

Българска академия на науките
Институт по експериментална морфология, патология и
антропология с музей

ДЕСИСЛАВ РУСЕВ ДИНЕВ

**Цитотоксична активност на метални [Cu(II), Co(II)]
комплекси с Шифови бази и Дисулфирам при човешки
и животински туморни клетки**

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: Морфология (шифър: 01.06.26)

Научен ръководител:

Проф Радостина Ивайлова Александрова, доктор

София, 2020 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

На първо място бих искал да изкажа моите най-сърдечни благодарности на научния ми ръководител проф. д-р Радостина Александрова - за получените знания и напътствия, за неограничената ѝ помощ и подкрепа, за нейното доверие и търпение, както и на моите скъпи колеги Абдулкадир Абудалех, Таня Живкова, Лора Дякова, Бойка Андонова-Лилова, Здравка Петрова и Милена Главчева - за тяхната помощ, приятелско отношение и проявен професионализъм.

Специални благодарности и към проф. Рени Калфин от Института по невробиология-БАН за ценните съвети, отзивчивост и съвети по време на цялостната ми работа.

Сърдечно благодаря на ръководството и всички колеги от ИЕМПАМ – БАН - за проявеното разбиране и за помощта им при провеждане на експерименталната работа.

Изказвам искрена благодарност към проф. д-р Георги Милошев и неговия колектив от Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН - за оказаното съдействие при провеждането на молекулярнобиологичните тестове.

Благодаря на доц. д-р Милена Мурджева от Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ – БАН за помощта при изследванията с конфокална микроскопия.

Благодаря на д-р Габриела Маринеску, д-р Даниела-Кристина Кулица и проф. Луминица Патрон от Института по физикохимия „Илие Мургулеску“ в Букурещ, Румъния, за предоставянето на синтезираните от тях метални комплекси, за приятелството и помощта.

Благодаря на всички мои приятели, които по време на подготовката на дисертационния труд се отнесоха с разбиране и търпение и ми оказваха морална подкрепа.

Не на последно място бих искал да отправя искрени благодарности и към уважаемите рецензенти и членове на Научното жури за времето, което са отделили, за да се запознаят с дисертационния труд, за ценните съвети и препоръки.

Изказвам специални благодарност към д-р Росен Спасов и доц. д-р Марин Александров!

Представеният Дисертационен труд е написан на 185 стр. и съдържа 21 фигури и 11 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 86 заглавия, от които 15 на кирилица и 71 на латиница.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена основно в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ) - БАН.

Металните комплекси са синтезирани и физикохимически охарактеризирани от д-р Даниела-Кристина Кулица, д-р Габриела Маринеску и проф. Луминица Патрон, Институт по физикохимия „Илие Мургулеску”, Румънска академия, Букурещ, Румъния.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заседание на секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, проведено (със заповед № РД-09-59/ 01.12.2020 г. на Директора на Института) на 03.12.2020 г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 17 март 2021 г. от 11.00 часа на открито заседание на Научно жури в състав:

Вътрешни членове:

проф. Светлозара Петкова, доктор (ИЕМПАМ-БАН) - Председател на Научното жури) - становище

Проф. Радостина Александрова, доктор (ИЕМПАМ-БАН) – становище

Външни членове:

Проф. Рени Калфин, доктор (Институт по невробиология – БАН) - рецензия

Проф. Иво Грабчев, дхн (Медицински факултет, СУ „Св. Кл. Охридски) - становище

Проф. д-р Анна Толева, доктор (Медицински колеж, Тракийски университет, Стара Загора) - рецензия

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

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. Въведение.....	7.стр.
II. Цел.....	10.стр.
III. Задачи.....	10.стр.
IV. Материали и методи.....	11.стр.
IV.1. Материали.....	11.стр.
IV.2. Методи.....	19.стр.
V.Резултати.....	21.стр.
V.I. Влияние на изпитваните вещества върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки....	21.стр.
V.II. Влияние на дисулфирам върху преживяемостта и пролиферативната активност на плъщи саркомни клетки.....	34.стр.
V.III. Антитуморни препарати.....	36.стр.
V.IV . Диметилсулфоксид.....	38.стр.
VI. Обсъждане.....	39.стр.
VII. Цитирана литература.....	43.стр.
VIII.Изводи.....	44.стр.
IX. Приноси.....	45.стр.
X. Списък с научни публикации по темата на дисертационния труд.....	46.стр.
XI. Списък на изнесени научни съобщения по темата на дисертационния труд.....	47.стр.
XII. Благодарности към научно-изследователски проекти.....	51.стр.

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА:

ЕИК – Ефективна инхибираща концентрация, при която изпитваното съединение напълно потиска образуването на 3D колонии от туморни клетки в полутечна среда.
КК – Клетъчна култура
ПКК – Първична клетъчна култура
ПКЛ – Постоянна клетъчна линия
КОМ – 3D Колонии-образуващ метод
МТТ – МТТ тест
СЗО – Световна здравна организация
ФСБ – Фосфатно-солеви буфер
ФТС – Фетален телешки серум
ЦК₅₀ – Цитотоксична концентрация на веществото, която намалява с 50% преживяемостта на третираните клетки
ЦК₉₀ – Цитотоксична концентрация на веществото, която намалява с 90% преживяемостта на третираните клетки
ЦТЕ – Цитотоксичен ефект
АО/PI – Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид
bipy = 2,2'-bipyridine;
CisPt – Цисплатина
CV – Тест за оцветяване с кристалвиолет
DMSO – Диметилсулфоксид
EGF – Епидермален растежен фактор
EGFR – Рецептор на епидермалния растежен фактор
ER – Естрогенен рецептор
HER2 – Рецептор на епидермалния растежен фактор тип 2
MDR – Multidrug resistance, Множествена лекарствена устойчивост
MeOH = CH₃OH
NR – Тест за включване на неутрално червено
PGP – P glycoprotein
PR – Рецептор за прогестерон
Ser – L-серин (L-serine)
SR-RSV – Rous sarcoma virus (Саркомен вирус на Раус) щам Schmidt-Ruppin
Thr – L-треонин (L-threonine)
TNBC – Triple Negative Breast Cancer, Тройно негативен рак на млечната жлеза
Trpt – DL-триптофан (DL-tryptophan)
Tyr – S-тирозин (S-tyrosine)
Van – o-vanillin
TB – Тест за определяне на клетъчна жизнестойност с помощта на трипаново синьо

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ракът (злокачествено новообразование, злокачествен тумор, неоплазма) обхваща голяма група заболявания. Туморният процес може да засегне почти всеки орган или тъкан на тялото, при което злокачествено трансформирани клетки растат неконтролируемо, водят до поява на аномална формация, нахлуват в съседни части на тялото и / или да се разпространят в далечни органи и тъкани (метастазират). Метастазирането е основна причина за настъпване на летален изход. Въпреки несъмнените успехи при профилактиката, ранната диагностика и лечението на някои неоплазии, раковите заболявания продължават да бъдат сред водещите причини за настъпване на смърт или трайно инвалидизиране, нареждайки се веднага след сърдечносъдовитне заболявания.

По данни на Световната здравна организация (СЗО) през 2018 г. броят на новодиагностицираните със злокачествено заболяване надхвърля 12 милиона души. Само през 2018 г. са регистрирани 9,6 милиона смъртни случая вследствие на раково заболяване – това е била причината за настъпване на смърт в един от всеки шест смъртни случая. При мъжете най-често се срещат ракът на белите дробове, простатата, дебелото/правото черво, стомаха и черния дроб, а при жените водещи в това отношение са неоплазиите на млечната жлеза, дебелото/правото черво, белите дробове, шийката на матката и щитовидната жлеза.

През 2018 г. в България са регистрирани над 35 000 нови случая, общият брой на регистрираните смъртни случаи от онкологични заболявания за същата година надхвърля 19 000. Според направените от специалисти прогнози, ако не бъдат предприети действия за подобряване на контрола върху раковите заболявания, включително чрез въвеждане на високоефективни и добре поносими агенти/подходи за лечение, през следващото десетилетие над 84 милиона души ще загубят живота си поради онкологични заболявания. В момента това се случва с две от десет жени и три от десет мъже.

Лечението на неоплазиите се основава на комплексен подход, включващ хирургична намеса, лъчетерапия и /или лекарствено лечение. Сред тях единственото, което има обхват в цялото тяло, е лекарственото лечение, на което се разчита, че може да открие разпространените се в организма ракови клетки и да блокира пролиферацията им или да ги унищожи, предотвратявайки по този начин развитието на вторични тумори (метастази). Лекарственото лечение има важно значение и при неоперабилни тумори, като целта е да направи възможно хирургичното им отстраняване и/или да повиши качеството на живот на пациентите и преживяемостта им.

Основните предизвикателства пред лечението на раковите заболявания са основно две: 1) Съпътстващите приложения им странични и токсични ефекти, които може да бъдат животозастрашаващи и да са дозолимитиращи; 2) Лекарствената устойчивост на раковите клетки, която често им позволява да избягат от цитотоксичния ефект на широк кръг съединения (т.нар. множествена лекарствена устойчивост).

Металите играят важна роля в медицината от хилядолетия, още от зората на цивилизацията. Използването на метали и техни соли за медицински цели е присъствало през цялата човешка история, неотменна част е и от терапията на някои заболявания днес (например злато при ревматоиден артрит и платина при онкологични заболявания). Редица метали са основни клетъчни компоненти, избрани от природата, за да функционират в незаменими биохимични процеси за живите организми. Това не е случайно, тъй като металите притежават уникални характеристики, които включват окислително-възстановителна способност, променливи режими на координация и реактивност спрямо органични субстрати, те са кофактори на ензими, влизат в състава на хормони и транскрипционни фактори. Поради високата им биологична активност, дейността на металите е строго регулирана при физиологични условия, а аномалните им концентрации се свързват с патогенезата на различни болестни състояния, включително неоплазии. Поради тези причини координационните комплекси на метали се превръщат в много привлекателни обекти за изследване като потенциални противоракови агенти. Откриването на антитуморната активност на платината доведе не само до създаването на мощни антинеопластични продукти, каквито са цисплатината, карбоплатината и оксалиплатината, но отвори нова страница в медицинската химия – търсене на нови метални съединения с обещаващ противотуморен потенциал.

През последните години интересът на специалистите е насочен и към възможността лекарствени препарати, одобрени и използвани от години в клиничната практика при други индикации, да бъдат пренасочвани към онкологията при проявена от тях антиракова активност. Причината е, че тези лекарствени продукти са вече с добре познати фармакокинетика, фармакодинамика и токсикологичен профил, което би съкратило времето за предклинични и клинични проучвания. Интерес в това отношение представлява и дисулфирамът, който от десетилетия се използва в леченето на алкохолна зависимост, а напоследък се натрупват съобщения и за потенциалните му антитуморни свойства.

. При проведените до момента от нас изследвания беше установено, че новосинтезирани комплекси на Zn(II), Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) с различни Шифови бази проявяват силно изразена цитотоксична/антипролиферативна активност при човешки и животински туморни клетки. При подготвянето на представения дисертационен труд си поставихме за цел да продължим търсенията си в тази посока, като проучим влиянието на новосинтезирани комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между о-ванилин (Van) и аминокиселините DL-триптофан (Trpt), L-серин (Ser), L-треонин (Thr) или S-тирозин (Tyr) върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетъчни линии, създадени от рак на млечната жлеза при човек и карцином на шийката на матката, както и тумори в плъх и пиле, както и да разкрием за пръв път информация за ефекта на дисулфирам върху трансформирани с птичи ретровирус плъши саркомни клетки, експресиращи онкогена v-src.

II. Ц Е Л

Да се изследва влиянието на новосинтезирани метални [Cu(II), Co(II)] комплекси с Шифови бази и на дисулфирам върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни клетки, както и на цитоморфологичните изменения в тях.

III. З А Д А Ч И

1. Да се определи влиянието на изследваните вещества върху **преживяемостта/пролиферативната активност на клетките** (ЦК₅₀, ЦК₉₀) от използваните като експериментални модели човешки и животински постоянни клетъчни линии;
2. Да се **сравни чувствителността** към изпитваните съединения на туморни и нетуморни клетки с еднакъв произход (човешки, животински);
3. Да се проследи наличието на **цитопатологични изменения** в култивираните в присъствието на изпитваните съединения туморни клетки;
4. Да се установи способността на веществата да предизвикват **двойно-верижни скъсвания** в ДНК молекулите на третираните клетки;
5. Да се изследва способността на тестираните съединения да предизвикват **автофагия**;

6. Да се проучи ефектът на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

IV МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

IV.1. МАТЕРИАЛИ

1. Химикали и консумативи

Хранителните среди RPMI-1640 и D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), както и феталният телешки серум (ФТС) са закупени от Gibco-Invitrogen (Великобритания). Диметилсулфоксидът (DMSO), неутралното червено (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин хидрохлорид), кристал виолетът (трис (4 – (диметиламино)фенил) метилиум хлорид), трипановото синьо ((3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-диметилбифенил-4,4'-дийл)ди (1Z)хидразин-2-yl-1-илиден]бис(5-амино-4-охо-3,4-дихидронафтален-2,7-дисулфонова киселина)), акридин оранжът (3,6-акридиндиамин, N,N,N',N'- тетраметил- монохидрохлорид), пропидиевият йодид, трипсинът и антитуморният препарат цисплатина са получени от AppliChem (Германия), тиазол блу тетразолиум бромидът (MTT), NaCl, РНАаза А, стандартната и нискотопящата се агароза, както и антитуморните препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин са от Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия), Na₂HPO₄ и NaOH са от Merck (САЩ, Канада), KCle доставен от Riedel de Haen (Honeywell, Румъния), а KН₂PO₄ е от Reanal Labor (Унгария). Дисулфирамът (Tetraethylthiuram disulfide) е от Sigma-Aldrich Co. (Германия), Антибиотиците (пеницилин и стрептомицин) за клетъчно култивиране са от Lonza (Белгия). Заешкото поликлонално антитяло срещу белтъка LC3B (abcam 48394) е произведено от Abcam (Великобритания). Средата Bio-Mount DPX (Medium viscosity covering for microscope slides) и хематоксилина (Mayer's Haematoxylin) са доставени от Biognost (Република Хърватска). Еозинът, както и реагентите за определяне на пролиферативната активност на клетките чрез установяване на изявата на Ki67 (Ready to Use Monoclonal Mouse Ab Clone MM1, Novolink Polymer detection system) са закупени от Leica (САЩ). Всички останали химикали с висока степен на

чистота са осигурени от местни доставчици. Стерилната пластмасова посъда и филтрите за стерилизиране на среди и разтвори (0.2 μm) са доставени от OrangeScientific (Белгия).

