

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Рени Емил Калфин, Ръководител на Научно направление
„Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“
при Институт по невробиология - БАН

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
„Доктор“

Професионално направление 4.3. „Биологически науки“
Докторска програма „Вирусология“

Автор: Магистър Христо Кънчев Христов

Форма на докторантурата: Редовна докторантура

Секция: „Патология“ на Институт по експериментална морфология, патология
и антропология с музей - БАН

Тема: „Антитуморна и антивирусна активност на новосинтезирани метални
комплекси на шифови бази и салиномицин и на модифицирани с 1,8-нафталимиди
глюкозамини“

Научен ръководител:

Професор Радостина Ивайлова Александрова, доктор – ИЕМПАМ-БАН

1. КРАТКИ БИОГРАФИЧНИ ДАННИ НА ДОКТОРАНТА

Христо Христов е роден на 1 януари 1980 г. в град Полски Тръмбеш, област Велико Търново. През 2009 г. той завършва специалност „Електротехника“ в Професионално-техническо училище „Карол Сверчевски“ в София. Образователно-квалификационна степен „Магистър“ по специалността „Вирусология“ Христо придобива през 2020 г. от Софийския университет „Св. Климент Охридски“ с отличен успех. След завършване на висшето си образование и проведен конкурс, Христо Христов е зачислен в редовна докторантура по „Вирусология“ в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей - БАН, а от 1 януари 2024 г. той е отчислен с право на защита.

От 2019 г. и понастоящем магистър Христо Христов е член на Българското дружество по анатомия.

2. АКТУАЛНОСТ НА ТЕМАТИКАТА

Дисертационният труд на редовен докторант Христо Кънчев Христов е посветен на важен проблем в съвременната медико-биологична наука – търсене на нови средства с мощна антитуморна активност, висока селективност и добра биологична поносимост. Независимо от големия напредък в лечението и диагностиката на злокачествените новообразувания, те продължават да бъдат един от основните проблеми не само пред медицинските и научни съсловия, но и пред цялото общество. Достатъчно е да споменем непрекъснато увеличаващата се честота на раковите заболявания в световен мащаб. Заслужава да се отбележи факта, че значима част от злокачествените новообразувания са свързани пряко или косвено с вирус-индуцирана карциногенеза, при която онкогенни вируси и вирусно-клетъчни взаимодействия допринасят за злокачествената трансформация и прогресията на тумора. Установено е, че между 10 и 15 % от всички ракови заболявания при хората се причиняват от вируси. Вирусните инфекции могат да допринесат за злокачествена трансформация на клетките чрез комбинация от механизми, като интеграция на вирусния геном, експресия на онкогени, предизвикване и поддържане на хронично възпаление, епигенетични промени и потискане на имунния отговор.

Основна причина за неуспеха на лечението на злокачествените новообразувания продължава да бъде мултилекарствената резистентност и донякъде нежеланите странични ефекти на химиотерапията, което обосновава усилията на учените в посока синтезиране, характеризизиране, изследване и приложение на нови съединения с потенциални антитуморни свойства. Добре известно е, че химиотерапията с платина е ефективен метод за лечение на онкологични заболявания. Медикаменти на основата на платина (цисплатина, оксалиплатина и карбоплатина) се използват рутинно - самостоятелно или в комбинация с други препарати, за лечение на различни злокачествени заболявания. Съединенията на рутения, които са един от обектите за изследване в настоящия дисертационен труд, притежават редица предимства пред платиновите препарати, сред които по-ниска токсичност и по-слабо изразена способност да предизвикват устойчивост в туморните клетки. В този контекст изследването на новосинтезирани метални комплекси на шифови бази и салиномицин, както и на модифицирани с 1,8-

нафталимиди глюкозамини, представлява научно обоснован и перспективен подход. Всичко казано дотук прави темата на дисертационния труд актуална в научно и научно-приложно отношение и обосновава необходимостта от проведените изследвания.

3. ПОЗНАВАНЕ НА ПРОБЛЕМА

От направената обширна литературна справка се вижда, че Христо Христов е отлично запознат със състоянието на изследвания проблем, обект на неговия дисертационен труд. Литературният обзор е съвременен и говори за автор със знания, който разбира направеното до момента и перспективите в бъдеще. Като цяло цитираните източници показват задълбочено познаване на научната литература и проблематиката, свързана с разработваната дисертационна теза. Използваната литература включва съвременни източници и обхваща широк спектър от публикации в областта на вирусологията, онкологията и медицинската химия. Цитираните данни са актуални и съобразени със съвременното състояние на научните изследвания.

