

РЕЦЕНЗИЯ

От: Проф. д-р Ренета Тошкова, дм, секция „Патология“, ИЕМПАМ-БАН, определена за член на научно жури, съгласно Заповед № 1050/18.12.2025 г. на Директора на Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН и избрана за официален рецензент на първото заседание на научното жури, проведено на 29.01.2026 г. (заповед № 64/23.01.2026г)

ОТНОСНО: Дисертационен труд за защита и присъждане на образователната и научна степен „Доктор“, в научна Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. „Биологични науки“ и Научна специалност „Биофизика“ за нуждите на лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на ИБФБМИ, БАН.

Тема на дисертационния труд: „Анти-туморни липиди - влияние върху трансмембранната клетъчна сигнализация ”.

Автор на дисертационния труд: асистент Тихомира Тихомирова Стоянова, задочен докторант към лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на ИБФБМИ при БАН.

Научни ръководители: Проф. д-р Румяна Цонева, дб
Проф. д-р Албена Момчилова, дбн

Рецензията е изготвена в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България (ЗРААСРБ), Правилника за неговото прилагане (ППП) и вътрешните нормативни актове на Българската академия на науките и ИБФБМИ, БАН. Декларирам, че нямам конфликт на интереси с кандидата в настоящата процедура.

Материали по процедурата: Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита пред научно жури на разширен семинар на ИБФБМИ при БАН, проведен на 05.12.2025 г. Представените материали на хартиен и електронен носител отговарят на изискванията на ЗРАСРБ, правилника за неговото приложение и специфичните правилници на БАН и ИБФБМИ, и включват задължителните за процедурата материали.

Биографични данни за кандидата: Тихомира Тихомирова Стоянова е родена през 1991г. в гр. Плевен. През 2014 г. завършва Софийски университет "Св. Климент Охридски", София като бакалавър „Молекулярна биология“, и две магистратури: Магистър „Клетъчна биология и патология“ през 2016г и Магистър „Биология на развитието“ през 2017г. От октомври 2015 е назначена на длъжност специалист - биолог (2015-2019) в секция „Липид - белтъчни взаимодействия на ИБФБМИ, а от 2019г е асистент (2019-2021) към същата секция. Понастоящем заема длъжност асистент (от 2021) в лаборатория „Трансмембранна сигнализация“: През януари 2017г е зачислена като

Задочен докторант в Лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на ИБФБМИ, БАН. Докторантката е изпълнила образователната програма и е покрила изискуемите количествени критерии - положила е изпити за докторантски минимум по базов предмет, компютри, английски език и е преминала два специализирани курса.

Актуалност и значимост на дисертационния труд: Дисертационният труд е посветен на изключително актуален и социално значим проблем – терапия на злокачествените онкологични заболявания, които са една от водещите причини за смърт в световен и национален мащаб, и значително намаляват продължителността на живота. Нарастващата честота и смъртност от онкологични заболявания убедително подчертават необходимостта от разработване на терапии, насочени към нови молекулни мишени, създаване на селективни и добре поносими лекарства, както и разработване на нови и ефективни терапевтични стратегии. Вниманието е насочено към тройно негативен рак на гърдата и недребноклетъчен карцином на белия дроб, двата най-често срещани вида рак в световен мащаб, характеризиращи се с висока агресивност, ранно метастазиране, развитие на лекарствена резистентност и неблагоприятна прогноза. Това са едни от най-трудните за лечение онкологични заболявания. Акцентът е върху механизма на действие на противотуморните липиди и ролята на липидната сигнализация като нова терапевтична цел при злокачествените заболявания. В този аспект темата на дисертационния труд „Анти-туморни липиди - влияние върху трансмембранната клетъчна сигнализация“ е актуална и перспективна както от научна, така и от приложна гледна точка и и предлага високо ниво на иновативност.