2. Вещества

2.1. Метални комплекси

Изследвана беше биологичната активност (влияние върху клетъчна преживяемост и пролиферация) на 8 новосинтезирани метални комплекса (Табл. 1):

- 4 комплекса на Cu(II) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между о-ванилин (o-vanillin = Van) и DL-триптофан (DL-tryptophan = Trpt) (Фиг. 2), L-серин (L-serine = Ser), L-треонин (L-threonine = Thr), S-тирозин (S-tyrosine = Tyr) (Фиг. 3);

- 4 комплекса на Co(II) със същите лиганди.

Табл. 1. Комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази

Вещество	Съкращение	Молекулна маса (g/mol)
[Cu(VanTyr)(bipy)]·MeOH	CuVanTyr	$M_w = 565.53$
[Cu(VanThr)(bipy)]·MeOH	CuVanThr	$M_w = 503.46$
[Cu(VanTrpt)(bipy)]·MeOH	CuVanTrpt	$M_w = 588.57$
[Cu(VanSer)(bipy)]·MeOH	CuVanSer	$M_w = 489.43$
[Co(VanTyr)(bipy)]·MeOH	CoVanTyr	$M_w = 560.53$
[Co(VanThr)(bipy)]·MeOH	CoVanThr	$M_w = 498.46$
[Co(VanTrpt)(bipy)]·MeOH	CoVanTrpt	$M_w = 583.57$
[Co(VanSer)(bipy)]·MeOH	CoVanSer	$M_w = 487.43$

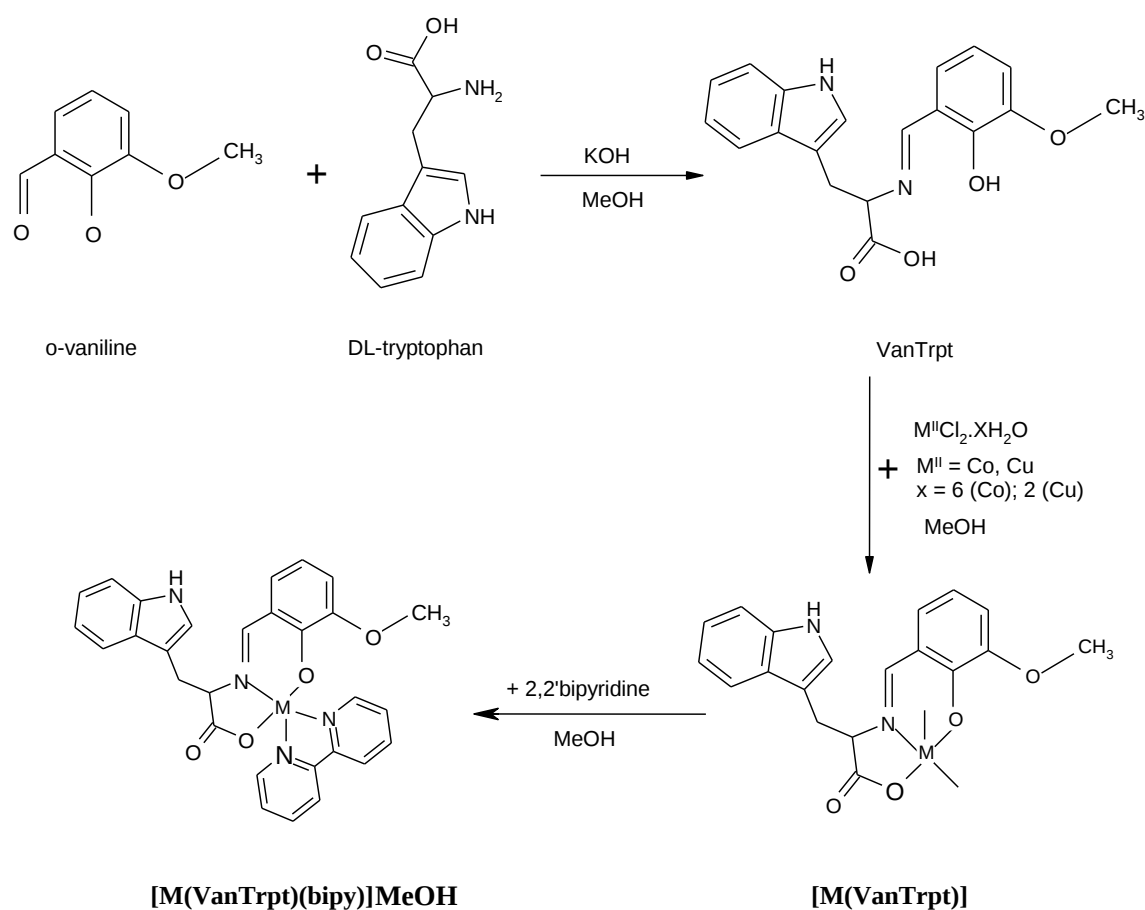
bipy = 2,2'-bipyridine; MeOH = CH₃OH;

VanTrpt = лиганд на Шифова база, получен от реакция между о-ванилин (Van) и DL-триптофан (Trpt);

VanSer = лиганд на Шифова база, получен от реакция между о-ванилин (Van) и L-serine (Ser);

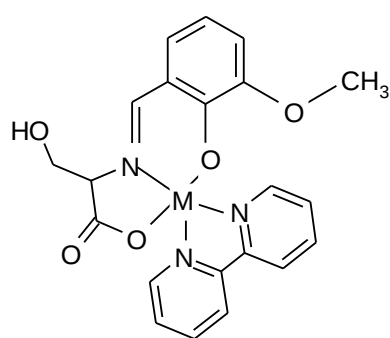
VanThr = лиганд на Шифова база, получен от реакция между о-ванилин (Van) и L-threonine (Thr);

VanTyr = лиганд на Шифова база, получен от реакция между о-ванилин (Van) и S-tyrosine (Tyr).

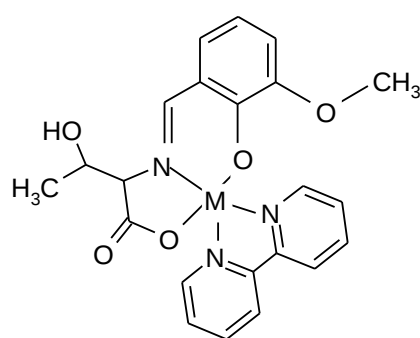


Фиг.1. Схематично представяне на синтеза на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между о-ванилин (Van) и DL-триптофан (Trpt)

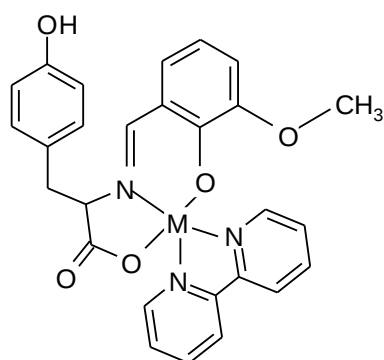
Останалите съединения са получени по описаната по-горе схема (Фиг. 1) за $[M(\text{VanTrpt})(\text{bipy})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$, където M е Co(II) или Cu(II) , с използване на L-серин (Ser), L-треонин (Thr), S-тирозин (Tyr) вместо DL-триптофан (Trpt). Структурните формули на комплексите са представени на Фиг. 2.



$[M(\text{VanSer})(\text{bipy})] \cdot \text{MeOH}$



$[M(\text{VanThr})(\text{bipy})] \cdot \text{MeOH}$



$[M(\text{VanTyr})(\text{bipy})] \cdot \text{MeOH}$

Фиг. 2. Структурни формули на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между о-ванилин (Van) и L-серин (Ser), L-треонин (Thr) и S-тирозин (Tyr); bipy = 2,2'-bipyridine; MeOH = CH_3OH .

Синтезирането и физико-химическото охарактеризиране на веществата е осъществено от групата на проф. д-р Луминица Патрон, Институт по физикохимия «Илие Мургулеску», Букурещ, Румъния.

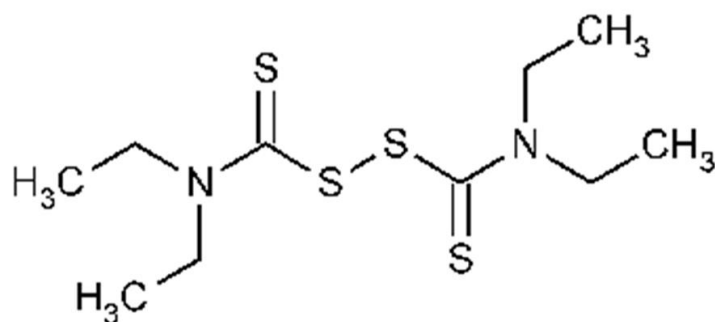
2.2. Дисулфирам

Структурата на дисулфирама (Tetraethylthiuram disulfide) е представена на Фиг. 3.

Комплексите на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази, както и дисулфирамът, бяха разтворени първоначално в диметилсулфоксид, след което бяха разредени в хранителна среда. Крайната концентрация на DMSO в изходния разтвор (където концентрацията на съответното вещество е 1 mg/mL) беше 2%. В Табл. 2 е представена концентрацията на DMSO в крайните работни разтвори на веществата. Разтворите бяха съхранявани в хладилник при 4°C и използвани не по-дълго от 2 седмици след разтварянето им.

Табл. 2. Съдържание на разтворителя (DMSO) в съответните разтвори на изпитваните вещества

Концентрация на изпитваното вещество ($\mu\text{g/ml}$)	Концентрация на разтворителя (Диметилсулфоксид) (%)
1 000 (Изходен разтвор)	2
400	0.8
200	0.4
100	0.2
50	0.1
25	0.05
12.25	0.025
10	0.02
6.25	0.0125
3.125	0.00625
1.56	0.003125
0.78	0.0015625
0.39	0.00078125



Фиг. 3. Дисулфирам

2.3. Комерсиални антитуморни препарати

В част от проведените експерименти бяха включени и антитуморните препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин, които изпълняваха ролята на положителни контроли. Работните разтвори бяха приготвени съгласно инструкциите на Фирмата-производител.

3. Клетъчни култури

Клетъчните култури, използвани като моделни системи при провеждане на експериментите, са представени в Табл. 3.

Табл. 3. Клетъчни култури, използвани като моделни системи при проведените експерименти

Произход	Клетъчни култури	
	Туморни	Нетуморни
Човек	MCF-7 – (ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻ , луминален A) рак на млечна жлеза; MDA-MB-231 – (ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺ , тройно негативен) рак на млечна жлеза HeLa – карцином на шийката на матката (съдържа човешки папиломен вирус тип 18 – HPV18)	Lep 3 – ембрионални клетки от бял дроб

Хамстер	Първични култури ^a от трансплантируем миелоиден тумор Графи	Слезкови лимфоцити и перитонеални макрофаги от здрави и тумор-носещи животни
Плъх	^b LSR-SF-SR - трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с <i>Rous sarcoma virus</i> , щам <i>Schmidt-Ruppin</i> (клетките съдържат онкогена <i>v-src</i>);	
Кокошка	^c LSCC-SF-Mc29 и полученият от нея клон E7 – трансплантируем хепатом у пиле, предизвикан с миелоцитоматозния вирус Mc29 (клетките експресират онкогена <i>v-myc</i>).	

ER = рецептор за естроген, PR = рецептор за прогестерон, HER2 = рецептор за епидермалния растежен фактор 2.

^aМиелоидният тумор на Графи в хамстер се поддържа в ИЕМПАМ-БАН от проф. д-р Ренета Тошкова, доктор. Първичните култури от трансплантируем тумор, от слезкови лимфоцити и перитонеални макрофаги от тумор-носещи и здрави хамстери са получени с любезното съдействие на проф. д-р Р. Тошкова.

^bКлетъчна линия LSR-SF-SR е получена от д-р Ивайло Александров, д-р Ив. Ив. и се поддържа в ИЕМПАМ-БАН (Александров, 1996) от колектива на проф. Радостина Александрова, доктор.

^cКлетъчната линия LSCC-SF-Mc29 и нейните клонове са създадени и охарактеризирани от проф. Р. Александрова, доктор. Според данните от проведените проучвания клетките от клон E7 не се отличават (по растежни свойства в култура, кариотип, провирусно съдържание, експресия на тумор-свързани антигени, туморогенен потенциал *in vivo*) от тези на изходната линия (Александрова, 2008).

Използваните клетъчни линии се съхраняват в Банката за клетъчни култури и вируси в ИЕМПАМ-БАН.

4. Лабораторни животни

- Хамстери (порода Златен сирийски), на възраст 2 месеца.

5. Експреиментални тумори

Трансплантируем миелоиден тумор у хамстер, предизвикан с мишия левкемичен вирус на Graffi (Jakimov et al., 1979). Туморът се поддържа чрез подкожно (s.c.) имплантиране на $1-2 \times 10^6$ клетки в областта на гърба на всеки 3 седмици в ИЕМПАМ-БАН от проф. д-р Ренета Тошкова, доктор.

6. Етични норми

Всички експерименти с лабораторни животни бяха проведени при стриктно спазване на изискванията на Ветеринарно-медицинските власти в България, които са в съзвучие с въведените в страните-членки на Европейския съюз „Правила за отглеждане и работа с опитни животни“. Броят на използваните лабораторни животни беше ограничен в максималната възможна степен, доколкото позволяват изискванията за получаване на статистически достоверни резултати.

8. Лаборатории и вивариуми

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения труд резултати, е извършена основно в лабораториите и вивариума на Института по експериментална патология, морфология, антропология с музей (ИЕМПАМ) - БАН. Част от изследванията са проведени в Института по молекулярна биология «Акад. Румен Цанев» – БАН (Кометно изследване и Флоуцитометричен анализ за определяне на апоптоза и некроза) и Института по имунология и биология на размножаването «Акад. Кирил Братанов» (конфокална микроскопия).

