

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Д-р Ренета Александрова Тошкова, ИЕМПАМ-БАН

Член на Научно жури, назначено със Заповед № РД-15-166/ 19.12.2022 г.
на Директора на ИЕМПАМ-БАН, гр. София

ОТНОСНО: Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, **професионално направление 4.3. Биологически науки**, Научна специалност “Морфология” (шифър 01 06 26).

Тема: “Антитуморна активност на новосинтезирани комплекси на рутений с шифови бази при първични и постоянни клетъчни линии”

Автор: Здравка Димитрова Петрова, редовен докторант в секция Патология, ИЕМПАМ, БАН,

Научен ръководител: проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

Дисертационният труд на Здравка Димитрова Петрова е в областта на експерименталната онкология и онкотерапия. Въпреки постиженията в съвременната терапия на злокачествените заболявания, заболяемостта и смъртността от онкологични заболявания заема второ място в световен мащаб. Основни причини за неуспеха на лечебните стратегии са свързани с първична и придобита множествена лекарствена устойчивост на туморните клетки, със системни нежелани странични ефекти на терапията, хетерогенност на туморите и др. Това налага провеждане на интердисциплинарни изследвания за създаване на нови, високоефективни и добре поносими лекарствени препарати, както и продължаване на усилията за дешифриране на молекулярно-биологичен профил на всеки тумор и пациент, с цел разработване на специални стратегии за персонализирана терапия на раковите заболявания. Обект на интензивни изследвания са съединенията на рутений, които са алтернативни кандидати за химиотерапевтици на основата на платина. Освен това идентифицирането на туморни стволови клетки и създаването на първични туморни култури са незаменим модел за изучаване на молекулярните и клетъчните характеристики на оригиналните тумори, и са перспективен инструмент на персонализираната антитуморна терапия. В това отношение темата на дисертационния труд отговаря на актуалните нужди на съвременната медицина.

Структура на дисертационния труд. Трудът е написан на 254 стр. и структуриран съгласно общоприетите принципи - заглавна страница,

съдържание, използвани съкращения -1 стр., увод -2 стр., литературен обзор - 54 стр., цел и задачи -1 стр., материал и методи -21 стр., резултати -128 стр., обсъждане -14 стр., изводи -2 стр., приноси -2 стр., литература -19 стр., и списък на публикации и участия в научни прояви. Библиографията включва 251 заглавия на латиница, като преобладават тези от последните 10 години. Дисертационният труд е онагледен общо с 36 таблици и 106 многокомпонентни фигури.

Литературният обзор е целенасочен и обширен, и включва данни относно: Епидемиология на онкологичните заболявания, Молекулярна класификация на карциномите на гърдата и клиничното ѝ приложение, Туморна хетерогенност, Туморни стволови клетки и лекарствена резистентност, Автофагия и лекарствена резистентност, Прецизна терапия, Първични клетъчни линии и Биологична роля на рутений и неговите комплекси.

Целта произтича логично от формулираните проблеми в обзора и е ясно формулирана, а именно: да се изследва влиянието на новосинтезирани метални [Ru(II)/(III)] комплекси с Шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки и предизвиканите в тях цитопатологични промени. За изпълнението на целта са дефинирани **7 конкретни задачи**.

Материал и методи. В раздела подробно и компетентно са описани използваните методи, които са разнообразни, прецизно подбрани и трудоемки, и позволяват адекватно да се изпълнят поставените задачи в дисертационния труд. Умело са съчетани и приложени класически и съвременни методи включващи: клетъчно-културални, молекулярно-биологични, цитоморфологични, цитохимични, микроскопски – светлинна, флуоресцентна, конфокална и ТЕМ микроскопия, колонии-образуващ тест, изолиране и фенотипизиране на стволови клетки, получаване на първични клетъчни култури и др. Тъй като целта на обучението в третото ниво на висшето образование е докторантът да получи умения и компетентности в тясна научна специалност, считам, че Здравка Петрова се е справила отлично като е овладяла разнообразен методологичен арсенал, който успешно е приложила в комплексното научно изследване по темата на дисертацията.

Резултатите са подробно представени и логично структурирани в основни раздели и подраздели съгласно поставените задачи. В първия раздел са описани резултатите от експерименти с постоянни клетъчни линии, а във втория са представени резултати от експерименти с първични клетъчни линии.

