

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ,  
ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ**

Вх. №

84  
24.03

20.21 г.

СОФИЯ

**СТАНОВИЩЕ**

от проф. д-р 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

**маг. Милена Митева Главчева**

редовен докторант в Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) – БАН, по професионално направление

4.3. Биологически науки и научна специалност: Морфология

на тема:

**ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ МЕТАЛНИ  
КОМПЛЕКСИ С ШИФОВИ БАЗИ И КОДЖИКОВА КИСЕЛИНА И НА СТАТИНИ  
ВЪРХУ ТУМОРНИ КЛЕТКИ**

**Милена Митева Главчева** е родена през 1969 г. Средното си образование е завършила през 1988 г. в 14 ЕСПУ „Проф. Д-р Асен Златаров“ със специалност Биотехнологии, УПК към „Техникум по индустриална химия“ и допълнително през 1995 г. – Национална финансово-стопанска гимназия, гр. София, със специалност „Банково, застрахователно и осигурително дело“. През 2006 г. тя завършва бакалавърска степен по специалността „Биотехнологии“ в Химикотехнологичен и металургичен университет – София, а през 2008 г. се дипломира като магистър по специалността „Клетъчна биология“ в Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. През периода 01.01.2016 г. – 31.12.2018 г. е редовен докторант в Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей - ИЕМПАМ, Българска академия на науките.

Разработеният от Милена Главчева дисертационен труд е написан ясно, точно и прецизно. Той е значителен по обем и се състои от три главни части: Литературен обзор (83 стр.), Материали и методи (16 стр.) и Резултати и обсъждане (82 стр.). Изложен е на 217 стр., съдържа 87 фигури, 58 таблици и са цитирани 331 литературни източници.

Литературният обзор е доста подробен и е съсредоточен върху същността и значимостта на проблема с онкологичните заболявания. Дадена обща характеристика на туморните образувания. Разгледани са основните лечебни стратегии и терапии,



използвани в клиничната практика. Също така е представена биологичната роля на цинка, кобалта, медта и никела в контекста на тяхната антитуморна активност и способността им да образуват метални комплекси с различни по структура шифови бази. Показани са химичните структури на някои шифови бази и тяхната биологична активност. Може да се каже, че литературният обзор показва много добра осведоменост на докторантката по дисертационната тема и той напълно отговаря на заглавието на дисертационния труд. Също така прави добро впечатление, че обзорът включва значителен брой литературни източници от последните няколко години, което показва актуалността и значимостта на провежданите изследвания.

Основавайки се на задълбочения литературен обзор е формулирана основната задача на дисертационния труд, а именно: *Да се изследва влиянието на новосинтезирани метални [Zn(II), Cu(II), Co(II)] комплекси с Шифови бази и с коджикова киселина, и на статините Ловастатин и Флувастатин върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от две от най-често срещаните неоплазии при жените – рак на гърдата и карцином на шийката на матката и върху трансформирани с вируси (птичи ретровируси, човешки папиломни вируси) туморни клетки.*

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

1. Определяне на влиянието на изследваните вещества върху преживяемостта / пролиферативната активност и да се определи тяхната цитотоксичност (ЦК50, ЦК90) върху моделни клетъчни системи.
2. Проследяване на наличието на цитопатологични изменения в култивираните в присъствие на изпитваните съединения туморни клетки.
3. Идентифициране на типа клетъчна смърт (апоптоза и/или некроза).
4. Определяне на антиоксидантна активност на веществата.
5. Сравняване на въздействието на изследваните съединения върху преживяемостта / пролиферативната активност на туморните и нетуморни клетки.
6. Проучване на ефекта на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

Така дефинираната тема, цели и задачи на дисертационния труд са в една изключително актуална научна област, която в последните години се развива интензивно във връзка с търсенето на нови биологично активни вещества с висока антитуморна активност. Безспорен тук е приносът на научният ръководител, който е насочили докторантката към разработването на тази тематика, а приносът на самата нея е в прецизността и задълбочеността за нейното изпълнение.

По време на разработването на дисертационния труд като биологично активни вещества са изследвани седем Cu(II) и Zn(II) комплекси на шифови бази, на основата на 2,6-диформил-р-крезол и аминокиселините β-аланин, α-валин, L-левцин, и фенилаланин. Също така са изследвани и три метални комплекса на коджикова киселина с Zn(II), Co(II) и Ni(II).