IV.2. М Е Т О Д И

1. Работа с клетъчни култури

1.1. Получаване на първични клетъчни култури

1.1.1. От трансплантируем тумор

1.1.2. Слезкови лимфоцити

1.1.3 Перитонеални макрофаги

1.2. Клетъчно култивиране

1.3 Замразяване и размразяване на клетки

2. Определяне на клетъчна жизненост/преживяемост и пролиферативна активност

2.1. Тест за оцветяване на мъртвите клетки с трипаново синьо

2.2. Определяне влиянието на вещества върху клетъчната преживяемост

2.2.1. МТТ тест

2.2.2. Тест за включване на неутрално червено (Neutral red uptake cytotoxicity assay)

2.2.3. Оцветяване с кристалвиолет (CVметод)

2.3. Определяне на клетъчна пролиферация чрез изследване експресията на ядрения белтък Ki-67

3. Проучвания върху способността на веществата да предизвикват цитопатологични изменения и смърт в третираните клетки

3.1. Влияние на вещества върху клетъчния монослой

3.2. Оцветяване на клетки с хематоксилин и еозин

3.3. Комбинирано оцветяване на клетките с акридин оранж (АО) и пропидиев йодид (PI)

4.Изследвания върху генотоксичната способност на веществата – Кометно изследване при неутрално рН

5. Проучване върху способността на веществата да предизвикват автофагия

5.1. Конфокална микроскопия

5.2. Имуноцитохимично определяне на LC3B маркера за автофагия

6. Изследване на влиянието на вещества върху 3D колонии-образуващата

7. Статистическа обработка на експерименталните данни - Експерименталните данни бяха обработвани по метода на вариационния анализ, като се изчисляваха двата основни статистически параметъра: средната аритметична величина ($\bar{x}$) и нейната грешка (SEM). По-нататък се прилагаше метода на еднофакторния дисперсионен анализ (ANOVA). Отделните групи бяха сравнявани с помощта на *Dunnet* теста, като разликата между групите се считаха за достоверни при приетите за биологични експерименти ниво на значимост $P < 0.05$. При статистическата обработка на експерименталните данни беше използвана компютърната програма *GraphPadPrizm*, *Graph Pad Software Inc., USA, 2000* и *Origin 6.1TM*.

8. Обработка на снимковия материал

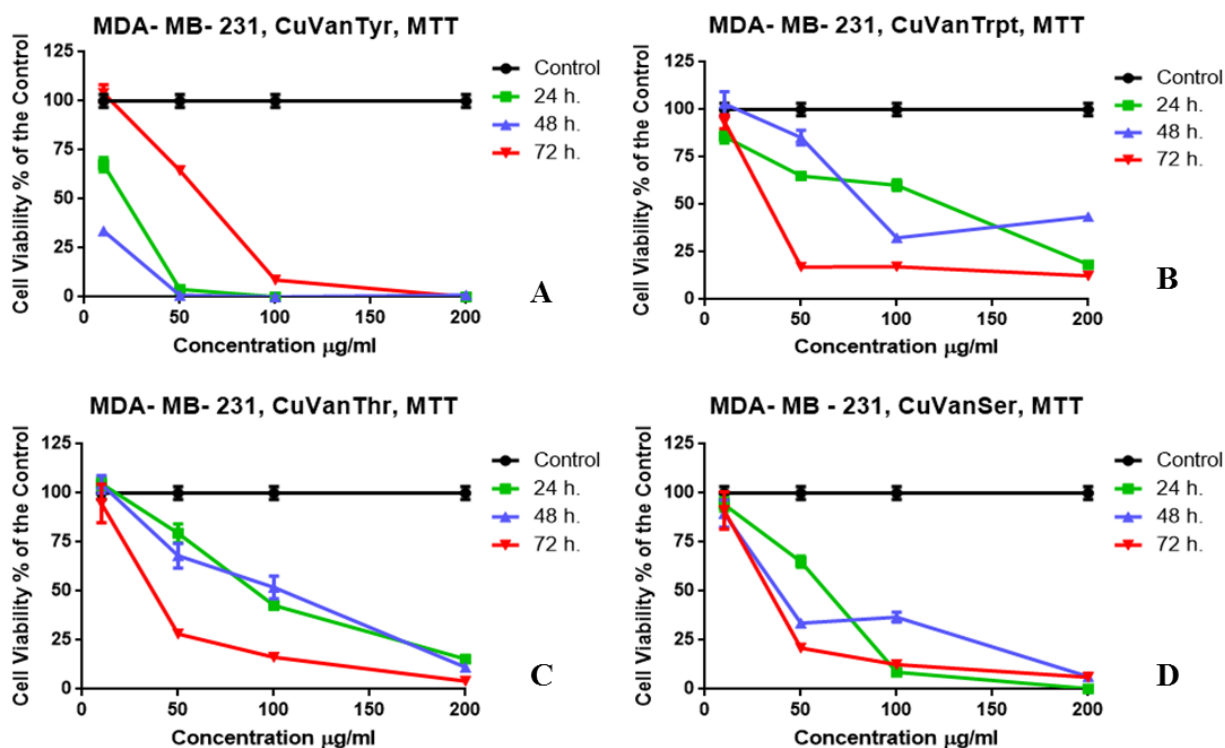
Снимковият материал беше обработен с помощта на Photoshop CS 5.1 Extended.

V. РЕЗУЛТАТИ

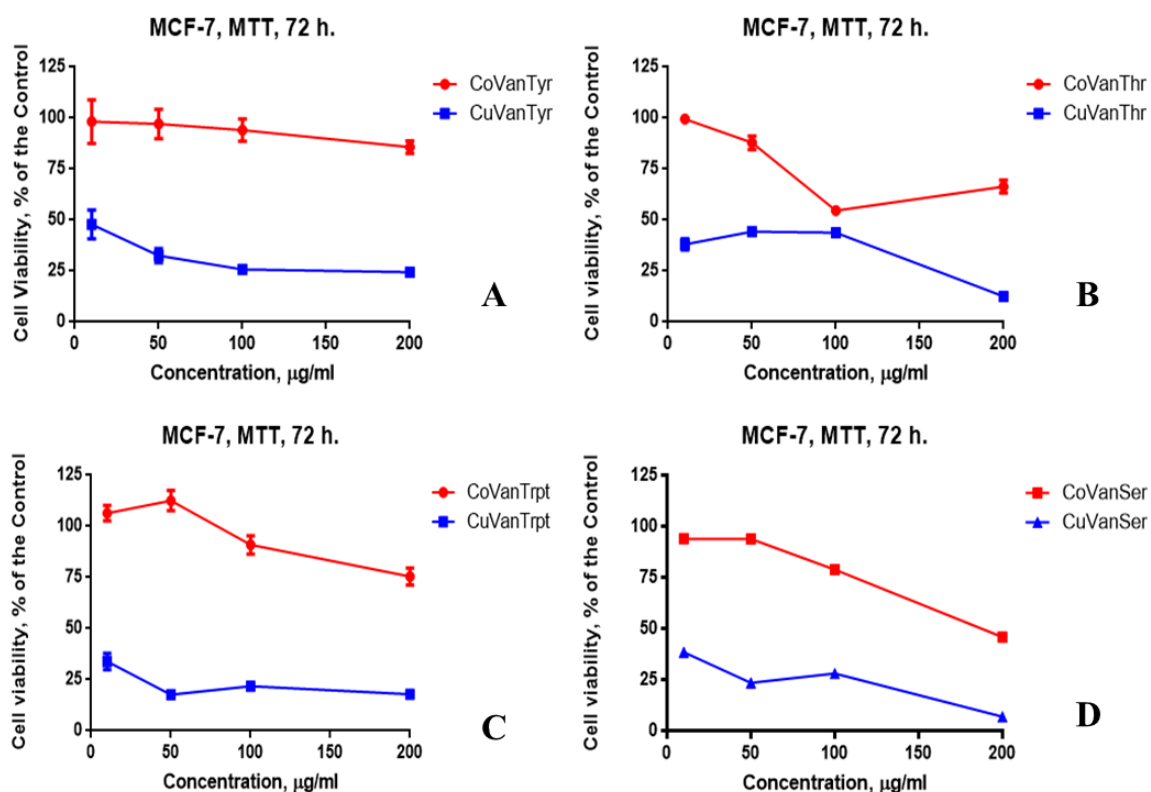
V. А. Комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази

V.I.1. Краткосрочни експерименти

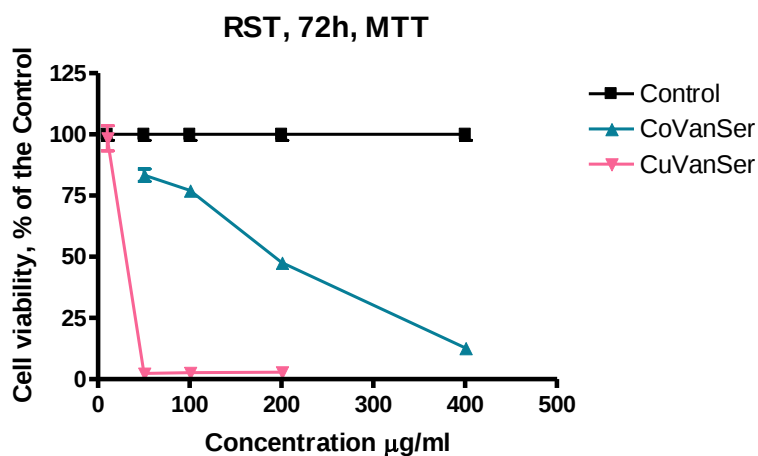
V.I.1.1. Влияние на изпитваните вещества върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки



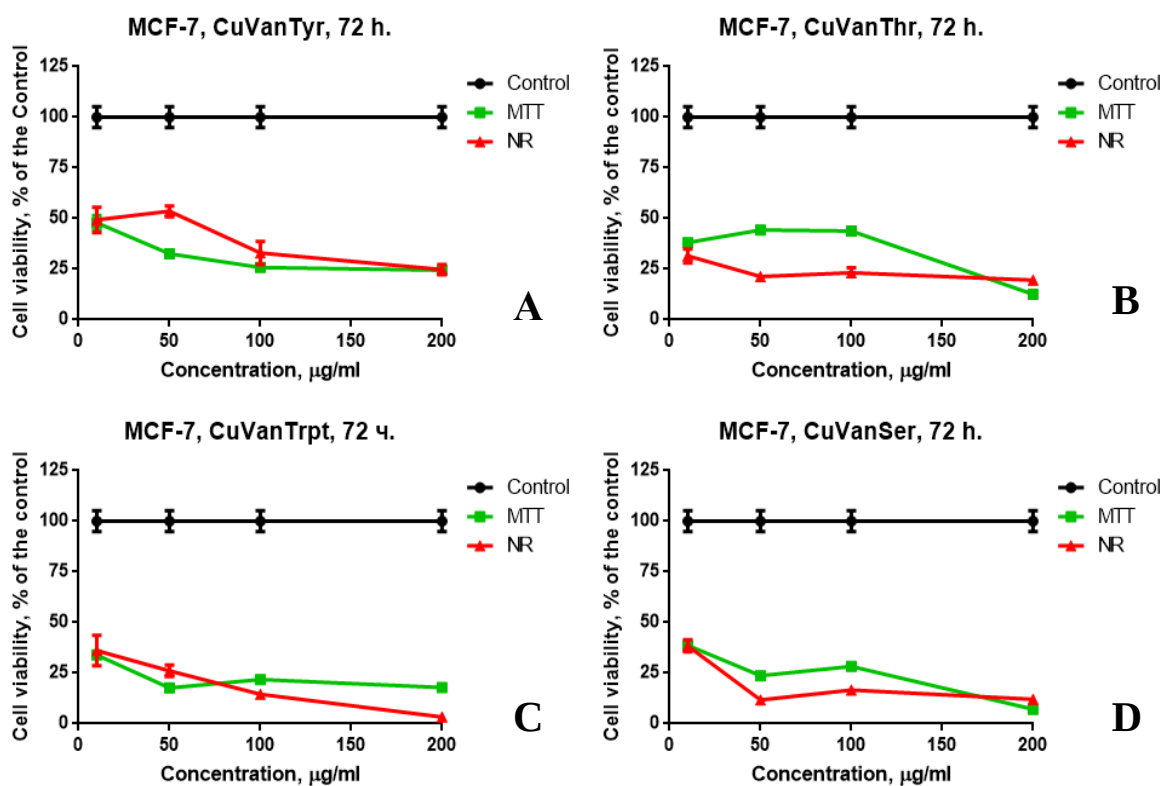
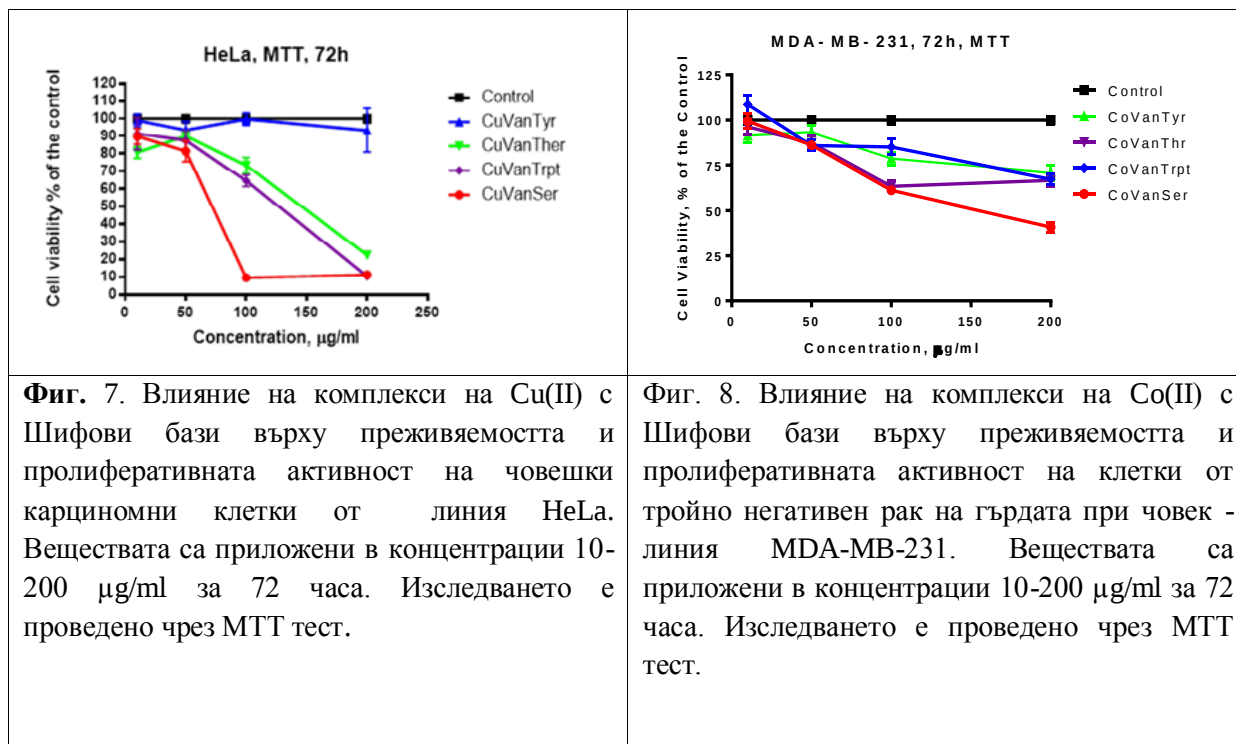
Фиг.4. Влияние на CuVanTyr (A), CuVanThr (B), CuVanTrpt (C) и CuVanSer (D) върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от тройно негативен рак на гърдата при човек - линия MDA-MB-231. Веществата са приложени в концентрации 10, 50, 100 и 200 $\mu\text{g/ml}$ за 24, 48 и 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.



