

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ  
И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ

---

ХРИСТО КЪНЧЕВ ХРИСТОВ, МАГИСТЪР

„АНТИТУМОРНА И АНТИВИРУСНА АКТИВНОСТ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ МЕТАЛНИ  
КОМПЛЕКСИ НА ШИФОВИ БАЗИ И САЛИНОМИЦИН И НА МОДИФИЦИРАНИ С 1,8-  
НАФТАЛАМИДИ ГЛЮКОЗАМИНИ“

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика  
Професионално направление: 4.3 Биологически науки  
Научна специалност: „Вирусология“

Научен ръководител:

Проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор (ИЕМПАМ-БАН)

София, 2026 г.

---

Представеният Дисертационен труд е написан на 218 стр. и съдържа 73 фигури и 58 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 302 заглавия.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей – Българска академия на науките (ИЕМПАМ- БАН). Част от изследванията са проведени в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” – БАН.

Металните комплекси с Шифови бази са синтезирани и химически/физикохимически охарактеризирани от проф. д-р Габриела Маринеску и доц. д-р Даниела-Кристина Кулица, Институт по физикохимия „Илие Мургулеску”, Румънска академия, Букурещ, Румъния; инж. д-р Илдико Бута и проф. Отилия Костишор от Института по химия „Кориолан Драгулеску“, Румънска академия, Тимишоара, Румъния.

Металните комплекси със салиномицин са синтезирани от доц. д-р Юлияна Иванова, Медицински факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Модифицираните с 1,8- нафталамиди глюкозамини са приготвени от проф. д-р Иво Грабчев, Медицински факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, проведено със заповед № НО -05-05-19 от 18.12.2025 г. на Директора на Института .

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в Заседателна зала „Акад. Ксенофонт Иванов“ на ИЕМПАМ-БАН (ул. „Акад. Георги Бончев“, бл. 25, София) на открито заседание на Научно жури, назначено със Заповед № на Директора на Института, в състав:  
.....

Председател на Научното жури: проф. д-р Димитър Кадийски (ИЕМПАМ-БАН)

Членове:

Проф. д-р Нина Атанасова (ИЕМПАМ-БАН)

Проф. д-р Рени Калфин (Институт по невробиология-БАН)

Проф. д-р Галина Куртева (УМБАЛ „Св. Екатерина“)

Доц. д-р Стефка Крумова (НЦЗПБ)

Материалите по защитата се намират на разположение на интересуващите се в Канцеларията на ИЕМПАМ-БАН (стая 209).

Изказвам искрената си благодарност на моя научен ръководител проф. д-р Радостина Александрова за професионалното ръководство, подкрепата и търпението през целия период на моята докторантура.

Благодаря за вдъхновението към научната работа, за ценните съвети и насоки, както и за доверието и ангажираността още от времето на моята магистратура. Благодарение на нейната подкрепа и всеотдайност този дисертационен труд беше успешно реализиран.

Благодаря на моите колегии и приятели от Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН – гл. асист. д-р Тая Живкова, гл. асист. д-р Абдулкадир Абудаллах и инж. д-р Пламен Киров, както и на гл. асист. д-р Лора Дякова от Института по невробиология на БАН, за съдействието, колегиалната подкрепа и създадената благоприятна работна среда по време на изследванията.

Изказвам благодарности на д-р Десислав Русев Динев, асистент в Медицинския факултет към Медицински университет – София, за професионалната подкрепа.

Изказвам благодарност на колегите от Румънската академия – проф. д-р Габриела Маринеску и доц. д-р Даниела-Кристина Кулица от Института по физикохимия „Илие Мургулеску“, Букурещ; проф. д-р Отилия Костишор и инж. д-р Илдико Бута от Института по физикохимия „Кориолан Драгулеску“, Тимишоара, както и на проф. д-р Иво Грабчев и доц. д-р Юлияна Иванова, за синтезирането и предоставянето на металните комплекси и модифицираните с 1,8-нафталимиди глюкозамини, използвани в настоящото изследване.

Благодаря на колегите от Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН – проф. д-р Георги Милошев и проф. д-р Милена Георгиева за оказаното съдействие при провеждането на молекулярнобиологичните тестове.

Благодаря на гл. асист. д-р Елица Голкочева от Национална референтна лаборатория „Хепатитни вируси“, НЦЗПБ, за оказаното съдействие при работата с хепатит Е вируса.

Изказвам благодарности на Ръководството на ИЕМПАМ-БАН за оказаната подкрепа и съдействие през цялото време на моята докторантура.

Искрено благодаря на моята съпруга, на моето семейство и на най-близките ми хора за разбирането, търпението и постоянната подкрепа през годините на обучение и научна работа.

Благодаря на Научното жури за отделеното време, ценните напътствия и препоръки във връзка с дисертационния труд.

***С обич и признателност посвеждавам този дисертационен труд на моето семейство – на моите деца, на моята съпруга и на най-близките ми хора.***

## СЪДЪРЖАНИЕ:

I. Въведение .....	6
II. Цели.....	7
III. Задачи.....	7
IV. Материали и методи.....	8
V. Резултати и обсъждане.....	15
V.1. Цитотоксична / антитуморна активност на вещества.....	15
V.1.1. Комплекси на метали с Шифови бази.....	15
V.2. Влияние върху репликацията на човешки херпесни вируси (HSV-1/HHV-1 и HSV-2/HHV-2).....	44
V.3. Разработване на ин витро клетъчна система за заразяване с HEV и поддържане на вирусната репликация в лабораторни условия.....	45
V.4. Определяне на съдържанието на метали в яйца от различни системи за производство.....	46
VI. Изводи.....	49
VII. Справка за приносите в дисертационния труд.....	50
VIII. Резюме или заключение (на английски език).....	51
IX. Използвана литература.....	52
X. Списък с научни публикации по темата на дисертацията и цитирания.....	53
XI. Списък на изнесени научни съобщения по темата на дисертацията.....	56
XII. Благодарности към научноизследователски проекти.....	60

## НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА:

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

КК – Клетъчна Култура

ОВХ – Остър вирусен хепатит

СЗО – Световна Здравна Организация

ФСБ – Фосфатно-солеви буфер

ФТС – Феталният телешки серум

ЦК<sub>50</sub> – Цитотоксична Концентрация на веществото, която намалява с 50% преживяемостта на третираните клетки

ЦК<sub>90</sub> – Цитотоксична Концентрация на веществото, която намалява с 90% преживяемостта на третираните клетки

ЦПЕ – Цитопатичен Ефект

МТТ тест – колориметричен тест за оценка на метаболитната активност на клетките

ALSV – Птичи левкозни и саркомни вируси (Avian Leukosis and Sarcoma Viruses)

АО/PI – Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид (Double staining with acridine orange (AO)/propidium iodide (PI))

С-onc – Клетъчен онкоген (Cellular oncogene)

Ctrl – Контрола

CV – Тест за оцветяване с кристалвиолет (Crystal violet staining)

DMSO – Диметилсулфоксид (Dimethylsulfoxide)

HPV – Човешки папиломен вирус (Human papilloma virus)

HSV – Херпес симплекс вирус

LCR – Long Control Region

Mc29 – Миелоцитоматозен вирус

NR – Тест за включване на неутално червено (Neutral red uptake assay)

RSV – Саркомен вирус на Раус (Rous sarcoma virus)

V-onc – Вирусен онкоген (Viral oncogene)

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Злокачествените новообразования остават водеща причина за заболяемост и смъртност в световен мащаб, въпреки значителния напредък в диагностиката и терапията. Значима част от тях са свързани пряко или косвено с **вирус-индуцирана карциногенеза**, при която онкогенни вируси и вирусно-клетъчни взаимодействия допринасят за злокачествената трансформация на клетките и прогресията на тумора. Традиционните противотуморни средства често се характеризират с ограничена терапевтична възможност, развитие на лекарствена резистентност и тежки нежелани реакции. Това налага търсене и разработване на нови противотуморни агенти, които да съчетават по-висока селективност към туморните клетки, по-благоприятен токсикологичен профил и потенциал за преодоляване на устойчивостта, включително в контекста на вирусно трансформирани клетъчни системи.

Комплексните съединения на метали с биологично активни лиганди заемат особено място в съвременната експериментална онкофармакология и антивирусни изследвания. Успехът на платина-съдържащите цитостатици показва, че металните комплекси могат да бъдат изключително ефективни противотуморни агенти. В последните години интересът се насочва към комплекси на есенциални метали като мед, цинк, кобалт, манган и никел, както и на рутений, които демонстрират обещаващ профил по отношение на активност, селективност и потенциално по-ниска системна токсичност (Adhikari et al., 2024). Допълнително внимание привличат новосинтезираните метални комплекси на шифови бази, металните комплекси на салиномицин, както и системите на основата на хитозан и негови химически модификации, които могат да функционират както като носители, така и като компоненти, модулиращи биологичната активност, фармакокинетиката и клетъчното таргетиране, включително с потенциал за проява както на противотуморна, така и на антивирусна активност (D'Amato et al., 2023).

Онковирусологичните модели предоставят особено ценна платформа за оценка на противотуморната и потенциално антивирусната активност на нови съединения. Клетъчни линии, трансформирани с високорисков човешки папиломен вирус (HPV18), както и с онкогенни ретровируси като Mc29 и Rous sarcoma virus (RSV), експресират вирусно кодирани онкогени (v-onc), включително v-myc и v-src. Тези модели се характеризират с постоянно работещи онкогени и дълбоко нарушена регулация на клетъчния цикъл, апоптозата и сигналните пътища, свързани с пролиферацията и оцеляването на клетките. Поради това те представляват подходяща експериментална система за изследване както на противотуморния, така и на потенциалния антивирусен ефект на новосинтезираните метални комплекси, както и за анализ на тяхното въздействие върху ключови вирусно-клетъчни процеси.

В този контекст особено значение придобиват металните комплекси на шифови бази, които могат да модифицират **окислително-редукционния баланс** на клетките и да взаимодействат с нуклеинови киселини и белтъци, както и да повлияват митохондриалната функция. Метал-салиномицининовите комплекси представляват интерес поради способността на салиномицин да атакува туморни стволови клетки и да

нарушава йонната хомеостаза, докато координацията с метални йони може да промени липофилността, стабилността и клетъчния транспорт на тези съединения. Хитозанът и неговите модификации, от своя страна, позволяват създаването на биосъвместими носещи системи, които да повишат клетъчното усвояване, да подобрят разтворимостта и да осигурят контролирано освобождаване на активните комплекси (Munteanu et al., 2023).

Въпреки наличието на отделни проучвания върху метални комплекси и техния противотуморен потенциал, все още липсват достатъчно систематизирани данни за въздействието на новосинтезирани комплекси на шифови бази, салиномицин–метални йони и хитозан-базирани системи на основата на есенциални метали (мед, цинк, кобалт, манган, никел) и рутений върху **онковирусно трансформирани клетъчни модели**. Не са напълно изяснени редица въпроси, сред които спектърът на цитотоксичност и антипролиферативна активност, потенциалните механизми, включително индукция на апоптоза, промени в експресията на вирусни онкогени (*v-myc*, *v-src*) и въздействие върху ключови клетъчни сигнални пътища, свързани с вирусно индуцираната злокачествена трансформация (Zhang & Bai, 2024).

На този фон **обект на настоящата дисертация** са новосинтезирани метални комплекси на шифови бази, метални комплекси на салиномицин с йони на есенциални метали и рутений, както и наноразмерни модификации на хитозан. Тяхната цитотоксична и потенциална антитуморна активност е изследвана при култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни клетки, трансформирани с HPV18, Мс29 (съдържащ гена *v-myc*) и RSV (съдържащ гена *v-src*).

## II. ЦЕЛИ

1. Да се изследва цитотоксичната активност на новосинтезирани комплекси на метали с различни лиганди (Шифови бази, салиномицин) и модифицирани с 1,8-нафталимиди глюкозамини (наночастици) върху трансформирани с вирус (птичи ретровируси, човешки папиломни вируси) туморни клетки и влиянието на изпитваните съединения върху репликацията на човешки херпесни вируси (HSV-1/HHV-1 и HSV-2 / HHV-2).
2. Разработване на ин витро клетъчна система за заразяване с HEV и поддържане на вирусната репликация.

## III. ЗАДАЧИ

1. Определянена цитотоксичната/потенциалната антитуморна активност на новосинтезирани комплекси на метали (Zn, Cu, Co, Ru, Ni, Mn) с ШБ или салиномицин.
2. Определянена цитотоксичната/потенциалната антитуморна активност на модифицирани с 1,8-нафталимиди глюкозамини (наночастици) върху

трансформирани с вирус (птичи ретровируси, човешки папиломнивируси) туморни клетки и влиянието им върху репликацията на човешки херпеснивируси (HSV-1/HHV-1 и HSV-2 / HHV-2).

3. Сравнение на чувствителността към изпитваните съединения (метални комплекси, модифицирани глюкозамини) на туморни и нетуморни клетки.
4. Сравнение на цитотоксичната активност на изследваните метални комплекси и модифицирани глюкозамини прилагани в клиничната практика антитуморни агенти.
5. Разработвана in vitro клетъчна система за заразяване с HEV и поддържане на вирусната репликация.
6. Да се оптимизира ввеждането на лабораторната практика протокол за продължително култивиране на HEV в клетъчна култура.

## **IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **IV.1. МАТЕРИАЛИ**

#### **1. Химикали и консумативи**

Хранителната среда D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) и феталният телешки серум (ФТС) са закупени от Gibco-I nvitrogen (Великобритания). Диметилсулфоксидът (DMSO), неутралното червено, кристалният виолетът, трипановото синьо, пропилендиетил йодид (PI), акридин оранжът (AO) и трипсинът са получени от AppliChem (Германия), а тиазол блу тетразолиум бромидът (MTT) и агарозата са от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия). За синтезите на салиномицин киселина и металните комплекси на салиномицин са използвани салиномицин-натрий, солна киселина, метални соли ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), диетилов етер, ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Салиномицин-натрий е предоставен от Петър Дорков, дх, Биовет, Пещера. Металните соли, солната киселина и органичните разтворители (супер чисти за анализ) са закупени от Merck, Германия.

Всички останали химикали с висока степен на чистота са осигурени от местни доставчици. Стерилната пластмасова посуда и филтрите за стерилизиране на среди и разтвори (0.2  $\mu\text{m}$ ) са доставени от Orange Scientific (Белгия).

#### **2. Вещества**

##### **2.1. Метални комплекси на Шифови бази - I група (Шифоба база SALTIAZ)**

Изследвана беше биологичната активност (влияние върху клетъчната преживяемост и пролиферация) на 5 новосинтезирани метални комплекса с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между салицилалдехид и 2-аминобензотиазол, представени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Изпитвани комплекси на метали с Шифови бази - I група (Шифова база SALTIAZ)

Кодово наименование	Молекулна формула	Молекулна маса (g/mol)
Ru	[Ru(SALTIAZ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)Cl]	661.2
Zn	[Zn(SALTIAZ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	608.0
Co	[Co(SALTIAZ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	601.5
Cu	[Cu(SALTIAZ)(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)]	396.7
Ni	[Ni(SALTIAZ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	601.3

Синтезирането и определянето на химичните и физико-химичните характеристики на веществата е осъществено от д-р Даниела-Кристина Кулица и д-р Габриела Маринеску от Института по физикохимия „Илие Мургулеску”, Букурещ, Румъния.

### 2.2 Метални комплекси на Шифови бази - II група (Шифова база V – V комплекси)

За получаването им е разработен нов синтетичен подход за синтез на хомо- и хетероядрени комплекси, базиран на Шифовия лиганд N,N'-бис[(3-метоксисалицилиденамино)-пропил]-пиперазин (H<sub>2</sub>L). Лигандът е кристализиран във формата H<sub>2</sub>L•2DMSO и неговата структура е определена (лигандът е означен като V). С използването на този лиганд са синтезирани следните комплекси: [CoL](ClO<sub>4</sub>) (VCo), [Zn<sub>2</sub>L(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>]•2H<sub>2</sub>O (VZn), [Cu<sub>3</sub>L<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (VCu) (Таблица 2).

**Таблица 2.** Метални комплекси на Шифови бази - II група (Шифова база V)

Кодово наименование	Молекулна формула	Молекулна маса (g/mol)
V	C30H48N4O6S2	624.28
VCo	[CoL](ClO <sub>4</sub> )	624.95
VZn	[Zn <sub>2</sub> L(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ]•2H <sub>2</sub> O	751.43
VCu	[Cu <sub>3</sub> L <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	1247.81

### 2.3. Метални комплекси на Шифови бази - III група (Шифова база L – L комплекси)

Изследвани бяха пет кордиционни полимера ([Cu<sub>3</sub>L<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)]NO<sub>3</sub>•2MeOH•2H<sub>2</sub>O, [Cu<sub>3</sub>L<sub>2</sub>(N<sub>3</sub>)]CH<sub>3</sub>COO, [Cu<sub>3</sub>L<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>), [MnL](ClO<sub>4</sub>), [CoL](NO<sub>3</sub>)•2CH<sub>3</sub>OH), базирани на Шифова база- H<sub>2</sub>L (H<sub>2</sub>L = N,N'-bis[(2-hydroxybenzylideneamino)-propyl]-piperazine) представени в Таблица 3.