Литературният обзор е структуриран в шест основни тематични подраздела с ясно изразена логическа последователност. Налице е много добре изградена тематична рамка, която интегрира онкология, вирусология, молекулярна биология и биоорганична химия. Положително впечатление прави интердисциплинарният характер на обзора – той съчетава епидемиологични данни, молекулярни механизми на карциногенезата и фармакологични стратегии.

Литературният обзор започва с представяне на раковите заболявания като глобален здравен и социален проблем, като са използвани актуални епидемиологични данни и прогностични оценки за развитието на заболяемостта в световен мащаб. По този начин авторът убедително аргументира обществената значимост на изследвания проблем.

В следващите раздели вниманието се насочва към вирус-индуцираната карциногенеза и са разгледани както историческите аспекти на онковирусологията (откриването на Rous sarcoma virus и идентифицирането на вирусните онкогени), така също съвременните представи за ролята на човешките онкогенни вируси. Детайлно са анализирани механизмите на действие на вирусните онкопротеини

(E6/E7 при HPV), интеграцията на вирусния геном и регулацията на клетъчния цикъл.

В обзора е налице ясна концептуална линия, която последователно води от фундаменталните механизми на карциногенезата към конкретните експериментални модели, използвани в дисертационния труд – клетъчни линии, трансформирани с HPV18, както и модели, базирани на птичи левкозни и саркомни вируси (RSV и Mc29).

Разделите, посветени на металите в медицината, шифовите бази, салиномицин и наномедицинските подходи, са логично продължение на изложените молекулярни механизми на карциногенеза. Авторът коректно проследява успешната терапия с платинови комплекси и аргументира необходимостта от разработване на нови метални съединения с подобрен профил на селективност и по-ниска токсичност. Представени са потенциалните механизми на действие на металните комплекси – взаимодействие с нуклеинови киселини, индукция на оксидативен стрес, влияние върху митохондриалната функция и сигналните пътища. Обсъдени са възможностите за повишаване на биологичната активност чрез координация със шифови бази и салиномицин, както и ролята на модифицираните носещи системи.

Тези раздели убедително подготвят експерименталната част на дисертационния труд и ясно очертават научната ниша, в която се позиционира изследването.

Особено положителна е интеграцията на вирусологията с молекулярната онкология, също така обвързването на теоретичните постановки с конкретните експериментални подходи в дисертационния труд.

В заключение, литературният обзор демонстрира високо ниво на теоретична подготовка. Авторът показва добро познаване на молекулярните механизми на активиране на онкогени, включително семейството MYC; разбиране на разликите между вирусни и клетъчни онкогени (v-onc и c-onc); ролята на хроничното възпаление и генетичната нестабилност в процеса на малигнизацията; ясното разграничаване между различните механизми на вирус-индуцирана трансформация.

4. МЕТОДИКА НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Обект на настоящата дисертация са новосинтезирани метални комплекси на шифови бази, метални комплекси на салиномицин с йони на есенциални метали и рутений, както и модифицирани с 1,8-нафталимиди глюкозамини (наночастици). Проведените експерименти целят изследване на противотуморната активност и механизмите на действие на тези съединения върху клетъчни модели на ракови клетки, трансформирани с HPV18, MC29 и RSV и експресиращи вирусни онкогени (v-опс, тус-опс). За тяхното изучаване успешно са приложени съвременни и класически методи: молекулярно-биологични, клетъчно-културални, биохимични, цитоморфологични и др.

Синтезът и физико-химичната характеристика на изследваните метални комплекси са извършени от колеги от Румънската академия на науките (комплексите с Шифови бази) и Медицинския факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ (комплексите на салиномицин и модифицирани с 1,8-нафталимиди глюкозамини).

Едно от основните изисквания към антитуморните препарати е действието им да е насочено към злокачествено трансформираните, а не към нормалните клетки на организма. Ето защо докторанта включва в експериментите си нетуморна линия от човешки клетки Hep3, получена от ембрионални белодробни фибробласти.

Христо Христов е доказал уменията си за работа с клетъчни култури, придобити под ръководството на проф. Радостина Александрова и колегите от екипа.

5. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Дисертационният труд е написан на 221 страници по стандартната схема и включва всички раздели, препоръчани за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, като е спазено съотношението между отделните части. Трудът е богато онагледен със 73 фигури и 58 таблици. Библиографията се състои от 318 литературни източници.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана – 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).