Фиг.5. Влияние на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от луминален тип А рак на млечна жлеза при човек - линия MCF-7. Веществата са приложени в концентрации 10, 50, 100 и 200 $\mu\text{g/ml}$ за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.

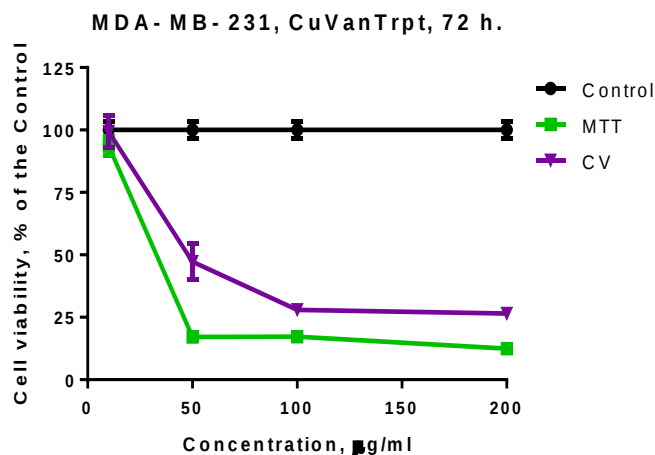


Фиг. 6. Влияние на CuVanSer (приложен в концентрации 10 – 200 $\mu\text{g/ml}$) и CoVanSer (приложен в концентрации 50 – 400 $\mu\text{g/ml}$) върху плъщи саркомни клетки от линия – LSR-SF-SR. Изследването е проведено чрез MTT тест на 72^{pn} час.



Фиг. 9. Влияние на CuVanTyr (A), CuVanThr (B), CuVanTrpt (C) и CuVanSer (C) върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от луминален тип A рак на млечна жлеза при човек - линия MCF-7. Веществата са приложени в концентрации 10-

200 $\mu\text{g/ml}$ за 72 часа. Изследването е проведено чрез МТТ тест и метод за включване на неутрално червено (NR).



Фиг. 10. Влияние на CuVanTrpt върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от тройно негативен рак на гърдата при човек - линия MDA-MB-231. Веществата са приложени в концентрации 10-200 $\mu\text{g/ml}$ за 72 часа. Изследването е проведено чрез МТТ тест (MTT) и оцветяване с кристал виолет (CV).

Табл. 4. Цитотоксична активност (IC_{50}) на комплекси на Cu(II) с Шифови бази при клетки от линии MCF-7, MDA-MB-231, HeLa и LSR-SF-SR.

Линия	CuVanTyr	CuVanThr	CuVanTrpt	CuVanSer
MCF-7	9.12 (16.12)	48.69 95.34	n.o	n.o
MDA-MB-231	72.18 (127.63)	32.98 (67.38)	36.51 (75.52)	32.34 (54.95)
HeLa	n.o	132.4 262.98	150.2 255.19	73.7 150.58
LSR-SF-SR	41.33 (82.09)	41.33 (82.09)	31.02 (52.70)	22.53 (46.00)

* IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) и ** IC_{50} (μM , в скоби) – концентрациите, при които процентът на живите клетки намалява с 50% в сравнение с нетретираната контрола;

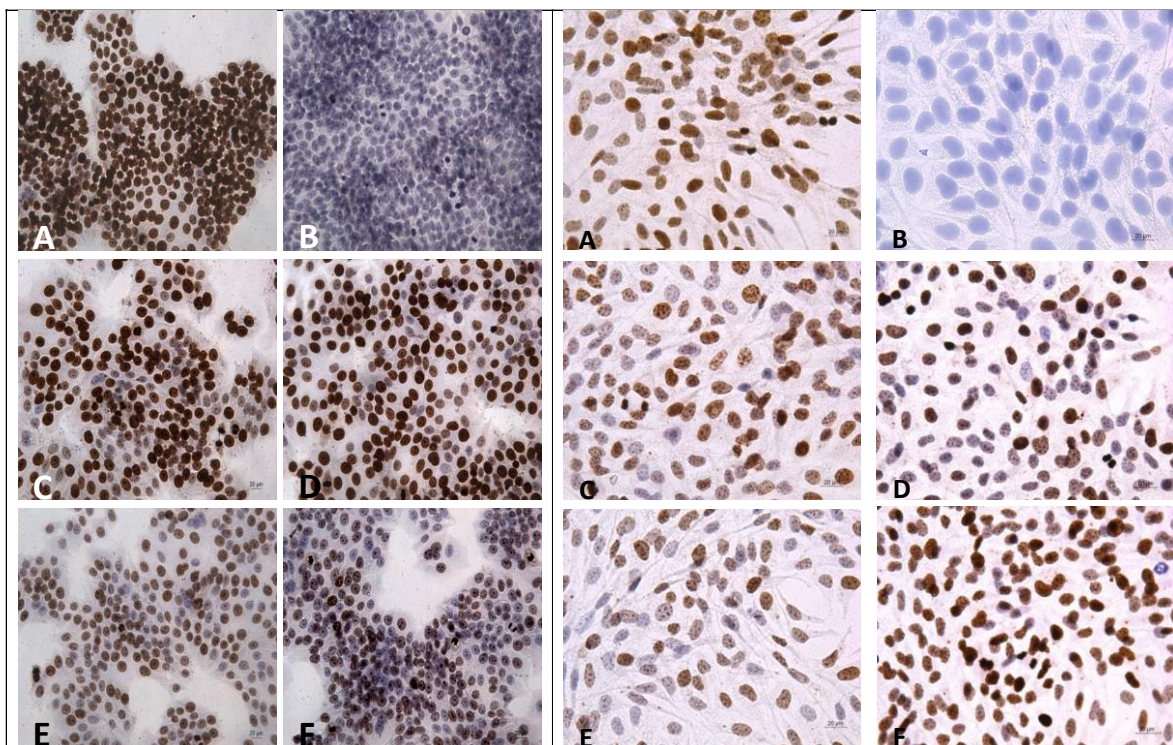
С н.о. (не е определена) са означени случаите, при които преживяемостта на клетките остава > 50% при всички изпитвани концентрации (10-200 µg/ml).

Табл. 5. Йерархични редове на комплекси на Co(II) и Co(II) с Шифови бази, отразяващи влиянието на веществата върху преживяемостта и пролиферативната активност на третираните туморни клетки

Клетъчна линия	Йерархичен ред
Интервал (Час)	72h
Метод	MTT
MCF-7	CuVanSer > CuVanTyr > CuVanThr > CuVanTrpt > CoVanSer > CoVanTyr > CoVanThr > CoVanTrpt
MDA-MB-231	CuVanTrpt > CuVanSer > CuVanThr > CuVanTyr > CoVanSer > CoVanTyr > CoVanTrpt > CoVanThr
HeLa	CuVanSer > CuVanTrpt > CuVanThr > CuVanTyr
LSR-SF-SR	CuVanSer > CuVanThr > CuVanTrpt > CuVanTyr > CoVanSer > CoVanTrpt > CoVanTyr > CoVanThr

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 MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа.

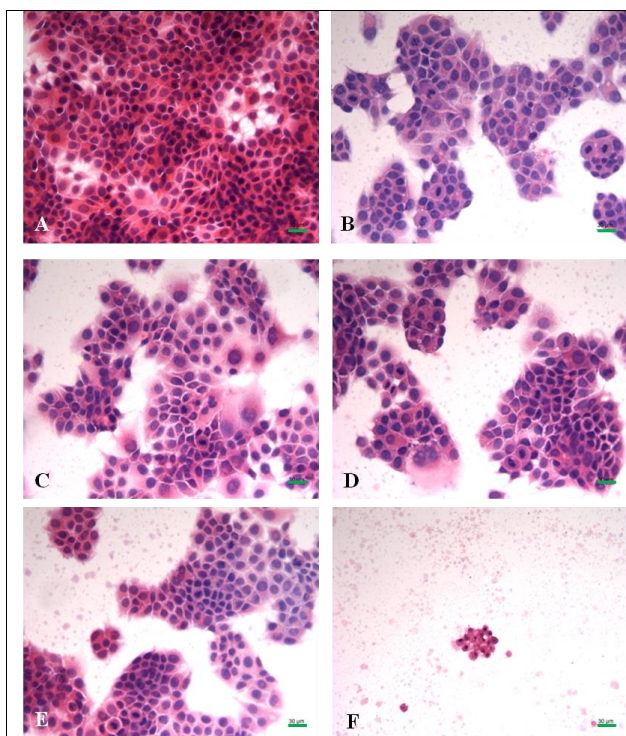
V.I.1.2. Влияние на комплекси на Co(II) и Cu(II) с Шифови бази върху изявата на маркера за клетъчна пролиферация Ki-67



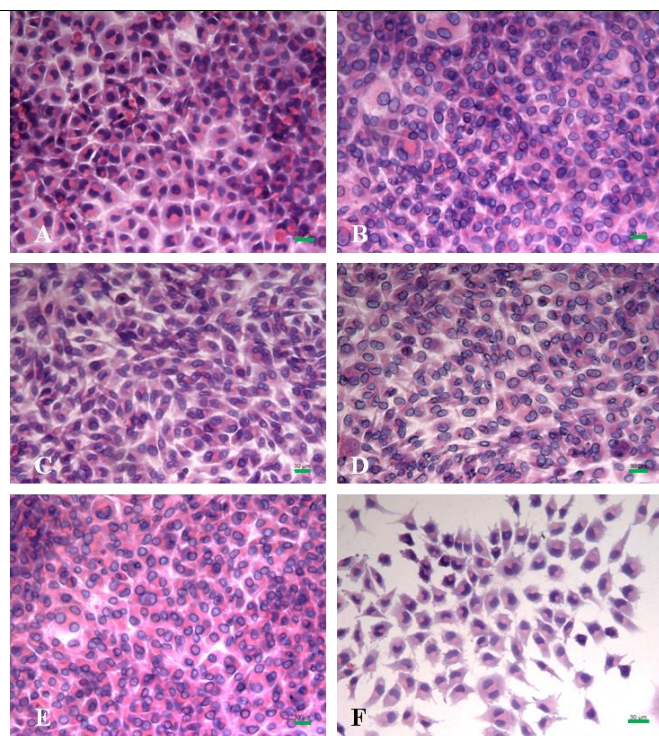
Фиг. 11. Клетки от линия MCF-7 – положителна контрола от нетретиран с вещества клетки (А) и негативна контрола (която не е инкубирана в присъствие на анти тяло срещу Ki-67)(В). Клетки от линия MCF-7, култивирани 72 часа в присъствието на 200 µg/ml CoVanTyr (С), 200 µg/ml CoVanThr (D), 50 µg/ml CoVanTrpt (E) и 50 µg/ml CoVanSer (F). Имуноцитохимична реакция с поликлонално анти тяло срещу Ki-67, визуализация с хромоген DAB (Diaminobenzidine). Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия, Бар = 20µm

Фиг. 12. Клетки от линия MDA-MB-231 - положителна контрола от нетретиран с вещества клетки (А) и негативна контрола (която не е инкубирана в присъствие на анти тяло срещу Ki-67)(В). Клетки от линия MDA-MB-231 култивирани 24 часа в присъствието на 10 µg/ml CoVanTyr (С), 10 µg/ml CoVanThr (D), 10 µg/ml CoVanTrpt (E) и 10 µg/ml CoVanSer (F). Имуноцитохимична реакция с поликлонално анти тяло срещу Ki-67, визуализация с хромоген DAB (Diaminobenzidine). Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия, Бар = 20µm

V.I.1.3. Цитопатологични изменения в третиран с вещества клетки, наблюдавани след двойно оцветяване с хематоксилин еозин

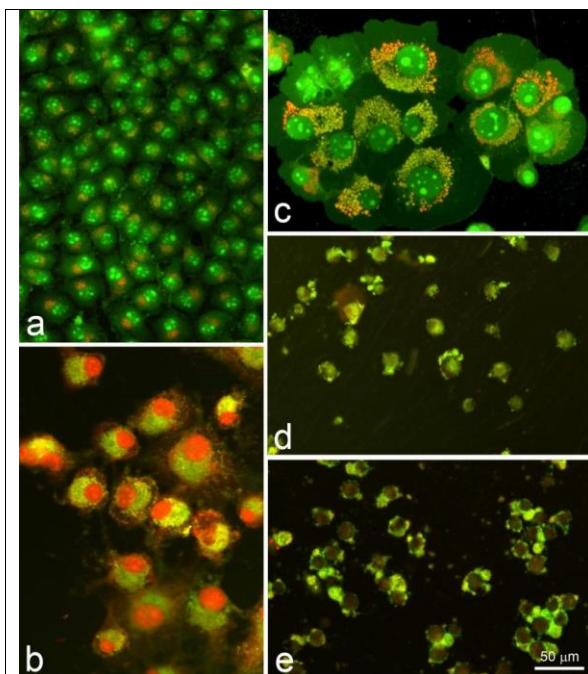


Фиг. 13. Плътен монослой от нетретираны клетки от линия MCF-7 (Контрола) с ясно оцветени в лилаво от хематоксилин интактни ядра и оцветена от еозин розова цитоплазма (A). Клетки от линия MCF-7 култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 10µg/ml CuVanTyr - с увеличен ядрен обем и намален клетъчен монослой, формиране на клетъчни кълъстери без ясни клетъчни граници в тях (B); 10µg/ml CuVanThr - намален клетъчен монослой, единични клетки с увеличен цитоплазмен и ядрен обем, клетъчна вакуолизация (C); 10µg/ml CuVanTrpt – клетки с раздута цитоплазма и запазен обем на ядрото, намален клетъчен монослой (D); 10µg/ml CuVanSer - съхранен ядрено цитоплазмен индекс, намален клетъчен монослой (E); 50µg/ml CuVanSer - силно редуциран до ниво на запазени отделни острови от клетки, присъствие на единични клетки, клетъчна фрагментация и клетъчни артефакти (F). Оцветяване с хематоксилин и еозин. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 µm.