Получени са данни за *in vitro* цитотоксичен/антипролиферативен ефект на 8 новосинтезирани комплекси на Ru(III) с Шифовите бази (Salen, Salphen, Salpn, Valen, Valphen, Valpn, Valpnol и Valdiami) и техния прекурсор с Ru(II)

чрез прилагане на комплексен подход на изследване. Използвани са методи с различни клетъчни/молекулни мишени и механизми на действие (MTT, NR и оцветяване с кристал виолет -CV) в краткосрочни (72 часа) и дългосрочни (43 дни) експерименти при моделни системи от 6 туморни (5 човешки и 1 плъша) с различен хистологичен произход (карциноми и саркоми) и 2 нетуморни човешки постоянни клетъчни линии. Установено е, че комплексите на Ru(III) с Шифови бази намаляват преживяемостта и потискат 2D и 3D растежа на третираните клетки в по-висока степен в сравнение с техния предшественик – комплексът на Ru(II). Най-добър ефект е наблюдаван при комплексите Ru Salpn и Ru Valdiamci, който е по-висок или съизмерим с този на утвърдените в клиничната практика препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин. Резултатите от имуноцитохимично изследване показват запазена експресия на маркера за пролиферативна активност (Ki67) при третираните туморни клетъчни линии (MDA-MB-231, MCF-7, Saos-2, HeLa), което предполага възможност за комбинирано приложение на комплексите на Ru(III) с т.нар. фазово-специфични антитуморни агенти, проявяващи цитотоксичен ефект по време на определени фази на клетъчния цикъл.

Доказана е способността на новосинтезирани комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази да предизвикват цитопатологични изменения и апоптотичен тип клетъчна смърт при третираните туморни клетъчни линии, установена по цитоморфологичните изменения в клетката и експресия на фосфатидилсерин с Annexin V. Получени са данни относно потенциала на изпитваните рутениеви съединения да предизвикат автофагия в третираните клетки, и е установено, че процесът завършва с апоптоза. Установена е корелация между наличието на туморни клетки със стволов фенотип CD44+ /CD24- /ALDH1+ в хистологичен материал от карцином на гърдата и възникването на регионални и далечни метастази, както и с развитието на туморен рецидив, което би подпомогнало избора на терапевтична стратегия. Получени и фенотипизирани са първични клетъчни култури от рак на млечна жлеза, остеосарком и липосарком при човек и е изследвана чувствителността им към конвенционални и нови противоракови агенти, което дава възможност за персонализиране на терапията в случай на туморни рецидиви в хода на предишна терапия.

Резултатите са онагледени с доказателствен материал от 25 таблици и 80 фигури с високо качество и информативност. Почти всички фигури са композитни и се състоят от по няколко графики или пана от снимки. Проведените изследвания са достатъчни по обем и методологичен обхват, като са използвани необходимите контроли и статистически методи за верификация на получените резултати, което позволява да се даде положителна и висока оценка на получените резултати.

В раздел „Обсъждане“ резултатите са анализирани стегнато и задълбочено в съответствие с наличната научна литература, целта и задачите на дисертацията. Те недвусмислено доказват антитуморен ефект на новосинтезираните съединения на Ru с Шифови бази и разширяват данните за биологична активност на този метал, а също така откриват възможност за бъдещи проучвания относно нови препарати и нови терапевтични подходи. На базата на получените резултати са **дефинирани 8 основни изводи**, които **точно отразяват** най-съществените постижения и закономерности в дисертационния труд и които напълно приемам.

В резултат на комплексното научно изследване са получени **4 оригинални научни приноси и 3 потвърдителни научно - приложни приноси**, както следва :

Оригинални научни приноси

1. За пръв път са получени данни за влиянието на 8 комплекса на Ru(III) и техен предшественик Ru(II) върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от различни хистологични типове тумори при човек, предизвиканите в тях цитоморфологични изменения и типа на клетъчната смърт.
2. Установена е обещаващата антитуморна активност на комплексите RuSalpn и RuValdiamci при клетки от тройно негативен рак на гърдата и остеосарком при човек, за които наличните в момента терапевтични възможности са крайно ограничени. RuSalpn и RuValdiamci имат селективно действие по отношение на туморните клетки, потискат миграцията и инвазивността им, ефектът им е сравним с този на конвенционалните антинеопластични препарати цисплатина, оксалиплатина, епирубицин и паклитаксел.
3. За пръв път е доказана способността на комплекси на Ru II/ III с шифови бази да потискат 2D- и 3D растежа и да предизвикват апоптоза при култивирани в лабораторни условия клетки, експресиращи онкогена v-src (плъща линия LSR-SF-SR), чиито клетъчни аналози участват в патогенезата на голям брой неоплазии у човека и животните и са разпознати като обещаваща мишена за прицелна антитуморна терапия.
4. Получена е сравнителна информация за цитотоксична/антитуморна активност на изпитваните комплекси на Ru(II) и Ru(III) с различни лиганди, която ще подпомогне създаването на нови високоефективни антинеопластични средства.