Структура и същност на дисертационния труд. Дисертационният труд е написан на 128 нестандартни страници, и съдържа обичайните раздели: Заглавна страница, Съдържание – 5 стр.; Използвани съкращения – 4 стр.; Увод (Въведение) – 2 стр.; Литературен обзор – 30 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 18 стр; Резултати и дискусия – 44 стр.; Обобщение - 9 стр.; Изводи – 1 стр.; Приноси – 1 стр.; Литература – 16 стр.; Приложения – 5 стр.- Публикации; Цитати; Декларация, Бъдещи научни планове. Библиографската справка включва 236 литературни източника на латиница. Трудът е онагледен с 46 фигури и 3 таблици, от които - 16 фиг (с коректно цитиран източник в подфигурния текст) и 2 таблици в обзора, 2 фиг в материали и методи и 28 фигури и 1 таблица в раздел „Резултати“. Трудът следва класически модел на експериментална биомедицинска дисертация, демонстрира логическа последователност и отговаря на изискванията за дисертационен труд за ОНС „Доктор“.

Литературният обзор е съвременен, целенасочен и подробен. Отличава се с ясен и стегнат стил, и представя систематизирана научна информация по ключови тематични области. Описани са два основни типа

рак – на гърда и бял дроб. Характеризирани са най-широко използваните клетъчните линии от рак на гърдата на база наличие или отсъствие на 3 важни клетъчни рецептори: естрогенов (ER), прогестеронов (PR) и рецептор за човешки епидермален растежен фактор 2 (HER2), както и от рак на белия дроб. Подробно са разгледани механизмите на клетъчна смърт апоптоза, некроптоза, некроза; процесът на метастазиране и клетъчен цикъл на размножаване на раковите клетки. Направен е задълбочен преглед на липидния състав и организацията на клетъчните мембрани, флуидитета на мембраните, сфинголипидния реостат, както и ролята на биоактивните молекули церамид, сфингозин-1-фосфат (S1P), и протеин киназа C α (PKC α) в регулацията на клетъчното оцеляване. Висока оценка заслужава умелото интегриране на сложни молекулярни механизми и тяхното значение за туморното оцеляване и размножаване. Отделено е внимание на антитуморните липиди, които въздействат върху клетъчната мембрана и редица сигнално-трансдукционни пътища, за разлика от класическите химиотерапевтици които се насочват директно към ДНК или митотичния апарат. Подробно са представени три антитуморни липида – два представители на алкилфосфохолините: еруфозин (EPC3) и милтефозин (HePC), и D-еритро-N,N-диметилсфингозин (DMS) – представител на сфинголипидния клас липидни молекули. Докторантката показва отлична литературна осведоменост, задълбочени познания в сравнително специализирана научна област - липидни сигнални пътища и антитуморни липиди, както и способност умело да анализира научни факти. **Целта** на дисертационния труд е логично изведена и формулирана: „Да се изследва механизмът на действие на анти-туморни липиди върху трансмембранната сигнализация при ракови клетки“. За постигането на целта правилно са набелязани **6 конкретни** задачи, като всяка задача надгражда предходната и допринася за цялостното разкриване на механизма на действие на изследваните антитуморни липиди, и предлага нова терапевтична стратегия базирана на „сфинголипиден реостат“ (превключване от пролиферация на туморните клетки към програмирана клетъчна смърт- апоптоза).

Оценка на използваните материали и методи на изследване: Използваният методичен подход е комплексен, обширен и модерен. Експерименталният материал е напълно достъпъчен по обем. Опитите са поставени и извършени правилно при наличието на съответни стандарти и контроли. Изборът на изследвани онкологични *in vitro* моделни системи (клетъчни линии от рак на гърдата и рак на белия дроб) и съответните контроли, както и на плазмиди, китове и реактиви е напълно обоснован и отговаря на приоритетите на съвременната медицинска онкология. Методите са описани старателно и подробно, което позволява тяхната възпроизводимост и от други изследователи.