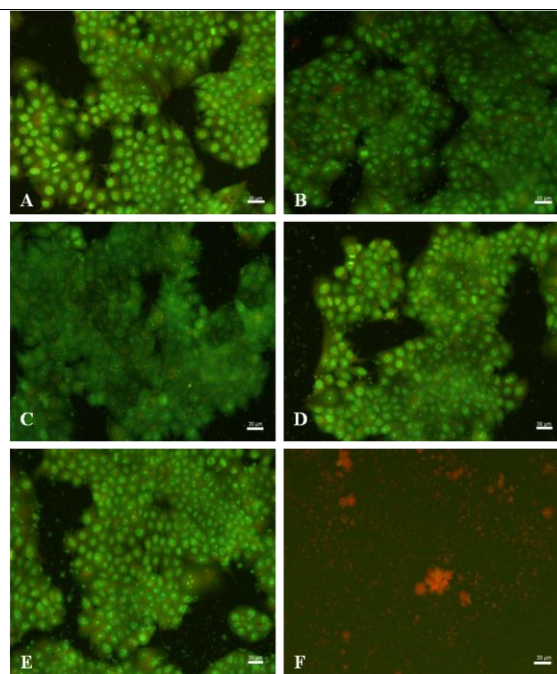


Фиг. 14. Плътен монослой от нетретираны клетки от линия MDA-MB-231 (Контрола) с ясно оцветени в лилаво от хематоксилин интактни ядра и оцветена от еозин розова цитоплазма (A). Клетки от линия MDA-MB-231 култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 10µg/ml CuVanTyr с единични цитоплазмени раздувания и окръгляне на клетките (B); 10µg/ml CuVanThr със запазен ядрен и цитоплазмен интегритет, без значителна разлика с контролата (C); 10µg/ml CuVanTrpt - наблюдават се клетъчни струпвания без ясни граници между тях, без видими разлики с контролата (D); 10µg/ml CuVanSer с цитоплазмени раздувания и ядрена декомпактизация (E); 50µg/ml CuVanSer със силна редукция в клетъчния монослой, нарушаване на ядрено-цитоплазмен индекс, наблюдават се клетки с ядрена фрагментация рефлектиращи загуба на виталност (F). Оцветяване с хематоксилин и еозин. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 µm.

V.I.1.4. Цитопатологични изменения в третиран с изпитваните вещества клетки, наблюдавани след двойно оцветяване с пропидиев йодид и акридин оранж



Фиг. 15. Плътен монослой от нетретиран клетки от линия HeLa (Контрола) с бледозелена ядрена флуоресценция, ярко жълтозелени ядръца и слаба цитоплазматична флуоресценция. В цитоплазмата се наблюдават периядрени лизозомални струпвания с ярка оранжевочервена флуоресценция (а). Клетки от линия HeLa култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 100 mg/ml CoVanSer. Уголемени мъртви клетки с яркочервени ядръца, яркочервени ядра и яркочелени гранулирани струпвания в цитоплазмата (б). HeLa клетки третиран в продължение на 72 часа с 200 mg/ml CoVanSer. Увеличени и заоблени слети клетки с голям брой червени и яркочелени лизозомни гранули (с). HeLa клетки третиран в продължение на 72 часа със 100 mg/ml CuVanTrpt (d) и 100 mg/ml CuVanThr (е). Умалени мъртви клетки с тъмночервени ядра и яркочълтозелени гранули в цитоплазмата. Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 50 μm .



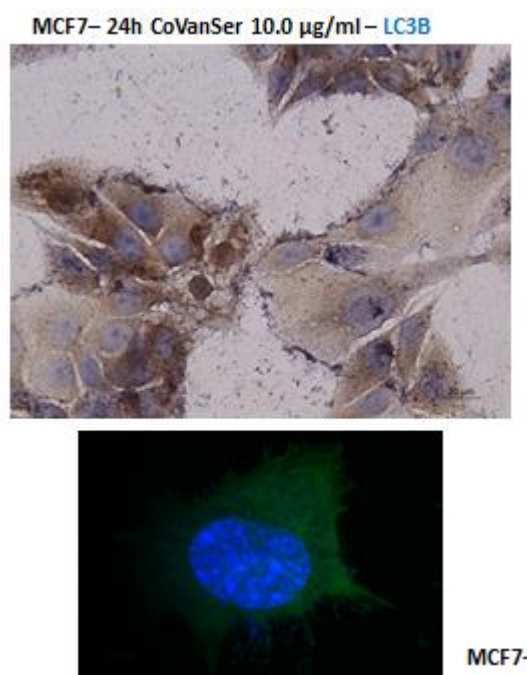
Фиг. 16. Монослой от витални нетретиран клетки от линия MCF-7 (Контрола) с бледозелена ядрена флуоресценция и яркочълтозелени ядръца. (А). Клетки от линия MCF-7 култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 10 $\mu\text{g/ml}$ CuVanTyr с увеличен цитоплазмен обем, тъмнозелена цитоплазматична флуоресценция (В); 10 $\mu\text{g/ml}$ CuVanThr с увеличен цитоплазмен обем, тъмнозелена ядрена и цитоплазматична флуоресценция без ясни граници между клетките (С); 10 $\mu\text{g/ml}$ CuVanTrpt с увеличен цитоплазмен обем, ярко зелена ядрена флуоресценция, тъмни цитоплазмени включения (D); 10 $\mu\text{g/ml}$ CuVanSer с единични клетки характеризиращи се с нарушен ядрено цитоплазмен индекс, клетъчна вакуолизация без изразена разлика в клетъчния слой спрямо контролата (Е); 50 $\mu\text{g/ml}$ CuVanSer със значително намален монослой, клетъчна фрагментация, мъртви клетки с ярко червена ядрена и цитоплазматична флуоресценция (F). Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия, Бар = 20 μm .

V.I.1.5. Проучване върху способността на комплексите на Co(II) и Cu(II) с Шифови бази да предизвикват автофагия

Комплексите на Co(II) с Шифови бази, приложени при клетки от рак на млечната жлеза при човек (постоянна клетъчна линия MCF-7), предизвикват автофагия при въздействие в продължение на 6-24 часа. При продължаващо до 72 час третиране обаче клетъчната преживяемост не се различава от тази на нетретираните клетки. Тези резултати насочват към извода, че чрез формиране на автофагозоми третираните клетки деактивират приложените вещества и преодоляват цитотоксичния им ефект (Фиг. 17).

При изследваните комплекси на Cu(II) концентрациите, при които след 24-часово третиране се регистрира формиране на автофагозоми, са близки до IC_{50} и дори до IC_{90} (определени на 72 час с МТТ тест). Това ни дава основание да предположим, че стартиралата автофагия вероятно завърша с клетъчна смърт.

Подобна зависимост беше наблюдавания и при клетките от линия MDA-MB-231.



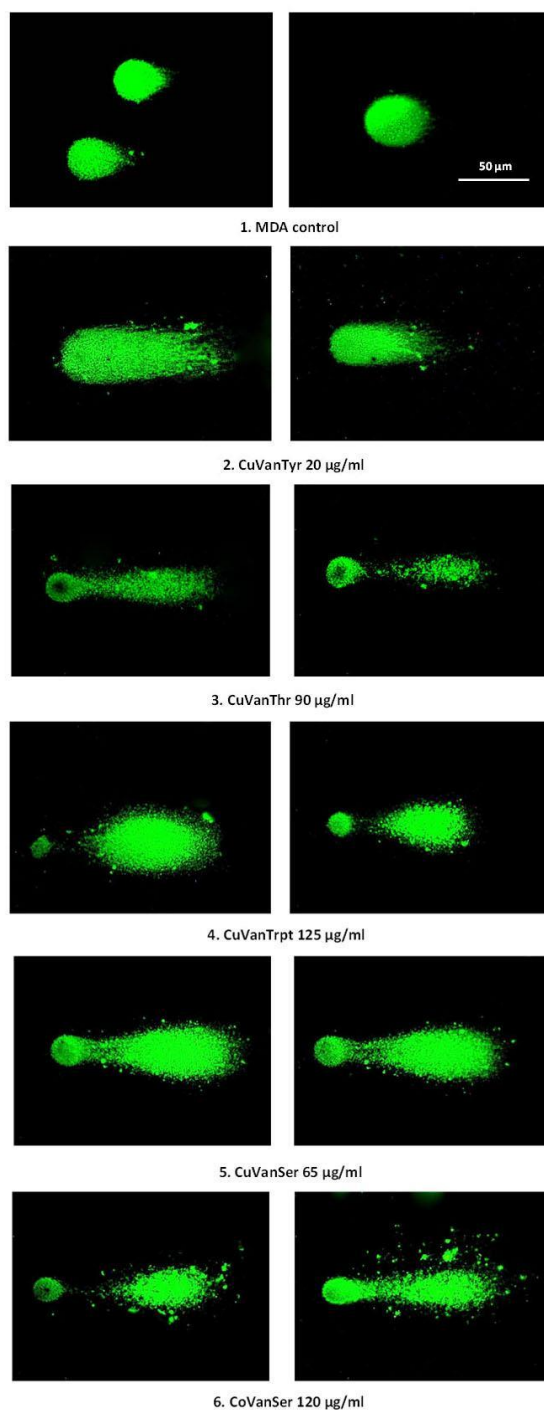
Фиг. 17. Клетки от линия MCF-7, култивирани 24 часа в присъствие на 10 µg / ml CoVanSer. (A) Имуноцитохимична реакция с поликлонално антитяло срещу белтъка LC3B, визуализация с хромоген DAB (Diaminobenzidine). Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия, Бар = 20µm; (B) Конфокална микроскопия с кит за детекция на автофагия CYTO-ID® (Enzo Life Sciences, Inc., САЩ), лазерно сканиращ микроскоп (система за конфокална микроскопия Leica TCS SPE)

V.I.1.6. Проучване върху способността на металните комплекси да предизвикват увреждания в ДНК молекулите на третираните клетки (Генотоксичен ефект)

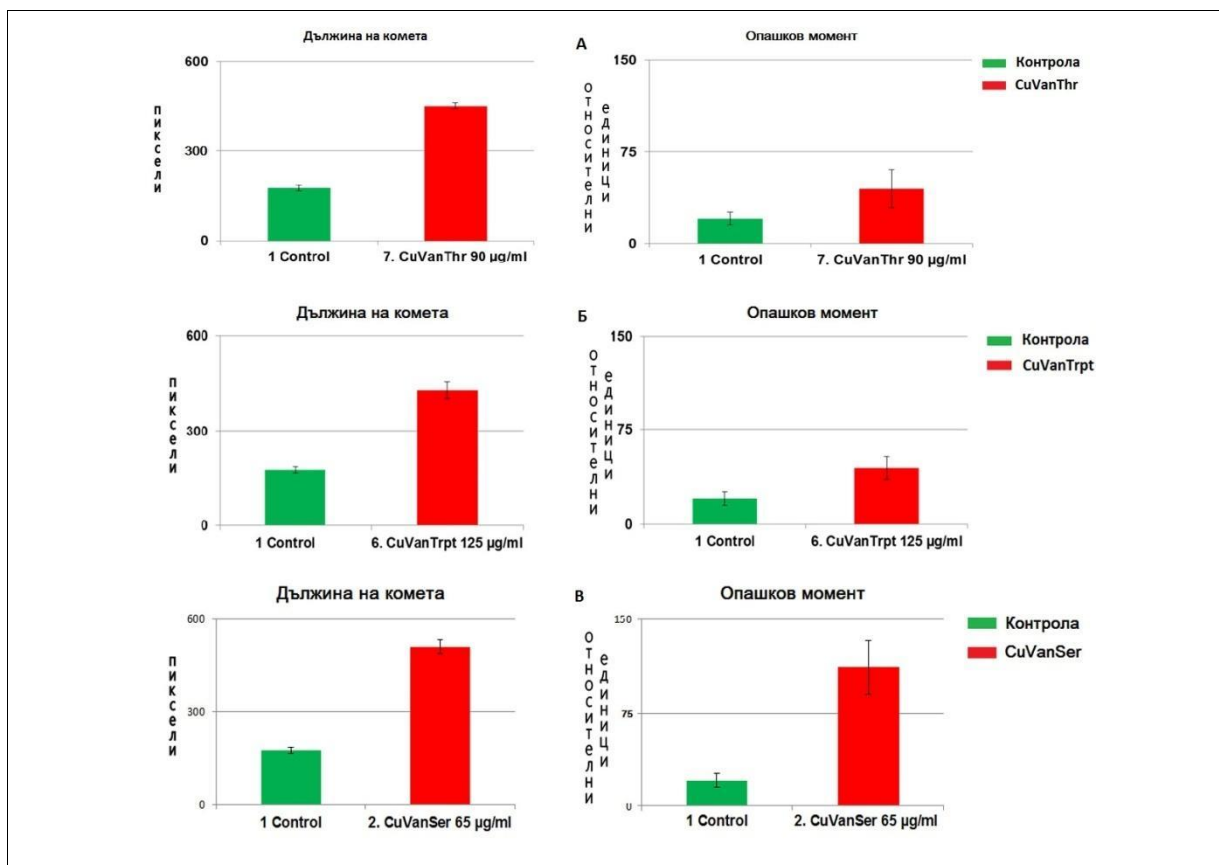
Табл. 6. Цитотоксичен и генотоксичен ефект на комплекси на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази

Комплекс (концентрация)	МТТ тест, % мъртви клетки спрямо Контрола	Кометно изследване при неутр. рН, % комети* спрямо контрола
CuVanTyr (20 µg/ml)	50	14.7
CuVanThr (90 µg/ml)	50	63
CuVanTrpt (125 µg/ml)	50	40.7
CuVanSer (65 µg/ml)	50	36.32
CoVanSer (120 µg/ml)	-	9.61

Клетките са култивирани в продължение на 24 часа в присъствие на изследваните вещества, чиято концентрация е посочена в скоби. Комплексите на Cu(II) са в ЦК₅₀, установена чрез МТТ тест след третиране за 24 часа. Способността на веществото да предизвиква двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки е определена чрез електрофореза на единични клетки в агарозен гел (Comet assay) при неутрално рН. *Процентът комети представлява % клетки спрямо контролата, в чиято ДНК са настъпили такива увреждания.



