

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Радослав Александров Александров,

Лаборатория по молекулни механизми на ДНК поправката, Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките

на дисертационен труд на тема:

“Антитуморни липиди - влияние върху трансмембранната клетъчна сигнализация”

Докторант: Тихомира Тихомирова Стоянова

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление: шифър 4.3 „Биологични науки“, Научна специалност „Биофизика“

Научни ръководители: проф. д-р Румяна Цонева и проф. д-р Албена Момчилова, дбн

I. Обща част

Тихомира Тихомирова Стоянова е задочен докторант към Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН (ИБФБМИ-БАН) от 2017 година. Дисертационният труд “Антитуморни липиди - влияние върху трансмембранната клетъчна сигнализация” е изработен под научното ръководство на проф. д-р Румяна Цонева и проф. д-р Албена Момчилова и обхваща 129 страници, 45 фигури, 3 таблици и 236 цитирани източници. Всички представени материали отговарят на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане, както и на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН.

II. Кратки биографични данни

Тихомира Стоянова е възпитаник на Математическата гимназия “Гео Милев” в Плевен, откъдето тя се дипломира през 2010 година. Между 2010 и 2014 година Тихомира Стоянова следва в бакалавърска програма “Молекулярна биология” на Биологическия факултет на Софийски университет, а между 2014 и 2017 година тя придобива две магистърски степени от Биологическия факултет на СУ – “Клетъчна биология и патология” и “Биология на развитието”. През 2015 година започва работа като специалист-биолог в секция “Липид-белтъчни взаимодействия”, а от 2019 година е асистент в секция “Липид-белтъчни взаимодействия”, а след това и в Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“. От 2016

година работи като биолог към клиничната лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ в София. От началото на 2017 година е зачислена като задочен докторант към Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на ИФБМИ-БАН.

III. Актуалност на темата на дисертацията

В глобален мащаб онкологичните заболявания заемат второ място сред водещите причини за смъртност след сърдечносъдовите заболявания. През последните години в редица развити държави се наблюдава промяна в тази тенденция като онкологичните заболявания вече изпреварват сърдечносъдовите като водеща причина за смъртност сред населението благодарение на напредъка в профилактиката, ранната диагностика и лечението на сърдечносъдовите заболявания, както и поради увеличаването на средната продължителност на живота.

Раковите заболявания представляват изключително разнообразна група от генетични заболявания, характеризиращи се с впечатляваща хетерогенност на генетично, молекулно и клетъчно ниво като дори тумори, произхождащи от една и съща тъкан, могат да се различават съществено по своята биология, скорост на растеж, способност за метастазиране и отговор към терапията. Именно тази хетерогенност прави лечението на онкологичните заболявания изключително предизвикателно. Стандартните терапевтични подходи – хирургично лечение, лъчетерапия и химиотерапия – често водят до значително редуциране на туморната маса и до първоначално добър клиничен отговор. В много случаи обаче те не успяват да елиминират напълно всички ракови клетки и често се стига до развитието на резистентност към химиотерапевтичните средства, което води до рецидив на заболяването и ограничаване на последващите терапевтични възможности.

Поради тези причини съвременните изследвания в областта на биологията на раковите заболявания са насочени към детайлното изясняване на молекулните механизми на канцерогенезата с цел разработване на по-прецизни, персонализирани и щадящи терапевтични стратегии. Активно се проучват и комбинирани подходи за химиотерапия, насочени към едновременното потискане на различни механизми на туморно развитие и ограничаване на вероятността за възникване на резистентност.

В светлината на казаното настоящият дисертационен труд изследва ефектите и механизмите на молекули от групата на антитуморните липиди (еруфозин, милтефозин и диметилсфингозин) като потенциални химиотерапевтици за лечението на често срещани и социално-значими видове рак, каквито са ракът на гърдата и ракът на белия дроб. Докладваните резултати подчертават потенциала на тези съединения за приложение в терапията на раковите заболявания. Те индуцират множество ефекти в раковите клетки, включително нарушения в регулацията на клетъчния цикъл, реорганизация на цитоскелета и потискане на клетъчната миграция, промени в състава и флуидитета на клетъчните мембрани, както и активиране на клетъчната програма за апоптоза. Съвкупността от тези промени води до ефективно инхибиране на туморния растеж и индуциране на клетъчна

смърт. Особено перспективни са резултатите, касаещи ефектите на милтефозина, както самостоятелно, така и в комбинация, тъй като той е алкилфосфолипид, който е вече одобрен за лечение на лейшманиоза при човека и следователно е с добре проучени фармакологични характеристики и странични ефекти, което би ускорило многократно евентуалното му въвеждане в клиничната практика и като противотуморен агент.

IV. Структура на дисертационния труд

Дисертацията на Тихомира Стоянова е структурирана по традиционния начин, с ясно дефинирани основни раздели и подраздели, и изпълнява всички необходими изисквания за подобен вид научен труд.