Докторантката е усвоила и прилага както утвърдени класически клетъчни и биологични методи (MTT, миграция-Scratch Assay, флуоресцентно оцветяване с фалоидин-TRITC; AO/EtBr, DAPI, RT-PCR), така и прецизни флуоресцентни анализи (клетъчен цикъл, тип индуцирана клетъчна смърт). Висока оценка заслужава включването на модерни биофизични методи, които рядко се срещат в стандартни дисертационни изследвания - сканираща флуоресцентно корелационна спектроскопия (sFCS) на клетки, флуоресцентни методи за анализ на мембранния флуидитет базирани на маркиране с Di4-ANEPPDHQ (конфокална микроскопия) и липидомни подходи (липидна екстракция, газова хроматография за холестерол). Допълнително предимство е прилагането на биохимични и молекулярни техники за изследване на сигнално-трансдукционни пътища, включващи анализ на протеинова фосфорилация (Western blot), определяне на биоактивни липидни медиатори (сфингозин-1-фосфат чрез ELISA), цитокинеза-блок микроядрен анализ (CBMN) на клетки и изчисляване на комбинационен индекс за оценка на синергичен терапевтичен ефект.

Методологичната част е много силна. Показва много добър експериментален опит на докторантката и умение за интегриране на множество данни от различни експериментални подходи – клетъчни, биофизични, молекулярни, биохимични и др. Проучването на антитуморни липиди като еруфозин, милтефозин и DMS представлява иновативен и съвременен подход, който се вписва в актуалните тенденции на онкологията за търсене на терапии с нови молекулни мишени и избор на селективни и по-малко токсични химиотерапевтици. Може да се обобщи, че използваната методология е напълно адекватна на поставените цели и задачи, и осигурява висока информативност и надеждност на получените резултати, и отговаря на изискванията за научноизследователски труд от висока категория.

Оценка на получените резултати: Разделът „Резултати и дискусия“ включва голям обем собствени данни на докторантката. Те са представени систематично в последователност, следваща планираните в дисертацията задачи. Експерименталните резултати са обособени в две самостоятелни, но тематично свързани части: Част I. Изследване на ефекта на еруфозин върху клетъчни линии от рак на гърдата с различен метастатичен потенциал (силно инвазивна MDA-MB-231, ниско инвазивна MCF-7 и нормална клетъчна линия MCF-10A); и Част II. Изследване на ефекта на милтефозин и DMS върху клетъчни линии A549 (аденокарцином на човешки белодробен епител) и HUVEC. Резултатите са онагледени с 28 дву- и многокомпонентни фигури и 1 таблица. Данните са статистически достоверни и са интерпретирани точно, което говори за професионализъм на докторантката. Накратко резултатите могат да бъдат описани както следва:

-Установен е изразен и селективен дозо- и време-зависим цитотоксичен ефект на еруфозин спрямо клетки от рак на гърдата, като най-висока чувствителност се наблюдава при силно агресивната тройно негативна клетъчна линия MDA-MB-231.

-Анализът на клетъчния цикъл разкрива, че еруфозинът индуцира задържане във фаза G2/M и натрупване на клетки в суб-G1 фракцията, съчетано с намаляване на S-фазата, което е индикатор за митотичен арест и програмирана клетъчна смърт. Ефектът е по-силно изразен при MDA-MB-231 клетки и не се установява при нормалните MCF-10A клетки.

-Молекулярният анализ показва, че еруфозинът потиска експресията на ключови регулатори на клетъчния цикъл – комплексите Cyclin B/CDK1 и Cyclin E2/CDK2, и обяснява от молекулярна гледна точка установения митотичен арест и блокиране на преходите G1/S и G2/M. Тези резултати подкрепят хипотезата, че еруфозинът нарушава координацията между клетъчната пролиферация и сигналните механизми, контролиращи клетъчния цикъл.

-Резултатите от морфологични, флуоресцентни и флоу-цитометрични анализи показват, че еруфозинът в терапевтични концентрации индуцира предимно ранна апоптоза, докато късна апоптоза и некроза се наблюдават главно при високи дози и продължително третиране. Отново се отчита по-висока чувствителност на MDA-MB-231 клетки спрямо MCF-7 клетки, докато нормалните клетки са с минимални промени

-Еруфозинът значително потиска миграцията и адхезията на MDA-MB-231 клетките по концентрационно- и времезависим начин, и тези резултати са в корелация с данните за промени в актиновия цитоскелет- ключов фактор за инвазивността на туморните клетки.