Фиг. 18. Представителни фигури на комети, получени след въздействие в продължение на 24 часа на клетки от линия MDA-MB-231 с комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази и последващ анализ за генотоксичност с Кометен тест при неутрално рН. Цифрата след наименованието на комплекса представлява концентрацията му в $\mu\text{g/ml}$.



Фиг. 19. Дължина на кометата и опашков момент при комети от линия MDA-MB-231, получени под въздействие с CuVanThr (А), CuVanTrpt (Б) и CuVanSer (В) в продължение на 24 часа.

V.I.2. Дългосрочни експерименти

Влияние на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази върху 3D колонии-образуващата способност на туморни клетки

Изследвано беше влиянието на веществата върху 3D колонии-образуващата способност на клетки от линии MCF-7 (луминален тип А рак на млечната жлеза у човек) и MDA-MB-231 (тройно негативен рак на млечната жлеза у човек). Първите колонии от 10-12 клетки бяха забелязвани в контролата обикновено към 5-12 ден. Определена е колонии-инхибиращата концентрация (КИК, µg/ml и µM), в която съответният комплекс напълно потиска 3D растежа на туморните клетки (Табл. 7 и 8). Анализът на получените резултати показва, че:

- Комплексите на Cu(II) демонстрират по-силно изразен инхибиращ ефект върху 3D растежа на туморните клетки в сравнение с комплексите на Co(II) със същите лиганди;

- Клетките от линия MCF-7 проявяват по-висока чувствителност към потискащия ефект на комплексите на Cu(II) с Шифови бази, докато 3D-колонии инхибиращата способност на CoVanTrpt е по-силно изразена при клетките от линия MDA-MB-231 – ЕИК на CoVanTrpt при клетките от тройнонегативен рак на гърдата е $\geq 200 \mu\text{g/ml}$, но при същата концентрация не се наблюдава пълно предотвратяване на 3D растежа на клетките от луминален тип А рак на млечната жлеза.

Табл. 7. 3D колонии инхибиращи концентрации (ЕИК, $\mu\text{g/ml}$ и μM) на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази при клетки от линия MCF-7

Период на проследяване (дни)	Метален комплекс	3D колонии инхибираща концентрация	
		$\mu\text{g/ml}$	μM
38	CuVanTyr	≥ 100	≥ 176.82
	CuVanThr	≥ 10	≥ 19.86
	CuVanTrpt	≥ 10	≥ 16.99
	CuVanSer	≥ 10	≥ 20.43
35	CoVanTyr	-	-
	CoVanThr	-	-
	CoVanTrpt	-	-
	CoVanSer	≥ 100	≥ 205.15

С (-) са означени случаите, при които ЕИК не е определена, тъй като при нито една от изпитваните концентрации (10-200 $\mu\text{g/ml}$) на веществата не е наблюдавано пълно потискане на 3D растежа на туморните клетки

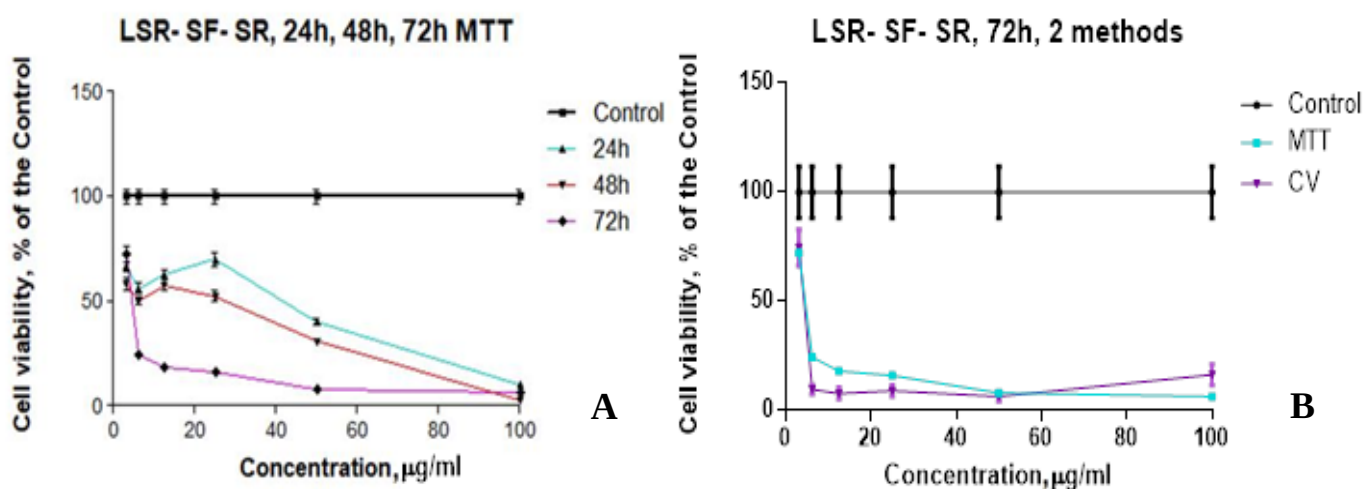
Табл. 8. 3D колонии инхибиращи концентрации (ЕИК, $\mu\text{g/ml}$ и μM) на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази при клетки от линия MDA-MB-231

Период на проследяване (дни)	Метален комплекс	3D колонии инхибираща концентрация	
		$\mu\text{g/ml}$	μM
42	CuVanTyr	≥ 100	≥ 176.82
	CuVanThr	≥ 100	≥ 198.62
	CuVanTrpt	≥ 100	≥ 169.90
	CuVanSer	≥ 100	≥ 204.31
42	CoVanTyr	-	-
	CoVanThr	-	-
	CoVanTrpt	≥ 200	≥ 171.35
	CoVanSer	≥ 100	≥ 205.15

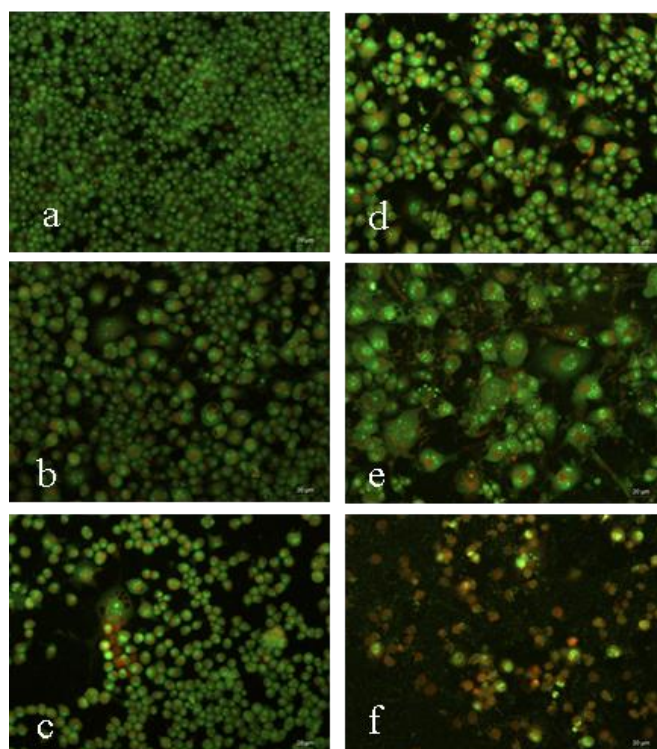
С (-) са означени случаите, при които ЕИК не е определена, тъй като при нито една от изпитваните концентрации (10-200 $\mu\text{g/ml}$) на веществата не е наблюдавано пълно потискане на 3D растежа на туморните клетки

V.II Влияние на дисулфирам върху преживяемостта и пролиферативната активност на плъши саркомни клетки

Установено беше, че приложен в концентрации 1-100 $\mu\text{g/ml}$ за 24 – 72 часа дисулфирамът намалява преживяемостта и пролиферативната активност на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR, като ефектът се засилва с увеличаване на концентрацията и удължаване на периода на въздействие (Фиг. 20, Табл. 9). Сходни експериментални данни бяха получени с МТТ тест (който отразява способността на митохондриалния ензим сукцинат дехидрогеназа да превръща оцветения в жълто тиазол блу тетразолиев бромид в пурпурен формазан) и багрене с кристал виолет (при което се оцветяват белтъци и ДНК (Фиг. 20Б). Приложен в концентрация ≥ 3.12 $\mu\text{g/ml}$ (10.54 μM) дисулфирамът напълно потиска способността на саркомните клетки да образуват 3D колонии в полутечна среда. Цитопатологични изменения бяха констатирани в клетките от линия LSR-SF-SR, култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на 0.39 - 25 $\mu\text{g/ml}$ дисулфирам. Наблюдаван беше клетъчен полиморфизъм, при което размерът на клетките се различаваше до 4-5 пъти, забелязваха се гигантски клетки с размер коло 30 μm , съдържащи големи, оптично плътни вакуоли. Ядрата бяха запазени, с по 2 или повече ядърца. Цитопламената морфология беше заличена. В цитоплазмената мембрана на отделни клетки, чийто размер беше <10 μm , се откриваха характерни за апоптоза изменения. Митотична активност не беше установена (Фиг. 21).



Фиг. 20. Влияние на дисулфирам върху преживяемостта и пролиферативната активност на при плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR. Дисулфирамът е приложен в концентрации 0.039-100 $\mu\text{g/ml}$ за 24, 48 и 72 часа (А) и 72 часа (Б). Изследването е проведено чрез МТТ тест (А) и МТТ тест (МТТ) и оцветяване с кристал виолет (CV) (Б).



Фиг. 21. Нетретираны плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR – Контрола (А) и клетки от същата линия, култивирани в продължение на 72 часа в присъствие на дисулфирам в концентрация 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (В), 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (С), 25 $\mu\text{g/ml}$ (D), 50 $\mu\text{g/ml}$ (Е) и 100 $\mu\text{g/ml}$ (F). Двойно оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид. Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Германия. Бар = 20 μm .

Табл. 9. Цитотоксична активност (IC_{50} , $\mu g/ml$ и μM) и (IC_{90} , $\mu g/ml$ и μM) на дисулфирам при плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR

Метод	MTT			CV
Период на въздействие	24h	48h	72h	72h
IC_{50}	42.1 (142.22)	27.2 (91.89)	4.4 (14.86)	4.3 (14.52)
IC_{90}	Н.о.	85.4 (288.51)	45.0 (152.02)	6.24 (21.08)

MTT = MTT тест; CV = оцветяване с кристал виолет;

IC_{50} и IC_{90} – концентрациите - в $\mu g/ml$ и μM (в скоби)**, 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 IC_{50}/IC_{90} на клетките не е определена при изпитваните от нас концентрации на дисулфирам (0.039-100 $\mu g/ml$)

V.III. Антитуморни препарати

Получените от нас данни за цитотоксичната активност на комплексите на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази и на дисулфирам при използването като моделни системи клетъчни линии бяха сравнени с тази на широко използвани в клиничната практика антитуморни препарати – цисплатина, оксалиплатина и епирубицин (Табл. 11).

Част от експериментите (проведените чрез MTT, NR и CV с монослойни клетъчни култури) са получени при предишни проучвания на нашата група (Дякова, 2019) и не са обект на този дисертационен труд, но са включени в сравнителния анализ.

Дългосрочните експерименти с 3D клетъчни култури за изследване на ефекта на антитуморните препарати върху преживяемостта и 3D растежа на клетките от линии LSR-SF-SR, HeLa и MDA-MB-231 са осъществени от нас и са част от представения дисертационен труд (Табл. 10).

Табл. 10. 3D колонии инхибиращи концентрации (КИК, $\mu\text{g/ml}$ и μM) на антитуморни препарати при клетки от линии LSR-SF-SR, HeLa и MDA-MB-231

	LSR-SF-SR	HeLa	MDA-MB-231
Период на проследяване (дни)	30	55-60	55-60
Цисплатина	$\geq 10^*$ (33)**	≥ 30 (100)	≥ 30 (100)
Оксалиплатина	≥ 30 (75)	≥ 50 (126.5)	≥ 50 (126.5)
Епирубицин	≥ 10 (18.5)	≥ 30 (55.2)	≥ 10 (18.5)

КИК е концентрацията (в $\mu\text{g/ml}^*$ и μM^{**}) на дисулфирама, която напълно потиска 3D растежа на туморните клетки в полутечна среда

Табл. 11. Йерархични редове на комплекси на Co(II) и Co(II) с Шифови бази, дисулфирам и антитуморни препарати (цисплатина, оксалиплатина и епирубицин), отразяващи влиянието на веществата върху преживяемостта и пролиферативната активност на третираните туморни и нетуморни клетки

Клетъчна линия	Йерархичен ред
Интервал (Час)	72h
Метод	MTT
LSR-SF-SR	CisPt > OxPt > Epirub > Disulfiram > CuVanSer > CuVanThr > CuVanTrpt > CuVanTyr > CoVanSer > CoVanTrpt > CoVanTyr > CoVanThr
HeLa	OxPt > Epirub > CisPt > CuVanSer > CuVanTrpt > CuVanThr > CuVanTyr

MCF-7	Epirub > CuVanSer > CuVanTyr > Cispt > Oxpt > CuVanThr > CuVanTrpt > CoVanSer > CoVanTyr > CoVanThr > CoVanTrpt
MDA-MB-231	Epirub > OxPt > CisPt > CuVanTrpt > CuVanSer > CuVanThr > CoVanSer > CoVanTyr > CoVanTrpt > CoVanThr
Lep-3	Epirub > CisPt > OxPt > CuVanSer > CuVanTyr > CuVanThr > CuVanTrpt > CoVanTyr > CoVanTrpt > CoVanThr > CoVanSet

CisPt = Цисплатина; OxPt = Оксалиплатина; Epirub = Епирубицин; Изпитваните вещества са подредени (в низходяща последователност според способността си да намаляват преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки) въз основа на цитотоксични концентрации IC_{50} (μM), определена чрез МТТ тест след въздействие в продължение на 72 часа.

