

СПРАВКА

за научните приноси на гл. ас. Иван Ангелов Илиев, доктор

Научната дейност на гл. ас. Иван Илиев е в областта на клетъчната биология и биохимията. През последните 12 години неговите изследвания са насочени към определяне на биологичната активност на новосинтезирани вещества и природни продукти, както и комбинирания ефекти на вече добре изучени съединения, при *in vitro* и *in vivo* условия. Актуалността на тематиката се увеличава с течение на времето, тъй като в световен мащаб се синтезират и изолират все повече и повече нови съединения, които е наложително да бъдат тествани от биологична гледна точка с цел запазване здравето и подобряване качеството на живот. Оценката за биологично въздействие на изследваните вещества е извършена върху моделни биологични системи (различни видове туморни и нормални клетъчни култури и експериментални животни). В процеса на биологичните изследвания са използвани следните групи от методи: 1. цитологични методи (BALB/c 3T3 NRU-тест за определяне на цитотоксичност и фототоксичност, MTT-тест за определяне на антипролиферативен ефект, клоногенен тест), 2. биохимични методи (PCR, агарозна електрофореза за разделяне на ДНК-фрагменти, SDS-PAGE за разделяне на протеини, конюгиране на антигени към молекулни носители, определяне на ензимна кинетика и др.), 3. хистологични методи (хистологичен анализ чрез оцветяване с еозин / хематоксилин, имунохистохимичен анализ, имунофлуоресцентен анализ, визуализация и локализация на ензими в хистологични и цитологични препарати чрез подходящи субстрати), 4. имунологични методи (определяне титъра на специфични антитела и количество антиген чрез директен и индиректен ELISA-анализ, имуноблот, производство на специфични, поликлонални, хиперимунни серуми), 5. микроскопски методи (светлинна и флуоресцентна микроскопия).

I. Приноси от дисертационния труд

1. Доказано е, че хемоцианините, изолирани от *Helix lucorum* и *Rapana venosa* са високо имуногенни гликопротеини, които стимулират паралелно клетъчния и хуморалния имунитет и са подходящи за използване като молекулни носители и адюванти при профилактични и терапевтични имунологични препарати.

2. Доказано е, че приложени като неспецифични имуноактиватори хемоцианините НН и RvH са високо ефективни при имуноterapia на асцитен тумор на Guerin, но не и при солиден миелоиден тумор на Graffi.

3. Чрез използването на хемоцианините НН и RvH като молекулни носители са разработени специфични експериментални имунотерапевтични препарати (НН-TsAg и RvH-TsAg) срещу трихинелоза, които притежават висок до 92% терапевтичен или предпазен ефект в зависимост от експерименталните условия.

II. Приноси, свързани с настоящия конкурс

1. Проучване биологичната активност на природни продукти.

1.1. Изследвани са биологични свойства (антиканцерогенни, антирекомбинантни и антитуморни) на амигдалин (Витамин В17) при дрожди, човешки и миши клетъчни култури. Резултатите показват, че амигдалина приложен самостоятелно не активира първите стъпки на туморогенезата, като индукция на митотична генна конверсия, митотичен кросинговър и Tu1 ретротранспозиция. При концентрация 100 µg/ml амигдалинът проявява инхибиращо действие върху мутагенната и канцерогенна активност на MMS и стандартния канцероген Cr^{VI}. В допълнение на това, бе установена висока селективност в антипролиферативната активност на амигдалина спрямо нормалните и туморни клетъчни линии. Това показва, че амигдалинът има потенциал да бъде използван като допълнително природно средство, допринасящо за по-ефективна профилактика и терапия на туморни заболявания. Публикация № 14

1.2. Установен е повишен фотодинамичен ефект на фотосенсибилизатора Радахлорин® (екстракт от синьозелено водорасло съдържащ: 80% хлорин еб, 5% хлорин рб и 15% пурпурин), когато бъде приложен в комбинация с инсулин. Изследванията са направени при *in vitro* условия, върху нормални и туморни клетъчни линии. Резултатите показват, че комбинираният ефект се дължи на повишен клетъчен пермеабилитет предизвикан от действието на приложения инсулин. Увеличената пропускливост на цитоплазмената мембрана води до по-голямо натрупване на фотосенсибилизатор при туморните клетки в сравнение с нормалните. Чрез флуоресцентна микроскопия бе установено натрупване на фотосенсибилизатора в областта на ядрената мембрана, както и повишаване количеството на радахлорин в туморните клетки третирани с инсулин. Резултатите от експериментите за определяне на фотодинамичен ефект показват ясно изразен комбиниран, синергичен ефект между изследваният фотосенсибилизатор и приложеният инсулин. Това дава възможност при инсулин потенцирана фотодинамична терапия да бъде намалена дозата на въведения в организма фотосенсибилизатор, в резултат на което се очаква да се наблюдават и по-малко странични ефекти. Публикация № 15

1.3. За първи път е изследвано влиянието на миозмин (миозмин – 3-(1-пиролин-2-ил)пиридин, среща се в хранителни продукти: сметана, картофи, киви и др.) върху клетъчния цикъл *in vitro* и *in vivo*. Резултатите от двете проучвания са напълно аналогични и показват неговата генотоксична активност. Натрупването на знания за наличните токсични вещества и техните концентрации в хранителните продукти дава възможност да се оптимизират диетите с цел по-здравословно хранене, което е от съществено значение при рисковите групи от хора. Публикация № 5

