

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ,  
ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ  
Вх. № ..... 175 .....  
..... 30.03 ..... 20.18 г.  
СОФИЯ

## РЕЦЕНЗИЯ

**От:** проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор, ИЕМПАМ – БАН, назначена за член на Научното жури със заповед № РД-15-19 / 31.01.2018 г. на Директора на ИЕМПАМ-БАН, и избрана за официален рецензент на първото заседание на Научното жури, проведено на 06.02.2017 г.

**Относно:** Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен “Доктор” по Професионално направление: ”Биологични науки” с шифър 4.3., По научна специалност: “Морфология“, шифър – 01.06.26

**Тема на дисертационния труд:** „Влияние на комплекси на метали с различни лиганди върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки“

**Автор на дисертационния труд:** асистент Таня Данчева Живкова, задочен докторант в секция “Патология“, Институт по Експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) при БАН

**Научен ръководител:** доц. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

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

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е написан на 223 нестандартни страници с класическа структура от: съдържание, използвани съкращения (1 стр.), въведение (3 стр.), литературен обзор (45 стр.), цел и задачи (2 стр.), материали и методи (16 стр.), резултати (100 стр.), обсъждане (19 стр.), изводи и приноси (3 стр.), списък на цитираната литература от 298 източника, от които 24 на кирилица и 274 на латиница. Структурата на отделните части е подходяща и подзаглавията съответстват на логиката на работата и коментиранияте резултати. Дисертацията е написана изключително четивно, на много добър научен език.

Дисертационният труд съдържа 75 комбинирани фигури и 44 таблици, като 10 таблици и 10 фигури са представени в литературния обзор с коректно цитирани източници, 6 фигури и 3 таблици в раздел „Материал и методи“, 30 таблици и 59 фигури в раздел „Резултати“ и 1 таблица в раздел „Обсъждане“.

**Актуалност на дисертационния труд:** Туморните заболявания са един от основните проблеми на здравеопазването по целия свят, поради широкото си разпространение, висок процент смъртност и произтичащите от тях социални и икономически проблеми. Въпреки ефективността на конвенционалните лекарства за лечение на рака, те показват ниска селективност (унищожават както раковите, така и делящите се нормални клетки), тежки странични и токсични ефекти (миелосупресия, кардио-, хепато- и нефротоксичност и др.), нисък терапевтичен ефект, обусловен от феномени като множествена лекарствена устойчивост и хетерогенност на туморните клетки, ракови стволови клетки; наличие на биологични бариери в организма. Това налага да се търсят, разработват и изследват нови по-малко токсични и високоефективни средства за борба с рака. Особено переспективни в това отношение са комплексите на метали с различни лиганди, включително Шифови бази и йонофорни антибиотици какъвто е монензинът.

На този изключително важен здравен проблем - терапия на злокачествените заболявания при човека е посветен настоящия дисертационен труд.

**Литературен обзор:** Систематично и изчерпателно в добре обособени тематични раздели докторантката представя научни данни върху: Обща характеристика на тумори; Отличителни белези на раковите клетки; Ролята на имунната система за възникването и прогресията на рак като се обръща внимание на: класификация и стадиране на туморите, канцерогени и етапи на канцерогенеза; (Прото)онкогени и тумор-супресорни гени; Епигенетика и рак. Дискутира се лекарственото лечение на раковите заболявания и е представена подробна (по механизъм на действие) класификация на използваните в съвременната онкологична практика антитуморни препарати. В пълнота са отразени наличните данни относно антитуморната активност на металите - цинк, кобалт, калций, магнезий, манган, никел, сребро, злато. Особено добро впечатление прави анализа на биологичните ефекти и механизми на действие на Шифови бази и техни производни (метални комплекси), и на йонофорния полиетерен антибиотик МонензинА.

На базата на анализа на литературните данни може да се заключи, че докторантката познава в дълбочина проблема и логично дефинира **целта:** „Да се изследва влиянието върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински ракови клетки на две групи новосинтезирани съединения:

- Комплекси на Zn(II), 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“.

Набелязаните 5 задачи са реалистични, логично подредени и изпълними.

