи младежки семинар “Пъстрият свят на биомедицината”, 25 май 2016 г., София, България - доклад
 32. **Tanya Zhivkova**, Vladimir Veselinov, Lora Dyakova, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Ramona Tudose, Luminita Patron, Otilia Costisor, Radostina Alexandrova. Metal complexes with different ligands suppress growth of sensitive and multidrug resistant cancer cells. Първи младежки семинар “Пъстрият свят на биомедицината”, 25 май 2016 г., София, България - доклад
 33. **Tanya Zhivkova**, Lora Dyakova, Pencho Beykov, Georgi Semovski, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Zn/Ag and Zn/Au complexes with Schiff bases inhibit 3D growth of cancer cells. Third

Youth Biomedical Workshop with International Participation “Biomedical World”, January 30 - 2 February 2017, Sofia, Bulgaria - доклад

34. **Таня Живкова**, Лора Дякова, Милена Георгиева, Георги Милошев, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова. Влияние на комплекси на метали с различни лиганди (йонифорни антибиотици, шифови бази) върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки. Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология - нови хоризонти”, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев”, 6-7 април 2017 г., София, България, стр. 38 - доклад

III. Доклад пред научни мероприятия в чужбина или пред международно научно мероприятие у нас

1. **Zhivkova T., R.** Alexandrova, M. Alexandrov, M. Georgieva, G. Miloshev, I. Pantcheva-Kadreva, M. Mitewa. Metal complexes of monensin decrease viability and proliferation of cultured human and animal tumor cells. 3rd International Student Medical Congress, 21-24 June 2011, Kosice, Slovak Republic, Book of Abstracts, p.132 – доклад
2. Alexandrova R., **T. Zhivkova**, L. Dyakova, I. Pantcheva-Kadreva, M. Mitewa. Monensin and its metal complexes as potential anticancer agents. The 12th edition of Timisoara’s Academic Days, Chemistry Symposium, 26-27 May 2011, Timisoara, Romania. – доклад
3. Alexandrova R., **Zhivkova T.**, A. Abudalleh, Dyakova L., Georgieva M., Miloshev G., E. Manlieva, Dinev D., Marinescu G., D.-C. Culita, Patron. L., R. Kalfin. Zinc complexes as potential anticancer agents. The 8th Edition of Symposium with International Participation “New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials with Relevance in Biological Systems, Technique and Environmental Protection”, 04-05 June 2015, Timisoara, Romania. – доклад
4. Alexandrova R., **T. Zhivkova**, D. Ivanov, M. Alexandrov, M. Kirilova, G. Miloshev, I. Pantcheva, M. Mitewa. Antineoplastic properties of monensic acid and its biometal (II) complexes. Turkish - FEPS Physiology Congress, 3-7 September 2011, Istanbul, Turkey - постер
5. **Tanya Zhivkova**, Delka Salkova, Ivayla Pantcheva-Kadreva, Mariana Mitewa, Radostina Alexandrova. What do we (not) know about monensin? The Sixth Edition of the Symposium with International Participation “New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials”, 8-9 November 2012, Timisoara, Romania, p. 11-15 - постер
6. **Живкова Т.**, Митренга П., Culita D.–С., Marinescu G., Patron L., Александрова Р. Влияние на комплекси на Zn/Au и Zn/Ag със Salen върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки туморни клетки. Двадесет и трета международна научна конференция “Предизвикателствата пред учените във връзка с новата програма за наука и иновации на ЕС “ХОРИЗОНТ 2020”, 6-7 юни 2013, Стара Загора, България - постер
7. **Zhivkova T.**, Mitrenga P., Dyakova L., Kalfin R., Culita D.–С., Marinescu G., Patron L., Alexandrova R. Effect of Zn/Au and Zn/Ag complexes with Salen on viability and proliferation of cultured human tumor cells. 13th Edition of the Academic Days Timisoara - New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection, 13-14 June 2013, Timisoara, Romania. – постер