Още в началото на дисертационния труд ясно е дефинирана *целта*, която е “да се изследва механизма на действие на антитуморни липиди върху трансмембранната сигнализация при ракови клетки”. За постигането на тази амбициозна цел са формулирани и *шест конкретни задачи*, чието осъществяване действително би характеризирало в дълбочина клетъчните ефекти на изследваните вещества от групата на антитуморните липиди и би разкрило възможностите им или пък недостатъците им при терапията на раковите заболявания.

Информацията, предоставена в *Литературния обзор*, е ясно изложена, последователно организирана и точно фокусирана върху изследователския проблем на дисертационния труд. В началото докторантката предоставя клинични и епидемиологични данни за значимостта на раковите заболявания в глобален мащаб и по-специално за рака на гърдата и белия дроб, които представляват съответно най-често срещания вид рак при жените и вторият най-често срещан вид рак при мъжете. Много полезна е информацията, предоставена за характеристиките на раковите клетъчни линии (включително и използваните в настоящия дисертационен труд), използвани при изследването на тези видове рак в лабораторни условия. След това докторантката последователно представя някои от основните пътища, водещи до загиването на клетките, като апоптоза, некроптоза и некроза, както и събитията, които съпътстват метастазирането на раковите клетки. Ключов е разделът, в който се разкриват основни положения по отношения на липидния състав и флуидитетните характеристики на биологичните мембрани, както и специалният фокус върху т.нар. “сфинголипиден реостат” – балансът между церамид и сфингозин-1-фосфат, който повлиява на пролиферативните способности на клетките.

Разделът *Материали и методи* подробно представя всички използвани в хода на изработката на дисертационния труд експериментални методи, като особено впечатление прави огромния набор от техники, приложени за задълбоченото изясняване на свойствата на антитуморните липиди. Докторантката е използвала разнообразни подходи за оценка на цитотоксичния потенциал на изследваните вещества, като МТТ тест и витално оцветяване с акридин оранж/етидиев бромид, scratch assay за оценка на клетъчна миграция, флоуцитометрия за детекция на апоптоза и некроза, както и за определяне на

въздействието на изследваните вещества върху прогресията на клетъчния жизнен цикъл при моделните клетъчни линии. В допълнение е направена RT-qPCR оценка на нивата на експресия на циклини и циклин-зависими кинази, за да се задълбочат резултатите, касаещи детектираните с флоуцитометрия промени в клетъчния цикъл. За разкриване на ефектите на антитуморните липиди по отношение на реорганизацията на цитоскелета, както и по отношение на флуидитета на мембраните и подвижността на мембранните белтъци, докторантката е използвала съвременни флуоресцентно-микроскопски техники, включително сканираща флуоресцентно-корелационна спектроскопия (sFCS), която е особено подходяща за измерване на дифузионните коефициенти на изследваните флуоресцентно-белязани белтъци в рамките на клетъчната мембрана на третираните ракови клетки. За да се изследват промените в състава на мембраните в резултат на третиране с антитуморни липиди, докторантката е характеризирала с тънкослойна хроматография фосфолипидния състав, а с газхроматография количествата холестерол в мембраните. Така представения набор от техники е впечатляващ, но и необходим за подробното характеризиране на ефектите на антитуморните липиди, каквато е целта на настоящия дисертационен труд.

Най-съществената част на дисертационния труд – разделът *Резултати и дискусия*, е разделен на две части, в рамките на които са представени получените резултати за ефектите на еруфозина върху клетъчни линии от рак на гърдата с различен метастатичен потенциал (Част I) и ефектите на милтефозина и диметилфингозина (DMS) върху белодробната ракова клетъчна линия A549 и нормалните нетрансформирани HUVEC клетки (Част II).

Резултатите в Част I разкриват свойствата на еруфозина да блокира пролиферацията на изследваните клетъчни линии от рак на гърдата по няколко различни начина, като от особен интерес е големият потенциал на еруфозина да потиска растежа и миграцията на силно агресивната тройно-негативна линия MDA-MB-231. Най-съществените и изцяло нови наблюдения в този раздел са следните:

- Еруфозинът предизвиква дозо- и времезависимо потискане на пролиферацията при клетъчните линии от рак на гърдата MDA-MB-231 и MCF-7, като ефектът е по-изразен при силно инвазивната MDA-MB-231.

- Еруфозинът индуцира митотичен арест във фаза G2/M при клетъчните линии MDA-MB-231 и MCF-7, съпроводен с увеличаване на суб-G1 фракцията и намаляване на клетките в S-фаза, като ефектът отново е по-изразен при MDA-MB-231.

- Оцветяването с акридин оранж/етидиев бромид и DAPI показва, че еруфозинът индуцира апоптоза, като ефектът е по-изразен при високоинвазивната MDA-MB-231 клетъчна линия и е концентрационно зависим.

- Еруфозинът потиска миграционния потенциал на силно инвазивната линия MDA-MB-231. Това показва, че антитуморният агент ефективно ограничава клетъчната миграция, която е от ключово значение за метастазирането.

- Оцветяването с фалоидин показва, че еруфозинът влияе върху актиновия цитоскелет като при високи дози се наблюдава разрушаване на актиновите

микрофиламенти. Тези промени биха могли да обяснят намаления миграционен потенциал на MDA-MB-231 клетките.