**Оценка на използваните материали и методи:** В работата успешно са приложени съвременни и класически методи: молекулярно-биологични, клетъчно-културални, биохимични, цитоморфологични, флуоресцентна микроскопия за оценка на антитуморния потенциал на 12 новосинтезирани метални комплекси по отношение клетъчна преживяемост, пролиферация, цитотоксичност, клоногенен ефект, цитопатологични промени, кометен анализ като тест за генотоксичност и др. Подходящо избрани са експерименталните моделни системи на клетъчни туморни линии, произхождащи от пациенти с някои от най-широко срещаните онкологични заболявания и на трансформирани с вируси животински туморни клетки. Използвани са адекватни статистически подходи и обработващи програми. Опитите са правилно изведени при наличието на съответни контроли и стандарти. Методите са подробно описани, което е основание да се приеме, че експерименталните умения на докторантката са с многопрофилно естество и на високо ниво. Експерименталният материал е огромен и напълно достатъчен за дисертация за научната и образователна степен „Доктор“.

**Оценка на получените резултати:** Резултатите от изследванията са представени в основни раздели и подраздели, в последователност следваща поставените за решаване в дисертацията задачи. Изложението на експерименталните резултати много удачно е предхождано, а също и съпътствано от подробни и добре онагледени таблици и фигури, представящи изследователската стратегия и нейната етапност, използваната методология, обобщени резултати и степенуване на биологичните ефекти.

Подробно са описани данните за влиянието на б комплекса на Zn/Ag и Zn/Au с шифови бази Salen, Salampy, Saldmen и на б комплекса на Mg(II), Ca(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II) с полиетерния йонофорен антибиотик монензин върху преживяемостта и пролиферативната активност в моделни *in vitro* системи на три групи клетъчни култури: трансформирани с вируси животински туморни клетки (пилешки и плъши); перманентни човешки туморни клетъчни линии с различен произход и характеристики (MCF-7 луминален тип А рак на млечна жлеза; MDA-MB-231- тройно негативен рак на млечна жлеза; HeLa - карцином на шийката на матката; HepG2 – хепатоцелуларен карцином; 8 MG BA – мултиформен глиобластом; A 431 – плоскоклетъчен карцином и получени от нея субклонове – A431- MDR1, A431-MRP1, A431 - ABCG2; нетуморни Lep 3 – ембрионални човешки клетки от бял дроб, които са изследвани чрез три различни метода за цитотоксичност - MTT, NR (оцветяване с неутрал ред) и CV (оцветяване с кристал виолет).

Проучени са цитопатологичните изменения в туморните клетки настъпили под влияние на изследваните новосинтезирани метални комплекси, чрез флуоресцентен метод след двойно интравитално флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид. Получени са резултати доказващи генотоксичност (увреждане в ДНК молекулите) на изследваните метални комплекси в третираните туморни клетки чрез електрофореза на единични клетки в агарозен гел – Комет изследване.

Направени са опити за идентифициране на типа клетъчна смърт настъпила (индуцирана) в туморни клетки, култивирани в присъствие на изследваните метални комплекси.

Извършени са впечатляващи по обем и методичен обхват изследвания. Получени са убедителни резултати, които са подробно онагледени с 59 многокомпонентни фигури и 30 таблици, анализирани детайлно, а в раздел обсъждане коментирани много умело в съответствие с поставените цел и задачи, и в съответствие с наличната литература. Личи много добрата теоритична подготовка на докторантката и уменията и да анализира собствените резултати в светлината на известните в литературата данни. Получените резултати имат потенциално значение за медицинската практиката, което позволява да се даде положителна и много висока оценка на проведените изследвания и резултати.

Формулирани са **6 основни изводи** в дисертацията, които напълно приемам. Те отразяват най-съществените резултати и констатации, получени в хода на разработката, както по отношение на наблюдаваните ефекти след прилагане на изследваните метални комплекси, така и относно вероятните механизми на тяхното антитуморно действие.

**Приноси.** Извършените комплексни проучвания и получените резултати върху антитуморния ефект на 12 новосинтезирани метални комплекси в краткосрочни и дългосрочни експериментални постановки, при използване на разнообразни и подходящи експериментални моделни клетъчни системи и адекватна методология могат да бъдат систематизирани като приноси с оригинален (3), потвърдителен (1) и приложен характер (1) и изложени както следва:

#### **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 CaMon (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**

4. 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**

5. 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.

Приносите са безспорни, обогатяват науката с нови оригинални данни и са с потенциално значение за медицинската практика. Трябва да отбележа, че приемам напълно така изложените приноси в дисертационния труд.