Веществата описани в т.2.2. и 2.3. са синтезирани и характеризирани от колектива на проф. Отилия Костишор от Института по химия в Тимишоара, Румъния, с активното участие на инж. д-р Илдико Бута (Buta et al., 2020, Buta et al. 2018).

**Таблица 3.** Метални комплекси на Шифови бази - III група (Шифова база L)

Кодово наименование	Молекулна формула	Молекулна маса (g/mol)
L	(C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	408,5
Co	[CoL](NO <sub>3</sub> )·2CH <sub>3</sub> OH	591,55
Mn	[MnL](ClO <sub>4</sub> )	560,91
Cu	[Cu <sub>3</sub> (C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1220,57
CuNO <sub>3</sub>	[Cu <sub>3</sub> (C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> )]NO <sub>3</sub> ·2CH <sub>3</sub> OH·2H <sub>2</sub> O	1104,73
CuN	[Cu <sub>3</sub> (C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (N <sub>3</sub> )]CH <sub>3</sub> COO	1180,98

#### 2.4. Метални комплекси със салиномицин

При подготовката на дисертационния труд е изследвана цитотоксичната активност на три комплекса на салиномицин с Zn(II), Cu(II) и Co(II). Повече информация за тях е представена на Фиг. 1 и в Табл. 4.

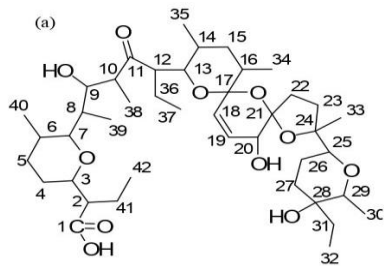
Веществата са синтезирани от доц. д-р Юлияна Иванова, Медицински факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ (Ivanova et al., 2012).

**Таблица 4.** Салиномицин и негови метални комплекси

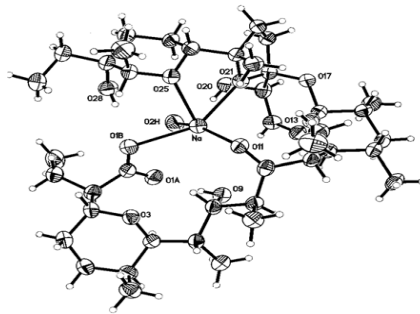
Кодово наименование	Молекулна формула	Моларна маса, g/mol	Допълнителна информация
SalH	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>11</sub>	750	Некоординиран антибиотик
SalNa*	C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> O <sub>11</sub> Na	773	Търговски продукт, комплекс на салиномицин с Na <sup>+</sup>
SalZn	C <sub>84</sub> H <sub>142</sub> O <sub>24</sub> Zn	1601,4	Комплексно съединение на салиномицин с Zn(II)
SalCu	C <sub>84</sub> H <sub>146</sub> O <sub>26</sub> Cu	1635,5	Комплексно съединение на салиномицин с Cu(II)
SalCo	C <sub>84</sub> H <sub>146</sub> O <sub>26</sub> Co	1631	Комплексно съединение на салиномицин с Co(II)

\*SalNa е включен само за сравнителна информация и не е обект на експериментална работа в представената дисертация

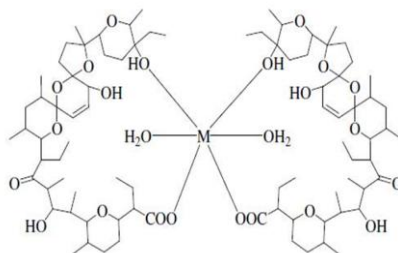
**Фиг. 1.** Салиномицин и негови метални комплекси



А. Структурна формула на SalH (салиномицинова киселина) със схема за номериране



Б. Кристална структура на SalNa (натриев салиномицин).

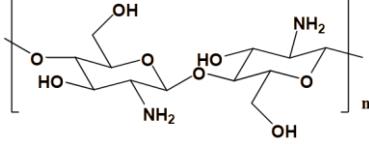
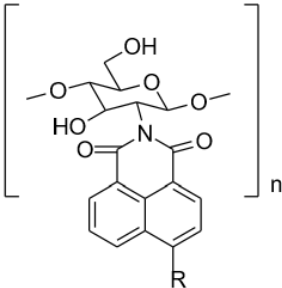
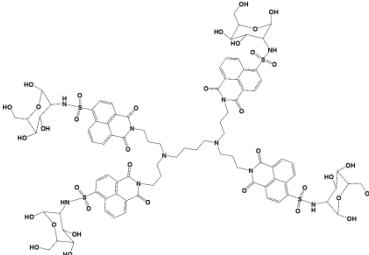


В. предполагаема структура на биметални (II) комплекси на салиномицин.

## 2.5. Глюкозамини, модифицирани с 1,8-нафталимиди

Изпитваните вещества от тази група са представени в Табл.5 Те са синтезирани от проф. дхн. Иво Грабчев от Медицинския факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Таблица 5. Глюкозамини, модифицирани с 1,8-нафталимиди

Наименование на изпитваното вещество	Химична формула	Работно наименование
Хитозан	 <p>The diagram shows the repeating unit of Chitosan, which is a linear polysaccharide composed of D-glucosamine units. Each unit is a six-membered pyranose ring with an amino group (-NH<sub>2</sub>) at the C2 position and hydroxyl groups (-OH) at the C3 and C6 positions. The units are linked by β-1,4-glycosidic bonds, forming a long chain with a subscript 'n' indicating the number of repeating units.</p>	Chitosan
Химична структура на модифициран хитозан с 1,8-нафталимид, заместванията са съответно при C-1 (Ch-1), при C-3 (Ch-3) и при C-4 (Ch-4)	 <p>The diagram shows a modified chitosan repeating unit. It features a glucose ring with a 1,8-naphthalimide group attached to the C1 position. The naphthalimide core has a substituent 'R' at the 8-position. The unit is enclosed in brackets with a subscript 'n'.</p>	Ch-1, Ch-3, Ch-4
Полипропилен имин от първо поколение, съдържащ 1,8-нафталимиди с глюкозаминови фрагменти	 <p>The diagram shows a complex polypropylene imine structure. It consists of a central polypropylene imine backbone (a chain of nitrogen atoms connected by propylene groups) with multiple 1,8-naphthalimide and glucosamine fragments attached to it. The glucosamine fragments are shown in their cyclic pyranose form.</p>	M2

## 2.6. Подготовка на изпитваните вещества (метални комплекси, модифицирани глюкозамини) за изследване

Изпитваните съединения бяха предварително разтворени в диметилсулфоксид (DMSO) с цел получаване на концентрирани изходни разтвори. След пълно разтваряне на

веществата, те бяха разредени в съответната хранителна среда до изискваните работни концентрации. Процентното съдържание на DMSO в изходните и работните разтвори е представено в Таблица 6.

Предходни наши изследвания показват, че DMSO може да индуцира цитотоксичен ефект при концентрации  $\geq 2\%$  (Дякова, 2019).

**Таблица 6.** Съдържание на диметилсулфоксид (DMSO) в работните разтвори на изпитваните съединения

Концентрация на изпитваното вещество ( $\mu\text{g/mL}$ )	Концентрация на DMSO (%)
0.5	0.001
1	0.002
5	0.01
10	0.02
25	0.05
50	0.1
100	0.2
200	0.4
400	0.8
600	1.2
1000	2.0

### 3. Експериментални модели

#### 3.1. Клетъчни култури

Използваните клетъчни култури са представени са в Таблица 7.

Клетъчната линия LSR-SF-SR е получена и охарактеризирана от доц. д-р Ивайло Александров, д-р (Alexandrov, 1993), а линия LSCC-SF-Mc29 от проф. Радостина Александрова (Александрова, 2008). И двете клетъчни линии се поддържат в ИЕМПАМ-БАН от колектива на проф. Р. Александрова. Останалите използвани от нас клетъчни линии са взети от Банката за клетъчни култури и вируси на ИЕМПАМ-БАН.

**Таблица 7.** Клетъчни култури, използвани като експериментални системи

Произход	Наименование	Т / НТ	Описание
<b>Цитотоксична / Антитуморна активност*</b>			
Човек	HeLa	Т	Карцином на шийката на матката, клетките са трансформирани с HPV – тип 18 (онкогени E5, E6, E7)
	Lep-3	НТ	Фибробластодни клетки от бял

			дроб на 3-месечен ембрион
Плъх	LSR-SF-SR	T	Трансплантируем сарком, предизвикан с птичия Rous sarcoma virus щам Schmidt-Ruppin, клетките експресират онкогена <i>v-Src</i>
Кокошка	LSCC-SF-Mc29	T	Трансплантируем хепатом у пиле, предизвикан с миелоцитоматозния вирус Mc29 - клетките експресират онкогена <i>v-myc</i>
<b>Антивирусна активност</b>			
Говедо	MDBK	HT	Бъбрек на здрав възрастен бик
<b>Модел на хронична инфекция с хепатит Е вирус</b>			
Човек	НepG2	T	Хепатоцелуларен карцином
Човек	PLC/PRF/5	T	Хепатоцелуларен карцином
Човек	A549	T	Недребноклетъчен рак на белия дроб

\*Тип изследвания, за които клетъчните линии са използвани;  
**T** = Туморна; **HT** = Нетуморни

## 3.2 Вируси

### Човешки херпесни вируси

В експериментите бяха използвани референтните щамове – *Herpes simplex virus* - 1 (HSV-1) щам F и *Herpes simplex virus* -2 (HSV-2) щам BA от колекцията на Лаборатория „Вирусология” на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски

### Хепатит Е вирус

Шест положителни за HEV серумни проби от пациенти с остър вирусен хепатит Е (OBX), предоставени от гл.ас. д-р Елица Голкочева, Национална референтна лаборатория „Хепатитни вируси“, НЦЗПБ. Критерии за подбор на пробите беше да са с концентрация на HEV RNA по-голяма от 100 000 [IU/ml], установено с RT-PCR.

## IV.2. МЕТОДИ

### 1. Работа с клетъчни култури и вируси

- 1.1. Клетъчно култивиране
- 1.2. Замразяване и размразяване на клетки
- 1.3. Вирусно култивиране

### 2. Определяне на клетъчна жизнест

- 2.1. Тест за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо (TB) - с електронен брояч (Invitrogen<sup>tm</sup>, Countess<sup>tm</sup>, Automated Cell Counter)

- 2.2. Определяне влиянието на вещества върху клетъчната преживяемост
  - 2.2.1. МТТ тест (MTT)
  - 2.2.2. Тест за включване на неутрално червено (Neutral red uptake cytotoxicity assay - NR)
  - 2.2.3. Оцветяване с кристалвиолет (CV)

### **3. Проучвания върху способността на веществата да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки**

- 3.1. Влияние на вещества върху клетъчния монослой
- 3.2. Оцветяване на клетки с акридин оранж (АО) и пропидиев йодид (PI)
- 3.4. Кометно изследване при неутрално рН за определяне на способността на веществата да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите (*Single Cell Gel Electrophoresis, Comet assay*)
- 3.5 FACS анализ за изследване на влиянието на веществата върху клетъчния цикъл и митохондриалната активност след оцветяване с родамин 123 (Rh123)

### **4. Изследване на влиянието на вещества върху 3D колонии-образуващата способност на туморни клетки (3D колонии образуващ метод = КОМ)**

### **5. Определяне на съдържание на метали в яйца от различни системи за производство**

### **6. Култивиране на вируси в клетъчни култури**

### **7. Определяне на вирусен титър в присъствие и отсъствие на изследваните вещества**

### **8. Статистическа обработка и графично представяне на експерименталните данни**

## **V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

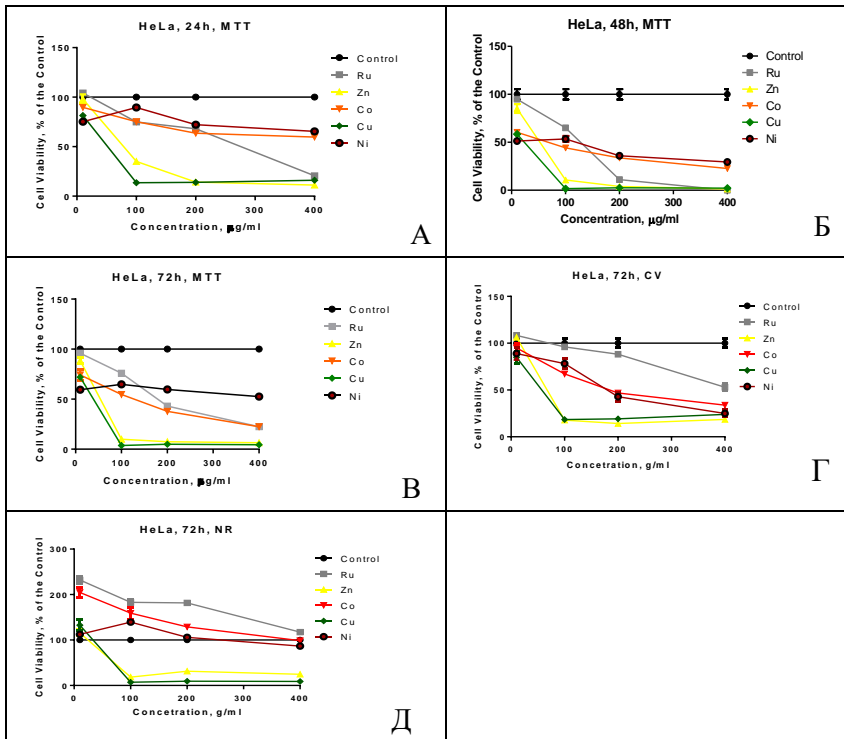
Проучванията бяха проведени чрез краткосрочни (най-често 24-72 часа) експерименти с монослойни (2D) култури и дългосрочни експерименти (продължителност над 2 седмици) с 3D колонии от туморни клетки в полутечна среда. Приложен беше комплекс от методи с различни клетъчни / молекулни мишени и механизми на действие.

### **V.1. Цитотоксична/антитуморна активност на вещества**

#### **V.1.1. Комплекси на метали с Шифови бази**

**Комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифова база SALTIAZ**

Веществата са приложени при трансформирани с ретровирус пльши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR в концентрации 10, 100, 200 и 400  $\mu\text{g/ml}$  в продължение на 24, 48 и 72 часа. С получените от проведените тестове (MTT, NR, CV) данни бяха построени криви „концентрация-отговор”, с чиято помощ бяха определени концентрациите, които намаляват съответно с 50% (ЦК<sub>50</sub>) и с 90% (ЦК<sub>90</sub>) дяла на живите клетки в сравнение с контролата (Фиг. 2 и Табл. 8). С тяхна помощ изпитваните съединения бяха подредени в йерархични последователности, отразяващи цитотоксичната им активност (Табл.9).



**Фиг.2.** Цитотоксичен ефект на комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифова база SALTIAZ при човешки карциномни клетки от линия HeLa. Веществата са приложени в концентрации 10-400  $\mu\text{g/ml}$  за 24, 48 и 72 часа. Влиянието им върху клетъчната преживемост и/или пролиферативна активност е определено чрез MTT тест (A, B, C), оцветяване с кристал виолет - CV (D) и тест за включване на неутрално червено - NR (E).

**Таблица 8.** Цитотоксични концентрации - ЦК<sub>50</sub> (μM) и ЦК<sub>90</sub> (μM), на изпитваните комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифова база SALTIAZ при клетки от линия HeLa.

Клетъчна линия	HeLa				
Метод	MTT			NR	CV
Време на въздействие (часове)	24	48	72	72	72
Ru SALTIAZ	415.6* (н.о.)**	192.8 (302.5)	270.6 (н.о.)	н.о. (н.о.)	605.0 (н.о.)
Zn SALTIAZ	128.7 (657.9)	86.4 (164.5)	54.0 (88.9)	85.2 (н.о.)	111.7 (н.о.)
Co SALTIAZ	н.о. (н.о.)	110.9 (н.о.)	213.5 (н.о.)	397.2 (н.о.)	307.4 (н.о.)
Cu SALTIAZ	130.8 (н.о.)	59.0 (217.3)	83.5 (232.7)	152.4 (н.о.)	144.1 (н.о.)
Ni SALTIAZ	н.о. (н.о.)	16.6 (н.о.)	665.2 (н.о.)	373.5 (н.о.)	300.6 (н.о.)