-Биофизичните и липидомни анализи показват, че еруфозинът понижава подредеността на плазмената мембрана, увеличава мембранный флуидитет и променя липидния ѝ състав чрез редукция на холестерол, сфингомиелин и фосфатидилхолин, както и повишаване на фосфатидилсерин. Тези промени водят до нарушаване на липидните рафтове и активиране на апоптотични сигнални пътища. Допълнително е установено, че еруфозинът увеличава дифузионната динамика на трансмембранни протеини, без да променя тяхната локализация, което показва комплексно въздействие върху мембранната организация и сигнализация и потвърждава ролята на мембраната като основна терапевтична мишена за еруфозина

- Установен е синергичен цитотоксичен ефект върху туморни клетки от недребноклетъчен белодробен карцином (A549) при комбинирано приложение на милтефозин и D-еритро-N,N-диметилсфингозин (DMS). Изчислените комбинационни индекси потвърждават наличие на по-силен антитуморен ефект при по-ниски концентрации и ограничена цитотоксичност към нормални HUVEC клетки, което е от значение за понижаване на токсичността и намаляване на страничните ефекти.

-Чрез морфологични, FACS и биохимични анализи е установено, че комбинираната терапия милтефозин/DMS индуцира апоптоза в туморните клетки чрез активиране на вътрешния митохондриален път, както и значително понижава нивата на S1P (сфингозин-1-фосфат) чрез синергично двойно инхибиране на SK1(сфингозин киназа 1) – директно от DMS, и на PKC (протеин киназа C) индиректно от милтефозин.

В заключение, резултатите убедително показват, че антитуморните липиди модулират мембранната организация, трансмембранната липидна сигнализация и ключови регулаторни пътища на клетъчния цикъл и апоптозата, и подкрепят тяхното приложение като основа за разработване на нови, по-селективни терапевтични подходи в онкологията.

Обсъждането е направено паралелно с представяне на получените резултати. Много добро решение е оформянето на самостоятелен раздел **Обобщение**, който задълбочено, аналитично, много компактно и убедително резюмира всички получени резултати от последователно реализирания научен план, комплексната експериментална методология и задълбоченото разбиране на молекулярните и клетъчните механизми на действие на антитуморните липиди. Резултатите подчертават потенциала за клинична приложимост на проведените изследвания и тяхната насоченост за лечение на едни от най-трудните злокачествени заболявания – рак на гърдата и на бял дроб. Силно впечатление правят две обстоятелства: аргументирано обсъждане на конкретните резултати в полза на коректно формулирани хипотези и обективно анализиране на получените собствени резултати в светлината на известните такива в научната литература. Тук трябва да се отбележи високата информираност и обективност на докторанката и научните ръководители.

Правилно изведени и много точно формулирани са **8 извода**, които приемам изцяло. Те са конкретни и отразяват адекватно получените резултати.

Оценка на приносите в дисертационния труд: Очертани са 5 научни приноси. Те са безспорни, обогатяват науката и отразяват нови до настоящия момент значими научни факти с потенциално клинично приложение. Приносите могат да се дефинират в две категории: оригинални (фундаментални) (1, 2 и 3) и научно –приложни (4 и 5).

Оригинални приноси: **1.** За първи път е демонстрирана пряка 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. **2.** За първи път е установено, че комбинираното третиране с милтефозен (HePC) и D-еритро-N,N-диметилсфингозин (DMS) проявява синергичен цитотоксичен ефект върху клетки от рак на бял дроб. **3.** Комбинираното третиране с милтефозин (HePC) и D-еритро-N,N-

диметилсфингозин (DMS) води до инхибиране на сигналните пътища, свързани със сфингозин киназа 1 и протеин киназа C, намаляване нивата на сфингозин-1-фосфат (S1P) в раковите клетки и индуцира апоптоза чрез активиране на вътрешния митохондриален път.

Научно-приложни приноси: 4. Високата селективност на използваните алкилфосфохолини (еруфозин и милтефозин) към високометастатичната ракова линия MDA-MB-231 и белодробната ракова линия A549, и същевременно слабият им ефект върху нормални MCF-10A и HUVES клетки, е предпоставка за използването им в съвременната антитуморна терапия. 5. Откритият синергичен цитотоксичен ефект на комбинацията милтефозин и DMS върху туморни клетки позволява постигане на по-висок терапевтичен резултат при по-ниски концентрации на милтефозина и намаляване на страничните ефекти. В допълнение добавям още един значим принос: 6. Апробиран е комплексен експериментален подход, обединяващ клетъчни, молекулярни, биохимични и биофизични методи, който позволява цялостна оценка на ефекта на антитуморните липиди на ниво мембрана и клетка и има методологична и научна стойност за бъдещи изследвания с теоретичен и приложен характер.