- Еруфозинът намалява подредеността на клетъчната мембрана и променя липидния ѝ състав, като ефектът е по-изразен при MDA-MB-231.

- Еруфозинът не променя локализацията на белтъците hEGFR и FPV-NA, но значително увеличава тяхната дифузионна динамика, което показва промени във физичните свойства на клетъчната мембрана.

В Част II са представените изследванията, касаещи ефектите на милтефозина и диметилсфингозина – поотделно или в комбинация, върху пролиферацията и свойствата на белодробната ракова клетъчна линия A549 и нетрансформирани HUVES клетки. Акцент в тази част на дисертацията е откритата синергия между тези два антитуморни липида в потискането на растежа на раковата клетъчна линия и в значително по-малкия им ефект върху нераковите HUVES клетки. Най-ключовите резултати във връзка с действието на милтефозина и DMS са:

- Ефектът на DMS и милтефозин върху жизнеспособността на раковите клетки A549 и нормалните HUVES е дозо- и времезависим, като и двете вещества потискат пролиферацията на клетките, но A549 са по-чувствителни към DMS. Комбинираното третиране демонстрира синергичен цитотоксичен ефект спрямо A549, като по-продължителното третиране усилва ефекта.

- Комбинираното третиране с милтефозин и DMS предизвиква морфологични и апоптотични промени в раковите клетки, изразени в окръгляне, намаляване на клетъчната плътност и образуване на апоптотични телца. Въпреки потенциалните генотоксични рискове на противотуморните лекарства, проведените изследвания не установяват значими генетични увреждания при третираните клетки.

- Флоуцитометричният анализ показва, че комбинираното третиране с милтефозин и DMS индуцира значителна апоптоза при раковите клетки A549, докато нормалните HUVES клетки проявяват значително по-ниска чувствителност. Това потвърждава селективния цитотоксичен ефект на комбинираната терапия спрямо туморните клетки.

- Комбинираното третиране с милтефозин и DMS понижава нивата на сфингозин-1-фосфат в раковите клетки A549, потвърждавайки, че инхибирането на S1P сигнализацията може да допринесе за антипролиферативния ефект.

Имайки предвид представените огромни по обем и разнообразни като методика на получаване експериментални резултати, трябва да се отбележи, че разделът *Обобщение* (Глава 5 в настоящия дисертационен труд), последван от разделите *Изводи* и *Приноси*, успешно резюмират и поставят направените изследвания в една обща рамка, което улеснява възприемането на резултатите в тяхната цялост. Похвално е и добавянето на раздел *Бъдещи научни планове*, където ясно са очертани нови посоки за изследване на ефектите на антитуморните липиди.

Към докторантката имам две препоръки във връзка с дисертационния труд. На някои места има допуснати и непоправени правописни грешки, което е нормално имайки

предвид обема на представената работа, но би било хубаво тези грешки да бъдат изчистени. Втората ми препоръка касае фигурите в рамките на дисертационния труд, които показват данни получени от прилагането на флуоресцентно-микроскопски техники или на флоуцитометричен анализ – тези фигури биха могли да се заменят с такива с по-голям размер и/или значително по-висока резолюция, за да се онагледят по-ясно и видимо представените резултати.

V. Публикации

Резултатите, получени в рамките на дисертационния труд са публикувани в три научни публикации в Q1, Q2 и Q3 журнали, а забелязаните цитати са вече 17.

Към докторантката имам следните въпроси:

- 1) Флуоресцентното багрило Di-4-ANEPPDHQ, което се използва за оценка на промените във флуидитета на клетъчната мембрана, разпределя ли се към останалите мембрани в клетките и това как би могло да повлияе оценката на флуидитета на клетъчната мембрана?
- 2) Спрямо какво са нормализирани GP (Generalized Polarization) стойностите, представени на фигури 33 и 34?
- 3) Имайки предвид факта, че милтефозинът е одобрен за приложение при човек за лечение на лейшманиоза, то какви са терапевтичните концентрации постижими в тялото на човек и как те се отнасят спрямо концентрационния диапазон на милтефозина, изследван в настоящия дисертационен труд?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представения ми за рецензия дисертационен труд докторант Тихомира Стоянова използва богат набор от експериментални техники, за да разкрие и характеризира задълбочено ефектите на антитуморните липиди еруфозин, милтефозин и диметилсфингозин върху миграцията, състоянието на клетъчната мембрана и пролиферацията при ракови клетъчни линии от рак на гърдата и рак на белия дроб. Получените оригинални резултати убедително показват потенциала на тези съединения в терапията на някои от най-социалнозначимите видове ракови заболявания и допринасят за по-доброто разбиране на техните молекулни и клетъчни механизми. Представеният труд напълно покрива изискванията за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Той демонстрира автора като задълбочен и компетентен изследовател, способен да решава сложни научни задачи и професионално да анализира и представя резултатите

си. Въз основа на изложеното, убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на Тихомира Тихомирова Стоянова образователната и научна степен „Доктор“.

28.02.2026
София

Рецензент:
/доц. д-р Радослав Александров /