

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ,
ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ
Вх. № 77
..... 18.03 20.21 г.
СОФИЯ

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Машенка Димитрова, доктор

секция „Експериментална морфология“ – ИЕМПАМ-БАН

Относно: дисертация за придобиване на ОНС „доктор“ на *Милена Митева Главчева* – редовен докторант към секция „Патология“ на ИЕМПАМ –БАН с научен ръководител *проф. Радостина Александрова*

Тема: „Цитотоксична активност на новосинтезирани метални комплекси с шифови бази и коджикова киселина и на статини върху туморни клетки“

Научна специалност: „Морфология“ (01.06.26), Професионално направление 4.3 „Биологически науки“

Милена Митева Главчева е придобила магистърската си степен по специалност „Клетъчна биология“ през 2008 г. в ПУ „Паисий Хилендарски“. В ИЕМПАМ-БАН тя постъпва през 2016 г. като редовен докторант по морфология, след успешно полагане на кандидат-докторантски изпити. През периода на докторантурата си Главчева работи в групата на научния си ръководител. Тя полага всички изпити от общоакадемичната и специализираната си програма, участва в подготовката на 4 научни публикации по темата на дисертацията и представя резултати на голям брой научни фируми. Събраните от нея точки по кредитната система на ЦО-БАН значително надхвърлят изисквания минимум. Документите на Милена Главчева показват пълно съответствие с критериите за присъждане на ОНС „доктор“, заложи в ЗРАСРБ и неговите Правилници.

Представеният за рецензия проект на дисертационен труд е написан на 219 страници и съдържа стандартните раздели – Въведение (2 стр.), Литературен обзор (83 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (18 стр.), Резултати (86 стр.), Обсъждане (11 стр.), Изводи, Справка за приносите и Литература. Ползваните литературни източници са 231, като над половината от тях са от последните 10 години. Препоръчвам в крайния вариант на дисертацията изписването на отделните източници да се уеднакви (написани са с различни шрифтове и различна подредба, а при някои липсва годината на издаване).

Дисертацията е онагледена с 49 таблици - 31 собствени и 17 взаимствани от литературата, и 82 фигури, от които 38 собствени и 44 от литературни източници. При взаимстваните таблици и фигури, литературният източник е коректно посочен в текста към тях. Собствените илюстративни материали са с много добро качество.

Дисертацията е посветена на актуален проблем - борбата с раковите заболявания. Независимо от огромния брой проведени изследвания и публикувани материали, разпространението на тези заболявания расте от година на година в международен мащаб. Основната причина за това е сложната етиология на рака и разнообразните му проявления, като в рамките на една група се наблюдават най-различни клинични симптоми и патоморфологични находки, различен отговор на приложеното лечение и т.н. Затова, този тип заболявания са основни кандидати за прилагане на персонализирани терапевтични подходи. Налице е непрекъснато търсене на нови, по-ефективни средства за терапия, с по-добра биологична поносимост и по-малко странични ефекти, които да подобрят преживяемостта и качеството на живот на пациентите и, като краен резултат, да увеличат

броя на успешно излекуваните. В този смисъл, дисертацията на Милена Главчева отговаря на съвременните изисквания, като предлага потенциални нови средства за борба с рака.

В литературния обзор е очертана същността и значимостта на проблема, дадена е обща характеристика на туморните заболявания, представено е известното за етиологията на туморните неоплазии и поведението на имунната система при развитието на туморите. Тази част от литературния обзор показва много добрата осведоменост на дисертантката върху известните досега механизми на туморогенезата и туморната прогресия. Такава осведоменост е необходима и дори задължителна за разработването на темата, но считам, че е отделено твърде много място за подробно разглеждане на отделни биохимични процеси, с участващите в тях сигнални пътища и контролиращи фактори, тъй като те не са пряко свързани с темата на работата. Голям е и броят на фигурите и таблиците, пренесени от литературни източници. Повечето от тях илюстрират добре текста, но не са особено необходими.

Най-целенасочена е частта от обзора, посветена на прилаганите към момента лечебни стратегии и препарати, като много добре са очертани техните предимства и недостатъци. Също така, подробно са разгледани биологичната роля и противотуморните свойства на използваните от авторката метали, шифови бази и техните полиидентатни комплекси, металните комплекси на коджикова киселина, както и статините. Огромната справка, която е направена за тези вещества и тяхната употреба в медицината е от съществено значение за постигането на поставените цели. Моя препоръка за бъдещата работа на авторката е да се съсредоточи върху действието на металните комплекси като цяло, а не да разглежда отделните им съставни части. В организма тези комплекси трябва да са устойчиви и да действат като цели молекули, защото разбиването им на структурни единици би било пагубно за редица органи и системи. Както металите (включително високи концентрации от есенциалните), така и шифовите бази, взети самостоятелно са токсични, но като комплекси могат да имат лечебно действие. Именно затова химиотерапевтиците се доставят до засегнатите органи чрез кръвообращението и обвити в безвредни липозоми, наночастици, включени в комплекси и др. Искам да подчертая, че посочените забележки са малки на фона на добре структурирания обзор и високото ниво на осведоменост на дисертантката.

Целта на работата и конкретните задачи са ясно очертани.