\*ЦК<sub>50</sub> и \*\*ЦК<sub>90</sub> (в скоби) - концентрациите (μM), при които процентът на живите клетки намалява с 50%, респективно с 90%, в сравнение с нетретираната контрола; С „н.о.“. (не е определена) са означени случаите, при които данните за преживяемостта на клетките не са позволили определянето на съответната концентрация; MTT = MTT тест; NR = Метод за включване на наутрално червено; CV = Оцветяване с кристал виолет.

**Таблица 9.** Йерархични редове на изпитваните комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифова база SALTIAZ, отразяващи в низходящ ред цитотоксичната им активност при клетки от линия HeLa.

Метод	Време на третиране(ч.)	Йерархичен ред ( $\mu\text{M}$ )
MTT	72	Zn > Cu > Co > Ru > Ni
CV	72	Zn > Cu > Ni > Co > Ru
NR	72	Zn > Cu > Ni > Co > Ru

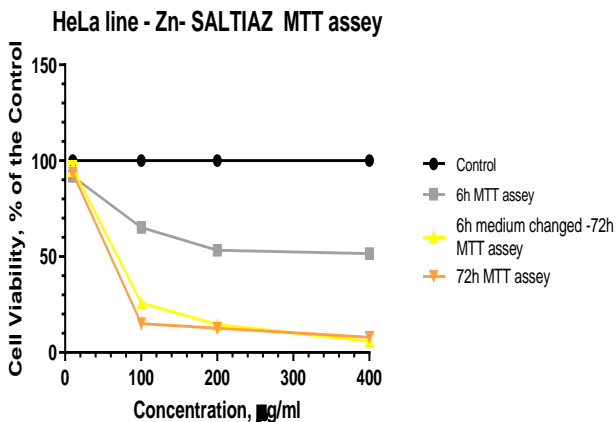
MTT = MTT тест; NR = Метод за включване на неутрално червено; CV = Оцветяване с кристал виолет. Йерархичните редове са построени въз основа на концентрациите, в които веществата намаляват преживяемостта на клетките с 50% (ЦК<sub>50</sub>,  $\mu\text{M}$ ), всеки ред започва с веществото, проявило най-висока цитотоксична активност (с най-ниска ЦК<sub>50</sub>). Подобни резултати бяха получени и при плъщите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR.

Сред металните комплекси с шифовата база SALTIAZ с ней-висока цитотоксична активност изпъкват комплексите на Zn и Cu (Табл. 8). Проучванията с кратки периоди на въздействие (3 и 6 часа в допълнение на 24, 48 и 72-часовите интервали, Виж Фиг. 3. Модифицирана експериментална постановка) разкриват, че Zn SALTIAZ намаляват преживяемостта и пролиферативната активност на третираните клетки още на бия час (Табл. 8, Фиг. 4). Замяната на съдържащата метален комплекс хранителна среда с немодифицирана среда (Фиг. 3) показва, че след отстраняването на металния комплекс от средата не се наблюдава обратимост на цитотоксичния ефект (Фиг. 4). Цитотоксичният ефект на изследваните съединения от тази група обаче остава най-силно проявен, когато клетките са култивирани в тяхно присъствие 72 часа (най-дългият изследван период на третиране).

Проведените дългосрочни експерименти също потвърдиха високата цитотоксична активност на комплексите на Zn и Cu с този лиганд при човешките карциномни клетки от линия HeLa, при плъщите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR те са изпреварени от комплекса на Ru (Табл. 10).



Фиг. 3. Модифицирана експериментална постановка.

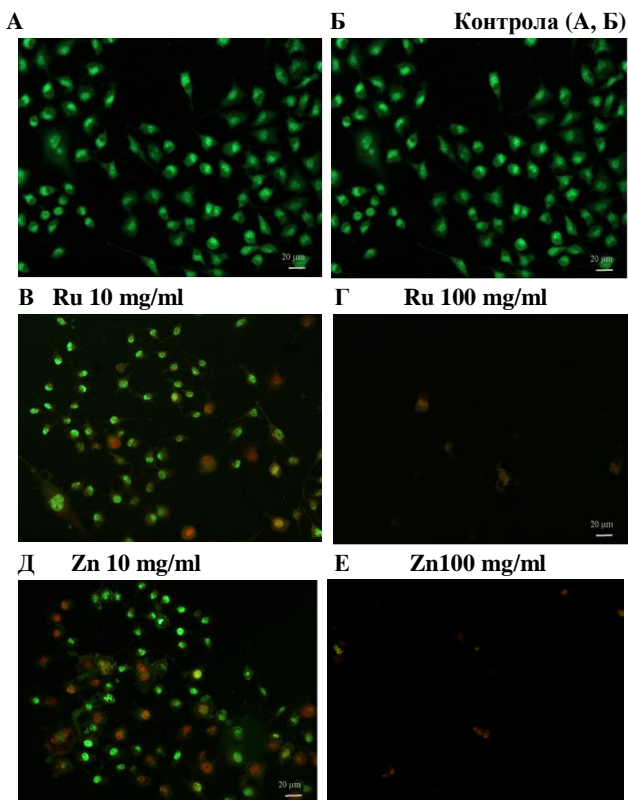


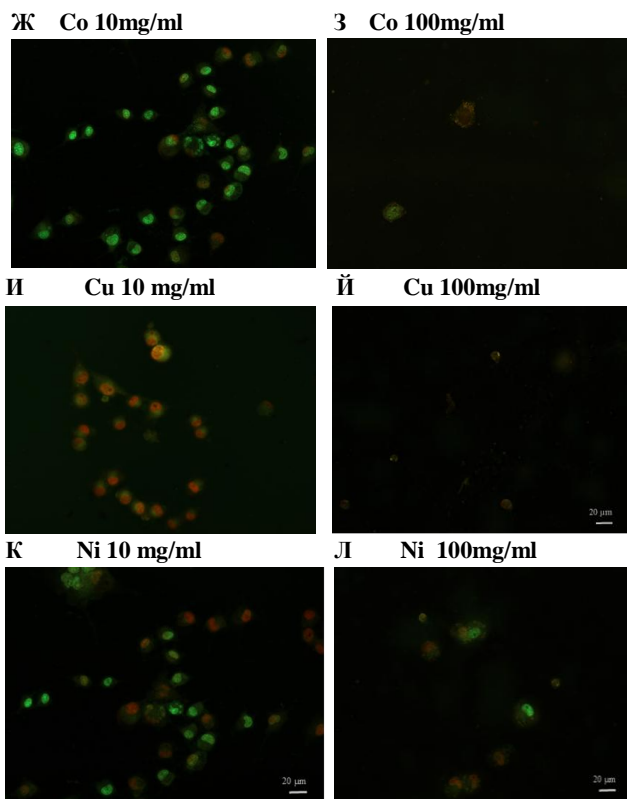
Фиг. 4 Цитотоксичен ефект на комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифова база SALTIAZ при човешки карциномни клетки от линия HeLa. Веществата са приложени в

концентрации 10-400  $\mu\text{g/ml}$  за 6 и 72 часа. Влиянието им върху клетъчната преживяемост и/или пролиферативна активност е определено чрез МТТ тест.

Способността на металните комплекси с ШБ SALTIAZ да предизвикват цитопатологични изменения в третираните клетки, както и тяхната гибел, беше илюстрирана чрез двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид (Фиг. 5 ).

Представените изображения илюстрират цитотоксичното въздействие на изпитваните вещества, изразяващо се в намаляване на клетъчния монослой до наблюдение на единични (мъртви) клетки и останки от тях, раздуване на клетките, нарушена проникваемост на цитоплазмената мембрана, кондензация на хроматина и извънклетъчна вакуолизация (blebbing).





**Фиг. 5.** Цитопатологични изменения в плъщи саркомни клетки от линия *LSR-SF-SR*, култивирани в присъствие на комплекси на метали (Zn, Cu, Co, Ni, Ru) с Шифова база SALTIAZ.

(А), (Б) Нетретиран и клетки от линия *LSR-SF-SR*, култивирани в продължение на 72 часа (Контрола); (В) 10 µg/ml Ru; (Г) 100 µg/ml Ru; (Д) 10 µg/ml Zn; (Е) 100 µg/ml Zn; (Ж) 10 µg/ml Co; (З) 100 µg/ml Co; (И) 10 µg/ml Cu; (Й) 100 µg/ml Cu; (К) 10 µg/ml Ni; (Л) 100 µg/ml Ni. Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 µm.

Изследвано беше влиянието на изпитваните комплекси (Таб. 10-11) на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифовата база SALTIAZ върху 3D колонии - образуващата способност на плъщите саркомни (*LSR-SF-SR*) и човешките карциномни (HeLa) клетки. Първите 3Д колонии от 10 - 12 клетки бяха забелязвани в контролата между 7 и 10-ия

ден. Определена беше 3D колония - инхибиращата концентрация (КИК,  $\mu\text{g/ml}$  и  $\mu\text{M}$ ), в която съответното вещество напълно потиска 3D растежа на туморните клетки. Анализът на получените резултати показва, че:

1. Комплексите на Zn и Cu демонстрират по-силно изразен инхибиращ ефект върху 3D растежа на туморните клетки в сравнение с останалите комплекси със същия лиганд.

2. Изпитваните метални комплекси са по-ефективни в потискането на 3D растежа на плъщите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR в сравнение с човешките карциномни клетки от линия HeLa.

**Таблица 10.** 3D колонии инхибиращи концентрации (КИК,  $\mu\text{g/ml}$  и  $\mu\text{M}$ ) на комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифовата база SALTIAZ при клетки от линия LSR-SF-SR

Период на проследяване (дни)	Метален комплекс	3D колонии инхибираща концентрация	
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$
25	Ru	$\geq 200$	302.4
	Zn	$\geq 200$	328.9
	Co	$\geq 400$	665.0
	Cu	$\geq 200$	504.2
	Ni	$\geq 400$	665.2

\*Наличието и 3D растежът на клетките са наблюдавани с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss, Jena, Germany). Посочени са стойностите, при които се наблюдава пълно потискане на 3D растежа на туморните клетки, т.е. в ямката се откриват само единични клетки или никакви клетки.

**Таблица 11.** 3D колонии инхибиращи концентрации (КИК,  $\mu\text{g/ml}$  и  $\mu\text{M}$ ) на комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифовата база SALTIAZ при клетки от линия HeLa

Период на проследяване (дни)	Метален комплекс	3D колонии инхибираща концентрация	
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$
28	Ru	$\geq 400$	604.9
	Zn	$\geq 200$	328.9
	Co	$\geq 400$	665.0
	Cu	$\geq 200$	504.2
	Ni	$\geq 400$	665.2

\*Наличието и 3D растежът на клетките са наблюдавани с помощта на инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss, Jena, Germany). Посочени са стойностите, при които се наблюдава пълно потискане на 3D растежа на туморните клетки, т.е. в ямката се откриват само единични клетки или никакви клетки.

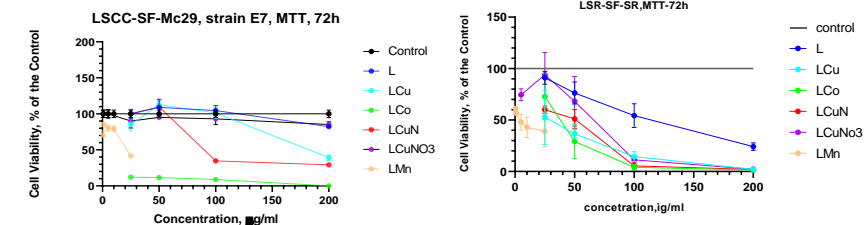
**Таблица 12.** Йерархични последователности на комплекси на метали (Ru, Zn, Co, Cu, Ni) с Шифовата база SALTIAZ според способността им да потискат преживяемостта и 2D / 3D растежа на третираните туморни клетки

Клетъчна линия	Метод	Интервал на третиране	Йерархична последователност
HeLa	MTT	72 часа	Cu > Zn > Ni > Ru > Co
	КОМ	28 дена	Zn > Cu > Ru > Co = Ni
LSR-SF-SR	MTT	72 часа	Cu > Zn > Ni > Ru > Co
	КОМ	25 дена	Ru > Zn > Cu > Co = Ni

\*Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта/пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксична концентрация ЦК<sub>50</sub> (µM), определена чрез MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа, както и според способността им да потискат 3D растежа на туморните клетки в полутечна среда, установена чрез 3D колонии-образуващ метод (КОМ), след култивиране в продължение на >20 дни.

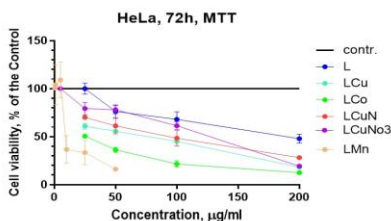
#### Комплекси на метали (Co, Cu, Mn) с Шифова база L (L- комплекси)

За определянето на цитотоксичната активност на изпитваните вещества LCo, LMn, LCu, LCuNO<sub>3</sub>, LCuN и L са използвани клетъчните линии HeLa, LSR-SF-SR, LSCC-SF-Mc29 и Hep-3. Част от получените резултати са представени на Фиг. XXX и в Табл. X.



A

B



**Фиг. 6.** Цитотоксичен ефект на металните комплекси (LCo, LMn, LCu, LCuNO<sub>3</sub> и LCuN) и техния лиганд (L) при клетки от линии LSCC-SF-Mc29 (A), LSR-SF-SR (B), HeLa (B). Веществата са приложени в концентрации 5 – 200 µg/ml за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.

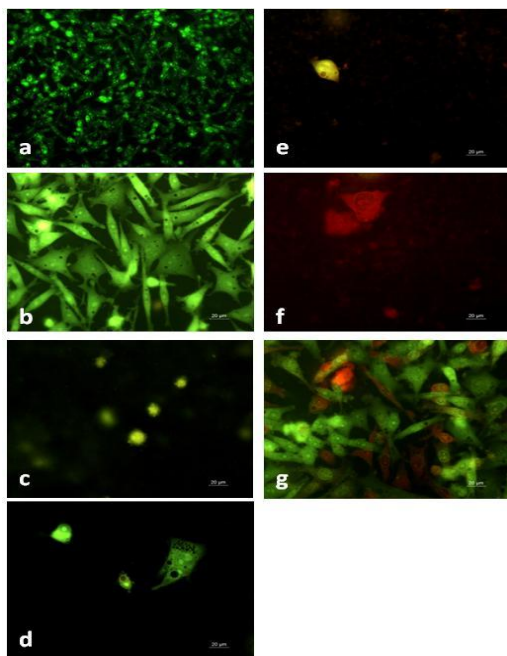
В

**Таблица 13.** Йерархични редове на изпитваните L-комплекси при използваните като моделни системи туморни клетъчни линии, построени въз основа на ЦК50 (μМ) определена чрез МТТ тест след въздействие в продължение на 72 часа

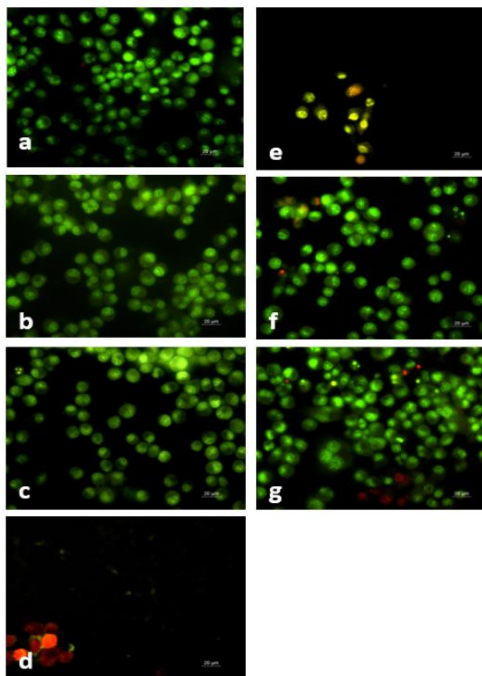
Клетъчна линия	Йерархичен ред
LSCC-SF-Mc29	LMn > LCo > LCuN > LCu > L = LCuNO3
LSR-SF-SR	LMn > LCo = LCuN > LCuNO3 > LCu > L
HeLa	LMn > > LCu > LCo > LCuN > LCuNO3 > L

\*Всеки ред започва с веществото, проявило най-висока цитотоксична активност, т.е. с най-ниска стойност на ЦК50.