Антитуморната им активност е изследвана спрямо четири човешки постоянни клетъчни линии, получени от две от най-честите неоплазии при жените: рак на гърдата (MCF-7 и MDA-MB-231) и карцином на шийката на матката (HeLa). С оглед получаване на сравнителни данни в част от експериментите е използвана нетуморна клетъчна линия от 3-месечен човешки ембрион (Lep-3). В изследванията са включени и две животински клетъчни линии, получени от трансплантируеми тумори, предизвикани с птичи онкогенни ретровируси -LSR-SF(SR) и LSCC-SF(Mc29) -клон E7.

Ефектът на антитуморната активност на тези нови съединения е проследен чрез използване на различни съвременни методи за анализ като: цитотоксични – оцветяване на клетките с тиазол блу (TB), неутрално червено (NR) и кристал виолет (CV), биохимични – определяне на клетъчна пролиферация чрез изследване експресията на ядрения белтък Ki-67 и цитологични (оцветяване с AO/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, с по-голяма продължителност). Проведени са изследвания за идентифициране на типа на клетъчната смърт –апоптоза и/или некроза. Също така е изследвана способността на тестваните съединения да оказват влияние върху формирането на 3D колонии. Всичко това показва, че докторантката успешно е усвоила и използвала тези биоаналитични методи, което несъмнено ще и бъде от полза и в следващите научни изследвания.

Основните резултати от разработването на дисертацията могат да се обединят в три основни групи, както следва:

1. Металните комплекси на шифовите бази и коджикова киселина с Zn(II), Cu(II), Co(II) и Ni(II) предизвикват намаляване преживяемостта и 2D/3D растежа в различна степен на използваните в дисертационната работа като експериментални модели клетъчни култури. Биологичната им активност е концентрационно и време зависима, като се увеличава с нарастване на приложената концентрация и време на въздействие.
2. Металните комплекси на Zn(II) и Co(II) с коджикова киселина имат по-добре изразен цитотоксичен ефект при туморните клетки, като тяхната ефективност е по-висока от тази на използвания в клиничната онкологична практика - цисплатина.
3. Използването на статини в концентрационния интервал  $1 \div 200 \mu\text{g/ml}$  значително намаляват преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните в тяхно присъствие плъщи саркомни клетки, трансформирани с Rous sarcoma virus щам Schmidt-Ruppin (LSR-SF-SR) и предизвикват цитопатологични изменения и смърт чрез апоптоза в тях.

Получените оригинални научни резултати при изследване на цитотоксичната/антитуморната активност на металните комплекси на нови шифови бази и



коджикова киселина могат да се отнесат като принос в експерименталната онкофармакология, клетъчната/молекулната токсикология и медицинската химия.

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

В обобщение на казаното до тук може да се заключи, че докторантката успешно се е справила с поставените 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, както в посока на фундаментални изследвания, така и в посока на тяхното практическо реализиране.

Описаните в дисертационния труд резултати са оформени в 3 публикувани научни публикации: Biomed J Sci & Tech Res (2019), Acta morphologica et anthropologica, (2018) и една в сборник „XV-th Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic compounds and Natural Products”, (2020) и една е подготвена за печат. За актуалността на изследванията и получените добри резултати е показателен и фактът, че първата статия е цитирана един път от чуждестранни учени. Също така докторантката е участвала в разработването на осем научни проекти, финансирани от ФНИ или от двустранно научно сътрудничество на БАН с други сродни научни организации.

Докторантката успешно е взела необходимите изпити и всички документи са представени съгласно изискванията. Авторефератът отразява коректно и точно резултатите от дисертационния труд.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представените резултати от разработената дисертация са актуални, много 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 в ИЕМПАМ -БАН. Въз основа на изложеното до тук с убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на Милена Главчева и предлагам на уважаемите членове на научното жури да подкрепят присъждането ѝ на образователната и научна степен "ДОКТОР" по научната специалност Морфология, по професионално направление 4.3. Биологически науки.

24.03.2021 г

Изготвил становище:.....

/проф. дхн И. Грабчев/