Докторантът също цели разработване на *in vitro* клетъчна система за заразяване с хепатит Е вирус (HEV) и поддържане на вирусната репликация.

Поставените задачи са конкретни, логично произтичат от целите на дисертационната теза и включват:

- оценка на цитотоксичност;
- анализ на антипролиферативен ефект;
- изследване на апоптоза;
- проучване на въздействие върху вирусни модели;
- сравнителна оценка на различните комплекси.

Експерименталната част на дисертационния труд дава ясна представа за научна стойност на проведеното изследване. Получените резултати са систематично представени, методологично обосновани и логически структурирани в съответствие с поставените цели и задачи. Авторът използва утвърдени количествени методи за оценка на клетъчна жизнеспособност (MTT, NR, CV тестове), което позволява обективна и възпроизводима оценка на ефекта. Получените данни показват, че част от металните комплекси проявяват значима цитотоксична активност, сравнима или в определени случаи превъзхождаща референтни съединения. Това представлява реален принос към търсенето на нови противотуморни агенти.

Важно постижение на дисертацията е изследването на механизмите на клетъчна смърт. Чрез флуоресцентни методи (AO/PI) и морфологичен анализ са установени типични признаци на апоптоза. Данните подкрепят хипотезата, че част от металните комплекси индуцират програмирана клетъчна смърт, а не неспецифична некроза. Това е съществено, тъй като апоптотичната индукция е предпочитан механизъм при противотуморни средства.

Особено ценна част от дисертацията е изследването на активността на съединенията върху вирусно трансформирани клетъчни системи (HPV18, RSV, Мс29).

При подготовката на дисертацията е разработена *in vitro* клетъчна система за заразяване с хепатит Е вирус и поддържане на вирусната репликация. Тя ще допринесе за провеждане на проучвания върху възможния онкогенен потенциал на хепатитния вирус и търсене на насочени срещу него антивирусни агенти.

Получените експериментални данни представляват съществен и оригинален принос в изследването на антитуморната активност на нови метални комплекси. Те разширяват познанията относно потенциала на координационните съединения като терапевтични агенти и създават основа за бъдещи предклинични разработки.

Изборът на вирусно трансформирани клетки е особено ценен, тъй като позволява да се оцени не само цитотоксичността, но също така потенциалното въздействие върху онкоген-зависими сигнални пътища (E6/E7-p53/pRb ос, v-src тирозинкиназна сигнализация, v-тус транскрипционна регулация).

Обсъждането на експерименталните резултати показва задълбочено и съвременно знание на докторанта относно вирусологията, биохимията и експерименталната химиотерапия. Използваната литература е богата, показва задълбоченото познаване на материята, с която Христо Христов работи. Дисертационната теза е отлично написана – интелигентно и с много знания, изключително богато онагледена с цветни фигури и таблици. Цитирани са широк кръг чуждестранни автори, при това със съвременни разработки. Дисертацията е написана на отличен български език, което за съжаление вече не се среща в съвременните дисертации, и с минимално използване на чуждици.

Всичко казано по-горе е доказателство за големия обем на материала, обработен и описан детайлно от Христо Христов, което ми дава основание да дам висока оценка на уменията на автора да разглежда получените резултати в контекста на известните факти от литературата, да открива причинно-следствените връзки между изследваните параметри и да формулира точно изводите си, като надхвърля очакваното за докторант ниво.

В заключение дисертационният труд демонстрира способност за мислене на ниво молекулярна патогенеза и лекарствен дизайн. Представените резултати

надхвърлят чисто описателното ниво и позволяват формулиране на хипотези с висока научна стойност.

6. ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА

Получените резултати имат потенциално значение за медицинската практиката, което позволява да им се даде висока оценка. Формулирани са **6 основни изводи** в дисертацията, които напълно приемам. Те отразяват най-съществените резултати и констатации, получени в хода на разработката, както по отношение на наблюдаваните ефекти след прилагане на изследваните метални комплекси, така и относно вероятните механизми на тяхното антитуморно действие.

