

СТАНОВИЩЕ

от проф., д-р Румяна Димитрова Цонева

Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“, ИБФБМИ-БАН”

относно дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен "доктор" по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Биофизика"

на Тихомира Тихомирова Стоянова, докторант към Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН

Тема на дисертационния труд: „Антитуморни липиди – влияние върху трансмембранната клетъчна сигнализация “

1. Актуалност на тематиката

Високият научен интерес към молекулярните механизми на действие на анти-туморните липиди (милтефозин, еруфозин) се дължи на изразеното им селективно действие към ракови клетки за предизвикване на клетъчна смърт. За разлика от повечето антитуморни агенти, антитуморните липиди нарушават липидната хомеостаза поради тяхното сходство с ендогенните фосфолипиди, като се насочват към мембранните липидни рафтове и променят липидно-свързаната сигнализация, което води до апоптоза. Това обяснява и нарастващия интерес от страна на фармацевтичната промишленост за разработване на по-ефективни насочени анти-туморни терапевтични стратегии използвайки комбинирани молекулни мишени.

Темата на дисертационния труд е насочена към разкриване на механизмите на действие на анти-туморните липиди върху биофизичните свойства на липидните мембрани като липиден състав, мембранен флуидитет и проитеинова дифузия, както и върху сфинголипидния метаболизъм в ракови клетки водещи до апоптоза. Важна част от дисертационния труд е свързана с изучаване на ефективността на комбинираното действие

на два антитуморни липида за намаляване на токсичността на антитуморните агенти върху нормални клетки при запазване на тяхната антитуморна активност. Като цяло темата на дисертацията носи висока актуалност в научната специалност „Биофизика“.

2. Познаване състоянието на проблема

Настоящият дисертационен труд се състои от 139 страници и е организиран и представен според приетите стандарти. Литературният обзор включва преглед на факторите обуславящи възникването на рака като заболяване, разпространението му по демографски групи, както и патогенезата, класификация и стадиране на рака на млечната жлеза и рака на белия дроб. Дадени са характеристиките на използваните клетъчни линии от рак на гърдата и рака на белия дроб. Подробно са описани видовете клетъчна смърт и отношението им към патогенезата на тумора, както и механизмите на метастазиране и на клетъчния цикъл. Широко е застъпена ролята на клетъчната мембрана в това число липиден състав, флуидитет и дифузионен капацитет. Специално място е отделено на сфинголипидния реостат и сфинголипидната сигнализация в контекста на туморогенезата и терапевтичните стратегии.

Ясното структуриране и изчерпателност на литературния обзор показва свободно боравене и анализиране на съвременната научна информация свързана с изследванията в тази област. За по-голямо онагледяване в обзора са представени 16 фигури и 2 таблици. Една голяма част от цитираните източници са на съвременни научни трудове, които пълноценно подкрепят изложените научни факти и направените изводи.

3. Цел, задачи и методология на изследването

Целта на настоящия дисертационен труд е ясно формулирана: да се изследва механизмът на действие на антитуморни липиди върху трансмембранната сигнализация при ракови клетки.

За нейното изпълнение са формулирани следните задачи: 1) Провеждане на цитотоксичен анализ на действието на EPC3, DMS и HePC (самостоятелно и в комбинация) върху ракови клетки с различна степен на инвазивност; 2) Изследване на типа клетъчна смърт, предизвикана след третиране с антитуморните липиди (самостоятелно и в комбинация); 3) Количествена оценка на предизвиканата клетъчна смърт; 4) Изследване на ефекта на антитуморните липиди върху клетъчния цикъл, клетъчната миграция, морфология и

цитоскелет; 5) Изследване на ефекта на антитуморните липиди върху флуидитета и дифузионната динамика на клетъчната мембрана; 6) Изследване на ефекта на антитуморните липиди

В частта "Материали и методи" са описани коректно и подробно използваните многобройни клетъчни, биохимични, имунологични и молекулярни методи, сред които: МТТ метод за определяне на клетъчна жизнеспособност и пролиферация, витално оцветяване с АО/EtBr, Scratch Assay, флоуцитометричен анализ на клетки за детекция на апоптоза и некроза, поточно-цитометричен анализ на Nicoletti за анализ на клетъчен цикъл, определяне нивото на иРНК чрез RT-PCR, имунофлуоресценция за определяне на клетъчна адхезия, конфокална микроскопия на клетки с Di-4-ANEPPDHQ, сканираща флуоресцентно корелационна микроскопия (sFCS) на клетки, имуноблот за определяне на степента на фосфорилиране на PKC α при клетки, цитокинеза-блок микроядрен анализ (CBMN) на клетки, цитохром С редуктазен (НАДФН) тест и др.