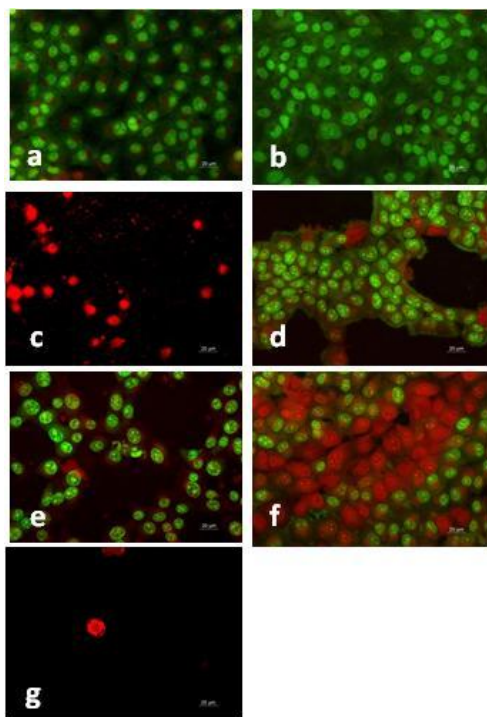
Получените чрез цитотоксичните тестове резултати за поведението на L-комплексите бяха потвърдени и чрез двойното оцветяване с АО/PI (Фиг. 7, 8 и 9).



**Фиг.7.** Цитопатологични изменения при клетъчна линия LSCC-SF-Mc29: нетретирани (контрола) и третирани за 72 часа с изпитваните L комплекси. Оцветяване с АО/PI, микроскоп Leika DM 5000B, Wetzlar, Germany, Bar =20μm.  
 а) контрола; б) L (50 μg/ml); в) LCu (50 μg/ml); д) LCo (50 μg/ml); е) LCuN (50 μg/ml); ф) LCuNO3 (50 μg/ml); г) LMn (1 μg/ml).



**Фиг. 8.** Цитопатологични изменения при клетъчна линия LSR-SF-SR: нетретиран (контрол) и третиран за 72 часа с изпитваните L комплекси. Оцветяване с АО/PI, микроскоп Leika DM 5000B, Wetzlar, Germany, Bar =20µm  
 а) контрола; б) L (50 µg/ml); в) LCu (20 µg/ml); д) LCo (20 µg/ml); е) LCuN (25 µg/ml) - наличие на мъртви клетки; ф) LCuNO3 (25 µg/ml); г) LMn (0.5 µg/ml).



**Фиг.9.** Цитопатологични изменения при клетъчна линия HeLa: нетретиран (контрол) и третиран за 72 часа с изпитваните L комплекси. Оцветяване с АО/PI, микроскоп Leika DM 5000B, Wetzlar, Germany, Bar =20µm  
 а) контрола; б) L (50 µg/ml); в) LCu (50 µg/ml); д) LCo (50 µg/ml); е) LCuN (50 µg/ml); ф) LCuNO3 (50 µg/ml); г) LMn (5 µg/ml).

Поведението на клетките от линии LSCC-SF-Mc29, LSR-SF-SR и HeLa, култивирани в полутечна среда в присъствие на L-комплекси, беше проследено в продължение на 33-36 дена. Определена беше (там където е възможно) ефективната 3D колонии потискаща концентрация на веществата (КИК,  $\mu\text{g/ml}$ ) (Табл. 14). С най-силно изразена способност да потиска 3D растежа на туморните клетки в полутечна среда се отличава комплексът LMn: той е единственият, който възпрепятства появата на 3D колонии от птичи хепатомни (LSCC-SF-Mc29, при КИК  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ ) и човешки карциномни (HeLa, при ЕИК  $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ ) клетки, а ЕИК при плъщите саркомни клетки е  $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ . Най-висока чувствителност към 3D колонии инхибиращия потенциал на тестираните вещества проявяват клетките от линия LSR-SF-SR.

**Таблица 14.** Ефективна 3D колонии инхибираща концентрация на изпитваните L комплекси

Вещество	Клетъчна линия (период на проследяване, дни)					
	LSCC-SF-Mc29 (33)		LSR-SF-SR (36)		HeLa (33)	
	22	33	30	36	22	33
L	$\geq 200$	$\geq 200$	-	-	$\geq 200$	$\geq 200$
LCuN	$\geq 200$	$\geq 50$	$\geq 50$	$\geq 50$	$\geq 200$	$\geq 200$
LCo	$\geq 200$	$\geq 200$	$\geq 50$	$\geq 25$	-	$\geq 200$
LCu	$\geq 200$	$\geq 200$	$\geq 25$	$\geq 25$	$\geq 100$	$\geq 200$
LCuNO <sub>3</sub>	$\geq 200$	$\geq 200$	$\geq 25$	$\geq 25$	-	-
LMn	$\geq 50$	$\geq 25$	$\geq 25$	$\geq 25$	$\geq 25$	$\geq 25$

\*В Таблицата е представена концентрацията ( $\mu\text{g/ml}$ ), при която веществата напълно потискат 3D колонии образуващата способност на туморните клетки (в ямките не се откриват колонии, а само единични клетки или липса на клетки изобщо).

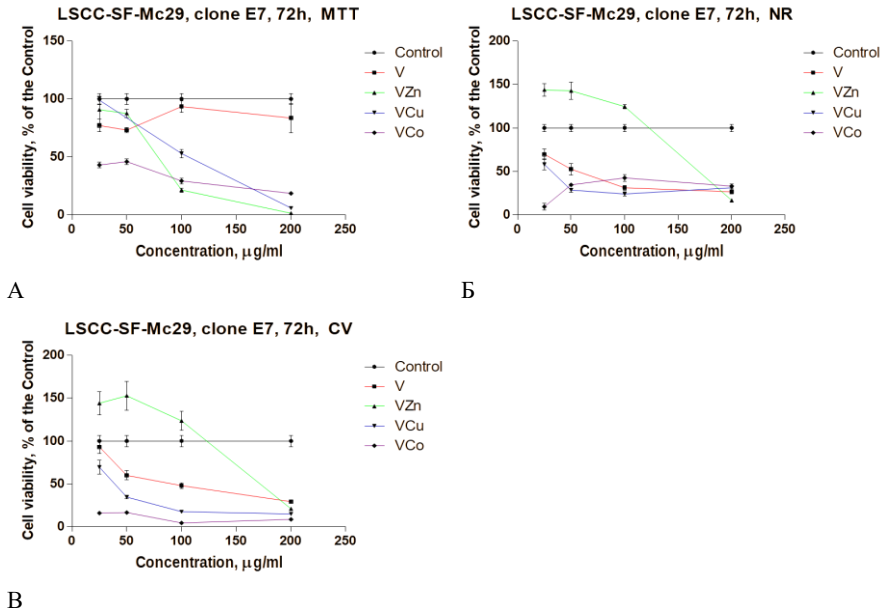
### Комплекси на метали (Zn, Cu, Co) с Шифова база V (V комплекси)

#### Краткосрочни експерименти с монослойни (2D) клетъчни култури

Цитотоксични тестове за определяне влиянието на веществата върху преживяемостта и пролиферативната активност на третираните клетки

Изследваните вещества бяха приложени в концентрации 25, 50, 100 и 200  $\mu\text{g/ml}$  за период от 24, 48 и 72 часа, след което % на преживелите клетки беше определен спрямо контролата (в която се приема, че 100% от клетките са живи). За целта бяха

използвани три теста: МТТ, които е приет за златен стандарт при определяне на цитотоксична активност на вещества, метод за включване на неутрално червено (NR) и техника за оцветяване с кристал виолет (CV) ( в автореферата са предствени част от графиките на 72 ч.). Построени бяха криви „концентрация – отговор (Фиг.10), от които бяха изчислени ЦК50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) и ЦК90 ( $\mu\text{g/ml}$ ), където е възможно (Табл.15). Въз основа на тези ефективни концентрации веществата бяха подредени в йерархични редове (Табл.16).



**Фиг. 10** Цитотоксичен ефект на метални (Zn, Co, Cu) комплекси и техния лиганд (V) при кокоши хепатомни клетки от линия LSCC-SF-Mc29, клон E7. Веществата са приложени в концентрации 25-200  $\mu\text{g/ml}$  за 72 часа. Изследването е проведено чрез МТТ тест (А), тест за включване на неутрално червено NR(Б) и оцветяване с кристал виолет CV(В)

**Таблица 15.** Цитотоксична концентрация 50 и 90 (\*ЦК<sub>50</sub> и \*\*ЦК<sub>90</sub> – в скоби, µM) на тестваните вещества в постоянни клетъчни линии от животински и човешки произход, определена чрез метода МТТ (MTT), оцветяване с неутрално червено (NR) и кристално виолетово (CV) след 72-часова експозиция.

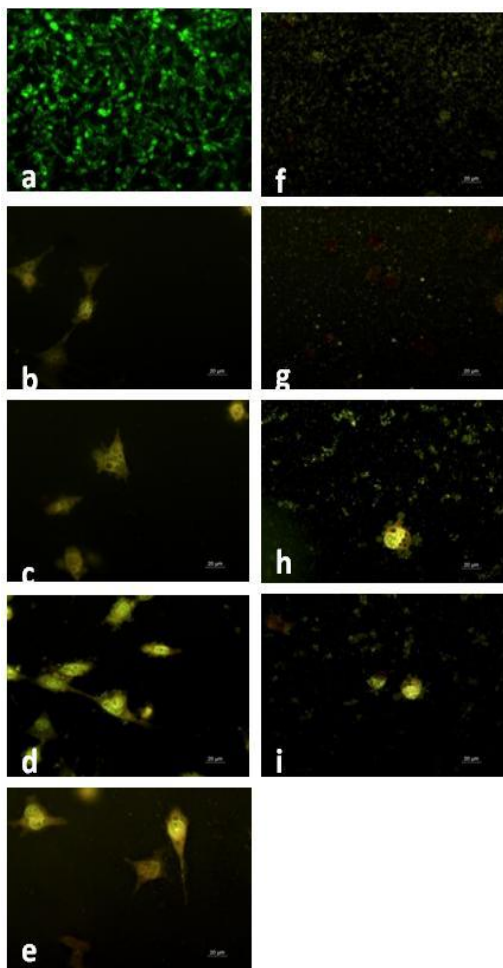
Вещества (µM)	Клетъчна линия				
	Метод	LSCC-SF- Mc29, clone E7	LSR-SF-SR (RST)	HeLa	Lep-3
V	MTT	-	99.63* (258.2)*	146.9 (-)	-
	NR	90.2 (-)	62.8 141.5	247.8 (-)	145.8 308.7
	CV	147.4 (-)	63.4 (320.5)	-	137.8 (320.5)
VZn	MTT	105.5 (208.9)	158.6 (255.3)	208.8 (-)	221.4 (-)
	NR	224.8 (-)	-	208.8 (-)	-
	CV	228.2 (-)	-	265.4 н.д	-
VCu	MTT	84.9 (153.4)	117.0 (155.3)	71.8 (154.6)	109.1 (152.7)
	NR	25.6 (-)	61.6 (100.9)	н.д 80.1)	109.7 (150.3)
	CV	30.9 (-)	64.9 (148.9)	37.6 (-)	103.7 (155.9)
VCo	MTT	н.д	135.4 (284.8)	-	82.8 (-)
	NR	н.д	75.7 (151.3)	н.д	68.5 (-)
	CV	н.д (122.3)	64.2 (-)	317.9 (-)	63.8 (-)

"-" – ЦК<sub>50</sub> и ЦК<sub>90</sub> не могат да бъдат изчислени, защото преживяемостта на клетките е по-голяма от 50% и 10% съответно.

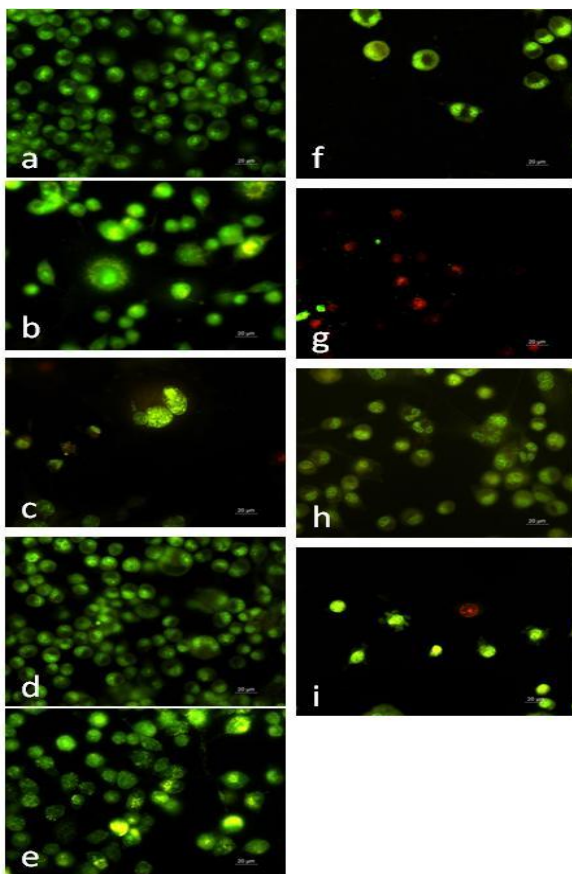
"н.д" – ЦК<sub>50</sub> и ЦК<sub>90</sub> не могат да бъдат изчислени, защото преживяемостта на клетките е по-малка от 50% и 10% съответно.

**Таблица 16.** Йерархични редове (в низходяща последователност, започваща от най-активното вещество) на изпитваните V-комплекси при използваните като моделни системи туморни клетъчни линии, построени въз основа на ЦК50 ( $\mu\text{M}$ ) определена чрез MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа

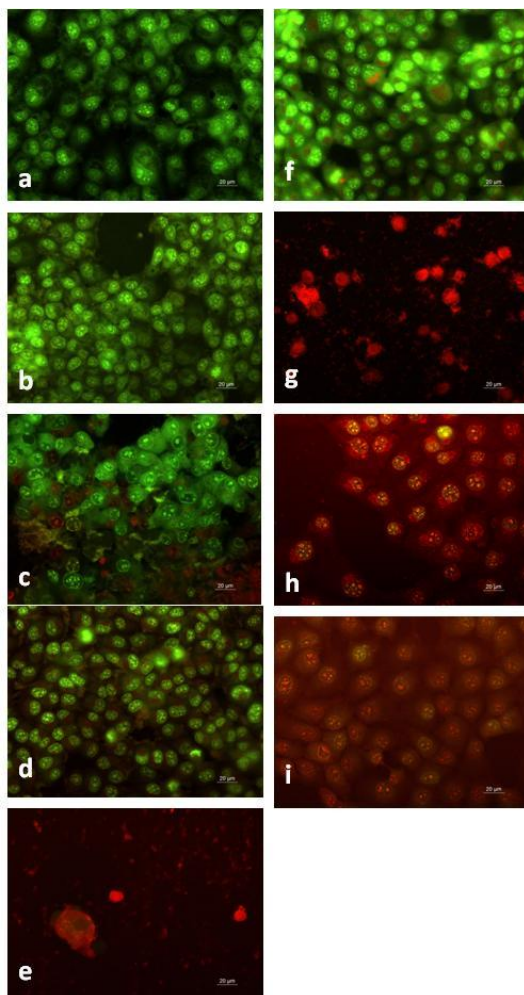
Клетъчна линия	Йерархичен ред
LSCC-SF-Mc29	$\text{VCo} > \text{VCu} > \text{VZn} > \text{V}$
LSR-SF-SR	$\text{V} > \text{VCu} > \text{VCo} > \text{VZn}$
HeLa	$\text{VCu} > \text{V} > \text{VZn} > \text{VCo}$



**Фиг.11** Клетки от линия LSCC-SF-Mc29, клон E7 - двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид след 72 часа въздействие с различни концентрации на изпитваните от нас вещества – V-комплекси. Контрола(a); V - 50  $\mu\text{g/ml}$  (b) и 100  $\mu\text{g/ml}$  (c); VZn - 50  $\mu\text{g/ml}$  (d) и 100  $\mu\text{g/ml}$  (e); VCu- 50  $\mu\text{g/ml}$  (f) и 100  $\mu\text{g/ml}$  (g); VCo - 50  $\mu\text{g/ml}$  (h) и 100  $\mu\text{g/ml}$  (i). Bar = 20 $\mu\text{m}$  (Leika DM 500B, Wetzlar, Germany).



**Фиг. 12** Клетки от линия LSR-SF-SR - двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид след 72 часа въздействие с различни концентрации на изпитваните от нас вещества - V-комплекси. Контрола(a); V - 25  $\mu\text{g/ml}$  (b) и 50 (c)  $\mu\text{g/ml}$ ; VZn - 25  $\mu\text{g/ml}$  (d) и 50 (e)  $\mu\text{g/ml}$ ; VCu- 25  $\mu\text{g/ml}$  (f) и 50 (g)  $\mu\text{g/ml}$ ; VCo - 25  $\mu\text{g/ml}$  (h) и 50  $\mu\text{g/ml}$  (i). Bar =20 $\mu\text{m}$  (Leika DM 500B, Wetzlar, Germany).