Критични бележки, препоръки, въпроси: Като цяло дисертационният труд е написан на много добър научен език. Нямам критични бележки и въпроси по същество. Похвално е, че въз основа на придобития опит и знания докторантката има визия и очертава насоки за по-нататъшното развитие и продължаване на изследванията. Бих отбелязала някои пропуски от технически характер: повторената номерация на фиг.18, променя общия брой на фигурите в дисертацията от 45 на 46; както и липсата на описание на статистически метод в раздел „Материали и методи“ въпреки, че за 11 фигури (за които се изисква статистически анализ) в раздел „Резултати и дискусия“ е цитиран метода по който е установена статистическата достоверност на резултатите. Направените редакционни забележки не намаляват научната оригиналност и значимост на извършените изследвания и не променят становището ми за отличен стил, език и форма на представяне на дисертационния труд.

Оценка на автореферата: Авторефератът е с обем от 70 страници. Изготвен е съгласно нормативните изисквания. Оформен е много добре графично и напълно съответства на съдържанието на дисертацията. Позволява да се придобие цялостна и обективна представа за научната стойност и значимост на проведеното изследване.

Публикации във връзка с дисертационния труд: Резултатите от дисертацията са включени в 3 статии, отпечатани на английски език в реферирани и индексирани в световна база данни списания, една в *Chemico-Biological Interactions*, с IF 3.723 (2019), SJR 1.112 и квартал Q1, една в *Biomolecules*, с IF 4.879 (2020), SJR 1.33 и квартал Q2; и една в

Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, с IF 0.3, SJR 0.15 и квантил Q3. Общият ИФ е 8.9 Научните публикации са в съавторство, и докторантката е първи, втори и трети автор в тях. Резултати по темата на дисертацията са представени с 6 доклада на научни форуми в страната, от които четири са с международно участие. Личният принос на докторантката в разработването на дисертационния труд е безспорен. Забелязани са 17 цитата в международни списания, на две от статиите, което показва засилен интерес на международната научната общност. Изследванията, включени в дисертацията са проведени в лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на ИБФБМИ при БАН с подкрепата на проекти в които докторантката е участник (проектш по двустранно сътрудничество с Германия и финансирани от ФНИ при МОН). Може да се обобщи, че научната продукция и наукометричните показатели напълно удовлетворяват заложените количествени критерий в ЗРАСРБ и съответните институционални правилници.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд е завършен, научно обоснован и актуален. Демонстрира задълбочена изследователска работа и съдържа приноси с научен и научно-приложен характер. Получените данни разширяват знанието за ролята на липидната сигнализация в онкогенезата, потвърждават ролята на мембраната като основна терапевтична мишена на антитуморните липиди и очертават перспектива за разработване на нови, терапевтични подходи в онкологичната медицинска практика. Научните трудове са публикувани в международни списания с висок квантил. В хода на докторантурата асистент Тихомира Стоянова е придобила нови теоритични и практически умения, и способност творчески да анализира научни резултати, да формулира научни изводи и приноси, да оформя научни статии, да работи в екип.

Считам, че представеният дисертационен труд по обем, съдържание и актуалност напълно отговаря, а в някои аспекти значително надвишава количествените критерии за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, съгласно ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и правилниците на БАН и ИБФБМИ-БАН.

Въз основа на всичко казано до тук, давам положителна и висока оценка на дисертационния труд, убедено гласувам с „Да“ и предлагам на членовете на уважаемото Научно жури да присъди на асистент Тихомира Тихомирова Стоянова образователната и научна степен „Доктор“, в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. „Биологични науки“ и Научна специалност „Биофизика“ за нуждите на лаборатория „Трансмембранна сигнализация“ на ИБФБМИ при БАН.

25.02.2026 г.

гр.София

Рецензент:

/Проф. д-р Ренета Тошкова, Доктор/