1.4. Изследвани са множество екстракти от различни видове хвойна (*Juniperus - Cupressaceae*) с български и чуждестранен произход с цел търсене на биологично активни субстанции с антиоксидантно и антипролиферативно действие за превенция и терапия на рака. Екстрактите с най-ясно изразен антипролиферативен

ефект са изолирани от видовете: *J. Sabina* L., *J. Virginiana* L. и *J. Communis* L. Идентифицираните екстракти с ефективна антиоксидантна и антипролиферативна активност имат потенциално приложение при бъдещи клинични изследвания относно комбинирана терапия с други антитуморни средства в случаи на резистентност, рецидиви, както и за понижаване на терапевтичните дози на цитостатици при лечение на рак. Публикация № 32

2. Проучване биологичната активност на синтетични вещества

2.1. Разработени и тествани са четири специфични субстрата (β AGP-HHNI, AAP, ANP и IAP) на ензима Фибробласт Активиращ Протеин α (FAP- α ; EC 3.4.21.B28). FAP- α е мембранно свързана, серинов тип, ендопептидаза с молекулна маса 170 kDa. Чрез тестваните субстрати може да бъде определена ензимната активност на FAP- α в клетъчни и тъканни хомогенати, както и локализацията на ензима в различни видове клетъчни култури и хистологични препарати. Тъй като FAP- α е тясно свързан с редица туморни заболявания, специфичните субстрати позволяват да се установи ролята на FAP- α , като диагностичен / прогностичен маркер при туморни заболявания. Публикации № 37; 38; 39 и 52

2.2. Чрез *in vitro* и *in vivo* експерименти за определяне на антитуморна активност е доказан комбиниран синергичен ефект между цисплатин и натриев бутират. Извършените молекулярно-биологични изследвания разкриват механизма на синергичното взаимодействие. Разкриването на механизмите на взаимодействие между лекарствените препарати при комбинирана терапия дава възможност за разработване на по-ефективни терапевтични протоколи. Публикация № 4

2.3. Изследвани са при *in vitro* условия голям брой новосинтезирани аминокиселинни и пептидни аналози и техни производни: sArg-CONHNH₂, sArg-CONHNC₆H₅, sArg-CONHN(CH₂CH₂Cl)₂, NsArg-CONHNH₂, NsArg-CONHNC₆H₅, NsArg-CONHN(CH₂CH₂Cl)₂, RGD, R(NO₂)GD, CavGD, RGD-Ome, Cav-ONHNC₆H₅, Cav-CONHN(CH₂CH₂Cl)₂, Cav-CONHNH₂, NCav-CONHNC₆H₅, NCav-CONHN(CH₂CH₂Cl)₂ и др. Определена е тяхната токсичност и антипролиферативна активност. Тематиката е важна за фармацията и биомедицината, тъй като молекулните миметици лесно се усвояват от организма при перорално приложение и в същото време модулират в значителна степен важни биологични процеси, като клетъчна адхезия, миграция, ангиогенеза, туморно метастазирание, апоптоза и др. Публикации № 16; 18; 27; 43; 44 и 45

2.4. Тестирана е антитуморната активност при *in vitro* условия на ново синтезирани антрацен съдържащи α -аминофосфонати и техни производни. Този тип съединения са високо перспективни при дизайна на нови антитуморни лекарства, тъй като се интеркарират в ДНК и така повлияват туморния растеж. Освен това, те са липофилни съединения, които лесно преминават през цитоплазмената и ядрената мембрана. Публикации № 7; 8; 9; 10; 26; 30; 33; 46; 47 и 48

3. Приноси с пряко приложно значение.

3.1. Извършен е ELISA – анализ на 50 серума от възрастни (40 - 72 години) и 50 серума от деца на възраст от 1 до 3 години, с цел определяне наличието на специфични антитела срещу човешки полиома вирус (JCV). Като антиген са използвани вирусоподобни частици (VLPs) формирани от пречистен вирусен гликопротеин експресиран от трансфектирани клетки на *Saccharomyces cerevisiae* AN22R. Резултатите показват, наличие на антитела специфични срещу JCV при 90% от пробите при възрастните и 32% от пробите при децата. Подобни изследвания са правени в Швеция, Швейцария, Англия и други европейски държави, като при всички тях процента на инфектираните е значително по-нисък в сравнение с българската популация. Тези резултати показват, че е възможно да бъде намален процента на заразените българи с JCV, ако се вземат необходимите мерки. Публикация № 25

3.2. Чрез диференциална сканираща калориметрия (ДСК) са намерени статистически достоверни разлики в термограмите и термодинамичните параметри при нормални и туморни клетъчни култури. Освен това, третираните туморни клетки с различни цитостатици показват променени термодинамични характеристики спрямо нормалните клетки. Това дава основание да смятаме, че е възможно да се открият термодинамични маркери за диагностика и проследяване ефекта на лечението при туморни заболявания. Публикация № 13

04. 09. 2018 г.

Гл. ас. Иван Илиев: