



СТАНОВИЩЕ

от проф. дхн Иво Грабчев

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

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

Десислав Русев Динев

редовен докторант

в *Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей*
(ИЕМПАМ) – БАН, ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 25, София, България

по професионално направление 4.3. Биологически науки
и научна специалност: Морфология (шифър: 01.06.26)

на тема:

Цитотоксична активност на метални [Cu(II), Co(II)] комплекси с Шифови бази и Дисулфирам при човешки и животински туморни клетки

Десислав Русев Динев е роден през 1990 г. През 2013 г. той завършва ОКС бакалавър по специалността „Биология“ в Биологическия факултет на Софийския Университет „Св. Климент Охридски“, а през 2015 г. се дипломира като магистър по специалността „Клетъчна биология и патология“. От декември 2016 до сега е докторант в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) – БАН, с научен ръководител проф. д-р Радостина Александрова.

Разработеният от **Десислав Динев** дисертационен труд е значителен по обем, като е изложен на 199 стр. Той съдържа 21 фигури, 11 таблици и са цитирани 86 литературни източници, като голяма част от тях са от последните десет години, което показва актуалността и значимостта на проведените изследвания. Дисертационният труд е написан ясно, точно и прецизно. Състои се от три основни части: Литературен обзор (45 стр.), Материали и методи (24 стр.) и Резултати и обсъждане (110 стр.).

Литературният обзор е доста подробен и е съсредоточен върху същността на раковите заболявания и предизвикателства пред съвременната лекарствена терапия за тяхното лечение. Специално внимание е отделено на страничните и токсични ефекти на антитуморните препарати и механизмите на лекарствена устойчивост на раковите клетки. Подробно е разгледана ролята на медните и кобатови йони като биологично важни метални хони за нормалното функционализиране на жизнените процеси в

човешкото тяло. На базата на задълбочения литературен обзор е формулирана основната задача на дисертационния труд: *Да се изследва влиянието на новосинтезирани метални [Cu(II), Co(II)] комплекси с шифови бази и на дисулфирам върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни клетки, както и на цитоморфологичните изменения в тях.*

За изпълнението на тази задача докторанът си поставя шест основни задачи.

1. Да се определи влиянието на изследваните вещества върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетките (ЦК₅₀, ЦК₉₀) от използваните като експериментални модели човешки и животински постоянни клетъчни линии;
2. Да се сравни чувствителността към изпитваните съединения на туморни и нетуморни клетки с еднакъв произход (човешки, животински);
3. Да се проследи наличието на цитопатологични изменения в култивираните в присъствието на изпитваните съединения туморни клетки;
4. Да се установи способността на веществата да предизвикват двойно-верижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки;
5. Да се изследва способността на тестваните съединения да предизвикват автофагия;
6. Да се проучи ефектът на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

Така дефинираните от докторанта тема, цели и задачи на дисертационния труд са в една изключително актуална научна област на биологичните и биомедицински изследвания, която в последните години се развива интензивно във връзка с търсенето на нови биологично активни вещества с антитуморна активност. Безспорен тук е приносът на неговата научна ръководителка, която го е насочила към тази тематика, а приносът на докторанта е в прецизността и задълбочеността за нейното изпълнение.

С разработването на дисертационния труд за първи път е изследвано влиянието на 8 новосинтезирани комплекси на Cu(II) и Co(II) с шифови бази, получени при кондензационна реакция между о-ванилин и някои аминокиселини: DL-триптофан, L-серин, L-треонин или S-тирозин, върху преживяемостта и пролиферативната способност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки с човешки и животински произход, както и за способността на изследваните съединения да предизвикват цитоморфологични изменения и автофагия.

Биологичната активност на изследваните метални комплекси върху преживяемостта и 2D / 3D растежа на раковите клетки е проведена в различен концентрационен интервал 10÷200 µg/ml. Изследвана е връзката между състава/структурата на металните комплекси и тяхната биологична активност и са направени задълбочени обяснения за изясняване механизма на биологичното им действие.

При провеждане на тези изследвания, ефектът на антитуморната активност на новите комплекси е проследен чрез използване на различни съвременни методи за анализ като: цитотоксични (MTT, NR, CV, TB), Конфокална микроскопия и имуноцитохимично определяне на LC3B маркер за автофагия. Проведени са изследвания върху способността на веществата да предизвикват цитопатологични изменения и смърт в третираните клетки, чрез изследване на влиянието на комплексите върху клетъчния монослой, оцветяване на клетки с хематоксилин и еозин или комбинирано оцветяване на клетките с акридин оранж (АО) и пропидиев йодид (PI) и др. Провеждани са както “краткосрочни експерименти” с монослойни култури (24-72 часа), така и дългосрочни експерименти с 3D колонии от туморни клетки (3D колонии-образуващ метод). Всичко това показва, че докторантът успешно е усвоил и използвал в научните си изследвания тези биоаналитични методи, което несъмнено ще бъде от полза и в следващите му научни изследвания.

Изводите от дисертационния труд могат да бъдат обобщени като:

- ✓ Изпитваните комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази предизвикват цитопатологични изменения и намаляват в различна степен преживяемостта и 2D/3D растежа на използваните като експериментални модели клетъчни култури. Наблюдаваното въздействие се усилва с увеличаване на концентрацията и времето на третиране.
- ✓ Комплексите на Cu(II) с Шифови бази показват по-висока цитотоксична активност (особено комплексът CuVanSer) в сравнение с тези на Co(II) със същите лиганди. Възможно е клетките да деактивират приложените кобалтови комплекси посредством образуване на автофагозоми, докато при комплексите на Cu(II) стартиралата автофагия да завършва с клетъчна смърт.
- ✓ Най-силно силно изразен цитотоксичен ефект и при двете групи метални съединения проявяват комплексите на лиганда VanSer – CuVanSer и CoVanSer.
- ✓ Наблюдаван е клетъчно-специфичен отговор, който най-вероятно отразява различията в произхода, биологията и поведението на злокачествените новообразувания, от които са получени използваните като моделни системи клетъчни култури, както и уникалността на всяка тумор / туморна клетъчна линия.
- ✓ Определената при кобалтовите комплекси ЦК50 (μM , MTT, 72 час) е по-висока при нетуморните човешки ембрионални клетки от линия Lep-3 в сравнение с туморните клетки от линии HeLa, MCF-7 и MDA-MB-231. Според изчислената при същите условия ЦК50, в преобладаващата част от случаите чувствителността на нетуморните човешки клетки към цитотоксичното действие на комплексите на Cu(II) превишава тази на злокачествено трансформирани клетки.
- ✓ Приложен в концентрации 1-100 $\mu\text{g/ml}$, дисулфирамът значително потиска преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните в негово

присъствие миши саркомни клетки, трансформирани с Rous sarcoma virus щам Schmidt-Ruppin (LSR-SF-SR).

- ✓ С единични изключения всички изпитвани вещества (метални комплекси с Шифови бази, дисулфирам) проявяват по-слаб цитотоксичен ефект в сравнение с утвърдените в клиничната практика антитуморни препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин.

Приносите от получените експериментални резултати имат както потвърдителен, така и приложен аспект.

В обобщение на казаното до тук може да се заключи, че докторантът успешно се е справил със заплануваните задачи. В рамките на дисертационния труд е извършена достатъчна по количество и качество експериментална работа, която разкрива огромен потенциал за бъдещо развитие на тази изключително интересна и модерна тематика в посока на практическото ѝ приложение.

Част от описаните в дисертационния труд резултати са оформени в 2 публикувани статии (Merit Journal of Medicine and Medical Sciences, Acta Morphologica et Anthropologica) и две приети за печат. По темата на дисертационния труд са представени и осемнадесет устни и постерни съобщения на национални и международни научни конференции. По време на разработване на докторската си работа докторантът е бил член на 8 научни проекта, които са финансирани от ФНИ и МОН.

Нямам конкретни лични впечатления от докторанта.

Авторефератът отразява ясно дисертационната работа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представените резултати от разработената дисертация са актуални, добре научно интерпретирани и могат да се отнесат към категориите новост за науката и обогатяване на съществуващите знания. Те напълно отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на ИЕМПАМ - БАН. Въз основа на изложеното до тук с убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на **магистър Десислав Русев Динев** и предлагам на уважаемите членове на научното жури да подкрепят присъждането му на образователната и научна степен **"ДОКТОР"** по научно направление 4.3 Биологически науки, научна специалност: Морфология (шифър: 01.06.26)

22.02.2021 г

Изготвил становище:.....

/проф. дхн И. Грабчев/

Личните данни (имена и подписи) са заличени на основание чл.4, т.1 от Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета от 27 април 2016 година относно защитата на физическите лица във връзка с обработването на лични данни и относно свободното движение на такива данни и за отмяна на Директива 95/46/ЕО (Общ регламент относно защитата на данните).