**Критични бележки, препоръки, въпроси:** Нямам критични бележки по същество. Бих отбелязала грешки от технически характер (стр.136 – фиг.60), използване на специфични термини с буквален превод. Направените забележки с формален, редакционен или доуточняващ характер при апробацията са педантично коригирани в настоящия дисертационен труд. Дисертационният труд като цяло е написан на много добър научен и литературен език. И да задам въпрос към докторантката: „Какво е значението на получените резултати за клиничната практика и да очертае бъдещи насоки за научно-изследователска работа?“

Във връзка с дисертацията са представени **пет научни публикации** (4 на английски и 1 на български език), като в една, асистент Таня Живкова е първи, в две е втори и в две - трети автор. Две от статиите са отпечатани в международни списания с импакт фактор (ОИФ- 1.708), 2 –в сборници от българско и 1 в сборник от международно научно мероприятие. Открити са 4 цитата в чужбина, което доказва международно признание на отпечатаните научни факти. Научни резултати по темата на дисертацията са представени с 49 доклада на национални (34) и международни (15) научни форуми. Докторантката е реализирала основна част от научните си изследвания в секция „Патология“ на ИЕМПАМ-БАН, с финансовата подкрепа на 2 проекта към ФНИ (ДО-02-84;ДФНИ Б-02/30); два проекта по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ (BG051PO001-3.3.06-0048/20012 и BG05M2OP001-2.009-0019-C01/2017); три - по Европейска програма COST и три проекта за двустранно сътрудничество с Румънската академия.

**Оценка на Автореферата.** Авторефератът отговаря на изискванията. В резюмиран вид отразява състоянието на изследвания проблем, поставената цел и задачи, използваните методи, получените собствени резултати аналитично описани и интерпретирани, направените авторски изводи и приноси. Оформен е много добре графично в съответствие с дисертационния труд.

**Биографични данни:** Таня Данчева Живкова е родена през 1985г в гр. София. Завършва с отличен успех Биологически факултет на СУ „Климент Охридски“, през 2008г – Бакалавър по специалност „Молекулярна биология“ и през 2010г – Магистър по специалност „Вирусология“. От януари 2013 г е задочен докторант в секция „Патология“ при ИЕМПАМ-БАН.

Положила е изпити за докторантски минимум, изпълнила е образователната програма и е надвишила изискуемите количествени критерии шесткратно - събрала е 1694 кредита при изискуеми 250. Докторантката е с отлична езикова и компютърна компетентност.

**Придобита компетентност съобразно изискванията на образователната и научна степен „Доктор“.** За изпълнение на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд, задочен докторант Таня Живкова демонстрира основни теоритични познания и практически умения при подбора и изпълнението на широк набор от съвременни методи, придобила е опит да анализира, обобщава и обективно да дискутира научни резултати, да прави конкретни изводи и да оформя научни статии, които напълно съответстват на изискванията на образователната и научна степен „Доктор“.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Таня Живкова представлява мащабно проучване в една много актуална и перспективна област от съвременните медико-биологични изследвания, свързана с терапия на онкологичните заболявания, и по-конкретно с прилагане на комплексен подход за оценка на антитуморния потенциал на новосинтезирани метални комплекси и съединения. Резултатите са с оригинален и научно-приложен характер и откриват възможности за бъдещо прилагане в клиничната практика при лечение на рак. Дисертационният труд е добре замислен, методично обоснован, прецизно изпълнен и богато илюстриран, и напълно отговаря, а в някои аспекти значително надвишава научните и образователни критерии за докторска степен залегнали в Закона за развитие на Академичния състав в Република България и правилника за неговото приложение, във вътрешните правилници на БАН и ИЕМПАМ при БАН. В хода на докторантурата Таня Живкова е овладяла, надградила и приложила успешно широк спектър от съвременни методични подходи и техники. Тя притежава способност самостоятелно и иновативно да решава теоритични и практически проблеми, творчески да интерпретира експериментални резултати и да оформя научни статии.

Имайки предвид гореизложеното с вътрешна убеденост давам своята положителна и висока оценка на разработения дисертационен труд, и предлагам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват с „ДА” за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Таня Живкова в Професионално направление 4.3."Биологически науки", научна специалност "Морфология" 01.06.26.

29 март, 2018г.,  
София

Рецензент:   
проф. д-р Ренета Тошкова

\* заличен подпис - лични данни – чл. 2, ал. 1 ЗЗЛД (Закон за защита на личните данни).