4. Оценка на получените резултати и тяхната интерпретация

В раздели "Резултати", „Дискусия" и „Обобщение“ (52 стр.) задълбочено са коментирани получените резултати касаещи ефекта на еруфозина върху клетъчни линии от рак на гърдата с различен метастатичен потенциал и по-специално влияние на еруфозина върху клетъчната преживяемост, клетъчен цикъл, предизвикване на клетъчна смърт, миграционен потенциал, цитоскелетна организация, флуидитет на клетъчна мембрана, липиден състав, дифузионна белтъчна динамика.

В последващи изследвания е оценен и анализиран комбинираният ефект на милтефозин и диметилсфингозин върху жизнеспособността на ракови клетки от бял дроб и ендотелни клетки, възникване на апоптоза/некроза, активността на цитохром С редуктаза, ядрени аномалии и ниво на клетъчни и извънклетъчни нива на S1P.

В глава „Заклучение“ систематично са изредени главните акценти на настоящето изследване включено в дисертацията, което придава прегледност и яснота на извършеното изследване.

На базата на проведените експерименти са формулирани четири извода определящи клетъчно-специфичната цитотоксичност на еруфозина към високоинвазивни клетки от рак на гърдата, концентрационно зависимо индуциране на апоптоза, промени в клетъчния

цикъл, намаляване на миграционния потенциал, понижаване на подредеността на липидния слой на клетъчната мембрана и засилена дифузия на белтъци през нея.

Във връзка с комбинираното действие на милтефозин и DMS са формулирани три извода определящи синергичния ефект на комбинираното третиране върху ракови клетки от бял дроб, индуциране на късна апоптоза чрез активиране на вътрешния апоптотичен път и понижаване на нивата на S1P в ракови клетки от бял дроб.

5. Оценка на приносите на дисертационния труд

Посочените **Приноси** са адекватни и изчерпателни. Изведени са три приноса с **оригинален характер** обобщаващи най-важните резултати на дисертационния труд, като се акцентира върху пряката връзка между промяната в липидния състав, подредеността на липидния слой и дифузионната динамика на клетъчната мембрана под действието на еруфозин, и промени в клетъчния цикъл във фаза G2/M и предизвикване на апоптоза при високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231 от рак на гърдата. Другите два приноса са свързани с комбинираното действие на милтефозин и диметилсфингозин и проявата на синергичен цитотоксичен ефект върху клетки от рак на бял дроб, както инхибирането на сигналните пътища, свързани със сфингозин киназа 1 и протеин киназа C, намаляване нивата на S1P в раковите клетки и индуциране на апоптоза чрез активиране на вътрешния митохондриален път. Отличени са и два приноса с **приложен характер** акцентиращи върху приложимостта на изплезваните алкилфосфохолини в съвременната антитуморна терапия поради проявените ниски странични ефекти върху нормални клетки и възможността за използване на по-ниска концентрация на милтефозин с цел допълнителен спад на нежеланите страничните ефекти.

Включването на „Бъдещи научни планове“ на дисертантката придава постоянство и задълбоченост в изясняване на механизмите засегнати в дисертацията и засиления научен интерес към настоящата научна тематика.

6. Личен принос на докторанта и публикации

Във връзка с дисертационния труд са публикувани три статии с импакт фактор в квартали Q1, Q2, и Q, в една от които Тихомира Стоянова е водещ автор.

Заклучение:

Представеният от **Тихомира Тихомирова Стоянова** дисертационен труд представя едно актуално и оригинално проучване свързано с изследва механизма на действие на антитуморни липиди върху трансмембранната сигнализация при ракови клетки. Докторантката показва владение на голям набор от методики и отличен усет за анализиране и обобщаване на получените резултати. Дисертацията, както и придружаващите я документи напълно отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, правилниците на БАН и ИБФБМИ за неговото приложение.

Като взимам под внимание всичко изредено по-горе, убедено гласувам положително и препоръчвам на почитаемото Научно жури да подкрепи присъждането на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Биофизика" на докторант Тихомира Тихомирова Стоянова.

1.03.2026 г.
София

Изготвил становището: 
(проф. д-р Румяна Димитрова Цонева)