V.IV. Диметилсулфоксид

Изпитваните от нас вещества (метални комплекси, дисулфирам) бяха първоначално разтворени в диметилсулфоксид (DMSO), а впоследствие разредени в хранителна среда. В Табл. 2 са посочени тестваните от нас концентрации на изследваните съединения, както и съответното процентно съдържание на диметилсулфоксид в тях. При предишни наши проучвания беше установено, че в концентрация < 2% DMSO не намалява значително броя на живите клетки в сравнение с контролата (Дякова, 2019). При проведените от нас експерименти най-високите изпитвани концентрации на веществата са 400 $\mu g/ml$ (в някои от експериментите с комплекси на Co(II) с Шифови бази) и 200 $\mu g/ml$, в които концентрацията на DMSO е съответно 0.8% и 0.4%. Това показва, че наблюдаваният под влияние на комплексите на Co(II) и Cu(II) с Шифови бази, както и на дисулфирама, цитотоксичният ефект се дължи на самите тях, а не на съдържащия се в пробите разтворител диметилсулфоксид.

VI. Обсъждане

При изпълнението на задачите, поставени в представения дисертационен труд беше изследвано за първи път влиянието на осем новосинтезирани комплекса на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни и нетуморни клетки, както и цитотоксичният ефект на дисулфирам при трансформирани с ретровирус плъщи саркомни клетки, експресиращи онкогена *v-src*.

Получените от нас резултати показаха, че приложени за 24-72 часа в определени концентрационни граници: 10 – 200 µg/ml при металните комплекси с Шифови бази (до 400 µg/ml при комплексите на Co(II)) и 1 – 100 µg/ml при дисулфирама, изследваните от нас вещества намаляват в различна степен преживяемостта и пролиферативната активност на използваните като експериментални модели туморни клетки, предизвиквайки в тях характерни цитопатологични изменения. Като цяло, цитотоксичният ефект се усилва с увеличаване на концентрацията и времето на въздействие.

При металните комплекси с Шифови бази, по-добре изразена способност да намаляват преживяемостта и пролиферацията на туморните клетки демонстрират тези на Cu(II). Те значително превъзхождат в това отношение съответните комплекси на Co(II) със същия тип лиганди. С най-силно проявена цитотоксична активност сред медните комплекси се отличава CuVanSer (с изключение на линия MDA-MB-231, при която на преден план излиза CuVanTrpt, следван от CuVanSer). При кобалтовите съединения най-ефективен цитотоксичен агент е CoVanSer. Дисулфирамът показва най-силно изразен цитотоксичен ефект сред изпитваните съединения при плъщите саркомни клетки от линия LSR-SF-SR, единствената линия, при която е изследван при подготовката на този дисертационен труд. Цитотоксичната активност на всички тествани от нас вещества – дисулфирам и комплекси на Cu(II) Co(II) с Шифови бази, отстъпва на тази на използваните като положителни контроли антитуморни препарати. Единственото изключение е при линия MCF-7, при която CuVanSer, заедно с CuVanTyr, „изпреварват“ оксалиплатината и цисплатината, като отстъпват само на епирубицина (Табл. 11).

При проведените експерименти беше наблюдаван клетъчно специфичен отговор, който се изрази в различната степен на повлияване на отделните клетъчни линии в присъствие на тестираните вещества. С най-голяма чувствителност към цитотоксичния ефект на металните комплекси с Шифови бази се отличават трансформираните с вирус туморни клетки: LSCC-SF-Mc29 следвана от LRS-SF-SR при комплексите на Co(II), LRS-SF-SR при CuVanSer и CuVanTrpt и HeLa при CuVanSer и CuVanThr. По отношение на двете получени от рак на млечната жлеза клетъчни линии (MCF-7 и MDA-MB-231) – ЦК₅₀ (μM), определена чрез MTT тест след третиране в продължение на 24 часа, е по-ниска при линия MDA-MB-231 в сравнение с MCF-7. Единственото изключение е CoVanThr, чийто цитотоксичен ефект е по-силно изразен при клетките от линия MCF-7.

Наблюдаваният клетъчно-специфичен отговор (клетките от отделните линии проявяват различна чувствителност към цитотоксичния ефект на изпитваните вещества) се дължи на различния произход на клетките и биологични характеристики на туморите (от човек, плъх, хамстер, кокошка; туморни и нетуморни; карциноми и сарком; локализация – млечна жлеза и шийка на матката; имунологични и молекулни характеристики – експресия на рецептори за хормони и растежни фактори, мутационен статус на тумор супресорни гени – p53 и др.), както и на феномена хетерогенност на туморните клетки, който превръща всеки тумор / получена от него клетъчна линия в уникална система.

Високата чувствителност на клетките от линия Lep-3 може да се дължи и на следните причини: 1) Намалената чувствителност към апоптоза е една от ключовите характеристики на раковите клетки, каквито са и линии HeLa, MCF-7 и MDA-MB-231. (Hanahan, Weinberg, 2011); 2) Линия Lep-3 е получена от 3-месечен човешки ембрион – тези клетки проявяват висока чувствителност към условията на микросредата.

След въздействие с CuVanSer и CoVanSer в продължение на 72 часа преживяемостта на първичните клетъчни култури от тумора на Графи в хамстер е по-ниска в сравнение с тази на слезковите лимфоцити от същите тумор-носеци и здрави лабораторни животни.

Установяването на зависимост между състава/структурата и биологичната активност на съединенията изисква провеждането на задълбочен целенасочен анализ, който не е бил обект на представения дисертационен труд. Във всички случаи трябва да се отбележи обаче, че комплексите на Cu(II) проявяват значително по-висока

цитотоксична/цитостатична активност в сравнение със съответните комплекси на Co(II) със същите лиганди. И в двете групи метални комплекси най-висока цитотоксична активност проявяват комплексите на Шифовата база VanSer – CuVanSer и CoVanSer.

Изясняването на механизма на действие на потенциален антитуморен агент и разпознаването на молекулните му мишени в клетката е важна стъпка при натрупването на нови знания, позволяващи разработване на ефективни терапевтични стратегии за лечение на раковите заболявания.

Отговорът на тези въпроси ще бъде предмет на следващи наши проучвания, но наличната в научната литература информация и получените от нас първоначални резултати ни позволяват да направим някои предположения и най-вече да очертаем насоката на бъдещите ни изследвания.

Към момента са познати различни механизми, обуславящи антитуморното действие на веществата, сред които блокиране на пролиферацията на клетките посредством повлияване върху микротубулите на делителното вретено; алкилиране на ДНК; потискане на активността на ензими (топоизомеразы, липооксигеназа), специфично потискане на свръхактивирани пътища на растежни фактори и хормони, повлияние върху имунния отговор (Ancuceanu, Isidor, 2004, Alexandrova, Beykov, 2017).

Изпитваните от нас комплекси на Cu(II) с Шифови бази показват по-силно изразена антитуморна активност в сравнение със комплексите на Co(II) със същите лиганди. В литературата са описани различни мед-съдържащи съединения с обещаващ антитуморен потенциал, като са изказани различни хипотези за антинеопластичното им действие – потискане функционирането на ензима цикооксигеназа, предизвикване на увреждания в ДНК молекулите, про-апоптотичен ефект и др. (Alexandrova et al., 2003; Marzano et al., 2009; Barnett, Brundage, 2010; Leon et al., 2017; Ramachandran et al., 2018; Zhang et al., 2019; Gałczyńska et al., 2020). Напълно възможно е един или повече от описаните механизми да обуславят цитотоксичните и антипролиферативните свойства на изследваните от нас медни комплекси с Шифови бази. Факт е, че всички те (с изключение на CuVanTyr) проявиха изразена способност да предизвикват двойноверижни скъсвания в ДНК молекулите на третираните клетки от линия MDA-MB-231 (в 36-63% от третираните клетки, Табл. 6). Изследвайки антитуморната активност на Cu(I) – никотинат, Abdel-Mohsen и сътр. (2017) установяват, че тя се дължи на потискането на автофагията и стимулирането на апоптозата. При проведените от нас

експерименти с комплекси на Cu(II) с Шифови бази беше намерено ниско ниво на автофагия при висока смъртност на третираните клетки. Това, което прави медните комплекси особено атрактивни като потенциални противотуморни агенти е, че се очаква те да проявяват по-слабо изразени в сравнение с платиновите медикаменти и се предполага, че може да преодолеят устойчивостта към цисплатината (Wang et al., 2006).

Описани са и различни механизми, които вероятно обуславят антитуморния ефект на дисулфирама, включително потискане на функцията на протеазомите, инхибиране на сигналния път STAT3, както и на предизвикания от TGF-beta епително-мезенхимен преход посредством повлияване на сигналния път ERK/NF-kB/Snail и др. Съобщено е, че дисулфирамът повишава активността на антитуморните препарати като увеличава чувствителността на туморните клетки към тях (например към алкилиращите агенти) (Kona et al., 2011; Paranjpe et al., 2015). Демонстрирано е, че дисулфирамът проявява протективен ефект по отношение на предизвиканата от доксорубицин кардиотоксичност (Sonawane et al., 2018). Смята се, че тиоловите групи и структурата на тиурама са абсолютно необходими за антитуморните свойства на дисулфирама (Butcher et al., 2018).

Получените при подготовката на представения дисертационен труд резултати показват, че металните комплекси с Шифови бази и в частност на тези на Cu(II) и Co(II), представляват интерес за експерименталната онкология и онкофармакология. Проучванията в тази област ще подпомогнат изясняването на биологичните активности на тези метали, както и на Шифовите бази, ще улеснят създаването на нови антитуморни препарати с висока ефективност и добра поносимост. Вниманието заслужава и изучаването на антитуморния потенциал на дисулфирама – добре познат медикамент с дълга предистория в терапията на алкохолната зависимост, който е разпознат и като кандидат за пренасочване към нуждите на клиничната онкология. За да разберем дали това ще се случи, е нужно да бъдат проведени допълнителни проучвания, каквито се провеждат от редица специалисти. В представения дисертационен труд за пръв път съобщаваме за способността на дисулфирама да намалява преживяемостта и да потиска 2D/3D растежа на трансформирани с ретровирус плъщи саркомни клетки, експресиращи онкогена v-src, чиито клетъчни аналози участват (при нарушена регулация в изявата и активността им) в патогенезата на голям брой злокачествени заболявания при хора и животни и са разпознати като мишена за насочена антитуморна терапия.

VII. Цитирана литература

1. Дякова Л. Влияние на нестероидни противовъзпалителни средства, жлъчни киселини и техни метални комплекси върху преживяемостта и пролиферативната активност на туморни клетки. Дисертационен труд за присъждане на ОНС „Доктор“, София, 2019 г.
2. Abdel-Mohsen MA, Abdel Malak CA, Abou Yossef MA, El-Shafey ES. Antitumor Activity of Copper (I)-Nicotinate Complex and Autophagy Modulation in HCC1806 Breast Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017 Nov 24;17(11):1526-1536. doi: 10.2174/1871520617666170327144122. Agent: Updated Review on Literature and Patents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2019;14(2):113-132. doi:10.2174/1574892814666190514104035
3. Alexandrova, R., G. Rashkova, I. Alexandrov, W. Tsenova, R. Tudose, O. Costisor. Briefly about copper. *Exp. Pathol. Parasitol.*, 2003, 6/12, 3-12.
4. Alexandrova, R., P. Beykov. Medicinal plants and alkaloids in the fight against cancer. In: *New aspects in medicinal plants and pharmacognosy*. A. Tiezzi, T.M. Karpinski (Eds). JB Books, Poznan, Poland, 2017. ISBN 978 83 947078-0-4, pp. 21-53.
5. Ancuceanu, R.V., V. Istudor. Pharmacologically active natural compounds for lung cancer. *Altern. Med. Rev.*, 9, 2004, 402-419
6. Barnett B., Brundage M., Hanson L., Rosana Schafer, Janet C. Tou, Prenatal cadmium exposure dysregulates sonic hedgehog and Wnt/ β -catenin signaling in the thymus resulting in altered thymocyte development, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 242(2), 2010, 136-145
7. Butcher, K., V. Kannappan, R.S. Kilari, M.R. Morris, C. McConville, A.L. Armesilla, W. Wang. Investigation of the key chemical structures involved in the anticancer activity of disulfiram in A549 non-small cell lung cancer cell line. *BMC Cancer.*, 2018, 18(1), doi: 10.1186/s12885-018-4617-x.
8. Gałczyńska K, Drulis-Kawa Z, Arabski M. Antitumor Activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) Complexes. *Molecules.* 2020, 25(15), 3492. doi: 10.3390/molecules25153492.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.Noemi Andor, Carlo C Maley , Hanlee P Ji, *Cancer Res.* 2017 May 1;77(9):2179-2185.
10. Kona, F.R., D. Buac, A.M. Burger. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr Cancer Drug Targets.*, 11(3), 2011, 338-46.
11. Leon IE, Cadavid-Vargas JF, Di Virgilio AL, Etcheverry SB. Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallodrugs with Anticancer Activity. *Curr Med Chem.* 2017;24(2):112-148. doi: 10.2174/0929867323666160824162546.
12. Marzano, Cristina; Pellei, Maura; Tisato, Francesco; Santini, Carlo Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents), 2009, 9(2), 185-211
13. Paranjpe, A., R. Zhang, F. Ali-Osman, G.C. Bobustuc, K.S. Srivenugopal. Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. – *Oncotarget*, 6(38), 2015, 40907-40919.
14. Ramachandran E, Gandin V, Bertani R, Sgarbossa P, Natarajan K, Bhuvanesh NSP, Venzo A, Zoleo A, Glisenti A, Dolmella A, Albinati A, Marzano C. Synthesis,

- characterization and cytotoxic activity of novel copper(II) complexes with aroylhydrazone derivatives of 2-Oxo-1,2-dihydrobenzo[h]quinoline-3-carbaldehyde. *J Inorg Biochem.* 2018 May;182:18-28. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.016.
15. Sonawane, V.K., U.B. Mahajan, S.D. Shinde, S. Chatterjee, S.S. Chaudhari, H.A. Bhangale, S. Ojha, S.N. Goyal, C.N. Kundu, C.R. Patil. A Chemosensitizer Drug: Disulfiram Prevents Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction and Oxidative Stress in Rats. - *Cardiovasc Toxicol.*, 2018, doi: 10.1007/s12012-018-9458-y.
 16. Wang T, Guo Z. Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem.* 2006;13(5):525-37. doi:10.2174/092986706776055742.
 17. Zhang YL, Deng CX, Zhou WF, Zhou LY, Cao QQ, Shen WY, Liang H, Chen ZF. Synthesis and in vitro antitumor activity evaluation of copper(II) complexes with 5-pyridin-2-yl-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinoline derivatives. *J Inorg Biochem.* 2019 Dec;201:110820. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110820.