В раздела „Материали“ е даден произхода на използваните химикали, консумативи и клетъчни линии, като комплексните съединения и клетъчните линии са представени в табличен вид, което считам за много прегледно. Дадени са и химичните структури на тези съединения и на статините, което приемам за подходящо. Не считам обаче, за нужно да се дава схемата на синтез на фиг. 43, защото синтетичната процедура не е дело на авторката. Погрешно е изписано името на тетразолиевата сол МТТ, което поставя въпроса дали е използвана тя или някоя друга.

Използваните методи са адекватни на поставените цели и включват: клетъчно култивиране, определяне на цитотоксичност на изследваните вещества, оценка на клетъчна пролиферация чрез експресията на ядрения маркер Ki-67, проследяване на цитопатологични изменения, определяне на генна токсичност на веществата с кометен тест, определяне на типа на клетъчната смърт и изследване ефекта на комплексите върху 3D колонии-образуващата способност на туморните клетки, както и, разбира се,

статистическа обработка на данните. Процедурите са описани достатъчно подробно за евентуалното им повторение. Известно учудване буди прилагането на три теста за цитотоксичност – МТТ, неутрално червено и кристал виолет. Авторката е искала да сравни резултатите, получени по три начина, но и трите теста са верифицирани в литературата. За да се прави сравнение между отделните клетъчни линии, например, за определяне на коефициент на селективност, трябва да се използва само един тест, по очевидни причини. По-нататък в обсъждането е дадена обосновка за прилагането на 3-те теста, понеже отчитат състоянието на различни органели. Това обяснение не бих могла да приема. Не мисля, че може да се съди за състоянието, например за лизозомите, само по резултатите от теста с неутрално червено. Въпреки казаното по-горе, приемам решението на авторката и допълнителният ѝ труд като стремеж към прецизност и достоверност на резултатите.

В раздел „Резултати“ (който е най-голям от всички раздели) е отделено съществено място на определяне цитотоксичността на изследваните съединения. Резултатите са илюстрирани с огромен брой старателно изработени графики с използване на различни цветове, което улеснява прочита. Графиките отразяват концентрационни зависимости, зависимости от времето на третиране, сравнения между отделните методи, различните типове клетки и др. Получените данни са обобщени в прегледни таблици. Построени са и йерархични редове. Налага се общото впечатление, че трите метода дават числови резултати, сходни като тенденция, но различни йерархични редове, което не позволява да се направят ясни изводи. Експресията на маркера Ki-67 е определена само при клетки от линията MDA-MB-231, но убедително показва повишена експресия при продължително третиране. Що се отнася до проследяването на цитопатологичните изменения, резултатите от оцветяването на клетките с хематоксилин-еозин не са илюстрирани с нито една микрофотография. При оцветяването с акридин оранж/пропидиев йодид описаните изменения се виждат само на фотографиите с подходящо увеличение, тъй като не всички са такива. Вижда се добре само разкъсването на монослоя и оцветени с пропидиев йодид ядра (белег за некроза или късна апоптоза). За изменения в ядрата, вакуолизиране на цитоплазмата, образуване на апоптотични мехурчета и др., се доверявам на автора. Резултатите от кометния тест дават представа за уврежданията в ядрата на клетките под действие на изследваните вещества. Определянето на съотношението на клетките в апоптоза и некроза, проведено с поточна цитометрия, показва преобладаваща апоптоза при повечето тествани вещества, което е много положителен резултат. Резултатите за колонообразуване в 3D условия са дадени прецизно и са убедителни. Антитуморното действие на статините ловастатин и флувастатин е дадено в отделна част. При тях са проведени горните изследвания и важат всички коментари по-горе за другите тествани вещества. Накрая са показани и тестове за цитотоксичност на цисплатината, която (като краен резултат) е въведена в йерархичните редове. Оказва се, че за всички изследвани клетъчни линии най-висока ефективност показва някое от новоизследваните вещества, а цисплатината почти неизменно се намира на второ място, което също е добър резултат. В този раздел е необходимо да се направят промени във форматирането, защото има излишно големи разстояния между фигурите, а често текста към фигурата/таблицата е на друга страница. Има и доста правописни грешки, което се отнася за целия труд.

Много добро впечатление прави коректно поднесеното обсъждане на резултатите, което е написано ясно и предлага един обобщен поглед върху цялостната работа по дисертацията. Независимо от критичните ми бележки относно мотивите за някои от

изследванията (както беше казано по-горе), поздравявам авторката за нейното коректно и прецизно обсъждане на получените данни.

От проведените изследвания са направени 4 извода, с които съм съгласна. Очертани са 3 приноса с оригинален и 1 с потвърдителен характер, които също одобрявам.

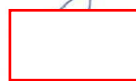
Проектът за автореферат правилно отразява съдържанието на дисертацията.

Заключение: Дисертационният труд на Милена Главчева представлява едно цялостно, добре проведено и представено изследване върху антитуморните свойства на избрана група съединения с потенциал за приложение при лечението на онкологични заболявания. Той съответства на едно актуално предизвикателство на съвременността – борбата с рака. Направените от мен забележки в никой случай не омаловажават достойнствата на дисертацията. В течение на работата докторантката е придобила широки познания върху проблема, усвоила е редица методики и способност да представя прегледно и убедително получените резултати.

Във връзка с изложеното по-горе, препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди на Милена Митева Главчева ОНС „доктор“ по специалност „Морфология“ (01.06.26) от) от Професионално направление 4.3 „Биологически науки“.

16.03.2021 г.

Рецензент:



/проф. М. Димитрова/