Потвърдителни научно - приложни приноси - Оптимизирани и въведени в лабораторната дейност са:

1. Подход за визуализиране на автофагия в третиран с метални комплекси туморни и нетуморни клетки, което улеснява търсенията ни в изучаването на

двойнствената роля на този процес в канцерогенезата, оцеляването и клетъчната смърт както и за идентифицирането на иновативни антитуморни средства.

2. Метод за получаване и имуноцитохимично фенотипизиране на първични култури от рак на млечна жлеза при човек, както и за изследването в кратък срок на чувствителността им към конвенционални и нови противоракови агенти. Тази стратегия 230 разкрива възможност за предварително изпитване на чувствителността на тумора на пациенти с онкологично заболяване от химиотерапевтични препарати, което би могло да подпомогне избора на терапия, особено при туморни рецидиви, възникнали след предходно лечение и е стъпка напред към персонализираната медицина.

3. Имунохистохимично изследване на експресията на биомаркерите, идентифициращи туморните стволови клетки при карцином на гърдата CD44, CD24 и ALDH1 на стандартно получени хистологични проби, фиксирани с формалин и включени в парафин (FFPE), без да е необходима подготовка на отделни образци за имунофлуоресцентно изследване. Достъпността и възможността за диагностично приложение на използваната от нас методика за имунохистохимична верификация на експресията на тъканни биомаркери, ще допринесе за приложението на концепцията за туморни стволови клетки (ТСК) в клиничната практика, а установяването на биологичните характеристики на туморните стволови клетки може да послужи за прогностични и диагностични цели

Критични бележки, препоръки, въпроси: Нямам критични бележки по същество. С докторантката са обсъдени пропуски от технически характер, които са взети под внимание в крайния вариант. Дисертационният труд като цяло е написан на много добър научен и литературен език.

Публикации: Във връзка с дисертацията са представени 3 научни публикации, в които докторантката заема водещо място. Две от публикациите са в списания индексирани в световни бази данни (Web of Science, Scopus) и 1 в международно неакадемично издателство. Научни резултати по темата на дисертацията са докладвани на 7 национални и 12 международни научни форуми. Основната част от научните изследвания докторантката е осъществила в изследователските лаборатории на секция „Патология“ при ИЕМПАМ-БАН, с финансовата подкрепа на научни проекти финансирани от външни и национални източници (ФНИ, COST-акции, двустранни проекти и др.). Докторантката участва общо в 7 научни проекта.

Оценка на автореферата–Авторефератът е добре оформен в съответствие с изискванията, и отразява в съкратен вид съдържанието на дисертационния труд. Коректно са представени и онагледени основните резултати, справка за изводи и приноси и данни за научната активност на докторантката.

Биографични данни – Здравка Петрова е родена в град София през 1979г. Завършва Софийската математическа гимназия в паралелка с профил биология. От 2000г е бакалавър по „Управление на здравните грижи“. През 2009 г придобива степен магистър по „Обществено здраве и здравен мениджмънт“ в МУ-София. През 2017г придобива степен магистър по „Вирусология“ в БФ на СУ „Св.Кл.Охридски“. След успешно издържан конкурсен изпит от януари 2018г е редовен докторант по научна специалност „Морфология“ в секция „Патология“, на ИЕМПАМ, с ръководител проф. Раостина Александрова. Докторант Здравка Петрова е изпълнила образователната програма и е надвишила изискуемите количествени критерии -събрала е 902 кредита при изискуеми 250.

За изпълнение на експерименталната работа по дисертацията докторант Здравка Петрова демонстрира основни теоритични познания по темата на дисертацията, умения за правилен подбор на подходяща методология и моделни системи, и практически умения за провеждане на научно-изследователска дейност. Придобила е опит да анализира, обобщава и обективно да дискутира и презентира научни резултати, да извежда конкретни изводи и да оформя научни статии, които напълно съответстват на изискванията на образователната и научна степен „Доктор“.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на докторант Здравка Петрова е оригинално, методично обосновано и прецизно изпълнено научно изследване, което по съдържание, актуалност и качество напълно отговаря на критериите на ЗРАС в РБ и правилника за неговото приложение, и на вътрешните правилници на БАН и ИЕМПАМ-БАН. Получените резултати допринасят за разширяване на наличните знания по темата на дисертацията и имат изразен оригинален и научно-приложен характер. Докторантката демонстрира задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност, както и умения за самостоятелни научни изследвания.

Гореизложеното ми позволява да дам положителна и висока оценка на разработения дисертационен труд и убедено да препоръчам на членовете на почитаемото Научно жури да **присъди** образователната и научна степен „Доктор“ на Здравка Петрова в Професионално направление 4.3." Биологически науки", Научна специалност " Морфология " 01.06.26.

20.02. 2023г.,
София

Рецензент:


проф. д-р Ренета Тошкова