VIII. ИЗВОДИ

Получените експериментални резултати позволяват да бъдат направени следните **по-важни изводи**:

1. Изпитваните комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази предизвикват цитопатологични изменения и намаляват в различна степен преживяемостта и 2D/3D растежа на използваните като експериментални модели клетъчни култури. Наблюдаваното въздействие се усилва с увеличаване на концентрацията и времето на третиране.
2. Комплексите на Cu(II) с Шифови бази показват по-висока цитотоксична активност (особено комплексът CuVanSer) в сравнение с тези на Co(II) със същите лиганди. Възможно е клетките да деактивират приложените кобалтови комплекси посредством образуване на автофагозومي, докато при комплексите на Cu(II) стартиралата автофагия да завършва с клетъчна смърт.
3. Най-силно силно изразен цитотоксичен ефект и при двете групи метални съединения проявяват комплексите на лиганда VanSer – CuVanSer и CoVanSer.
4. Наблюдаван беше клетъчно-специфичен отговор, който най-вероятно отразява различията в произхода, биологията и поведението на злокачествените новообразувания, от които са получени използваните като моделни системи клетъчни култури, както и уникалността на всеки тумор / туморна клетъчна линия.
5. Определената при кобалтовите комплекси ЦК₅₀ (μM, МТТ, 72 час) е по-висока при нетуморните човешки ембрионални клетки от линия Lер-3 в сравнение с туморните клетки от линии HeLa, MCF-7 и MDA-MB-231. Според изчислената при същите условия ЦК₅₀, в преобладаващата част от случаите чувствителността на нетуморните човешки клетки към цитотоксичното действие на комплексите на Cu(II) превишава тази на злокачествено трансформирани клетки.

6. Приложен в концентрации 1-100µg/ml дисулфирамът значително потиска преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в негово присъствие плъши саркомни клетки, трансформирани с Rous sarcoma virus щам Schmidt-Ruppin (LSR-SF-SR).
7. С единични изключения всички изпитвани вещества (метални комплекси с Шифови бази, дисулфирам) проявяват по-слаб цитотоксичен ефект в сравнение с утвърдените в клиничната практика антитуморни препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин.

IX. Приноси

1. Получени са оригинални данни за влиянието на 8 новосинтезирани комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази, получени при кондензационна реакция между о-ванилин (Van) и аминокиселините DL-триптофан (Trpt), L-серин (Ser), L-треонин (Thr) или S-тирозин (Tyr), върху преживяемостта и пролиферативната способност на култивирани в лабораторни условия туморни и нетуморни клетки с човешки и животински произход, както и за способността на веществата да предизвикват цитоморфологични изменения и автофагия.
2. Установена е зависимост между строежа/структурата и биологичната активност (цитотоксична / антитуморна) на изследваните метални комплекси. По-силно изразен цитотоксичен ефект се свързва с присъствието на Cu(II), както и с лиганда VanSer.
3. За пръв път е доказана способността на дисулфирам да потиска преживяемостта и 2D/3D растежа на трансформирани с ретровирус плъши саркомни клетки (линия LSR-SF-SR), които експресират *v-src*, чийто клетъчни аналози участват в патогенезата на голям брой неоплазии у човека и животните.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е високата чувствителност на трансформирани с ретровирус птичи хепатомни (линия LSCC-SF-Mc29 клон E7) и плъши саркомни (линия LSR-SF-SF)

клетки към цитотоксичното действие на вещества с различна структура и химични/физико-химични свойства.

Приноси с приложен характер

1. Разработен, оптимизиран и приложен е комплексен подход за изучаване на цитотоксичните / антитуморните свойства на комплекси на Cu(II) и Co(II) с Шифови бази при клетъчни култури (първични култури, постоянни клетъчни линии) с различен произход и биологични свойства (туморни и нетуморни; получени от човек, плъх, хамстер, кокошка; от карциноми и саркоми, тумори с различна локализация и имунологични и молекулни характеристики), включващ методи с различни мишени в клетката (молекули, органели) и механизми на действие, краткосрочни и дългосрочни експерименти, монослойни (2D) култури и триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

Х. Списък с научни публикации по темата на дисертационния труд

R. Alexandrova, **D. DINEV**, I. Gavrilova-Valcheva, I. Gavrilov “Cell cultures as model systems in breast cancer research” Merit Journal of Medicine and Medical Sciences, 7, 2, 2019, 054-057. ISSN: 2354-323X. (ISI Impact Factor 2018-2019 = 1.425).

Индексирано в ICI World of Journals (Index Copernicus International), Google Scholar, Open Academic Journals Index (OAJI), J-Gate, Thompson Reuters Researcher ID: S-5430-2016 и др.

D. DINEV, R. Spasov, L Dyakova, R. Alexandrova. Effect of disulfiram on viability and proliferation of virus transformed rat sarcoma cells Acta Morphologica et Anthropologica, 2018, 25, 3-4, 33-37. ISSN:1311-8773 (print) 2535-0811 (online). Index in Web of Science.

D. DINEV, T. Zhivkova, L. Dyakova, B. Andonova-Lilova, A. Abudalleh, M. Vidakovic, C. Podlipnik, R. Alexandrova. Effect of anticancer agents on viability and proliferation of 2D and 3D cultures of rat sarcoma cells, transformed by Rous sarcoma virus strain Schmidt-

Ruppin. Acta Morphologica et Anthropologica, 2020, 27, 3-4, 8-15. ISSN:1311-8773 (print) 2535-0811 (online). Index in Web of Science.

T. Zhivkova, **D. DINEV**, A. Abudalleh, R. Alexandrova. Briefly about disulfiram. In the Proceedings of XIVth Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products”, Sofia, 2019 (Приета за публикуване). ISSN: 2367-5683. (На български език)

XI. Списък на изнесени научни съобщения по темата на дисертационния труд

XI.I Доклад пред научни мероприятия в страната

1. **Десислав Динев**, Таня Живкова, Лора Дякова, Милена Георгиева, Георги Милошев, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова. Комплекси на мед (II) и кобалт (II) с шифови бази, проявяващи обещаваща цитотоксична активност при ракови клетки. Втори докторантски симпозиум „Молекулярната биология- нови хоризонти”, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев”, 6-7 април, 2017 г., София, България, стр. 37.
2. **Desislav Dinev**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Boyka Andonova-Lilova, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. “Cytotoxic activity of two Co (II) complexes with Schiff bases in human cervical carcinoma cells.” Youth scientific conference “Kliment’s days” 16th–17th November 2017, Sofia, Bulgaria.
3. **Десислав Динев**, Здравка Петрова, Бойка Андонова- Лилова, Росен Спасов, Милена Георгиева, Георги Милошев, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова. Цитотоксична активност на метални [Cu(II), Co(II)] комплекси с Шифови бази при човешки и животински туморни и нетуморни клетки. Трети Докторантски Симпозиум - "Молекулярна биология- от молекулите до клетките и обратно", 7-8 март 2019 г.

4. **Desislav Dinev**, Rossen Spasov, Milena Georgieva, Georgi Miloshev, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Radostina Alexandrova. Cu(II) and Co(II) complexes with schiff bases and their cytotoxic activity in 2D and 3D human and animal tumor cells youth scientific conference “Kliment’s days”, 8th November, 2019, Sofia university st. Kliment Ohridski faculty of biology, Sofia, Bulgaria.
5. Radostina Alexandrova, **Desislav Dinev**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Zdravka Petrova, Rossen Spasov, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Crtomir Podlipnik New metal [Cu(II), Co(II), Zn(II)/Ag(I), Zn(II)/Au(I)] complexes with schiff bases decrease viability and 2D/3D growth of cultured human cancer cells, scientific conference “Kliment’s Days” 5-th November 2020, Faculty of Biology, Sofia, Bulgaria.

XI.II Доклад пред научни мероприятия в чужбина или пред международни мероприятия у нас

1. **Desislav Dinev**, Radostina Alexandrova. Cancer stem cells. VIIIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 14-16 June, 2017, Sofia, Bulgaria; ISSN: 1314-9091. – доклад.
2. **Десислав Динев**, Таня Живкова, Лора Дякова, Милена Георгиева, Георги Милошев, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова. Влияние на метални комплекси с шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия туморни клетки. The XIIth Workshop with international electronic participation on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 27-29 November, 2017 Sofia, Bulgaria.
3. **Десислав Динев**. В търсене на метални комплекси с обещаваща антитуморна активност. Научен семинар II по Дейност 2: Популяризиране на науката и научните изследвания чрез провеждане на информационни кампании - научни семинари и дискусии. Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН Дата на провеждане: 16.04.2018 г.

4. **Desislav Dinev**, Radostina Alexandrova. Mechanisms of (multi)drug resistance of cancer cells. Xth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, July 03-05, 2019, Sofia, Bulgaria.
5. **D. Dinev**, R. Alexandrova. 3D cancer cell colonies as suitable model systems in experimental oncopharmacology. XVI International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, 11-14 May, 2017, Abstract Book, p.320.
6. Radostina Alexandrova, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, **Desislav Dinev**, Milena Glavcheva, Abedulkadir Abudalleh, Reni Kalfin, Daniela-Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron. The power of 3D cancer cell colonies as model systems in experimental oncopharmacology. First Annual Meeting, COST Action CA16119 CellFit, "In vitro 3-D total cell guidance and fitness", 12-13 September 2017, Albena Resort, Bulgaria
7. **Desislav Dinev**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Poster: Effect of Cu(II) and Co(II) complexes with schiff bases on viability and proliferation of virus- transformed rat sarcoma cells. The 9th edition of the symposium with international participation New Trends and Strategies in the Chemistry of Advanced Materials. September 24-25, 2020 Timisoara, Romania.
8. **Desislav Dinev**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, Seminar of ecology- 2016 with international participation 21-22 .04 .2016 Sofia Bulgaria. Cu(II) and Co(II) complexes with the same ligands express different cytotoxic/cytostatic activities.
9. **Desislav Dinev**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. 9th Scientific conference of the Bulgarian Focal Point of the European Food Safety Authority 24-25.10.2016 Пoчpeп: Why do we need cobalt and vitamin B12?

10. **Desislav Dinev**, Tanya Zhivkova, Katya Popova, Boyka Andonova-Lilova, Vladimir Veselinov, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. XV International Congress Of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria 12-15.05.2016. Cu(II) and Co(II) complexes with Schiff bases with promising antitumor activity.
11. **D. Dinev**, B. Andonova-Lilova, A. Abudalleh, L. Dyakova, T. Zhivkova, M. Dosina, V. Kulchitsky, R. Alexandrova. Effect of disulfiram on viability and proliferation of virus-transformed rat sarcoma cells. VII National Conference with international participation "Morphological Days", June 8 – 10, 2018, Sofia, Bulgaria.
12. **Desislav Dinev**, Zdravka Petrova, Rossen Spasov, Tanya Zhivkova, Boyka Andonova-Lilova, Lora Dyakova, Abedulkadir Abudalleh, Kristin Boteva, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova. Cytotoxicity assessment of new Cu(II) and Co(II) complexes with Schiff bases. International Scientific Conference "Tradition and Modernity in Veterinary Medicine", April 12-14, 2019, Sofia, Bulgaria, Abstract Book, p.23-24
13. **Desislav Dinev**, Milena Glavcheva, Tanya Zhivkova, Boyka Andonova-Lilova, Chukwuemeka Obinna Ekeh, Melita Vidakovic, Crtomir Podlipnik, Radostina Alexandrova. Effect of cisplatin and oxaliplatin on viability and proliferation of 2D and 3D cultures of rat sarcoma cells, transformed by Rous sarcoma virus strain Schmidt-Ruppin. Second International Conference "Veterinary Medicine in Service of People", October 18-19, 2019, Stara Zagora, Bulgaria.

ХІІ. Благодарности към научноизследователски проекти

Проучванията, проведени при подготовката на дисертационния труд, са осигурени финансово от:

- ✓ Договор №Б 02/30 от 12.12.2014 г. На тема: “Експериментални моделни системи за проучвания в областта на злокачествените новообразувания и костното моделиране” Ръководител: доц. Радостина Александрова, доктор, ИЕМПАМ – БАН.
- ✓ Договор №BG051PO001-3.3.06-0048 от 04.10.2012 г., на тема: „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи за ефективно прилагане на биомедицинските изследвания за подобряване качеството на живот” Оперативна програма "Развитие на човешките ресурси" 2007-2013 г., Европейския социален фонд и Република България. Ръководител: проф. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН;
- ✓ Договор №BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017 г. на тема: „Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината—,Проектът е финансиран по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси”, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския съюз. Ръководител: проф. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН;
- ✓ Договор за двустранно сътрудничество между Българска академия на науките (Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей) и Румънска академия на науките (Институт по физико-химия в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара) на тема: „Лекарствено чувствителни и устойчиви ракови клетки в търсене на нови антитуморни агенти” (2015-2017). Ръководител от българска страна доц. Радостина Александрова, доктор, ИЕМПАМ-БАН;
- ✓ Договор за двустранно сътрудничество между Българска академия на науките и Румънска академия на науките - Институт по физико-химия „Илие Мургулеску” в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара на тема: "Приложение на 3D клетъчни култури за проучвания върху антитуморната активност на метални съединения" (2018-2020г.). Ръководител от българска страна: доц. Радостина Александрова, доктор, ИЕМПАМ-БАН;
- ✓ Договор № ДКОСТ 01/19 от 08.12.2017 г., Европейска мрежа за мултидисциплинарни проучвания и биомедицинско приложение на автофагията” Ръководител: проф. Радостина Александрова, доктор, ИЕМПАМ-БАН;
- ✓ Договор № ДКОСТ 01/10 от 22.10.2018 г. „Насоки за оптимално поддържане на 3D клетъчни култури in vitro”. Ръководител проф. Радостина Александрова, доктор.
- ✓ Договор за двустранно сътрудничество между Българска академия на науките и Институт към Национални изследователски център, Отделение за медицински проучвания, гр. Гиза, Египет (2016-2018). Ръководител от българска страна: доц. Радостина Александрова, доктор, ИЕМПАМ-БАН.