**Фиг. 13** Клетки от линия HeLa - двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид след 72 часа въздействие с различни концентрации на изпитваните от нас вещества - V-комплекси. Плътен монослой от клетки от линия HeLa -контрола(a); V - 100  $\mu\text{g/ml}$  (b) и 200 (c)  $\mu\text{g/ml}$ ; VZn - 50  $\mu\text{g/ml}$  (d) и 100 (e)  $\mu\text{g/ml}$ ; VCu- 50  $\mu\text{g/ml}$  (f) и 100 (g)  $\mu\text{g/ml}$ ; VCo - 25  $\mu\text{g/ml}$  (h) и 50 (i)  $\mu\text{g/ml}$ . Bar =20 $\mu\text{m}$  (Leika DM 5000B, Wetzlar, Germany).

**Дългосрочни експерименти с триизмерни (3D) колонии от туморни клетки с метални комплекси на V лиганд.**

Получените резултати за влиянието на изпитваните метални комплекси с Шифова база V върху 3D растежа в полутечна среда на използваните като моделни системи туморни клетки от линии LSCC-SF-Mc29, LSR-SF-SR и HeLa са обобщени в Табл.17. Най-висока чувствителност към цитотоксичното действие на веществата проявяват плъщите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR. Най-слабо чувствителни са човешките карциномни клетки от линия HeLa, при които на 21ия ден липсваха 3D колонии от клетки, но 12 дена по-късно такива има Табл. 17.

**Таблица 17.** Влиянието на изпитваните метални комплекси с Шифова база V върху 3D растежа в полутечна среда

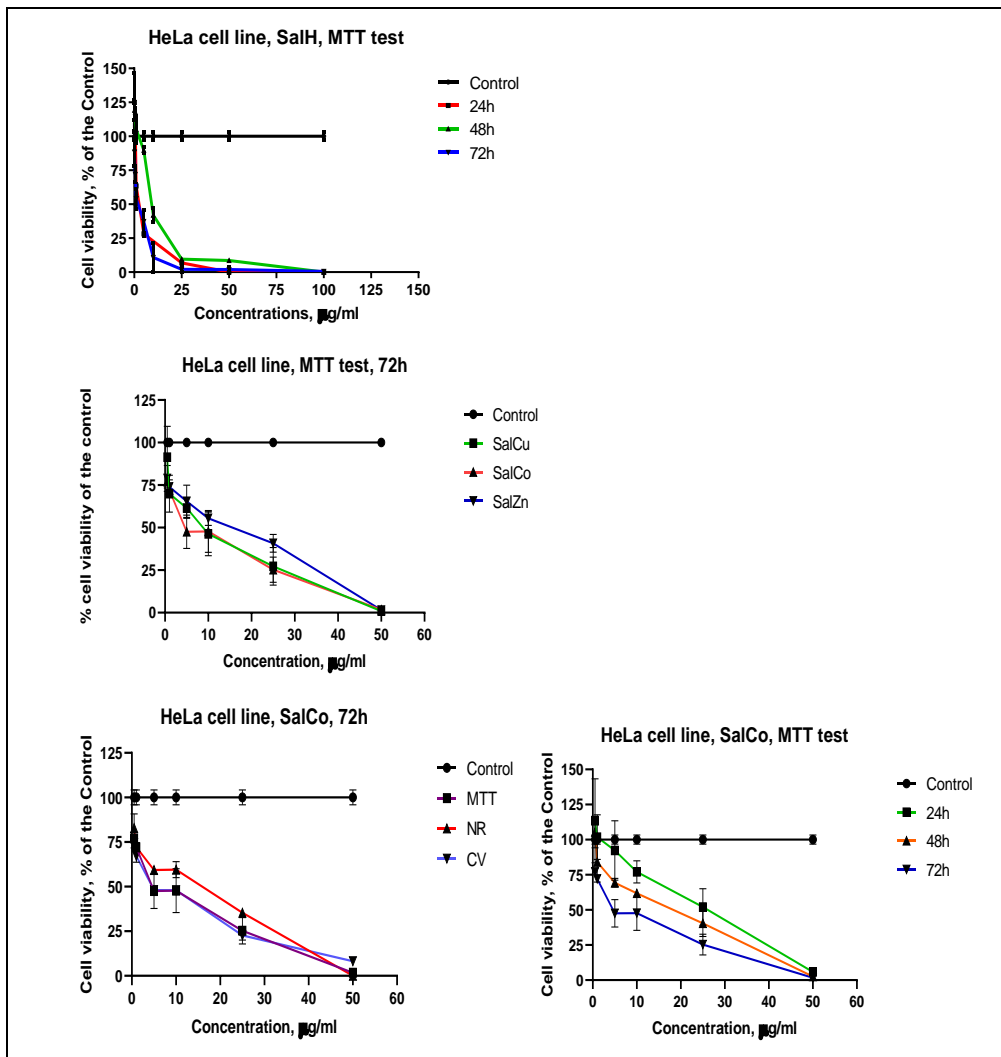
Вещество	Клетъчна линия (период на проследяване, дни)					
	LSCC-SF-Mc29		LSR-SF-SR		HeLa	
	21	33	30	36	21	33
V	≥ 200	Н.Е	Н.Е	Н.Е	≥ 200	Н.Е
VCu	≥ 200	≥ 25	≥ 25	≥ 25	≥ 200	Н.Е
VCo	≥ 200	≥ 25	≥ 25	≥ 25	≥ 200	Н.Е
VZn	≥ 200	≥ 25	≥ 25	≥ 25	≥ 200	Н.Е

В Таблицата са представени 3D колонии инхибиращите концентрации - КИК ( $\mu\text{g/ml}$ ), при които приложеното вещество напълно потиска триизмерния растеж на клетките и в ямката се наблюдават само единични клетки; HE = няма ефект.

**Метални комплекси на салиномицин**

Изследваните вещества (SalCu, SalCo и SalZn) бяха приложени в концентрации 0.5, 1, 5, 10, 25 и 50  $\mu\text{g/ml}$ , а въздействието им върху преживяемостта и пролиферацията на използваните като моделни системи човешки карциномни клетки от линия HeLa беше проследено за времеви интервали от 24, 48 и 72 часа чрез използването МТТ тест (МТТ – 24, 48 и 72 часа), метод за включване на неутрално червено (NR – 72 часа) и оцветяване с

кристал виолет (CV – 72 часа). Получените с тях резултати са представени на Фиг. 14 и в Табл.18. И беше построен йерархичен ред на активност Таб.19.



**Фиг. 14** Цитотоксичен ефект на метални комплекси на салиномицин SalCu, SalCo и SalZ при човешки карциномни клетки от линия HeLa. Веществата са приложени в концентрации 0.5 – 50 µg/ml за 72 часа. Изследването е проведено с MTT, метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV).

**Таблица 18.** Цитотоксични концентрации 50 и 90 (\*ЦК<sub>50</sub> и \*\*ЦК<sub>90</sub> - в скоби, µg/ml) на изследваните вещества при клетъчна линия HeLa и Lep-3, определени с МТТ тест, метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV).

Вещество	HeLa					Lep-3
	24h	48h	72h			72h
	MTT	MTT	MTT	NR	CV	MTT
SalH	3.3* (32.1)**	12.7 (32.7)	2.5 (13.3)	5.7 (13.3)	3.86 (28.8)	Н.д.
SalCu	13.9 (29.6)	10.5 (26.4)	5.3 (25.3)	10.6 (29.5)	2.51 (30.6)	1.6 (21.8)
SalCo	16.1 (29.3)	11.4 (27.0)	2.7 (25.4)	9.4 (26.5)	2.9 (28.7)	1.2 (14.4)
SalZn	21.9 (31.2)	10.8 (26.4)	9.9 (27.9)	9.8 (26.4)	2.9 (27.1)	2.3 (24.4)

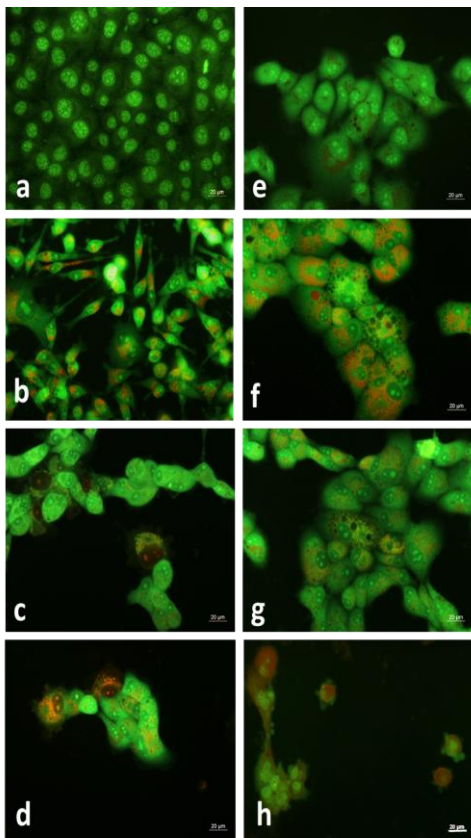
Н.д. – няма данни

**Таблица 19.** Йерархичен ред на салиномицина и неговите метални комплекси, отразяващи в низходящ ред цитотоксичния им потенциал при клетки от линии HeLa и Lep-3

Метод	HeLa
MTT	SalH ≥ SalCo > SalCu > SalZn
NR	SalH > SalCo > SalZn > SalCu
CV	SalCu > SalCo = SalZn > SalCu
	Lep-3
MTT	SalCo > SalCu > SalZn

Всеки йерархичен ред е построен въз основа на концентрациите, в които веществата намаляват преживяемостта на клетките с 50% и започва с веществото, проявило най-висока активност спрямо култивираните за 72 часа в негово присъствие клетки (т.е. с най-ниска ЦК<sub>50</sub>, µM/ml).

Установена беше способността на салиномицина и неговите метални комплекси да предизвикват цитопатологични изменения в третираните с тях човешки карциномвни клетки от линия HeLa (Фиг. 15).



**Фиг.15** Цитопатологични промени, предизвикани от координирани съединения на салиномицин в HeLa клетки. а – нетретирани контролни HeLa клетки, б – третирани с 5 µg/mL SalH, с – третирани с 5 µg/mL SalCu, d – HeLa клетки, третирани с 10 µg/ml SalCu, е – HeLa клетки, третирани с 5 µg/ml SalCo, f – HeLa клетки, третирани с 10 µg/ml SalCo, g – HeLa клетки, третирани с 10 µg/ml SalZn, h – HeLa клетки, третирани с 25 µg/ml SalZn. Двойно оцветяване с АО и PI, микроскоп Leika DM 5000B (Wetzlar, Germany), Bar =20µm

### Дългосрочни експерименти

В Таблица 20 са представени ефективните концентрации, които напълно инхибират растежа на 3D колонии от туморни клетки в полутечна среда. Резултатите показват, че 32 дни след началото на експеримента не са открити 3D колонии, когато изследваните съединения са приложени в концентрации  $\geq 1$  mg/ml (салиномицин) и  $\geq 5$  mg/ml (метални комплекси).

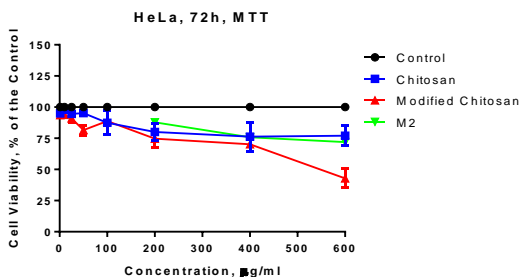
**Таблица 20.** Влияние на SalH, SalCu, SalCo и SalZn върху способността на клетките от линия HeLa да образуват 3D-колонии в полутечна среда

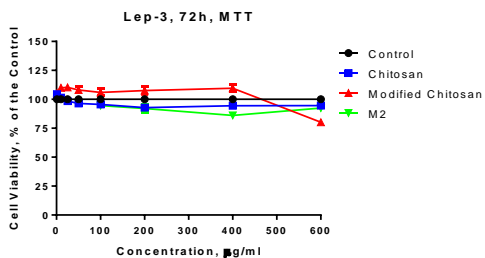
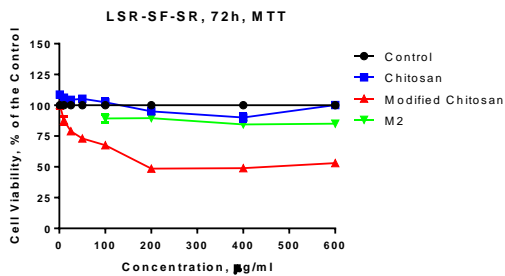
Вещество	HeLa, µg/mL	HeLa, µM
SalH	≥ 1	≥ 1.33
SalZn	≥ 5	> 3.12
SalCu	≥ 5	> 3.06
SalCo	≥ 5	> 3.07

Таблицата представя ефективните концентрации (КИК), при които се наблюдава пълна липса на клетки или наличие на отделни единични клетки в ямката, но не се образуват 3D колонии от клетки.

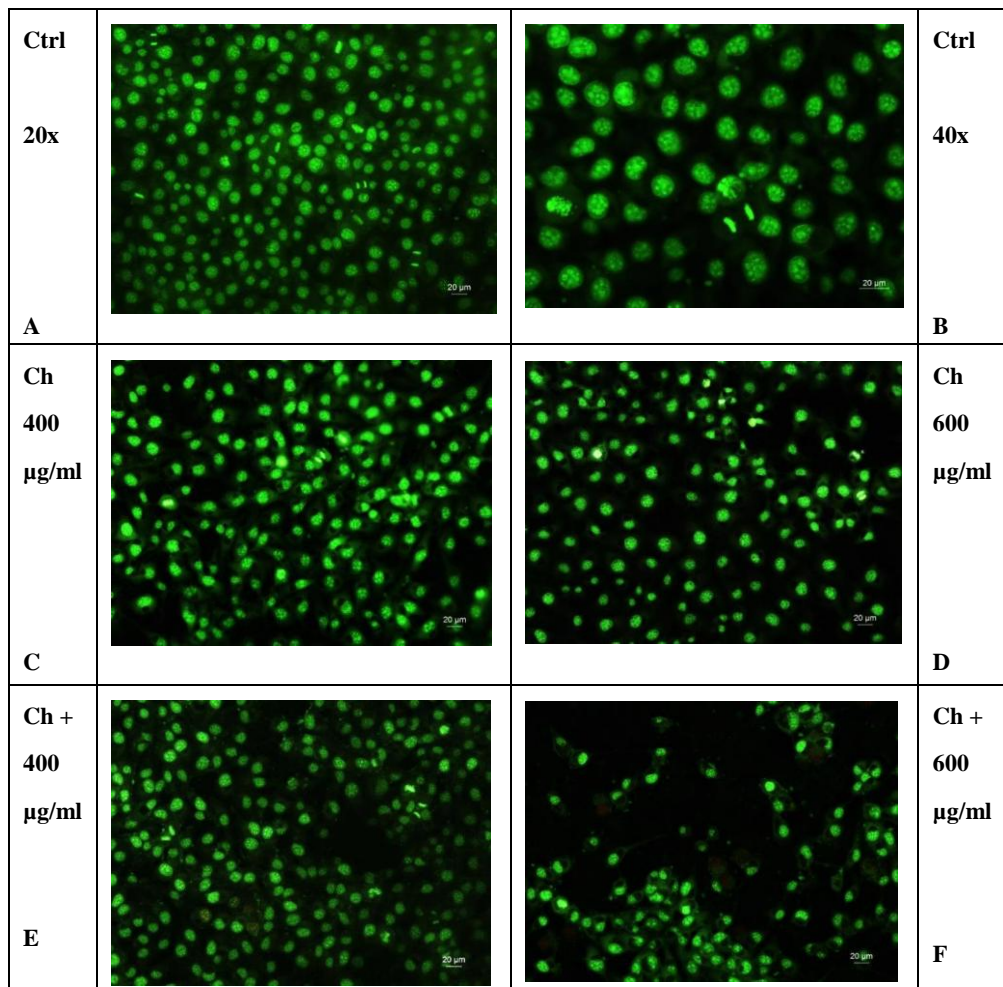
### V.1.2. Цитотоксична активност на глюкозамини, модифицирани с 1,8-нафталимиди

Изследванията бяха осъществени с дендример от първо моколение M2 и производни на хитозан (ch-1, ch-3, ch -4). Получените данни за цитотоксичната им активност са систематизирани на Фиг. 16 и Табл. 21, а наблюдаваните под тяхно влияние цитопатологични изменения – във Фиг. 17.





**Фиг. 16.** Цитотоксичен ефект на хитозан, модифициран хитозан ch-1 и дендримера M2 при човешки карциномни клетки от линия HeLa, плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF-SR, нетуморни човешки ембрионални клетки от линия Lep-3. Веществата са приложени в концентрации 1-600 µg/ml за период от 72 часа. Ефектът от въздействието върху клетъчната преживяемост и/или пролиферативна активност е определен чрез MTT тест.

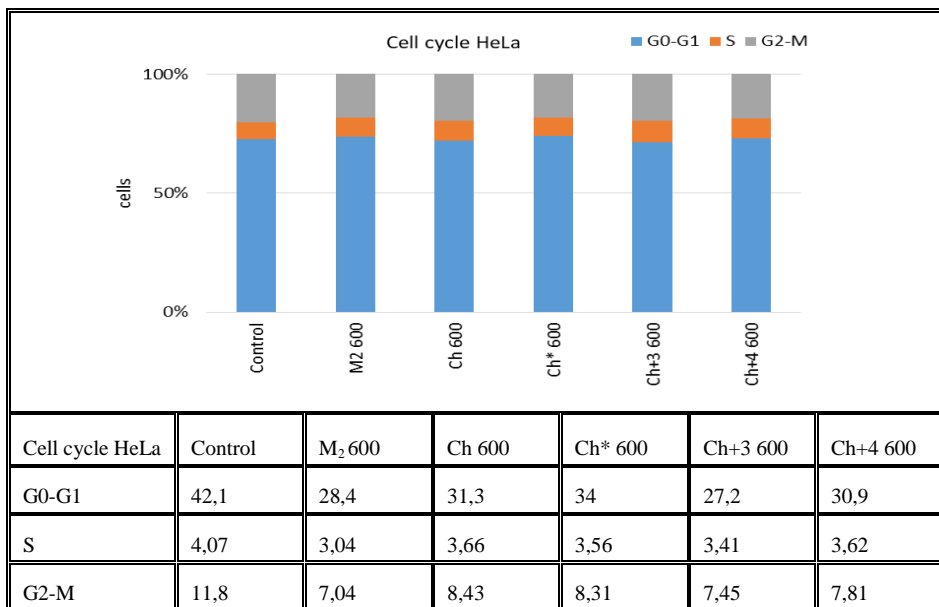


**Фиг. 17** Цитопатологични изменения в клетки от линия HeLa: нетретираны клетки (A, B - контрола) и клетки, култивирани в присъствие на различни концентрации Хитозан - 400 µg/ml (C) и 600 µg/ml (D) и Модифициран Хитозан (Ch + = Ch 1) - 400µg/ml (E) и 600 µg/ml (F)

### **Влияние върху разпределението на клетките във фазите на клетъчния цикъл**

Установено беше, че приложени в концентрация 600 µg/ml за 72 часа дендримерът M2, хитозанът и модифицираните хитозани ( ch\*=ch-1, ch-3, ch-4) не

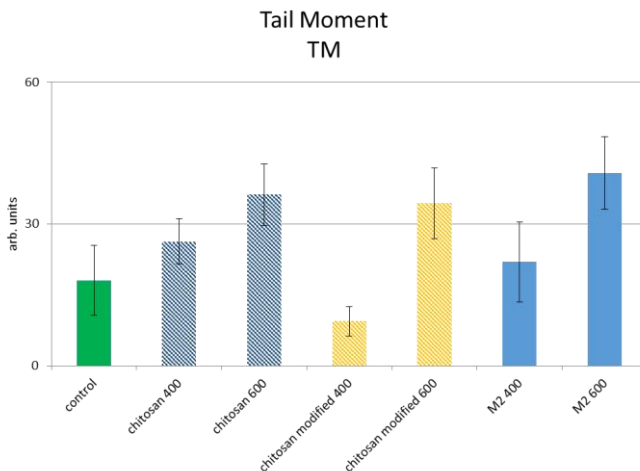
оказват влияние върху фазите на клетъчния цикъл (Фиг. 18). Тази информация е важна с оглед на потенциалното клинично приложение на антитуморен агент, особено в комбинация с други противотуморни продукти, тъй като ефектът на някои от наличните антинеопластични лекарства зависи от фазата на клетъчния цикъл.



**Фиг.18** Влияние на изпитваните вещества – хитозан и модифициран хитозан (Ch\* = Ch-1, Ch-3, Ch-4), приложени в концентрации 400 µg/ml и 600 µg/ml за 72 часа, върху фазите на клетъчния цикъл. Ch\* = Ch-1( без ефект)=

### Способност на веществата да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулата на третираните клетки (тест за генотоксичност)

Проведен беше кометен тест при неутрално рН с клетки от линия HeLa, третираны в продължение на 72 часа с дендримера M2, хитозан и модифициран хитозан ch-1. На Фиг. 19 е представен т. нар. Опашков момент (Tail Moment) – комплексен показател, отразяващ едновременно дължината на кометата и наситеността на получаваните опашки. Резултатите илюстрират способността и на трите вещества да предизвикват двойноверижни скъсвания в култивираните в тяхно присъствие клетки, най-вече когато са приложени в най-високата концентрация изпитвана концентрация 600 µg/ml.



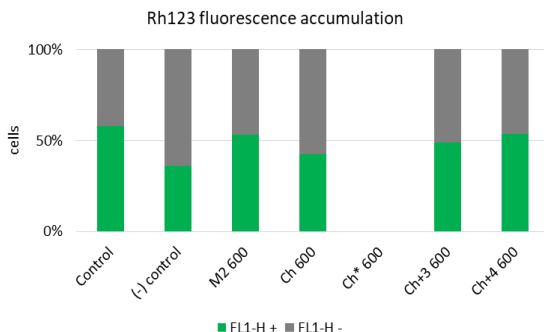
**Фиг. 19.** Неутрален кометен тест при клетки от линия HeLa, култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 400  $\mu\text{g/ml}$  и 600  $\mu\text{g/ml}$  дендример M2, хитозан и модифициран хитозан ( $\text{ch}^*=\text{ch}-1$ ).

### **Влияние върху митохондриалния потенциал**

Проведени бяха експерименти за определяне на влиянието на изследваните глюкозамини върху митохондриалния мембранен потенциал ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) на третираните клетки чрез флуоресцентно-активирано клетъчно сортиране (ФАКС) и оцветяване с родамин. Включена беше и негативна контрола, която беше използвана за околичествяване на наблюдаваните резултати. За целта клетките бяха третирани с FCCP (карбонилцианид 4-(трифлуорометокси)фенилхидразон), протонофорен разграничител на процесите на дишане и фосфорилиране в митохондриите.

Получените резултати са представени на Фиг.20. Те показват слабо повлияване на митохондриалния потенциал на клетките от линия HeLa след третиране с тестваните вещества. Ефектът е специфичен и дозо-зависим. Най-силен ефект се забелязва при третиране с  $\text{Ch}^*600$  ( $\text{ch}-1$ ). При култивиране на клетките в присъствие на това вещество се наблюдава пълно инхибиране на митохондриалния потенциал.

Значението на получените резултати е важно, тъй като повлияването на активността на митохондриите, включително потискането на мембрания потенциал, се разглежда като потенциална антитуморна терапевтична стратегия (например чрез увреждане на електрон-транспортните вериги и образуване на свободни радикали - ROS; с цел сенсibiliзиране на туморните клетки към терапията и др.



**Фиг. 20** Анализ на влиянието на изследваните глюкозамини върху митохондриалния потенциал на клетки от линия HeLa. Ch\* = Ch-1

### Дългосрочни експерименти

#### Влияние на глюкозамини, модифицирани с 1,8-нафталимиди, върху 3D растежа на туморни клетки в полутечна среда

Получените резултати при клетките от линии HeLa и LSR-SF-SR са представени в Табл. 20. Първите 3D колонии от 10 – 12 клетки се наблюдаваха в контролата между 7 – 10-ия ден. При нито една от изпитваните концентрации на дендримера M2, хитозан и модифицирания хитозан Ch-1 не беше отчетено пълно потискане на 3D растежа на туморните клетки и от двете туморни линии.

**Таблица 20.** 3D колонии инхибиращи концентрации (КИК,  $\mu\text{g/ml}$ ) на глюкозамини, модифицирани с 1,8-нафталимиди при клетки от линии LSR-SF-SR и HeLa

Вещество	Клетъчна линия		
	HeLa	LSR-SF-SR	
Продължителност на проследяване	35 дни	32/35 дни	38 дни
Хитозан	n.i.	n.i.	-
Ch1	n.i.	n.i.	-
Ch3	-	$\geq 600$	$\geq 100$
Ch4	-	$\geq 200$	$\geq 200$
Дендример M2	n.i.	n.i.	-

n.i. = няма потискане (no inhibition); (-) – няма данни

### **Сравняване на цитотоксичния ефект на изследваните от нас вещества с този на конвенционални антитуморни препарати**

Цитотоксичният ефект на изпитваните от нас метални комплекси с Шифови бази и салиномицин и модифицирани с 1,8-нафталимиди глюкозамини беше сравнен с този на три утвърдени в клиничната практика антитуморни препарата – цисплатина, оксалиплатина и епирубицин, а получените резултати са обобщени в Табл. 21 и 22. Данните за ЦК50 (определена чрез МТТ тест след въздействие в продължение на 72 часа) на антитуморните препарати са получени от Лора Дякова (2019) и са използвани за сравнителен анализ в представения дисертационен труд.

С най-висока активност при човешките карциномни клетки от линия HeLa се отличават комплексите на Co(II), Cu(II) и Zn(II) със салиномицин, като активността им превишава тази на антитуморните препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин. Цитотоксичният ефект на LMn превъзхожда този на цисплатината и епирубина.

### **Сравняване на цитотоксичния ефект на изследваните от нас вещества при човешки туморни и нетуморни клетки**

Сравнителни данни са представени в Табл. 21. В повечето случаи ЦК50 (определена на 72 час с МТТ тест) при нетуморните човешки клетки е по-ниска от тази при карциномните клетки от линия HeLa. Изключенията са малко, впечатление сред тях прави комплексът CuSALTIAZ, чиято ЦК50 (МТТ, 72 час) е приблизително два пъти по-висока за клетките от линия Hep-3 (145.7  $\mu\text{g/ml}$  или  $\mu\text{M}$ ) в сравнение с HeLa (83  $\mu\text{g/ml}$  или  $\mu\text{M}$ ). Този резултат не е изненадващ, като се има предвид висока чувствителност на ембрионалните клетки към въздействието на факторите от околната среда от една страна и способността на туморите да генерират адаптирани и устойчиви към условията на микрообкръжението им клетъчни популации в хода на своята прогресия.

**Таблица 21.** Цитотоксична активност (ЦК50,  $\mu\text{M}$ , МТТ тест, 72 час) на метални комплекси с Шифови бази и салиномицин и на антитуморните агенти цисплатина, оксалиплатина и епирубицин при човешки туморни (HeLa) и нетуморни (Lep-3) клетки.

МТТ 72 h	Вещества	HeLa	Lep-3
		SalCo	2.7
	SalCu	5.3	1.6
	SalZn	9.9	2.3
	CisPt*	28.2	1.6
	OxPt*	15.3	2.4
	Epi*	29.9	1.2
	L	465.	н.о
	LCu	<b>63.</b>	<b>63.3</b>
	LCo	65.4	66.7
	LCuN	79.0	66.8
	LCuNO3	115.3	н.о
	LMn	16.0	1.6
	V	146.9	н.о
	VZn	<b>208.8</b>	<b>221.4</b>
	VCu	71.8	109.1
	VCo	н.о	82.8
	Ru SALTIAZ	270	н.о
	Zn SALTIAZ	54,0	н.о
	Co SALTIAZ	213.0	102.2
	Cu SALTIAZ	<b>83.0</b>	<b>145.7</b>
	Ni SALTIAZ	665.0	н.о

\*Цитотоксичната активност на антитуморните агенти цисплатина (CisPt), оксалиплатина (OxPt) и епирубицин (Epi) са определени при предишни наши проучвания и не са обект на представения дисертационен труд (Дякова, 2019), включени са в таблицата за сравнителен анализ.

**Таблица 22.** Йерархични редове, отразяващи влиянието на метални комплекси с Шифови бази и салиномицин и на комерсиални анти туморни препарати (цисплатина, оксалиплатина, епирубидин) върху преживяемостта и пролиферативната активност на човешки туморни и нетуморни клетки.

Клетъчна линия	Йерархичен ред
HeLa	SalCo > SalCu > SalZn > OxPt > LMn > CisPt > Epi > Zn SALTIAZ > LCu > LCo > VCu > LCuN > Cu SALTIAZ > LCuNO3 > V > CZn > Co SALTIAZ > Ru SALTIAZ > L > Ni SALTIAZ > VCo
Lep-3	SalCo = Epi > SalCu = LMn = CisPt > SalZn > OxPt > LCu > LCo > LCuN > VCo > Co SALTIAZ > Cu SALTIAZ > VZn > L = V = LCuNO3 = R SALTIAZ = Zn SALTIAZ = Ni SALTIAZ

CisPt = Цисплатина; OxPt = Оксалиплатина; Epi = Епирубидин; Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксични концентрации ЦК50 (µM), определена чрез МТТ тест след въздействие в продължение на 72 часа. Данните за ЦК50 на анти туморните препарати са получени при предишни наши проучвания (Дякова, 2019) и са използвани за сравнителен анализ.

## V.2. Влияние върху репликацията на човешки херпесни вируси (HSV-1/HHV-1 и HSV-2/HHV-2)

Изследвано беше влиянието на хитозан и модифициран хитозан ch-1 върху репликацията на два щам на HSV – *Herpes simplex virus -1* (HSV-1/HHV-1) щам F и *Herpes simplex virus -2* (HSV-2/HHV-2) щам BA.

Предварително беше изследвано влиянието на изпитваните вещества върху преживяемостта на говежди бъбречни клетки от линия MDBK – за проучванията са подбрани концентрации (200 µg/ml), при които преживяемостта на клетките е > 80-90% (на 72 и 96 час).

Вирусите бяха тествани върху клетки от линия MDBK в десетократни разреждания в присъствие (200 µg/ml) и в отсъствие на вещества.

Съществена разлика между инфекциозния титър на използваните като модели херпесни вируси, култивирани в присъствие и в отсъствие на хитозани, не беше отчетена (Табл. 23). Не беше наблюдавана и спонтанна дегенерация на клетъчния монослой в контролните незаразени ямки.

**Таблица 23.** Инфекциозен титър на човешки херпесни вируси (HSV-1/HHV-1, HSV-2/HHV-2) в присъствие и в отсъствие на хитозан и модифициран хитозан ch-1 (в концентрация 200 µg/ml).

Вирус	Инфекциозен вирусен титър		
	Контрола (В отсъствие на вещество)	Хитозан (200 µg/ml)	Модифициран Хитозан (200 µg/ml)
HSV1	10 <sup>5.12</sup>	10 <sup>5.12</sup>	10 <sup>5.10</sup>
HSV2	10 <sup>5.52</sup>	10 <sup>5.49</sup>	10 <sup>5.12</sup>

### **V.3. Разработване на ин витро клетъчна система за заразяване с HEV и поддържане на вирусната репликация в лабораторни условия**

Тръгвайки към изпълнението на тази задача, взехме предвид два описани в достъпната литература протоколи:

- Разработен от Schemmerer и сътрудниците му (Schemmerer et al., 2019), основан на смяна на хранителната среда за клетъчно култивиране в хода на вирусното култивиране;
- Предложен от Takahashi и съавтори (Takahashi et al., 2010), при който се използват серуми от пациенти положителни за HEV.

При подбора на клетъчните линии, използвани в тези експерименти, се ръководем от следните критерии: те да са използвани успешно от други изследователи за заразяване с HEV; да са подходящи за провеждане на трансфекция (според характеристиките на клетъчната линия). От значение бяха видът на вирусния инокулум, получен от съответната серумна проба според използвания протокол за заразяване; концентрацията на HEV RNA (IU/ml), определена в серума за заразяване; генотипът / субгенотипът на HEV (3с, 3f, неопределен генотип); количеството на използвания вирусен инокулум (100 µl, 200 µl, 350µl).

Между двата описани по-горе протокола се спряхме на този на Takahashi и съавтори, тъй като при него изследователите са използвали серумни проби с доказано наличие както на HEV RNA, така и на антитела срещу HEV.

Пробите бяха наблюдавани ежедневно за поява на цитопатичен ефект. Два пъти седмично половината хранителна среда в матраците беше подменена с нова. На определени интервали беше замразявана културална течност за последващи анализи. Заразените със серум от пациенти съдържащ HEV вирус матраци стигнаха до 4-ти (за

линия А549) и 7-ми пасаж. (за линия НерG2). След всеки цикъл беше взимана проба за PCR анализ за наличие и секвениране на вируса. Тези проучвания бяха проведени в Националния център по заразни и паразитни болест в София и не са част от представения дисертационен труд. Те потвърдиха надеждността на разработената от нас система, която допринесе за успешното изпълнение на работната програма на проект / договор (№ КП-06-Н-33/2 от 13.12.2019 г.) с Фонд „Научни изследвания“, чието изпълнение получи най-високата оценка („Много добър“).

Анализът показва, че е постигнато успешно заразяване на човешката клетъчна линия А549 с два от използваните вирусни инокулума - 224 (HEV 3f) и 450 (HEV 3c) и на линия НерG2 –с вирусни инокулуми 224 (HEV 3f) и 166 (с неопределен субгенотип). По отношение на количеството вирусен инокулум, успешно заразяване на конфлуентен монослой от клетъчна линия А549 беше постигнато при използване на 350µl вирусен инокулум, а за клетъчна линия НерG2 – при използване на 200µl вирусен инокулум.

#### **V.4. Определяне на съдържанието на метали в яйца от различни системи за производство**

Физическите характеристики на яйцата не показаха съществени различия между отделните системи за отглеждане. Масата на яйцата беше  $65,3 \pm 3,0$  g, а масата на белтъка както следва: при интензивно отглеждане  $36,8 \pm 2,2$  g,  $36,2 \pm 2,4$  g за биологично и свободно отглеждане;  $37,0 \pm 2,8$  g за дворно отглеждане.

#### **Зона на изследване и събиране на проби**

Събирането на яйца е проведено за период от 2 седмици, между 1 и 25 февруари 2022 г. Яйцата са осигурени от райони, където се намират най-големите производители на яйца, продавани в търговската мрежа в Румъния. Те са показани в Таблица 24 и Фигура 21. Събрани са общо 50 проби, по 10 от всяка система за отглеждане. Четиридесет яйца са от търговски производители и 10 са от села, където хората отглеждат кокошките си в дворове за домашна консумация. Всички кокошки са хранени с търговски фураж с еднакво минерално съдържание (2800 kcal/kg), включващ 18% суров протеин, 0,72% цистеин+метионин, 0,9% лизин, 3,5% калций и 0,35% фосфор. Кокошките са получавали редовно и минерални добавки. Освен това, свободно отглежданите, биологично отглежданите и дворно отглежданите кокошки са имали достъп до открити зони за хранене. Дворно отглежданите кокошки често са получавали остатъци от храната на домакинството без допълнителни витамини и минерали. Биологично и свободно отглежданите птици са имали достъп до площи с естествена трева и почва за 5 до 6 часа на ден. Дворно отглежданите кокошки са имали достъп до двора и околните площи за повече от 8 часа на ден.

**Таблица 24.** Проби, събрани в Румъния

Код	Система за отглеждане	Област на събиране
VkYd	Дворно	AR BH
0	Биологично	DJ BH
1	Свободни	DJ DB
2	Подово	DB BH
3	Клетъчно	DB BH



**Фиг.21.** Областите в Румъния, в които са събирани пробите (TUBS, CC BY-SA 3.0)

### Аналитични измервания на металното съдържание

Аналитичните изследвания бяха проведени с високорезолюционна ICP-OES система за радиално наблюдение - HORIBA JY ULTIMA 2 (Jobin Yvon, Longjumeau, Франция). Изходните разтвори на интересуващите ни елементи бяха приготвени с помощта на стандартни разтвори за моноелементи на Merck, проследими до SRM от NIST 1000 mg/l Certipur®.

В Таблица 25 са представени измерените стойности за есенциалните микроелементи. По-високите стойности за есенциалните микроелементи са тясно свързани с произхода на яйцата – тези от дворно, биологични и свободно отглеждани кокошки показват по-високи концентрации на есенциални елементи, което придава по-висока хранителна стойност на яйцата.

**Таблица 25.** Концентрации ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) на есенциални елементи

Елемент	Тип отглеждане					min	max	Токсично ниво ( $\text{mg}/\text{kg}$ )
	Дворно	Биологично	Свободно	Подово	Клетъчно			
<b>Есенциални елементи</b>								
Cu	0.837978	1.361827	1.324966	1.067969 9	0.6721668	0.6721 668	1.361 827	250
Mn	0.006639	0.057608	NDL	NDL	0.01324	0	0.057 608	4000
Zn	1.088555	3.278107	1.5635	2.288861	0.8333671	0.8333 671	3.278 107	2000
<b>Тежки метали</b>								
Ni	0.235058	0.094421	0.136302	0.189199 3	0.1227397	0.0944 213	0.235 058	400

NDL – non-detectable levels (неоткриваеми нива)

### Мед

В съответствие с Американския институт по медицина (2001), препоръчителният дневен прием на мед за възрастен човек е 900-1300  $\mu\text{g}$  /ден (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board 2001). Едно яйце съдържа приблизително 10  $\mu\text{g}$  /порция, като по този начин осигурява 1,1% от препоръчителния дневен прием на мед.

### Манган

Нашето проучване разкри, че повечето яйца са с концентрации на манган под концентрациите, които се откриват чрез ICP-OES.

### Цинк

Препоръчителният среден дневен прием за възрастни е между 8 и 12  $\text{mg}/\text{day}$  и яйцата биха могли да бъдат лесен избор за осигуряване на допълнителен цинк с нисък калориен прием (US Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 2001). Установената при нашето проучване концентрация на елемента показва, че консумирането на едно яйце дневно би осигурило приблизително 5% от дневния прием.

### Никел

Замърсяване с никел не е налично. Измереното количество е в нормални граници на елемента, доставян от фуражни източници – зърнени храни и зеленчуци (Mania et al., 2019).

Яйцата от екологични и свободно отглеждани системи са по-богати на есенциални елементи, като Cr, Cu, Fe, Mn и Zn. Концентрацията на тежки метали, като Cd, обаче е по-висока при интензивното земеделие в сравнение с екологичните системи.

Това може да се дължи на хранителните съставки, влизащи в състава на фуражите, използвани като храна за кокошки, или идва от замърсяване от оборудване, използвано за отглеждане на тези птици. Разликите в качеството на яйцата от различните системи за отглеждане показват, че потребителите имат възможност да подобрят хранителния си прием, като избират яйца от екологични източници, тъй като те имат по-висока хранителна стойност. Освен това, резултатите показват необходимостта от подобряване на животновъдните практики и хуманното отношение в животновъдството, като се насочват към екологични практики (Kirov et al., 2023).

## VI. ИЗВОДИ

1. Изпитваните метални комплекси с шифови бази или салиномицин намаляват преживяемостта и 2D/3D растежа на използваните като моделни системи трансформирани с вирус туморни клетки, като ефектът им се усилва с увеличаване на концентрацията и времето на въздействие. Цитотоксичният ефект на модифицираните с 1,8-нафталимиди глюкозамини е значително по-слабо изразен.
2. Демонстрирано беше наличието на клетъчно-специфичен отговор, следствие най-вероятно на различията в произхода и биологията на злокачествените новообразувания, от които са получени използваните като експериментални модели клетъчни линии, както и на феномена «хетерогенност на туморните клетки».
3. Нетуморните човешки ембрионални клетки от линия Lер-3 показват висока чувствителност към токсичния ефект на изпитваните вещества.
4. Сред изпитваните вещества най-силно изразени цитотоксични / потенциални антитуморни свойства при клетките от карцином на шийката на матката у човек (клетъчна линия HeLa) притежават комплексите на салиномицин с мед, цинк и кобалт. Активността им е потвърдена чрез прилагане на методи с различни мишени в клетката (молекули, органели) и осъществяване на краткосрочни (до 72 часа, с монослойни култури) и дългосрочни експерименти (повече от 30 дни, с 3D колонии от туморни клетки). Цитотоксичната им активност надвишава тази на утвърдените антитуморни препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин).
5. В групата на модифицираните с 1,8-нафталимиди глюкозамини най-висока цитотоксична и генотоксична (двойноверижни скъсвания в ДНК молекулата) активност проявява Ch-1, който напълно потиска митохондриалния потенциал в третираните клетки (вероятна причина за цитотоксичния му ефект). Веществата не оказват влияние върху разпределението на клетките в клетъчния цикъл. Цитотоксичният им ефект значително отстъпва на този на мекалните комплекси с шифови бази и използваните като контроли антитуморни препарати.
6. Тестираните съединения (хитозан и модифициран хитозан) не повлияват репликацията на HSV-1 (щам F) и HSV-2 (щам BA).

## **VII. ПРИНОСИ**

### **Оригинални научни приноси**

1. Получени са оригинални данни за влиянието на 16 новосинтезирани комплекси на метали (CuII, ZnII, CoII, RuII, NiII, MnII) с Шифови бази (13 комплекса) или салиномицин (3 комплекса) върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия трансформирани с човешки папиломни вируси или птичи ретровируси туморни клетки и човешки нетуморни клетки.
2. Установено е, че комплексите на салиномицин (SalCo > SalCu > SalZn) намаляват в най-висока степен преживяемостта и 2D/3D растежа на култивирани в лабораторни условия човешки карциномни клетки от линия HeLa, като активността им превъзхожда тази на утвърдените в клиничната практика антитуморни препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин.
3. За пръв път е разкрита информация за цитотоксичния, генотоксичния и митотоксичния ефект на четири модифицираните с 1,8-нафталимиди глюкозамини.

### **Приноси с научноприложен характер**

1. Оптимизиран и приложен е комплексен подход за изучаване на цитотоксичната активност на модифицираните с 1,8-нафталимиди глюкозамини при трансформирани с птичи ретровируси и човешки папиломни вируси туморни клетки.
2. Разработена и въведена в лабораторната ни дейност е клетъчна моделна система за продължително култивиране на хепатит Е вирус, която ще помогне при проучвания върху потенциалния онкогенен ефект на този вирус и изпитването на насочени срещу него антивирусни агенти.

## VIII. SUMMARY

Cancer remains a major cause of morbidity and mortality worldwide, despite significant progress in tumor diagnosis and treatment. A substantial proportion of malignancies are directly or indirectly associated with virus-induced carcinogenesis, in which oncogenic viruses and virus–host cell interactions contribute to malignant cell transformation and tumor progression. The limited efficacy, development of drug resistance, and severe side effects of conventional antitumor therapies necessitate the search for novel agents with improved selectivity, lower toxicity, and effectiveness in virus-transformed cellular systems.

Metal complexes with biologically active ligands represent a promising direction in contemporary experimental oncopharmacology and antiviral research. In addition to the established success of platinum-based drugs, increasing attention has been directed toward complexes of essential metals such as copper, zinc, cobalt, manganese, nickel, and ruthenium. Newly synthesized Schiff base metal complexes, metal–salinomycin complexes, and chitosan-based systems and their chemical modifications exhibit favorable biological properties, including cytotoxic and antiproliferative activity, potential antiviral effects, and improved pharmacokinetic and targeting characteristics.

Oncovirus-transformed cellular models provide an appropriate experimental platform for evaluating the biological activity and mechanisms of action of novel metal-based compounds. Cell lines transformed with high-risk human papillomavirus (HPV18), MC29, and Rous sarcoma virus (RSV) express viral oncogenes (*v-myc*; *v-src*) and are characterized by profound disturbances in cell cycle regulation, cell death, and signaling pathways related to tumor progression.

The present dissertation focuses on newly synthesized Schiff base metal complexes, salinomycin metal complexes, 1,8-naphthalimide-modified glucosamines (nanoparticles), and chitosan-based systems containing essential metal ions and ruthenium. The antitumor activity of these compounds were investigated in virus-transformed tumor cell models and compared with non-tumor cells and clinically used antitumor agents. Additionally, the effects of the tested compounds on the replication of human herpesviruses (HSV-1/HHV-1 and HSV-2/HHV-2) were evaluated. An *in vitro* cellular system for hepatitis E virus (HEV) infection and long-term viral replication was also developed and optimized.

The results of this study contribute to a better understanding of the antitumor and antiviral potential of metal-based complexes and chitosan-derived systems and support their further development as promising candidates for targeted therapy in virus-associated malignancies.

## IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- 1.Александрова, Р. Изолиране, характеризиране и приложение на постоянни клетъчни линии от предизвикан с вирус Мс29 трансплантируем хепатом у пиле, автореферат на дисертационен труд, 2008.
- 2.Дякова, 2019 Дякова, Л. (2019). Влияние на нестероидни противовъзпалителни средства, жлъчни киселини и техни метални комплекси върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки
- 3.Alexandrov, I. Immunobiological characterization of transplantable sarcoma in rats. – *Compt. Rend. Acad. bulg. Sci*, 46, 1993, 97-100
- 4.Zhang, Y., Guo, W., Zhan, Z., & Bai, O. (2024). Carcinogenic mechanisms of virus-associated lymphoma. *Frontiers in immunology*, 15, 1361009.
- 5.Buta, I., Ardelean, A., Lönnecke, P., Novitchi, G., Hey-Hawkins, E., Andruh, M., & Costisor, O. (2020). Structural and magnetic properties of three one-dimensional nitrate-, azido- and phenoxido-bridged copper (II) coordination polymers. *Polyhedron*, 190, 114766.
6. Ildiko Buta, Sergiu Shova, Sorina Ilies, Florica Manea, Marius Andruh, Otilia Costisor, Mono- and oligonuclear complexes based on a o-vanillin derived Schiff-base ligand: Synthesis, crystal structures, luminescent and electrochemical properties, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1248, 2022, 131439, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131439>
7. Ivanova, Juliana, et al. "Comparative study on the effects of salinomycin, monensin and meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid on the concentrations of lead, calcium, copper, iron and zinc in lungs and heart in lead-exposed mice." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 58 (2020): 126429.
- 8 Kirov, Plamen M., et al. "Comparative study of metal concentration determination in albumen of hen eggs originating from industrial poultry farms, backyard and free-range hens using ICP-OES technique." *BioRisk* 20 (2023): 129-138
9. Monika, M. et al. National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene 70(4): 393–399.
10. Schemmerer, Mathias, et al. "Isolation of subtype 3c, 3e and 3f-like hepatitis E virus strains stably replicating to high viral loads in an optimized cell culture system." *Viruses* 11.6 (2019): 483.
- 11.Schemmerer, Mathias, et al. "Molecular epidemiology and genotype-specific disease severity of hepatitis E virus infections in Germany, 2010–2019." *Emerging Microbes & Infections* 11.1 (2022): 1754-1763.

12. Takahashi, Masaharu, et al. "Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation." *Journal of clinical microbiology* 48.4 (2010): 1112-1125.

13. US Institute of Medicine, Food and Nutrition Board (2001) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC.

## **X. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Kirov, P.M., Karadjov, M., **Hristov, H.K.**, Alexandrova, R.. Comparative study of metal concentration determination in albumen of hen eggs originating from industrial poultry farms, backyard and free-range hens using ICP-OES technique. *BioRisk*, 20, Pensoft, 2023, ISSN:13132644, 13132652, DOI:10.3897/biorisk.20.97322., 129-138. SJR (Scopus):0.254

### **Цитирана в:**

1.1. Tejada-Purizaca TR, Garcia-Chevesich PA, Ticona-Quea J, Martínez G, Martínez K, Morales-Paredes L, Romero-Mariscal G, Arenazas-Rodríguez A, Vanzin G, Sharp JO, McCray JE. "Heavy Metal Bioaccumulation in Peruvian Food and Medicinal Products". *Foods*. 29;13(5):762. 2024

1.2. Tejada-Purizaca, T. R., Garcia-Chevesich, P. A., Ticona-Quea, J., Martínez, G., Martínez, K., Morales-Paredes, L., ... & McCray, J. E. "Estudio concluyó que alimentos peruanos contienen altas concentraciones de metales normados y no normados". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 1-5. 2024

1.3. Danova, K. International Seminar of Ecology – 2022. *BioRisk*, (20), pp. 1-5, 2023

2. Alexandrova, R., Tsachev, I., Kirov, P., Abudalleh, A., **Hristov, H.**, Zhivkova, T., Dyakova, L., Baymakova, M.. Hepatitis E virus (HEV) infection among immunocompromised individuals: a brief narrative review.. *Infection and Drug Resistance*, 17, Dovepress, 2024, ISSN:1178-6973, DOI:DOI <https://doi.org/10.2147/IDR.S449221>, 1021-1040. SJR (Scopus):0.793, JCR-IF (Web of Science):2.9

### **Цитирана в:**

2.1. Lotfy, G., Farid, N., Abu-Nasef, S., Ezzat, S.F. "Role of Exosomes from Mesenchymal Stem Cell in Hepatic Regeneration After Acute Liver Damage by Carbon Tetrachloride in Adult Male Albino Rats (Histological Study)". *Egyptian Journal of Histology*. 47(3), 1235-1251, Article 118, 2024.,

- 2.2. Papageorgiou, D., de Lastic, A.-L., Tsachouridou, O., Metallidis, S., Akinosoglou, K. "HEV Infection in Beta-Thalassemia Patients". *Pathogens*, 13(12), 1058, 2024.
- 2.3. Santos-López, G., Panduro, A., Sosa-Jurado, F., Fierro, N. A., Lira, R., Márquez-Domínguez, L., Cerbón, M., Méndez-Sánchez, N., Roman, S. "Advances in the Elimination of Viral Hepatitis in Mexico: A Local Perspective on the Global Initiative". *Pathogens*, 13(10), 859, 2024.
- 2.4. Szczotka-Bochniarz, A. and Kochanowski, M. "Pork as a Source of Diverse Viral Foodborne Infections: An Escalating Issue". *Diversity*, 16(11), 679, 2024.
- 2.5. Yadav, K.K. and Kenney, S.P. "Hepatitis E virus immunosuppressed animal models". *BMC Infectious Diseases*. Article number: 965, (24), 2024.
- 2.6. Amiri Z., Karami S., Gheshlaghi A., Hashemi S. M. A., Sarkari B., Morabbi L., Sarvari J. "Seroprevalence of hepatitis E virus among solid organ transplant recipients: insights from southern Iran: Hepatitis E Virus Antibodies in Transplant Recipients." *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 18(2), 2025.
- 2.7. Bagulo H., Majekodunmi, A., Welburn S., Bimi L. "The burden of hepatitis E virus infection among Ghanaian pregnant women". *Frontiers in Public Health*, 12, 2025.
- 2.8. Changyi J., Cunquan X., Luyu W., Hongtao W., Ping H., Mengmeng G., Jian W. "When HEV infection meets organ transplantation." *International Journal of Surgery* 111(10):p 7114-7124, 2025.
- 2.9. Girish V., Grant L., Sharma B., Koirala J. "Hepatitis E." NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health, In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID: 30335311, 2025.
- 2.10. He H., Li H., Yan L., Wang G., Liu Y., An T., Tu Y., Wang S., Cai X. "Hepatitis E Virus Detection in Swine Livers and Feces in Heilongjiang, Northeastern China". *Microorganisms*, 13, 1899, 2025.
- 2.11. Janczura, J., Jończyk, K., Nowak, K., Choromański, T., Pawliński, J., Starnawski, P., Woynarowski, M. "Hepatitis E in the pediatric population: an overlooked disease but a genuine concern?". *Clinical and Experimental Hepatology*. 2025.
- 2.12. Jiao H., Wu S., Wang L., Meng C., Zhou G., Guo J., Cao L., Zhao Y., Song Z., Wen J. "Bioinformatics Analysis of the Key lncRNAs of the Viral Response Pathway in HepG2 Expressing Genotype IV Swine Hepatitis E Virus ORF3." *Microorganisms*, 13(9), 2086, 2025.

- 2.13. Jiao, H., Wang, L., Meng, C., Wu, S., Qi, Y., Guo, J., Li, J., Cao, L., Zhao, Y., Wen, J. J., & Wang, F. "Comprehensive Bioinformatics Analysis the circRNAs of Viral Infection Associated Pathway in HepG2 Expressing ORF3 of Genotype IV Swine Hepatitis E Virus." *Microorganisms*, 13(12), 2654, 2025.
- 2.14. Junjun, W., Jiabin, X., Kejie, H., Yahong, H., Zhen, L., Huaming, L., Yufang, W., Rong X. "Acute hepatitis E virus infection following ECMO-assisted cardiopulmonary resuscitation and blood transfusion: A case report and systematic review." *Medicine*, 104(43), 2025.
- 2.15. Li, M., Shi M., Ji, C., Wang, L., Xiang, Z., Wang, Y., Wang, H., Gu, M., Ji, R., Jian Wu, J." The Gut Microbiota in Elderly Patients with Acute Hepatitis E Infection". *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 13(7), 578-587, 2025.
- 2.16. Mbencho M., Hafza N., Cao Le., Mingo V., Nyarko-Afriyie E., Achidi E., Ghogomu S., Velavan Th."Prevalence, genotype distribution, and risk factors of Hepatitis E virus in blood donors, HIV patients, and pregnant women in Southwest Cameroon." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 111, 4, 2025.
- 2.17. Nghikevali, A., Crowley, T."Community leaders' experiences of hepatitis E in a Namibian informal settlement: A qualitative study". *Journal of Public Health in Africa*, 16, 1, 2025.
- 2.18. Tukruna, N., Alabdulsalam, H., Hayan, R. Alhadri, A., Alsaiani, F., Zalah, A., Alebaid, S., Alblowi, M., Jafar, M., Almadkhly, H., Abdulwahed, W., Allaghabi, S., Alqerafi, A., Alharbi, M., Dweiri, R. "Hepatitis E Virus: Comprehensive Virological Insights, Diagnostic Strategies, and Laboratory Management for Clinical and Research Specialists." *Saudi Journal of Medicine and Public Health*, 2(2), 437–449, 2025.
- 2.19. Wang, M., Duan, B., Liu, M., Zhang, Y., Wu, F., Li, G., Ouyang, Y. "Vaccination Strategies and Research Gaps in Hepatitis E Virus for Special Populations". *Vaccines*, 13, 621, 2025.
- 2.20. Wei B., Wang W., Guo Z., Yin W., Cheng M., Yang Y., Tian Y., Sun Y., Liu T., Hu Y., She R., Tian J. "Rapid visual detection of hepatitis E virus combining reverse transcription recombinase-aided amplification with lateral flow dipstick and real-time fluorescence". *Journal of Clinical Microbiology*, 2025.
- 2.21. Zhang B., Kuang S., He ZH., Zhang J., Li S., Duan H., Ma ZH., Ding J. "Avian HEV triggered egg decline: Viral-host, immune-neuroendocrine mechanisms in layers". *Veterinary Microbiology*, 309, 2025.
- 2.22. Zhu Sh., Yuan J., Ju F., Gu M., Xiang Z., Zhang, Y. ".The gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio: a good noninvasive biomarker for predicting for the

occurrence and prognosis of patients with hepatitis E virus-related acute liver failure".  
Frontiers in Medicine, 12, 2025.

3. Zhivkova, T., **H. Hristov**, R. Alexandrova, A. Abudalleh, L. Dyakova, P. Dorkov, J. Ivanova. In vitro antitumor activity of metal complexes of salinomycin with cobalt (Co(II)), copper (Cu(II)) and Zinc (Zn(II)) ions against human cervical cancer (HeLa) and melanoma (A375, SH-4) cells. В процес на редактиране в списание Results in Chemistry.

## XI. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

### Доклади пред научни мероприятия в страната

1. **Hristo Hristov**, Radostina Alexandrova.  
HPV / човешки папиломен вирус – ключът за превенцията е в нас.  
Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 9–11 юни 2021 г., София, България.
2. **Hristo Hristov**, Veronika Bataklieva, Desislav Dinev, Abedulkadir Abudalleh, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Radostina Alexandrova.  
Cytotoxic effect of new metal complexes with Schiff bases on human cervical carcinoma cells.  
Научна конференция „Климентови дни“, 5 ноември 2021 г., София, България.
3. **Hristo Hristov**, Veronika Bataklieva, Desislav Dinev, Abedulkadir Abudalleh, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Radostina Alexandrova.  
Cytotoxic activity of metal complexes with Schiff bases in virus-transformed rat sarcoma and human cervical carcinoma cells.  
XVI работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“, 24–26 ноември 2021 г., София, България.
4. **Христо Христов**, Десислав Динев, Абдулкадир Абудаллах, Лоря Дякова, Десислава Станева, Иво Грабчев, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Awad I. Said, Радостина Александрова.  
Влияние на новосинтезирани съединения върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни и нетуморни клетки.  
Трети интердисциплинарен докторантски форум, 6–7 юни 2022 г., Кюстендил, България.
5. Orlin Alexandrov, Toluwase Israel Tomori, Monika Dimcheva, Awad I. Said, **Hristo Hristov**, Abedulkadir Abudalleh, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Ivo Grabchev, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Radostina Alexandrova.

First steps in evaluating cytotoxic / antitumor activity of new compounds.

VIII National Conference with International Participation “Morphological Days”, 10–12 юни 2022 г., София, България.

6. **Hristo Hristov**, Desislav Dinev, Abedulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Radostina Alexandrova.  
Metal complexes with Schiff base decrease viability and 2D/3D growth of human cervical carcinoma cells.  
VIII National Conference with International Participation “Morphological Days”, 11 юни 2022 г., София, България.
7. **Hristo Hristov**, Desislav Dinev, Abedulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Desislava Staneva, Kalina Shishkova, Awad I. Said, Ivo Grabchev, Radostina Alexandrova.  
Study of cellular response in virally transformed cell lines under the action of chitosan and its derivatives.  
Scientific Conference of Faculty of Biology “Kliment’s Days 2022”, 4 ноември 2022 г., София, България.
8. **Hristo Hristov**, Abedulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Tanya Zhivkova, Mariya Georgieva, Ivo Grabchev, Desislava Staneva, Georgi Miloshev, Awad I. Said, Radostina Alexandrova.  
Evaluation of cytotoxic / antitumor properties of 1,8-naphthalimide derivatives on human and animal tumor cells.  
4th Interdisciplinary PhD Forum with International Participation, 16–19 май 2023 г., Сандански, България.
9. Plamen Kirov, Ionica Iancu, Mirela Imre, Viorel Herman, Alexandru Gligor, Rusko Petrov, Radostina Alexandrova, **Hristo Hristov**, Abudalleh Abedulkadir.  
First serological evidence for West Nile virus infection amongst horse population in Northern Bulgaria.  
International Seminar of Ecology, 28–29 септември 2023 г., София, България.
10. **Hristo Hristov**, Radostina Alexandrova, Lora Dyakova, Tanya Zhivkova, Abedulkadir Abudalleh, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu.  
Проучване на потенциалния цитотоксичен / антитуморен ефект на новосинтезирани метални комплекси със Шифови бази (ин витро)  
80 години Съюз на учените в България – в служба на обществото, 4–6 октомври 2024 г., Варна, България.

#### **Доклади пред научни мероприятия в чужбина или пред международни научни мероприятия у нас**

1. Тая Живкова, Абдулкадир Абудаллах, Бойка Андонова-Лилова, **Христо Христов**, Десислав Динев, Елица Голкочева, Радостина Александрова.

*Cell cultures as model systems in Hepatitis E virus research.*

Постер – [17.04.2021]

2. Радостина Александрова, Бойка Андонова-Лилова, **Христо Христов**, Десислав Динев, Абдулкадир Абудаллах, Таня Живкова, Лора Дякова, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Virginija Jankauskaite, Nabanita Saha, Crtomir Podlipnik.

*Cell cultures as model systems for biorisk assessment.*

Постер – [29.09.2021]

3. **Hristo Hristov**, Abedulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, Tanya Zhivkova, Awad I. Said, Monika Dimcheva, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Ivo Grabchev, Radostina Alexandrova.

*Retrovirus transformed rat sarcoma cells in the searching for potential antitumor agents.*

Постер

4. **Христо Христов**, Абдулкадир Абудаллах, Десислав Динев, Лора Дякова, Таня Живкова, Моника Димчева, Десислава Станева, Иво Грабчев, Радостина Александрова.

*Цитотоксична активност на хитозани върху човеишки остеосаркомни клетки.*

Постер

5. Radostina Alexandrova, **Hristo Hristov**, Abedulkadir Abudalleh, Desislav Dinev, Lora Dyakova, Desislava Staneva, Kalina Shishkova, Awad I. Said, Ivo Grabchev.

*Investigations on cytotoxic and antiviral effects of 1,8-naphthalimide derivatives.*

Постер

6. Plamen Kirov, Methody Karadjov, **Hristo Hristov**, Radostina Alexandrova.

*Comparative study of metal concentration determination in albumen of hen eggs originating from industrial poultry farms, backyard and free-range hens using ICP-OES technique.*

Доклад

7. **H. Hristov**, D. Dinev, A. Abudalleh, L. Dyakova, D. Staneva, K. Shishkova, A. Said, I. Grabchev, R. Alexandrova.

*Evaluation of biological activity (cytotoxic, antiviral) of 1,8-naphthalimide derivatives.*

Постер

8. R. Alexandrova, **H. Hristov**, A. Abudalleh, L. Dyakova, D. Staneva, M. Georgieva, G. Miloshev, A. I. Said, I. Grabchev.

*Cytotoxicity of 1,8-naphthalimide derivatives in human breast and cervical cancer cells.*

Доклад

9. R. Alexandrova, A. Abudalleh, Z. Petrova, **H. Hristov**, T. Zhivkova, L. Dyakova, I. Grabchev, D.-C. Culita, G. Marinescu, I. Buta, O. Costisor.

*Challenges, lessons and successes in the search for new antitumor and antiviral agents.*

Пленарен / ключов доклад

10. Radostina Alexandrova, Abedulkadir Abudalleh, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, **Hristo Hristov**, Plamen Kirov.

*The challenges of hepatitis E virus.*

Доклад

11. Plamen Kirov, Radostina Alexandrova, **Hristo K. Hristov**.

*Comparative study of metal concentration determination in albumen of hen eggs originating from industrial poultry farms, backyard and free-range hens using ICP-OES technology.*

Постер – [20.09.2024]

12. A. Georgieva, **H. Hristov**, T. Zhivkova, A. Abudalleh, L. Dyakova, P. Dorkov, J. Ivanova, R. Alexandrova.

*Cytotoxic activity of salinomycin complexes with manganese (II) and gadolinium (II) on human melanoma cells.*

Постер – [05.06.2025]

13. R. Alexandrova, **H. Hristov**, T. Zhivkova, A. Abudalleh, L. Dyakova, O. Alexandrov, I. Buta, D.-C. Culita, G. Marinescu.

*Targeted cancer therapy: challenges, success and hope.*

Доклад по покана – [24.09.2025]

14. A. Abudalleh, T. Zhivkova, **H. Hristov**, L. Dyakova, D.-C. Culita, G. Marinescu, R. Alexandrova.

*Potential antitumor activity of Cu(II) complexes with Schiff bases in human tumor cells.*

Постер

15. T. Zhivkova, L. Dyakova, A. Abudalleh, **H. Hristov**, D.-C. Culita, G. Marinescu, T. Mocanu, R. Alexandrova.

*Newly synthesized Zn/Au complexes with Schiff base ligands as potential antitumor agents in treatment of human glioblastoma multiforme.*

Доклад

16. L. Dyakova, T. Zhivkova, A. Abudalleh, **H. Hristov**, D.-C. Culita, G. Marinescu, T. Mocanu, E. Naidenov, R. Alexandrova.

*Creating a new experimental model necessary for personalized medicine for the treatment of human glioblastoma multiforme.*

Доклад

17. A. Abudalleh, T. Zhivkova, **H. Hristov**, L. Dyakova, T. Mocanu, D.-C. Culita, A.-M. Madalan, G. Marinescu, R. Alexandrova.

*Cytotoxic evaluation of novel Cu(II)-Schiff base complexes derived from o-vanillin and amino acids against human melanoma and cervical cancer cells.*

Постер – [26.11.2025]

## **XII. БЛАГОДАРНОСТИ**

**Дисертационният труд е осъществен с финансовата подкрепа на:**

**Фонд „Научни изследвания“ в Република България**

- Договор № КП-06-Н-33/2 от 13.12.2019 г. на тема: Тема: “Проучвания върху генотипното разнообразие и участието на полипролинови регион в ин витро адаптацията на хепатит Е вируса”. Ръководител на проекта: гл. асист. Елица Голкочева, доктор (Национален център по заразни и паразитни болести, София); Ръководител на работна група от ИЕМПАМ-БАН: проф. Радостина Александрова, доктор. Оценка за изпълнението на проекта: Мн. добър (Пр. 80/25.10.2024 г.);
- Договор № КП-06-КОСТ16 от 16.12.2020 г. на тема: "Проучвания върху цитотоксичната / антитуморната активност на новосинтезирани глюкозамини, модифицирани с 1,8-нафталимиди". Ръководител на проекта: проф. Радостина Александрова, доктор. Оценка за изпълнението на проекта: Добър (Пр. 80/25.10.2024 г.).

**Програма за двустранно сътрудничество между БАН и сродни организации в чужбина (Румънска академия)**

- Договор за двустранно сътрудничество между БАН (ИЕМПАМ) и Румънската академия (Институт по физикохимия „Илие Мургулеску“, Букурещ; Институт по химия „Кориолан Драгулеску“, Тимишоара) на тема: “Търсене на потенциални нови агенти за терапия на тумори”, срок на изпълнение 2022 - 2025 г. Ръководител на проекта от българска страна: проф. Радостина Александрова, доктор

**Европейския съюз „Next Generation EU“ чрез Националния план за възстановяване и устойчивост на Република България**

- проект № BG-RRP-2.004-0008