Извършените комплексни проучвания и получени резултати при изследване 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 могат да бъдат систематизирани като приноси с оригинален, методологичен и приложен характер както следва:

1. Оригинални научни приноси

- 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
- За пръв път е получена информация за цитотоксичния, генотоксичния и митотоксичния ефект на четири модифицирани с 1,8-нафталимиди глюкозамини (наночастици)

2. Методологични приноси

- Използвани са онковирусни модели като платформа за оценка на противотуморната и потенциално антивирусната активност на нови съединения

- Приложен е интердисциплинарен 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

3. Научно-приложни приноси

- Разработена е клетъчна моделна система за продължително култивиране на хепатит Е вирус, която да бъде използвана при проучвания върху потенциалния онкогенен ефект на този вирус и изпитването на насочени срещу него антивирусни агенти

7. Публикации и докладвания по темата на дисертационния труд

Съобразно Закона за развитие на научния състав в Република България и Правилника за неговото приложение за защита на дисертационен труд в професионално направление 4.3. „Биологически науки“ са необходими минимум 30 точки, получени от група показатели от 5 до 10. По темата на дисертационния труд са излезли от печат две научни публикации – един обзор публикуван в списание с квантил Q2, който носи 20 точки и една експериментална статия публикувана в списание с квантил Q3, от която докторанта получава 15 точки или с общо събраните 35 точки Христо Христов надхвърля минималните изисквания за защита на дисертационен труд. По темата на дисертацията е изпратена за печат още една експериментална статия в процес на рецензиране в международното списание „Results in Chemistry“ с квантил Q2.

Много добро впечатление прави факта, че излезлите от печат статии са цитирани общо 25 пъти. Във връзка с разработената дисертационна теза докторантът има 10 участия в научни форуми в страната, в 80% от които е първи автор. Докторантът също така е съавтор в 17 представяния на резултатите пред научни мероприятия в чужбина или пред международни научни форуми в България, в 35% от които е първи автор. Горепосочените факти недвусмислено показват, че Христо Христов е придобил умения да представя работата си пред научната общност, а това е съществена част от обучението по време на разработването на докторска дисертация.

8. ЛИЧНО УЧАСТИЕ НА ДОКТОРАНТА

Христо Христов лично участва в проведеното изследване. Приносите на дисертационния труд, отбелязани от докторанта, са негово дело, получени с подкрепата и съдействието на научния ръководител професор Радостина Александрова.

9. АВТОРЕФЕРАТ

Авторефератът е написан на 60 стандартни страници и съответства на съдържанието на дисертацията. От автореферата може да се добие много добра представа за направеното научно изследване. За лесното възприемане на резултатите от читателя допринася богатото онагледяване на автореферата с 25 таблици и 21 фигури, преобладаващата част от които са цветни. В автореферата са включени целта и задачите на проучването, всички основни за дисертационния труд резултати и тяхното обсъждане, изводите и приносите. В заключение авторефератът изпълнява основната си функция – да представи синтезирано, но достатъчно подробно научния замисъл, експерименталния подход и получените резултати, без да навлиза в прекомерни детайли, характерни за пълния текст на дисертацията.

10. КРИТИЧНИ ЗАБЕЛЕЖКИ И ПРЕПОРЪКИ

Критични бележки към докторанта нямам. Получените експериментални данни са многобройни и значението им тепърва ще нараства. Препоръката ми е те да бъдат обобщени в научни статии и изпратени за публикуване в списания с висок импакт-фактор, защото заслужават да станат достъпни за международната научна общност.

Въпроси към докторанта:

1. Какви са основните предимства на металните комплекси спрямо класическите цитостатици ?
2. Има ли индикации за митохондриално участие в механизма на действие на изследваните метални комплекси ?
3. Какво е значението на получените резултати за клиничната практика ?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработеният от докторанта Христов дисертационен труд е комплексно и трудоемко проучване върху изключително актуален проблем на експерименталната онкология и онкофармакология. Разширени са познанията относно взаимодействието между новосинтезирани метални комплекси и вирус-индуцирани туморни системи. Получени са оригинални данни, които имат не само научна стойност, но представляват интерес за диагностичната и лечебна медицинска практика.

Дисертационният труд показва, че редовен докторант магистър Христов притежава задълбочени знания и професионални умения по научната специалност „Вирусология“, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Дисертационният труд е добре замислен, методично обоснован, прецизно изпълнен и напълно отговаря, а в някои аспекти надхвърля научните и образователни критерии за докторска степен, залегнали в Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и вътрешния правилник на ИЕМПАМ-БАН.

Предвид гореизложеното, давам своята положителна оценка за проведеното научно изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и с убеденост препоръчвам на почитаемите членове на Научното жури да гласуват с „ДА“ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на магистър-вирусолог Христо Христов в Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност „Вирусология“.

4 март 2026 г.

Рецензент:

A red rectangular box used to redact the signature of the reviewer.

Проф. д-р Рени Калфин