8. **Zhivkova T.D.**, Dyakova L.V., Mitrenga P., Georgieva M., Miloshev G., Culita D.-C., Marinescu G., Patron L., Alexandrova R. Zn/Au and Zn/Ag complexes with salen decrease viability and proliferation of human tumor cells. 11th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Medical University-Pleven, Bulgaria, 16 –19 October 2013, Book of Abstracts, p. 140 – *постер*.
9. Radoslina Alexandrova, **Tanya Zhivkova**, Lora Dyakova, Boyka Andonova-Lilova, Abdulkadir Abudalleh, Pavel Mitrenga, Marin Alexandrov, Dimitar Ivanov, Milena Georgieva, George Miloshev, Greta Patroniou, Gabriela Marinescu, Dana Culita, Reni Kalfin, Luminita Patron. Effect of zinc(II) complexes on viability and proliferation of tumor and non-tumor cells. Zinc-Net, The COST action TD1304 “The Network for Zinc Biology”. Ith Scientific Conference and IInd Management Committee meeting, 3rd of November, 2014, London. – *постер*
10. Alexandrova R., **Zhivkova T.**, Abudalleh A., Georgieva M., Miloshev G., Culita D., Marinescu G., Patron L., Gavrilov I., Kalfin R.. Cytotoxic/cytostatic activities of newly synthesized Zn/Ag and Zn/Au complexes in cultured human and animal cells. The 7th Int. Congress of Asian Society of Toxicology “New Frontiers in Modern Toxicology” (ASIATOX), 23-26 June 2015, Jeju Island, South Korea. Abstract Book, P007, p. 191 – *постер*
11. Alexandrova R., **Zhivkova T.**, Dyakova L., Abudalleh A., Dinev D., Georgieva M., Miloshev G., Patrinoiu G., Marinescu G., Culita D.-C., Kalfin R., Patron L.. Zinc complexes as promising anticancer agents. 11th Zn-UK Meeting, Anglia Ruskin University, 10 July 2015, Cambridge, United Kingdom – *постер*.
12. Alexandrova R., **Zhivkova T.**, Abudalleh A., Dyakova L., Dinev D., Mitrenga P., Ivanov D., Toshkova R., Gavrilov I., Georgieva M., Miloshev G., Culita D., Marinescu G., Patron. L., Kalfin R.. Newly synthesized Zinc/Gold and Zinc/Silver complexes with Schiff-base ligands as potential anticancer agents. The European Cancer Congress 2015, Reinforcing multidisciplinary, 18th ECCO- 40th ESMO, Abstract number: 161, 25-29 Sep., 2015, Vienna, Austria. <http://www.europeancancercongress.org/Scientific-Programme/Abstract-search?abstractid=22016>; Eur. J. Cancer, 2015, 51, Suppl.3, S 17 – S 18., **IF = 6.163** (за 2015 г.) – *постер*
13. **Zhivkova T.**, Georgieva M, Dyakova L, Miloshev G, Pantcheva-Kadreva I, Mitewa M, Alexandrova R. From farm animals to human’s food: effects on cell viability/proliferation and DNA integrity of antibiotics Monensin, Salinomycin and their metal complexes. Shaping the Future of Food Safety, Together. Proceeding of the 2nd EFSA Scientific Conference, 14-16 October 2015, Milan, Italy, Book of Abstracts. p. 98 – *постер*
14. **Zhivkova T.**, Dyakova L., Gavrilova-Valkova I., Marinescu G., Culita D.-C., Gavrilov I., Abudalleh A., Patron L., Alexandrova R. Zn/Ag and Zn/Au complexes with Schiff bases Salen, Salampy and Saldmen effectively decrease viability and proliferation of human breast cancer cells. Dietary supplements vs food biofortification and the gut microbiome: human and animal health outcomes, 22 - 23 March 2016, Sofia, Bulgaria – *постер*
15. **T. Zhivkova**, L. Dyakova, D. Culita, G. Marinescu, L. Patron, R. Alexandrova. Zn/Ag and Zn/Au complexes with Schiff bases significantly reduce 3D growth of cancer cells in vitro. XVIth International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 11-14 May 2017, Abstract Book, p.117 – *постер*

XV. Професионални и научни награди по темата на дисертационния труд

- Грамота «Най-добра научна разработка» на колектив с ръководител Р. Александрова, получена на Научна конференция “15 години Тракийски университет, Ст. Загора”, проведена на 21 май 2010 г. в гр. Стара Загора. Тема на доклада: “Monensin: effect on viability and proliferation of human tumor cells”, с автори Р. Александрова, Т. Живкова, Д. Иванов, П. Борисова, И. Панчева, М. Митева.

XVI. Благодарности към научно-изследователски проекти

Проучванията са проведени с финансовата подкрепа на:

- Договор № ДО-02-84/2008, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ при МОН, на тема: *„Полиетерни йонофорни антибиотици: предизвикателство към координацията им с метални йони за модифициране на техните терапевтични свойства“*. Ръководител на проекта: проф. дхн Мариана Митева, Факултет по химия и фармация, СУ „Св. Климент Охридски“. Ръководител на Работна група от ИЕМПАМ – БАН: доц. Радостина Александрова, доктор.
- Договор № ДФНИ Б 02/30 от 12.12.2014 г., финансиран от Фонд „Научни изследвания“ при МОН, на тема: *“Експериментални моделни системи за проучвания в областта на злокачествените новообразувания и костното моделиране”* Ръководител на проекта: доц. Радостина Александрова, доктор от ИЕМПАМ – БАН.
- Договор № BG051PO001-3.3.06-0048 от 04.10.2012 г., на тема: *„Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи за ефективно прилагане на биомедицинските изследвания за подобряване качеството на живот”* Оперативна програма "Развитие на човешките ресурси" 2007-2013 г., Европейския социален фонд и Република България.
- Договор № BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г. на тема: *„Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината“*. Проектът е финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз.
- Акция TD1304 на Европейската програма COST *"The network for the biology of zinc" (Мрежа за изучаване на биологичната активност на цинка)* (2013-2017).
- Акция CA 15135 на Европейската програма COST *„Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process (MuTaLig)”* (2016-2020).
- Акция CA 16119 на Европейската програма COST *“In vitro 3-D total cell guidance and fitness”* (2017 – 2021) г.

- **Договор за двустранно сътрудничество** между Българска академия на науките (Институт по експериментална патология и паразитология) и Румънската академия (Институт по физико-химия в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара) на тема: “Съвременни материал: проучвания върху антитуморните и антимикробните им свойства и механизма на действие” Ръководител от българска страна гл. ас. Радостина Александрова, доктор (2009-2011).
- **Договор за двустранно сътрудничество** между Българска академия на науките (ИЕМПАМ) и Румънската академия (Институт по физико-химия в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара) на тема “Приложение на човешки и животински клетъчни култури за изследване на нови материали с обещаваща биологична активност”). Ръководител от българска страна: доц. Р. Александрова (2012-2014).
- **Договор за двустранно сътрудничество** между Българска академия на науките (ИЕМПАМ) и Румънската академия (Институт по физико-химия в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара) на тема: „*Лекарствено чувствителни и устойчиви ракови клетки в търсене на нови антитуморни агенти*” (2015-2017). Ръководител от българска страна доц. Радостина Александрова, доктор.

Дисертационният труд и авторефератът са отпечатани с финансовата подкрепа на Договор № **BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017** г. на тема: „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината“. Проектът е финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз.