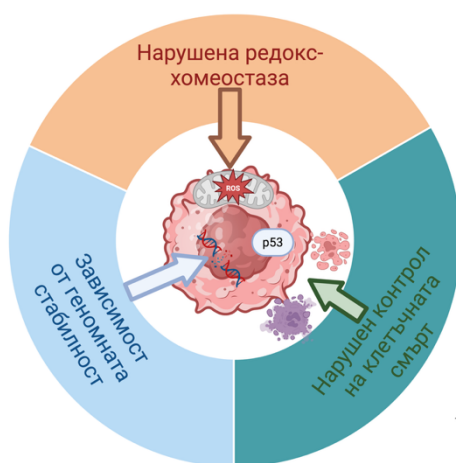


ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ „АКАД.
РУМЕН ЦАНЕВ“ – БАН

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИЯ
ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА НАУЧНАТА СТЕПЕН
„ДОКТОР НА БИОЛОГИЧЕСКИТЕ НАУКИ“

НА ТЕМА:
ОБЩА МИШЕНА, РАЗЛИЧНИ АГЕНТИ:
ФУНДАМЕНТАЛНИТЕ УЯЗВИМОСТИ НА ТУМОРНАТА
КЛЕТКА КАТО ОСНОВА ЗА СЕЛЕКТИВНО
ПРОТИВОТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ



ПРОФ. Д-Р ИВА УТРИНОВА
СОФИЯ, 01.07. 2026 Г.

СЪДЪРЖАНИЕ

БЛАГОДАРНОСТИ

1. УВОД

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

2.2. НАУЧНИ ЗАДАЧИ

3. РЕЗУЛТАТИ

НАПРАВЛЕНИЕ 1

НАПРАВЛЕНИЕ 2

НАПРАВЛЕНИЕ 3

4.1. КОНВЕРГЕНЦИЯ НА СТРУКТУРНО РАЗЛИЧНИ АНТИТУМОРНИ АГЕНТИ КЪМ ОБЩИ КЛЕТЪЧНИ МЕХАНИЗМИ

4.2. ТРИТЕ ТУМОРНИ УЯЗВИМОСТИ КАТО ОРГАНИЗИРАЩИ ОСИ

4.3. СЕЛЕКТИВНОСТТА КАТО СВИДЕТЕЛСТВО ЗА УЯЗВИМОСТ-НАСОЧЕНО ДЕЙСТВИЕ

4.4. ОТ БИОЛОГИЧНО АКТИВНАТА МОЛЕКУЛА ДО ТЕРАПЕВТИЧНОТО ПРИЛОЖЕНИЕ: РОЛЯТА НА ПОЛИМЕРНИТЕ НАНОСИСТЕМИ

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

6. НАУЧНИ ПРИНОСИ

6.1. ПРИНОСИ С ФУНДАМЕНТАЛЕН ХАРАКТЕР

6.2. ПРИНОСИ С ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ХАРАКТЕР

6.3. ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

7. ИЗВОДИ

8. ПЕРСПЕКТИВИ И БЪДЕЩО РАЗВИТИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

8.1. РАЗВИТИЕ НА НАФТАЛИМИДНАТА ПЛАТФОРМА

8.2. ПОЛИМЕРНИ НАНОСИСТЕМИ И ТАРГЕТИРАНА ДОСТАВКА

8.3. МОРСКИ БИОРЕСУРСИ И *RAPANA VENOSA*

8.4. ПРИРОДНИ ПРОДУКТИ И ЗЕЛЕНИ БИОТЕХНОЛОГИИ

9. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИЯТА

БЛАГОДАРНОСТИ

Изследванията, включени в настоящия дисертационен труд, са осъществени в периода 2017–2026 г. с финансовата подкрепа на научноизследователски проекти на Фонд „Научни изследвания“:

1. Нови фeroцен-съдържащи камфор сулфонамиди - антитуморна активност и механизъм на действие. № на договор: ДН11/16
2. Антитуморна активност и механизъм на действие на новосинтезирани ДНК-интеркалиращи хетероциклично кондензирани нафталимиди. № на договор: КП06-Н61/1
3. Циклични полимерни "четки" - иновативни платформи за синтез на сферични нуклеинови киселини и доставяне на лекарства и полинуклеотиди. № на договор: КП06-Н89/2
4. Нови биокomпоненти и биогенни наночастици от хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa* срещу рак на кожата № на договор: КП06-Н81/6

Изследванията са подкрепени и от Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина“ — БиоАктивМед на МОН, договор № Д01/217.

Представените резултати са плод на дългогодишно сътрудничество между специалисти от различни научни области и научни институции в България и чужбина.

Специална благодарност се изказва на Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – Българска академия на науките, който осигури научната среда, инфраструктурата и административната подкрепа за реализиране на значителна част от изследванията, включени в настоящия труд.

Авторът изразява най-искрената си благодарност към всички колаборатори, както и към колегите, докторантите и студентите от секция „Структура и функция на хроматина“, без чиято всеотдайна подкрепа този труд не би бил възможен.

1. УВОД

Раковите заболявания представляват един от най-значимите здравни проблеми на съвременното общество. Според данните на Международната агенция за изследване на рака (IARC) към Световната здравна организация (СЗО), през 2022 г. в световен мащаб са регистрирани около 20 милиона нови случая на онкологични заболявания и близо 9,7 милиона смъртни случая [1, 2]. Приблизително всеки пети човек развива рак в хода на живота си, като всеки девети мъж и всяка дванадесета жена умират вследствие на злокачествено заболяване [3]. Прогнозите сочат, че до 2050 г. броят на новодиагностицираните случаи ще нарасне до над 35 милиона, като увеличението ще възлезе на 77% спрямо настоящите данни — тенденция, която се дължи предимно на застаряването и нарастването на световното население (Фигура 1) [1, 4].

Сред всички видове злокачествени заболявания ракът на белия дроб е най-разпространеният в глобален мащаб (12,4% от новите случаи) и едновременно с това — водещата причина за смъртност (18,7% от онкологичните смъртни случаи). Следват го ракът на гърдата (11,6%), колоректалният рак (9,6%), ракът на простатата (7,3%) и стомашният рак (4,9%) [1, 3]. В контекста на настоящия дисертационен труд особено значение имат ракът на белия дроб, ракът на гърдата и донякъде ракът на простатата кожният меланом, тъй като именно срещу клетъчните модели на тези заболявания са насочени изследванията, описани в следващите глави. Въпреки значителния напредък в областта на онкологията, включително развитието на таргетирани терапии, имунотерапия и персонализирана медицина, конвенционалната химиотерапия остава основен стълб на лечение при повечето солидни тумори. Нейните принципни ограничения обаче са добре известни: неселективна цитотоксичност с увреждане на здравата тъкан, значителни нежелани ефекти и не на последно място - феноменът лекарствена резистентност.

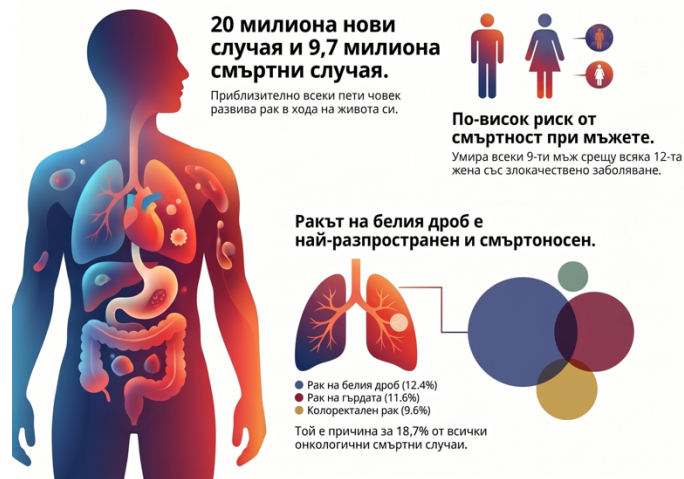
Придобитата и вродената мултилекарствена резистентност е отговорна за около 90% от неуспехите на химиотерапевтичното лечение при метастатичен карцином [5, 6]. Генетичната хетерогенност на туморните клетки, активирането на

алтернативни сигнални пътища и промените в лекарствения метаболизъм допринасят за постепенното развитие на резистентен фенотип [7].

Глобалната тежест на рака: Статистика и прогнози (2022–2050)

Този преглед представя ключови данни от Международната агенция за изследване на рака (IARC) за 2022 г. и сравнителен анализ с прогнозите за 2050 г., като акцентира върху водещите видове заболявания и демографските причини за техния ръст.

2022: Текущото състояние на глобалното здраве



2050: Бъдещи предизвикателства

Очакван скок до над 35 милиона нови случая.

Това представлява драматично увеличение от 77% спрямо данните от 2022 г.

Демографските промени са водещ фактор за ръста.



Тенденцията се дължи основно на застаряването и нарастването на световното население.

NotebookLM

Фигура 1. Глобалната тежест на рака: актуално състояние и прогнози до 2050 г. Източник: адаптирано по данни на International Agency for Research on Cancer (IARC), GLOBOCAN 2022 и прогнози за периода 2022–2050, визуализация с NotebookLM.

Преодоляването на тези ограничения изисква интегриран подход, съчетаващ разработването на нови биологично активни молекули, идентифицирането на алтернативни молекулни мишени и създаването на ефективни системи за доставка. През последните две десетилетия значителен интерес предизвикват както синтетичните малки молекули с нови механизми на действие, така и природните продукти, които продължават да бъдат неизчерпаем източник на структурно разнообразие и биологична активност. Паралелно с това развитието на наномедицината открива нови възможности за повишаване на селективността, бионаличността и терапевтичната ефективност на противотуморните агенти. Тези направления постепенно се утвърждават като взаимнодопълващи се стратегии в

съвременната онкологична фармакология, насочени към по-ефективно и по-прецизно повлияване на туморните клетки.

Независимо от различния химичен произход на изследваните съединения и биологични системи, значителна част от тях въздействат върху ограничен брой фундаментални уязвимости на туморната клетка. Сред тях особено значение имат нарушенията в редокс-хомеостазата, репликационният стрес, уврежданията на ДНК и активирането на програми за клетъчна смърт.

Настоящият дисертационен труд е изграден върху хипотезата, че структурно различни синтетични и природни агенти могат да индуцират противотуморен ефект чрез конвергенция към общи клетъчни механизми. Поради това основен акцент е поставен върху ролята на оксидативния и репликационния стрес, нарушенията в ДНК интегритета, p53-зависимите сигнални пътища и механизмите на програмирана клетъчна смърт като определящи фактори за туморната чувствителност към терапевтично въздействие.

Изследванията, включени в настоящия дисертационен труд обхващат три взаимнодопълващи се научни направления, които включват разработването на нови синтетични антитуморни агенти (фероцен-съдържащи камфор сулфонамиди и хетероциклично-анулирани нафталимиди), изследването на природни източници на биологична активност (морски молюски, растителни и гъбни продукти), допълнени от прилагане на иновативни полимерни наносистеми за оптимизиране на лекарствената доставка. По този начин са представени всички основни етапи от съвременния процес на създаване на противотуморни средства – от откриването на активни молекули до подобряване на тяхната фармацевтична приложимост.

Проведените изследвания са реализирани в Института по молекулярна биология "Акад. Румен Цанев" — БАН, в рамките на национални научни проекти, с активното участие на докторанти, постдокторанти и наши колаборатори от България и чужбина. Резултатите са публикувани в 10 рецензирани научни статии в реномирани международни издания (Web of Science / Scopus), покриващи периода 2021–2026 г. Резултатите, представени в тези публикации, формират научната основа на дисертацията, проследявайки развитието на една

последователна изследователска програма – от откриването на нови синтетични и природни антитуморни агенти, през изясняването на техните молекулни механизми на действие, до разработването на съвременни подходи за подобряване на тяхната фармацевтична приложимост. Получените резултати показват, че независимо от химичната природа на използваните молекули, противотуморният ефект може да бъде постигнат чрез въздействие върху ограничен брой фундаментални клетъчни уязвимости, свързани с поддържането на геномната стабилност, редокс-хомеостазата и програмите за клетъчно оцеляване.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Раковите заболявания продължават да бъдат водеща причина за смъртност в глобален мащаб, а наличните химиотерапевтични подходи са ограничени от липса на туморна селективност, нежелани странични ефекти и неизбежната поява на лекарствена резистентност. В отговор на тези предизвикателства настоящият дисертационен труд е насочен към системно идентифициране и охарактеризиране на нови антитуморни агенти от синтетичен и природен произход, с акцент върху молекулните механизми на тяхното действие и разработването на стратегии за повишаване на тяхната фармацевтична приложимост чрез полимерни наносистеми за доставка.

Изследванията са реализирани в три взаимосвързани тематични направления, намерили отражение в 10 публикации в реномирани международни научни издания. Обединяващата концепция на представените изследвания е, че структурно различни синтетични и природни агенти могат да реализират противотуморния си ефект чрез въздействие върху общи клетъчни уязвимости, а съвременните наносистеми могат да повишат тяхната терапевтична приложимост. Поради това в настоящия труд е приложен интегриран подход, обхващащ първите етапи на едно предклинично изследване – от идентифицирането на биологично активни молекули и изясняването на техните механизми на действие до разработването на стратегии за тяхната оптимизирана доставка.

2.1. Цел на дисертационния труд

Целта на настоящия дисертационен труд е да се покаже, че структурно различни синтетични и природни биологично активни агенти могат да реализират селективен противотуморен ефект чрез въздействие върху ограничен брой фундаментални уязвимости на туморната клетка, и да се разработят подходи за повишаване на тяхната фармацевтична приложимост чрез съвременни полимерни наносистеми.

2.2. Научни задачи

В рамките на тази обща цел са формулирани шест конкретни научни задачи:

Задача 1. Да се изследва цитотоксичната и противотуморната активност на новосинтезирани фeroцен-съдържащи камфор сулфонамидни производни, като се охарактеризират молекулните механизми на тяхното действие.

Задача 2. Да се охарактеризират биологично новосинтезирани хетероциклично-анулирани нафталимидни производни и да се изследва ролята на репликационния стрес, ДНК уврежданията и клетъчния отговор към генотоксичен стрес за реализиране на техния противотуморен ефект.

Задача 3. Да се оцени антитуморният потенциал на природни продукти от морски, растителен и гъбен произход и да се идентифицират клетъчните механизми, свързани с тяхната биологична активност.

Задача 4. Да се охарактеризират биологично новоразработени полимерни наносистеми за доставка на биологично активни съединения с цел подобряване на тяхната разтворимост, стабилност, клетъчно натрупване и терапевтична ефективност.

Задача 5. Да се идентифицират общите фундаментални уязвимости на туморната клетка, чрез които структурно различни синтетични и природни агенти реализират селективния си противотуморен ефект.

3. РЕЗУЛТАТИ

Експерименталната основа на настоящия дисертационен труд се формира от 10 научни публикации, публикувани в рецензирани международни списания през периода 2021–2026 г.

Публикациите са групирани в три тематични направления, съответстващи на основните изследователски области на дисертацията. Те съдържат оригиналните резултати, върху които е изграден настоящият дисертационен труд и проследяват развитието на последователна изследователска програма, насочена към идентифициране на нови антитуморни агенти, изясняване на техните молекулни механизми на действие и разработване на подходи за повишаване на тяхната селективност и фармацевтична приложимост.

В следващите подраздели са представени първите страници на използваните публикации, които съдържат съответните резюмета и са групирани по тематични направления.

РАЗДЕЛИТЕЛ 1

НАПРАВЛЕНИЕ 1

ФЕРОЦЕН-СЪДЪРЖАЩИ КАМФОР СУЛФОНАМИДИ

Публикации, представящи синтеза, противотуморната активност и молекулния механизъм на действие на фероцен-камфор-сулфонамидните производни (DK-164, CC-78) и тяхното наноформулиране.

1. Schröder, M., Petrova, M., Vlahova, Z., Dobrikov, G. M., Slavchev, I., Pasheva, E., & **Ugrinova, I** (2022). **In vitro anticancer activity of two ferrocene-containing camphor sulfonamides as promising agents against lung cancer cells.** Biomedicines, 10(6), 1353. **IF 4.5 Q1**
2. Schröder, M., Petrova, M., Dobrikov, G. M., Grancharov, G., Momekova, D., Petrov, P. D., & **Ugrinova, I** (2023). **Micellar Form of a Ferrocene-Containing Camphor Sulfonamide with Improved Aqueous Solubility and Tumor Curing Potential.** Pharmaceutics, 15(3), 791. **IF 6.9 Q1**



Article

In Vitro Anticancer Activity of Two Ferrocene-Containing Camphor Sulfonamides as Promising Agents against Lung Cancer Cells

Maria Schröder ^{1,†}, Maria Petrova ^{1,†} , Zlatina Vlahova ¹, Georgi M. Dobrikov ² , Ivaylo Slavchev ², Evdokia Pasheva ¹ and Iva Ugrinova ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Biology “Akad. Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str, bl 21, 1113 Sofia, Bulgaria; marias82@abv.bg (M.S.); mhristova84@abv.bg (M.P.); vlahova94@gmail.com (Z.V.); eva@bio21.bas.bg (E.P.)

² Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str, bl 9, 1113 Sofia, Bulgaria; gmdob@orgchm.bas.bg (G.M.D.); ivailo.slavchev@orgchm.bas.bg (I.S.)

* Correspondence: ugriva@gmail.com; Tel.: +359-887-985-463

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The successful design of antitumour drugs often combines in one molecule different biologically active subunits that can affect various regulatory pathways in the cell and thus achieve higher efficacy. Two ferrocene derivatives, DK-164 and CC-78, with different residues were tested for cytotoxic potential on non-small lung cancer cell lines, A549 and H1299, and non-cancerous MRC5. DK-164 demonstrated remarkable selectivity toward cancer cells and more pronounced cytotoxicity against A549. The cytotoxicity of CC-78 toward H1299 was even higher than that of the well-established anticancer drugs cisplatin and tamoxifen, but it did not reveal any noticeable selective effect. DK-164 showed predominantly pro-apoptotic activity in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells, while CC-78 caused accidental cell death with features characteristic of necrosis. The level of induced autophagy was similar for both substances in cancer cells. DK-164 treatment of A549, H1299, and MRC5 cells for 48 h significantly increased the fluorescence signal of the NFκB (nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells) protein in the nucleus in all three cell lines, while CC-78 did not provoke NFκB translocation in any of the tested cell lines. Both compounds caused a significant transfer of the p53 protein in the nucleus of A549 cells but not in non-cancerous MRC5 cells. In A549, DK-164 generated oxidative stress close to the positive control after 48 h, while CC-78 had a moderate effect on the cellular redox status. In the non-cancerous cells, MRC5, both compounds produced ROS similar to the positive control for the same incubation period. The different results related to the cytotoxic potential of DK-164 and CC-78 associated with the examined cellular mechanisms induced in lung cancer cells might be used to conclude the specific functions of the various functional groups in the ferrocene compounds, which can offer new perspectives for the design of antitumour drugs.

Keywords: ferrocene derivatives; lung cancer; cytotoxicity; apoptosis; autophagy; ROS



Citation: Schröder, M.; Petrova, M.; Vlahova, Z.; Dobrikov, G.M.; Slavchev, I.; Pasheva, E.; Ugrinova, I. In Vitro Anticancer Activity of Two Ferrocene-Containing Camphor Sulfonamides as Promising Agents against Lung Cancer Cells. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1353. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061353>

Received: 19 May 2022

Accepted: 6 June 2022

Published: 8 June 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chemotherapy plays a significant role in the treatment of cancer worldwide. That is why the identification and study of new promising molecular structures as potential anticancer drugs is a great challenge. Chemotherapeutics, combining several biologically active subunits in one molecule, can modulate different regulatory pathways in the cell and thus achieve higher efficacy than drugs that affect only one cellular process [1–3]. The success of cisplatin in antitumour therapy as one of the main chemotherapeutics in clinical practice motivated scientists’ interest in metal compounds. In the last few decades, several cisplatin analogues have been developed as potential antitumour agents, but only



Article

Micellar Form of a Ferrocene-Containing Camphor Sulfonamide with Improved Aqueous Solubility and Tumor Curing Potential

Maria Schröder ^{1,†}, Maria Petrova ^{1,†}, Georgi M. Dobrikov ², Georgy Grancharov ³, Denitsa Momekova ⁴, Petar D. Petrov ^{3,*} and Iva Ugrinova ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Biology “Akad. Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., bl 21, 1113 Sofia, Bulgaria

² Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., bl 9, 1113 Sofia, Bulgaria

³ Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev St., bl 103A, 1113 Sofia, Bulgaria

⁴ Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, 2 Dunav St., 1000 Sofia, Bulgaria

* Correspondence: ppetrov@polymer.bas.bg (P.D.P.); ugriviva@gmail.com (I.U.); Tel.: +359-02-979-6335 (P.D.P.); +359-887-985-463 (I.U.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The discovery of new anticancer drugs with a higher, more specific activity and diminished side effects than the conventional chemotherapeutic agents is a tremendous challenge to contemporary medical research and development. To achieve a pronounced efficacy, the design of antitumor agents can combine various biologically active subunits in one molecule, which can affect different regulatory pathways in cancer cells. We recently demonstrated that a newly synthesized organometallic compound, a ferrocene-containing camphor sulfonamide (DK164), possesses promising antiproliferative activity against breast and lung cancer cells. However, it still encounters the problem of solubility in biological fluids. In this work, we describe a novel micellar form of DK164 with significantly improved solubility in aqueous medium. DK164 was embedded in biodegradable micelles based on a poly(ethylene oxide)-*b*-poly(α -cinnamyl- ϵ -caprolactone-*co*- ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene oxide) triblock copolymer (PEO₁₁₃-*b*-P(CyCL₃-*co*-CL₄₆)-*b*-PEO₁₁₃), and the physicochemical parameters (size, size distribution, zeta potential, encapsulation efficiency) and biological activity of the obtained system were studied. We used cytotoxicity assays and flow cytometry to determine the type of cell death, as well as immunocytochemistry to assess the influence of the encapsulated drug on the dynamics of cellular key proteins (p53 and NFkB) and the process of autophagy. According to our results, the micellar form of the organometallic ferrocene derivate (DK164-NP) exhibited several advantages compared to the free substance, such as higher metabolic stability, better cellular uptake, improved bioavailability, and long-term activity, maintaining nearly the same biological activity and anticancer properties of the drug.

Keywords: block copolymers; polymeric micelles; cancer therapy; ferrocene-based drugs



Citation: Schröder, M.; Petrova, M.; Dobrikov, G.M.; Grancharov, G.; Momekova, D.; Petrov, P.D.; Ugrinova, I. Micellar Form of a Ferrocene-Containing Camphor Sulfonamide with Improved Aqueous Solubility and Tumor Curing Potential. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 791. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030791>

Academic Editor: Tomáš Etrych

Received: 1 February 2023

Revised: 23 February 2023

Accepted: 25 February 2023

Published: 27 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is the second-leading cause of death in the world [1]. The cancer burden continues to grow globally, exerting tremendous physical, emotional, and financial strains on both social and health systems. Along with surgery, irradiation, and immunotherapy, the most commonly used approach for treating cancer is chemotherapy, which applies different cytotoxic substances causing cell death in cancer tissue [2]. Unfortunately, these chemotherapeutic drugs have many disadvantages, including a short circulation half-life, restricted targeting, and low specificity, and can cause damage to both healthy and cancerous cells [3–5]. Consequently, most drug development efforts are focused on novel cancer therapeutics with improved properties.

РАЗДЕЛИТЕЛ 2

НАПРАВЛЕНИЕ 2

ХЕТЕРОЦИКЛИЧНО-АНУЛИРАНИ НАФТАЛИМИДИ

Публикации, представящи бензодиоксин- и бензофуран-анулираните нафталимидни производни като индуктори на репликационен стрес и ДНК увреждания, с двойна p53-зависима и p53-независима активност.

3. Vlahova, Z., Lazarov, L., Petrova, M., Yusein-Myashkova, S., Mutovska, M., Stoyanov, S., Zaganyarski, Y. and **Ugrinova, I.**, 2026. **Benzofuran-Annulated Naphthalimides Trigger Replication Stress, DNA Damage, and p53-Dependent Cell Cycle Arrest** *Pharmaceutics*, 18(7), p.754. **IF 6.9 Q1**
4. Vlahova, Z., Lazarov, L., Petrova, M., Yusein-Myashkova, S., Mutovska, M., Stoyanov, S., Zaganyarski, Y. and **Ugrinova, I.**, 2026. **Benzodioxin-Annulated Naphthalimides as Potent DNA Replication Stress Inducers with Dual p53-Dependent and Independent Antitumor Activity.** *Pharmaceutics*, 18(2), p.167. **IF 6.9 Q1**

Article

Benzodioxin-Annulated Naphthalimides as Potent DNA Replication Stress Inducers with Dual p53-Dependent and Independent Antitumor Activity

Zlatina Vlahova ¹, Lazar Lazarov ¹ , Maria Petrova ¹ , Shazie Yusein-Myashkova ¹ , Monika Mutovska ² , Stanimir Stoyanov ² , Yulian Zaganyarski ^{2,*}  and Iva Ugrinova ^{1,*} 

- ¹ Institute of Molecular Biology “Akad. Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., bl. 21, 1113 Sofia, Bulgaria; vlahova94@gmail.com (Z.V.); lazarutko@gmail.com (L.L.); mhrstova84@abv.bg (M.P.); shazi@abv.bg (S.Y.-M.)
- ² Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, 1 J. Bourchier Blvd, 1164 Sofia, Bulgaria; ohmgm@chem.uni-sofia.bg (M.M.); ohss@chem.uni-sofia.bg (S.S.)
- * Correspondence: ohjz@chem.uni-sofia.bg (Y.Z.); ugriva@gmail.com (I.U.)

Abstract

Background/Objectives: The development of small-molecule agents that selectively target DNA replication remains a central strategy in anticancer drug discovery. In this study, we report the biological characterization of a novel 6-nitro-benzodioxin-naphthalimide (NI) derivative (compound **5a**), evaluated as a potential DNA-targeted anticancer lead. **Methods/Results:** The antiproliferative activity of **5a** was assessed in a small panel of human lung carcinoma cell models (A549, H1299) and a non-malignant control (MRC-5), revealing pronounced cytotoxic effects in tumor cells, accompanied by favorable selectivity indices. Mechanistic investigations demonstrated that treatment with **5a** results in strong inhibition of DNA synthesis, as evidenced by a marked reduction in EdU incorporation and a robust induction of the DNA damage marker γ H2AX. These effects were associated with cell-cycle perturbations characterized by accumulation in G₁ and G₂/M phases, followed by activation of apoptotic pathways. Importantly, clonogenic survival assays confirmed that even transient exposure to **5a** leads to a sustained loss of proliferative capacity, indicating irreversible long-term cellular damage. These results support a replication stress-driven mechanism of action for compound **5a**, consistent with interference in DNA-associated processes during S phase. **Conclusions:** While the precise molecular initiating event remains to be elucidated, the observed biological profile positions **5a** as a promising DNA-targeted lead structure with potential for further pharmaceutical optimization. These findings provide a solid foundation for the continued development of naphthalimide-based compounds as anticancer agents within a pharmaceutically relevant framework.

Keywords: naphthalimide; benzodioxin; DNA damage; cell cycle arrest; apoptosis; p53; lung carcinoma



Academic Editor: Haibing Zhou

Received: 22 December 2025

Revised: 21 January 2026

Accepted: 23 January 2026

Published: 27 January 2026

Copyright: © 2026 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Introduction

Over the past five decades, 1,8-naphthalimide derivatives have attracted sustained scientific interest owing to their unique DNA-interactive properties, structural tunability, and broad biological potential. The search for affordable, potent, and selective anticancer agents remains a central objective in medicinal chemistry, particularly in light of persistent challenges related to drug resistance, off-target toxicity, and unfavorable pharmacokinetic

Article

Benzofuran-Annulated Naphthalimides Trigger Replication Stress, DNA Damage, and p53-Dependent Cell Cycle Arrest

Zlatina Vlahova ¹ , Lazar Lazarov ¹, Maria Petrova ¹ , Shazie Yusein-Myashkova ¹ , Jordana Todorova ¹, Maria Schröder ¹ , Monika Mutovska ² , Stanimir Stoyanov ² , Yulian Zagranyski ^{2,*}  and Iva Ugrinova ^{1,*} 

¹ Institute of Molecular Biology “Acad. Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., bl. 21, 1113 Sofia, Bulgaria; vlahova94@gmail.com (Z.V.); lazarutko@gmail.com (L.L.); mhrstova84@abv.bg (M.P.); shazi@abv.bg (S.Y.-M.); jordanabg@yahoo.com (J.T.); marias82@abv.bg (M.S.)

² Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, 1 J. Baurchier Blvd, 1164 Sofia, Bulgaria; ohmgm@chem.uni-sofia.bg (M.M.); ohss@chem.uni-sofia.bg (S.S.)

* Correspondence: ohjz@chem.uni-sofia.bg (Y.Z.); ugriva@gmail.com (I.U.)

Abstract

Background/Objectives: DNA-targeting small molecules that induce replication stress represent a promising strategy in anticancer drug development. 1,8-Naphthalimide (NI) derivatives are well-established DNA-intercalating agents, and heterocyclic annulation offers a rational approach to enhancing their potency and tumor selectivity. Here, we report the synthesis and biological evaluation of a novel series of benzofuran-containing naphthalimide derivatives, with particular focus on the lead dinitro-substituted compound **5d**. **Methods:** Cytotoxic activity was assessed using the MTT assay in A549 (p53 wild-type), H1299 (p53-null), and MRC-5 cells. Long-term antiproliferative effects were evaluated by clonogenic survival assay. Cell cycle distribution was analyzed by propidium iodide staining and flow cytometry. Replication stress and DNA damage were quantified by EdU incorporation and γ H2AX immunofluorescence, respectively. Apoptosis was assessed by Annexin V/PI staining and caspase-3/7 activation assay. p53 nuclear accumulation and autophagy induction were evaluated by immunofluorescence and Western blot, using LC3 as an autophagic marker. **Results:** All compounds exhibited cytotoxic activity in the nanomolar range, with **5d** emerging as the most potent and selective. Clonogenic survival was significantly reduced, indicating durable suppression of proliferative capacity. Treatment with **5d** induced G₁ arrest in A549 cells and the accumulation of H1299 cells in G₂/M, consistent with p53-dependent and p53-independent checkpoint activation, respectively. EdU incorporation was markedly reduced, while γ H2AX intensity increased, collectively supporting a replication stress-driven mechanism of DNA damage. Apoptosis was confirmed by increased Annexin V-positive populations and caspase-3/7 activation. LC3 puncta formation and LC3-I/LC3-II conversion were increased, indicating LC3 processing and autophagosome accumulation consistent with the activation of autophagy-related processes. **Conclusions:** **5d** induces a cellular phenotype consistent with replication stress, including reduced EdU incorporation, γ H2AX accumulation, cell cycle arrest, and apoptotic cell death in a p53 status-dependent manner. These findings establish benzofuran-annulated naphthalimides as a promising scaffold for the development of anticancer agents that exploit replication stress vulnerabilities in tumor cells.

Keywords: benzofuran; naphthalimide; anticancer agents; replication stress; DNA damage; γ H2AX; cell cycle arrest; apoptosis; p53; autophagy-related LC3 response



Academic Editor: Kenneth K. W. To

Received: 14 May 2026

Revised: 11 June 2026

Accepted: 16 June 2026

Published: 20 June 2026

Copyright: © 2026 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and

conditions of the [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[Attribution \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

РАЗДЕЛИТЕЛ 3

НАПРАВЛЕНИЕ 3

БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ ПРИРОДНИ ИЗТОЧНИЦИ

Публикации, представящи антитуморната активност на хемолимфни фракции от черноморския молюск *Rapana venosa* и потенциала им като хемосенсибилизиращи агенти. Публикации, представящи противотуморния потенциал на канабидиол (CBD), куркумин, екстракти от български гъбни видове (вкл. *Amanita muscaria*) и *Croton lechleri* и разработването на полимерни наносистеми — рН-чувствителни ниозоми — за оптимизиране на лекарствената доставка.

5. Petrova, M., Vlahova, Z., Schröder, M., Todorova, J., Tzintzarov, A., Gospodinov, A., ... & **Ugrinova, I** (2023). **Antitumor activity of bioactive compounds from *Rapana venosa* against human breast cell lines**. *Pharmaceuticals*, 16(2), 181. **IF 5.5 Q1**
6. Todorova, J., Lazarov, L. I., Petrova, M., Tzintzarov, A., & **Ugrinova, I**. (2021). **The antitumor activity of cannabidiol on lung cancer cell lines A549 and H1299: the role of apoptosis**. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 873-879. **IF 1.7 Q3**

7. Dushkov, A., Petrova, M., Todorova, J., Gospodinov, A., & **Ugrinova, I.** (2021). **Natural medicine: An evaluation of the in vitro cytotoxic effect of several Bulgarian fungal species on two panels of cancer cell lines.** Bulg. Chem. Commun, 53, 35-41. **SJR Q4**
8. Dushkov, A., Vosáhlová, Z., Tzintzarov, A., Kalíková, K., Křížek, T., & **Ugrinova, I** (2023). **Analysis of the Ibotenic acid, Muscimol, and Ergosterol content of an amanita Muscaria Hydroalcoholic extract with an evaluation of its cytotoxic effect against a panel of lung cell lines in vitro.** Molecules, 28(19), 6824. **IF 5.1 Q1**
9. Tzintzarov, A., Boyadzhieva, S. S., Coelho, J. A., Tsvetanova, F., Petrova, M., Stoev, G., ... **Ugrinova, I** & Stateva, R. P. (2024). **Novel Insights into the Biological Activity of Croton lechleri Twigs Extracts and Advancements in Their Sustainable Recovery.** Molecules, 29(17). **IF 5.1 Q1**
10. Gugleva, V., Mihaylova, R., Momekov, G., Kamenova, K., Forys, A., Trzebicka, B., **Ugrinova, I** ... & Petrov, P. D. (2024). **pH-responsive niosome-based nanocarriers of antineoplastic agents.** RSC advances, 14(16), 11124-11140. **IF 6.1 Q1**



Article

Antitumor Activity of Bioactive Compounds from *Rapana venosa* against Human Breast Cell Lines

Maria Petrova ¹, Zlatina Vlahova ¹, Maria Schröder ¹ , Jordana Todorova ¹, Alexander Tzintzarov ¹, Anastas Gospodinov ¹, Lyudmila Velkova ^{2,*} , Dimitar Kaynarov ², Aleksandar Dolashki ², Pavlina Dolashka ^{2,*} and Iva Ugrinova ^{1,*}

¹ Institute of Molecular Biology “Acad. Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., Bld. 21, 1113 Sofia, Bulgaria

² Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., Bld. 9, 1113 Sofia, Bulgaria

* Correspondence: lyudmila_velkova@abv.bg (L.V.); pda54@abv.bg (P.D.); ugriva@gmail.com (I.U.); Tel.: +359-887-193423 (P.D.)

Abstract: This study is the first report describing the promising antitumor activity of biologically active compounds isolated from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*—a fraction with Mw between 50 and 100 kDa and two structural subunits (RvH1 and RvH2), tested on a panel of human breast cell lines—six lines of different molecular subtypes of breast cancer MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-474, BT-549, SK-BR-3, and MCF-7 and the non-cancerous MCF-10A. The fraction with Mw 50–100 kDa (HRv 50–100) showed good antitumor activity manifested by a significant decrease in cell viability, altered morphology, autophagy, and p53 activation in treated cancer cells. An apparent synergistic effect was observed for the combination of HRv 50–100 with cis-platin for all tested cell lines. The combination of HRv 50–100 with cisplatin and/or tamoxifen is three times more effective compared to treatment with classical chemotherapeutics alone. The main proteins in the active fraction, with Mw at ~50 kDa, ~65 kDa, ~100 kDa, were identified by MALDI-MS, MS/MS analyses, and bioinformatics. Homology was established with known proteins with antitumor potential detected in different mollusc species: peroxidase-like protein, glycoproteins Aplysianin A, L-amino acid oxidase (LAAO), and the functional unit with Mw 50 kDa of RvH. Our study reveals new perspectives for application of HRv 50–100 as an antitumor agent used alone or as a booster in combination with different chemotherapies.

Keywords: *Rapana venosa* hemolymph; breast cancer; cisplatin; tamoxifen; bioactive compounds; mass spectrometry



Citation: Petrova, M.; Vlahova, Z.; Schröder, M.; Todorova, J.; Tzintzarov, A.; Gospodinov, A.; Velkova, L.; Kaynarov, D.; Dolashki, A.; Dolashka, P.; et al. Antitumor Activity of Bioactive Compounds from *Rapana venosa* against Human Breast Cell Lines. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 181. <https://doi.org/10.3390/ph16020181>

Academic Editor: Paweł Kafarski

Received: 6 December 2022

Revised: 16 January 2023

Accepted: 18 January 2023

Published: 24 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Oncological diseases are characterized by high incidence and mortality and have significant social and health impacts. Cancer is a leading cause of death worldwide, accounting for nearly 10 million deaths in 2020, or nearly one in six deaths [1]. Breast cancer is the most common cancer in women and the second most common cancer overall, with global incidence and mortality rates of 24.2% and 11.6%, respectively, making it the second cause of mortality among women worldwide. Conventional cancer treatments, such as chemotherapy and radiation, have numerous pitfalls, being toxic to healthy cells, leading to many side effects, ineffective induction of cell death, and drug resistance [2]. Monotherapeutic approaches target actively proliferating cells non-selectively, which ultimately leads to the destruction of both healthy and cancerous cells. Chemotherapy can be toxic to patients, with multiple side effects and risks, and strongly compromise their immune system by affecting bone marrow cells [2,3].

A particular case is the treatment of patients diagnosed with triple-negative breast cancer (TNBC) due to high resistance to anticancer drugs. This persuades researchers to

The antitumor activity of cannabidiol on lung cancer cell lines A549 and H1299: the role of apoptosis

Jordana Todorova, Lazar I. Lazarov, Maria Petrova, Alexander Tzintzarov and Iva Ugrinova 

Department of Structure and Function of Chromatin, Institute of Molecular Biology “Roumen Tsanev”, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

In the recent years, the application of new antitumor drugs has focused on the replacement of conventional chemotherapeutics with compounds derived from natural products. Cannabidiol (CBD) is one of the 113 cannabinoids derived from the plant *Cannabis sativa* and is characterized with complex and not entirely understood biological function. Unlike the other most abundant cannabinoid in *Cannabis sativa* – tetrahydrocannabinol, cannabidiol has low affinity to the endocannabinoid receptors and the manifestation of its activity does not appear to rely on the endocannabinoid system. Cannabidiol is used in the treatment of many diseases including some types of cancer. The aim of our study was to evaluate the cytotoxic activity of cannabidiol and its effect on the process of programmed cell death. This process is directly involved in the antitumor effect of many drugs. Two lung cancer cell lines, A549 expressing p53 and H1299-p53 negative, were used. Apoptosis was monitored by Annexin V assay and the activation of Caspase 3/7. We found that CBD treatment led to a dose-dependant apoptosis increase in p53 positive A549 cells. The level of apoptosis in p53 negative H1299 cells was much lower and did not seem to be dose dependent. However, the total cell viability was similar for the two cell lines, which was due to the increased necrosis observed in H1299 cells.

ARTICLE HISTORY

Received 26 January 2021
Accepted 8 April 2021

KEYWORDS

Cannabidiol (CBD);
apoptosis; lung cancer;
p53; Cas 3/7

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide [1,2]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents 85% of all lung cancers and is characterized by genetic abnormalities, which lead to alterations in signalling pathways that are targets for drug therapies – as a result leading to drug resistance [3]. Therefore, the development of novel therapeutic alternatives for NSCLC patients is an area of intense investigation.

Cannabinoids have been used for many centuries to counter pain. The endocannabinoid system (ECS) is an evolutionarily conserved signalling pathway, which has diverse regulatory functions [4]. In the last two decades, a growing body of evidences had shown the role of ECS in a diverse scope of diseases, such as psychological disorders, motion disorders like Parkinson's and Huntington's disease, neuropathy, disseminated sclerosis, spinal cord trauma, atherosclerotic disease, heart attack, hemorrhagic stroke, high blood pressure, eye disease, abnormal weight and bone diseases. For each of these diseases the potential positive effect of cannabidiol (CBD), a good candidate for ECS

modulator and/or regulator, has been demonstrated [4–9]. Several studies have demonstrated that cannabinoids also have antineoplastic effect and are usually accompanied with no negative side effects such as the ones produced by the conventional chemotherapy treatment [10,11].

Cannabidiol (CBD) exerts selective cytotoxicity and halts the proliferation of many types of cancer. These effects mainly rely on processes such as apoptosis and autophagy and they are observed in many types of cancer [12–16]. In *in vitro* experiments CBD showed the most powerful antineoplastic activity compared to other phytocannabinoids [11]. In *in vitro* experiments CBD has been established as a potent anti-metastatic agent in treatment of cervical cancer cells [17], alveolar and lung cancer cells [18,19] and breast carcinoma cells [20]. Furthermore, CBD has demonstrated anti-neoplastic effects on solid tumors *in vivo* [12,18,19].

The aim of our study was to evaluate the cytotoxic activity of cannabidiol and its effect on the process of programmed cell death – a process directly involved in the antitumor effect of many drugs. Two lung cancer cell lines, A549 expressing p53 and H1299-p53

CONTACT Iva Ugrinova  ugryiva@gmail.com  Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, bldg. 21, Acad. G. Bonchev Str, Sofia 1113, Bulgaria.

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Natural medicine: an evaluation of the *in vitro* cytotoxic effect of several Bulgarian fungal species on two panels of cancer cell lines

A. Dushkov, M. Petrova, J. Todorova, A. Gospodinov, I. Ugrinova*

Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, 1113, Sofia, Bulgaria

Received January 14, 2021; Revised March 01, 2021

The medicinal potential of Bulgaria's wild-growing fungi has, until recently, largely gone unexplored by the native scientific community. While many of the region's mushrooms have long been prized by residents as a valuable food source, they have generally not been thought of as having the medicinal value of certain herbs, for example. However, the growing body of scientific literature confirming the diverse beneficial effects of many Asian mushrooms (long held in high regard by ancient medicinal traditions of their respective regions), as well as the somewhat surprising discovery that some of these same mushrooms can be found in Bulgaria, has sparked our interest in exploring the effects they may have on different types of cancer, with the goal of either complementing existing treatments or, perhaps, uncovering new treatments based on compounds isolated from fungal extracts. We have prepared different ethanol and water extracts from the mushrooms *Trametes versicolor*, *Lenzites betulina*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis betulina* and *Amanita muscaria* and have examined the primary cytotoxic effect of these crude extracts on a panel of human skin and lung cancer cells *in vitro*, with the goal of establishing their IC₅₀ values via MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, comparing them, and gaining perspective for future research. Our results show that all extracts exhibit varying degrees of cytotoxicity even at low concentrations, warranting further inquiries into their anti-tumor potential.

Key words: fungi; cancer; cytotoxicity; replication; natural medicine

INTRODUCTION

Historically, different civilizations' attitudes toward mushrooms in general have been very dissimilar. As Gordon and Valentina Pavlovna Wasson point out [1], there is a clear dichotomy between civilizations that readily accept mushrooms as a food source and even medicine (termed 'mycophilic') and those that disregard them or outright reject them as such ('mycophobic'). A good example of a mycophilic civilization is ancient China, where mentions of mushrooms can be found in some of the oldest known medicinal texts, such as the *Huangdi Neijing*. China is also the home of some of the first known mushroom cultivation attempts – the fungus *Auricularia auricula-judae* is known to have first been grown intentionally in China around the year 600 A.D [2]. In comparison, after the Roman Age, many Western European civilizations have either not paid much attention to mushrooms in general, or regarded them as unnatural and dangerous due to their proclivity for growing on dead and rotting matter, their sudden appearance after rainfall as compared to the slow-growing plants (even appearing in circles, whose common name 'fairy rings' reflects their supposed supernatural origin in

the Western European mind), and their curious shapes, colors and odors. Bulgaria is, in some ways, no exception to this – while some of the local mushrooms have been well regarded as delicious edibles, evidence for their medicinal use is scarce. However, the times are changing, and with the growing availability of information accumulated on the medicinal properties of staple Asian mushrooms, the scientific community is gaining an interest in exploring the beneficial effects of their consumption and the mechanisms of action of their active compounds. The realization that some of the best medicinal fungi from Asia – the well-known *Trametes versicolor* (kawaratake, 雲芝 *yun zhi*), *Ganoderma lucidum* (reishi), *Grifola frondosa* (maitake), and *Inonotus obliquus* (chaga), for example – can be found in Bulgaria's forests, has prompted us to take active interest in examining the effects of several local species on cancerous cells *in vitro*.

The species of mushroom we studied in this work – all wood-growing fungi, except for *Amanita muscaria* - have each been indicated to contain compounds that exhibit some kind of anti-cancer activity via various mechanisms. *Trametes versicolor*, or 'turkey's tail', contains a compound known as polysaccharide K, or Krestin (PSK), a protein-bound polysaccharide used as an adjuvant

* To whom all correspondence should be sent:

E-mail: ugryiva@gmail.com

Article

Analysis of the Ibotenic Acid, Muscimol, and Ergosterol Content of an Amanita Muscaria Hydroalcoholic Extract with an Evaluation of Its Cytotoxic Effect against a Panel of Lung Cell Lines In Vitro

Alexander Dushkov ¹, Zuzana Vosáhlavá ², Alexander Tzintzarov ¹, Květa Kalíková ² , Tomáš Křížek ³ and Iva Ugrinova ^{1,*} 

¹ Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria; dushkov.imb@gmail.com (A.D.); alexander_imb@abv.bg (A.T.)

² Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic; kveta.kalikova@natur.cuni.cz (K.K.)

³ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic; tomas.krizek@natur.cuni.cz

* Correspondence: ugrinova@gmail.com

Abstract: The fungus *Amanita muscaria* is universally recognizable for its iconic appearance; it is also widely regarded as poisonous, inedible, and even deadly. In spite of that, there have been documented cases of use of *A. muscaria*-containing preparations against various diseases, including cancer, to no apparent ill effect. The search for compounds that can be used to treat cancer among various plants and fungi has been intensifying in recent years. In light of this, we describe an HPLC HILIC analytical method for the evaluation of the content of the anticancer compound ergosterol (ERG) and the neuroactive alkaloids ibotenic acid (IBO) and muscimol (MUS) that contribute significantly to the unpleasant physiological syndrome associated with *A. muscaria* consumption. A ‘homemade’ *A. muscaria* tincture made using 80-proof rye vodka as the solvent, an *A. muscaria* extract made with a standardized water–ethanol solution as the solvent, and fractions obtained from the second extract via liquid–liquid extraction with nonpolar solvents were analyzed. The study also presents the results of capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection and UHPLC-MS/MS analyses of the IBO and MUS content of the two native *A. muscaria* extracts and an evaluation of the standardized extract’s cytotoxic effect against a small panel of lung cell cultures in vitro. Our results show that the standardized extract has a significant cytotoxic effect and does not contain the compounds of interest in any significant quantity.

Keywords: cancer; fungi; alkaloids; HPLC; mass spectrometry; capillary electrophoresis; cytotoxicity; *Amanita muscaria*



Citation: Dushkov, A.; Vosáhlavá, Z.; Tzintzarov, A.; Kalíková, K.; Křížek, T.; Ugrinova, I. Analysis of the Ibotenic Acid, Muscimol, and Ergosterol Content of an Amanita Muscaria Hydroalcoholic Extract with an Evaluation of Its Cytotoxic Effect against a Panel of Lung Cell Lines In Vitro. *Molecules* **2023**, *28*, 6824. <https://doi.org/10.3390/molecules28196824>

Academic Editor: Vincenzo De Feo

Received: 17 August 2023

Revised: 20 September 2023

Accepted: 25 September 2023

Published: 27 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

With cancer at the forefront of many areas of clinical and biological research, scientists the world over are looking for novel compounds that exhibit potential for effective therapeutic and supportive applications to fight this deadly condition. While much of the research is focused on examining the action of plant-derived compounds, the world of fungi is also an area of rising interest. One fungus that seems to have not been examined for potential anticancer action as much as others have is *A. muscaria* (L.:Fr.) Hook., also known as fly agaric, fly amanita and mukhomor, among others. It is a fungus with an almost cosmopolitan distribution that can be found in woodland habitats in various boreal regions of the Northern Hemisphere. All known subtypes of *A. muscaria*, as well as the related species *A. pantherina* (DC.) Krombh., are widely considered inedible due to their consumption inducing a characteristic set of symptoms sometimes called ‘pantherina-muscaria

Article

Novel Insights into the Biological Activity of *Croton lechleri* Twigs Extracts and Advancements in Their Sustainable Recovery

Alexander Tzintzarov ¹, Stanislava S. Boyadzhieva ², Jose A. P. Coelho ^{3,4} , Flora Tsvetanova ² , Maria Petrova ¹ , Georgi Stoev ¹, Dragomir S. Yankov ² , Iva Ugrinova ^{1,*}  and Roumiana P. Stateva ^{2,*} 

¹ Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria; alexander_imb@abv.bg (A.T.); mhrstova84@abv.bg (M.P.); georgi_stoev_imb@abv.bg (G.S.)

² Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria; maleic@abv.bg (S.S.B.); florablue@abv.bg (F.T.); yanpe@bas.bg (D.S.Y.)

³ Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Rua Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal; jcoelho@deq.isel.ipl.pt

⁴ Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1049 001 Lisboa, Portugal

* Correspondence: ugriva@gmail.com (I.U.); thermod@bas.bg (R.P.S.)

Abstract: Sangre de drago, the sap of *Croton lechleri* Müll. Arg. tree, has been used for centuries in traditional medicine owing to its diverse biological activities. Extracts derived from different parts of the species contain a multitude of phytochemicals with varied applications. Twigs, however, are among the least studied parts of the plant. This study unveils new biological activities of *Croton lechleri* twig extracts recovered by applying Soxhlet and advanced green techniques. For all extracts, total phenolic content and antioxidant activity were determined. Subsequently, four were selected, and their cytotoxic effects were assessed on both normal (HaCat) and malignant melanoma (A375) skin cell lines using the MTT assay and trypan blue exclusion assay. All showed dose-dependent cytotoxicity, with the Soxhlet ethanol extract demonstrating the highest selectivity towards A375 cells over HaCat cells. The extracts induced apoptosis and necrosis, as confirmed by Annexin V/PI dual-labeling and flow cytometry, highlighting their ability to trigger programmed cell death in cancer cells. The selective inhibition of cell cycle progression in A375 compared to HaCat observed both for Soxhlet ethanol and pressurized ethanol extracts induces cell cycle arrest at multiple points, primarily in the G1 and G2/M phases, and significantly reduces DNA synthesis as evidenced by the decrease in the S-phase population, confirmed by the EdU assay. Consequently, the Soxhlet extract composition was analyzed using LC-MS, which revealed their richness in polyphenolic compounds, particularly flavonoids from the flavonol subclass.

Keywords: *Croton lechleri* twig extracts; supercritical; pressurized liquid extractions; cytotoxicity; selectivity index; total phenolic and flavonoid content; antioxidant activity



Citation: Tzintzarov, A.; Boyadzhieva, S.S.; Coelho, J.A.P.; Tsvetanova, F.; Petrova, M.; Stoev, G.; Yankov, D.S.; Ugrinova, I.; Stateva, R.P. Novel Insights into the Biological Activity of *Croton lechleri* Twigs Extracts and Advancements in Their Sustainable Recovery. *Molecules* **2024**, *29*, 4161. <https://doi.org/10.3390/molecules29174161>

Academic Editor: Athina Geronikaki

Received: 16 July 2024

Revised: 21 August 2024

Accepted: 28 August 2024

Published: 2 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Croton lechleri Mull. Arg., a species of flowering plant in the spurge family *Euphorbiaceae*, is a tree growing in Mexico, Colombia, Venezuela, Ecuador, Peru, and Brazil. It is best known for the production of characteristic thick deep red latex, called sangre de drago (dragon's blood), which is secreted when the tree bark is cut and is considered one of the strongest healing agents known [1]. As reported by Gupta et al. [2], the Spanish Jesuit P. Bernabe Cobo was the first to report that the red resin was used widely throughout the native tribes of Mexico, Peru, and Ecuador in the 1600s. Early Greeks, Romans, and Arabs also used the latex for its medicinal properties.

For centuries, sangre de drago has been widely employed internally to treat intestinal complaints and externally as a popular cicatrizant for wound healing in holistic medicine [1,2]. In recent years, the results of extensive in vitro and in vivo studies


Cite this: *RSC Adv.*, 2024, 14, 11124

pH-responsive niosome-based nanocarriers of antineoplastic agents†

Viliana Gugleva,^a Rositsa Mihaylova,^b Georgi Momekov,^b Katya Kamenova,^c Aleksander Forsy,^d Barbara Trzebicka,^d Maria Petrova,^e Iva Ugrinova,^e Denitsa Momekova^{*f} and Petar D. Petrov^{id *c}

Differences in pH between the tumour interstitium and healthy tissues can be used to induce conformational changes in the nanocarrier structure, thereby triggering drug release at the desired site. In the present study, novel pH-responsive nanocarriers were developed by modifying conventional niosomes with hexadecyl-poly(acrylic acid)_n copolymers (HD-PAA_n). Niosomal vesicles were prepared by the thin film hydration method using Span 60, Span 60/Tween 60 and cholesterol as main constituents, and HD-PAA modifiers of different concentrations (0.5, 1, 2.5, 5 mol%). Next, two model substances, a water-soluble fluorescent dye (calcein) and a hydrophobic agent with pronounced antineoplastic activity (curcumin), were loaded in the aqueous core and hydrophobic membrane of the elaborated niosomes, respectively. Physicochemical properties of blank and loaded nanocarriers such as hydrodynamic diameter (D_h), size distribution, zeta potential, morphology and pH-responsiveness were investigated in detail. The cytotoxicity of niosomal curcumin was evaluated against human malignant cell lines of different origins (MJ, T-24, HUT-78), and the mechanistic aspects of proapoptotic effects were elucidated. The formulation composed of Span 60/Tween 60/cholesterol/2.5% HD-PAA₁₇ exhibited optimal physicochemical characteristics (D_h 302 nm; ζ potential -22.1 mV; high curcumin entrapment 83%), pH-dependent drug release and improved cytotoxic and apoptogenic activity compared to free curcumin.

Received 21st February 2024
Accepted 1st April 2024

DOI: 10.1039/d4ra01334d

rsc.li/rsc-advances

Introduction

The key advantages of nanoparticulate drug delivery systems such as small size, functionality, capacity to encapsulate wide variety of bioactive substances and thus to improve their physicochemical characteristics and bioavailability have attracted enormous research interest, leading to constant improvement and evolution of nanomedicine.^{1,2} The site-specific drug delivery is especially beneficial in cancer therapeutics, as it contributes to diminished systemic toxicity, reduced side effects and

enhanced therapeutic efficacy.^{3,4} In particular, the elaboration of stimuli-responsive nanocarriers, which are able to release their cargo in response to specific triggers (*e.g.*, temperature, pH, redox potential, ionic composition, *etc.*) is a very promising concept for development of advanced nanocarriers.^{5,6} Niosomes are nanoscale drug delivery systems possessing good biocompatibility, biodegradability, and low toxicity.^{7,8} They are vesicular aggregates, identical to liposomes, but their bilayer membrane is composed of non-ionic surfactants (along with cholesterol) instead of phospholipids.⁹ This fact imparts to niosomes superior chemical stability, reduced cost of production, and facilitated scale-up.^{10,11} Niosomes have been exploited as feasible nanocarriers for delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs, biologically active compounds, genetic material, as well as imaging agents in diagnostics/therapeutics.^{12,13} Drug delivery of natural phytochemicals has been a challenging task due to their inherent disadvantageous properties such as high molar mass, limited aqueous solubility, low chemical stability, predisposition to photodegradation.¹⁴ In terms of topical application, these limitations may be overcome by developing advanced vesicular carriers, *e.g.*, aspasomes (ascorbyl palmitate-based vesicles),¹⁵ bilosomes (biles salts containing vesicular systems),¹⁶ elastic liposomes,^{17,18} or ultra-deformable vesicles.^{19–21} The last two types of nanocarriers

^aDepartment of Pharmaceutical Technologies, Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna "Prof. Dr Paraskev Stoyanov", 84 Tsar Osvoboditel Str., 9000 Varna, Bulgaria

^bDepartment of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, 2 Dunav Str., 1000 Sofia, Bulgaria

^cInstitute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, bl.103 Akad. G. Bonchev Str., 1113, Sofia, Bulgaria. E-mail: ppetrov@polymer.bas.bg

^dCentre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences, ul. M. Curie-Skłodowskiej 34, Zabrze, Poland

^eInstitute of Molecular Biology "Akad. Roumen Tsanev", Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev str., bl 21, Sofia 1113, Bulgaria

^fDepartment of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, 2 Dunav Str., 1000 Sofia, Bulgaria. E-mail: dmomekova@pharmfac.mu-sofia.bg

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d4ra01334d>



4. ОБОБЩЕНО ОБСЪЖДАНЕ

Представените в дисертационния труд изследвания обхващат три, на пръв поглед, тематично различни направления – фироцен-съдържащи сулфонамиди, хетероциклично-анулирани нафталимиди, природни продукти и полимерни наносистеми. Обединяващата им логика обаче не произтича от химичното сходство на агентите, а от свойствата на тяхната мишена. Туморната клетка, независимо от своя произход, разчита за оцеляването си на ограничен брой фундаментални процеси – поддържане на редокс-баланс, на геномната цялост и на контрола върху клетъчната смърт. Именно тези процеси, разгледани не като механизми на отделните съединения, а като присъщи уязвимости на туморния фенотип, представляват организиращата ос на настоящия труд.

От тази гледна точка структурното разнообразие на изследваните агенти не е пречка пред обобщението, а негова опора: щом химично несвързани молекули, действащи чрез различни първични механизми, поражават едни и същи клетъчни слабости и същевременно щадят нормалните клетки, то определящият фактор не е природата на агента, а уязвимостта на мишената. В този смисъл наблюдаваната туморна селективност не е второстепенно фармакологично качество, а основното свидетелство в подкрепа на тезата – тя показва, че ефектът се определя от особеностите на туморната клетка, а не само от свойствата на съединението.

4.1. Конвергенция на структурно различни антитуморни агенти към общи клетъчни механизми

Фироцен-камфор-сулфонамидите (DK-164, CC-78) и бензофуран-/бензодиоксин-анулираните нафталимиди (5a, 5d) представляват структурно различни класове синтетични антитуморни агенти. Независимо от съществените различия в химичната им природа, двата класа съединения конвергират към общ биологичен резултат – активиране на програми за клетъчна смърт.

При фероценовите производни този ефект се реализира предимно чрез редокс-активността на фероценовия фрагмент и генериране на реактивни кислородни видове, водещи до оксидативни увреждания на клетъчните макромолекули. За разлика от тях, хетероциклично-анулираните нафталимиди предизвикват геномна дестабилизация чрез директно взаимодействие с ДНК, репликационен стрес и активиране на отговора към увреждане на ДНК. Предварителни резултати, получени чрез кометен тест (comet assay) и анализ на репликационните влакна (fiber labeling), насочват към ключова роля на оста ATR/CHK1 в този процес – въпрос, който е предмет на текущи изследвания. Независимо от различните първични механизми, и двата класа съединения водят до натрупване на ДНК увреждания, активиране на DDR сигнализацията и ангажиране на p53-зависими или p53-независими механизми на клетъчна смърт.

Подобна функционална конвергенция се наблюдава и при природните агенти. Хемолимфната фракция HRv 50–100 от *Rapana venosa* и канабидиолът (CBD) от *Cannabis sativa* са биохимично несвързани молекулни системи, но предизвикват сходни клетъчни отговори. При всички е установена активация на p53 в туморните клетки. Тази активация е съпроводена с признаци на оксидативен и клетъчен стрес, което е съвместимо с хипотезата за стрес-медирано ангажиране на p53-зависими програми, макар че пряката причинно-следствена връзка остава да бъде потвърдена с функционални подходи (напр. ROS-улавящи агенти или модулиране на p53). Особено важно е, че и двата агента запазват активност и при p53-дефицитни модели, което показва ангажиране и на алтернативни механизми за елиминиране на туморните клетки.

Друга обща характеристика на тези природни агенти е тяхната туморна селективност. Както CBD, така и хемолимфните фракции на *R. Venosa*, а и екстрактите от *Croton lechleri* проявяват по-силен ефект върху туморните в сравнение с нормалните клетки, което вероятно отразява зависимостта на механизма им на действие от специфични особености на туморния фенотип, включително повишен редокс-стрес, нарушена митохондриална функция и висока пролиферативна активност.

4.2. Трите туморни уязвимости като организиращи оси

Систематичният преглед на трите направления показва, че противотуморният ефект на изследваните агенти се концентрира върху три повтарящи се слабости на туморната клетка, всяка от които може да бъде разгледана независимо, но които в действителност са преплетени.

Нарушената редокс-хомеостаза е първата от тях. Туморните клетки често поддържат повишени базални нива на реактивни кислородни видове в резултат на онкогенна активация и метаболитно препрограмиране, което ги доближава до прага на оксидативна поносимост. Допълнителното натоварване – независимо дали чрез редокс-циклиране на фероценовия фрагмент, чрез предполагаемо ензимно генериране на реактивни кислородни видове от молюскни белтъци (на база хомология с L-аминокиселинна оксидаза), или чрез митохондриална дисфункция – измества тези клетки отвъд адаптивния им капацитет, докато нормалните клетки понасят същото въздействие.

Зависимостта от поддържането на геномната стабилност е втората уязвимост. Хетероциклично-анулираните нафталимиди я разкриват най-ясно: чрез директно взаимодействие с ДНК и индуциране на репликационен стрес – едно от характерните уязвими състояния на туморната клетка [67, 68] – те претоварват системите за поправка и контрол на клетъчния цикъл, активирайки отговора към увреждане на ДНК. Принципът обаче не е ограничен до тях – всеки агент, който поражда ДНК увреждания или активира DDR сигнализацията, експлоатира същата зависимост.

Нарушеният контрол върху клетъчната смърт е третата ос. Много тумори съществуват в състояние на хроничен проапоптотичен натиск и разчитат на стеснен набор от механизми за преживяемост; затова сравнително слабо допълнително проапоптотично въздействие често е достатъчно да наклони баланса към необратима смърт.

Над тези три оси, без да съвпада с нито една от тях, стои p53 – интегратор на стресовите сигнали, който свързва оксидативното и геномното увреждане с

програмите за клетъчна съдба. Системното сравнение между клетъчни линии с различен TP53 статус показва, че функционалният p53 усилва апоптотичния отговор, но че нито един от изследваните агенти не зависи изцяло от него: при p53-дефицитни клетки се ангажират алтернативни пътища – митотична катастрофа, некротично подобни механизми на клетъчна смърт или тежка митохондриална дисфункция. Това е съществено, тъй като TP53 мутациите са сред най-честите нарушения в човешките неоплазии и често придружават терапевтичната резистентност; способността на агентите да действат и без функционален p53 разширява потенциалната им приложимост.

В работата ни често разглеждаме и процеса автофагия. Автофагията в повечето случаи изпълнява адаптивна, защитна роля – опит за ограничаване на стреса; едва когато увреждането надхвърли капацитета за възстановяване, тя отстъпва пред необратимото елиминиране на клетката.

4.3. Селективността като свидетелство за уязвимост-насочено действие

Ако трите уязвимости действително определят ефекта на изследваните агенти, то най-прякото наблюдаемо следствие от това би била туморната селективност – и именно тя се установява последователно при всички водещи съединения (Таблица 1). Селективността тук не е просто желателно фармакологично качество, а проверка на самата теза: тя показва, че действието се определя от особености, присъщи на туморната, но не и на нормалната клетка.

Трите групи уязвимости намират пряко отражение в наблюдаваната селективност. Повишеният базален оксидативен стрес прави туморните клетки по-чувствителни към фeroценовите производни, молюскните фракции и канабидиола, докато нормалните клетки разполагат с по-голям адаптивен резерв. Зависимостта от справянето с репликационния стрес обяснява защо нафталимидите достигат критично ниво на геномно увреждане в туморните, но не и в нормалните клетки – с индекси на селективност до 32 при бензофурановото производно 5d и линията H1299. Нарушеният контрол върху клетъчната смърт прави туморните клетки склонни да преминат към необратимо елиминиране при въздействие, което нормалните клетки понасят.

Особено показателен в това отношение е аналогът СС-78 [98]. При него структурната модификация спрямо ДК-164 води до загуба на NF-κB-зависимия механизъм и индуциране на некроза вместо апоптоза; едновременно с това се губи и туморната селективност ($SI < 1$, Таблица 1). Това пряко свързва механизма на действие със селективността: премахването на специфичното, уязвимост-насочено действие премахва и способността да се щадят нормалните клетки. СС-78 така служи като вътрешен негативен контрол, потвърждаващ, че селективността произтича от механизма, а не от химичния клас.

Таблица 1. Цитотоксична активност и туморна селективност на водещите агенти в изследователската програма

Водещ агент (направление)	Туморни клетки: IC50	Нормални клетки: IC50	SI	Механизъм / p53- зависимост	
ДК-164 (фероцен- камфор сулфонамид)	MCF-7: 14,2 μM; MDA-MB-231: 56 μM; A549: 13,7 μM; H1299: 52 μM	MCF-10A: 86 μM; MRC-5: 131 μM	2,5–9,6	ядрена p53- транслокация (само туморни), NF-κB, ROS, апоптоза, G1 арест	[14]
СС-78 (фероценов аналог)	MCF-7: 20 μM; MDA-MB-231: 9,2 μM; A549: 12,4 μM; H1299: 19 μM	MRC-5: 10 μM (MCF- 10A: н.т.)	< 1 ^b	некроза; без NF-κB транслокация	[98]
5a — бензодиоксин- нафталимид	A549 80 nM; H1299 68 nM	MRC-5 ≈ 450 nM	5,6; 6,6	репликационен стрес; двойна p53-зав. / незав. активност	[107]
5d — бензофуран- нафталимид	A549 61 nM; H1299 11 nM	MRC-5 352 nM	5,8; 32	репликационен стрес; γH2AX↑, EdU↓; апоптоза	[108]
HRv 50-100 (<i>Rapana venosa</i> , хемолимфна фракция)	рак на гърдата — изразена активност	минимален ефект (MCF-10A)	селект. ^a	p53 активация, автофагия; синергизъм с цисплатин	[123]

CBD (<i>Cannabis sativa</i>)	A549 ≈ H1299 (сходен IC ₅₀)	MRC-5 по-слаб ефект	селект. ^a	p53-зав. апоптоза (A549) / некроза (H1299)	[137]
<i>Croton lechleri</i> (етанолов екстракт)	A375 меланом — селективна	HaCaT — запазени	4,7	проапоптотична активност	[147]

* $SI = IC_{50}(\text{нормални}) / IC_{50}(\text{туморни})$; за гръдните линии спрямо MCF-10A, за белодробните спрямо MRC-5.

^a Качествена селективност: за фракции/екстракти (HRv 50-100, CBD) не се дефинира единичен IC₅₀/SI; при CBD общата жизнеспособност е сходна за A549 и H1299, но механизмът на смърт се различава p53-зависимо.

^b За CC-78 $SI < 1$ спрямо MRC-5 (IC₅₀ 10 μM при нормалните срещу 12–19 μM при туморните) – съединението не проявява туморна селективност; данните илюстрират загубата на селективно действие при структурната модификация спрямо DK-164.

Същественото е, че тази селективност е постигната предимно без класическо молекулно таргетиране на единичен рецептор или мутация. Вместо това тя произтича от насочване към фундаментални различия между туморния и нормалния фенотип. Такъв подход притежава потенциално предимство пред таргетирането на отделна молекула: той е по-малко зависим от конкретния мутационен профил на тумора и поради това потенциално приложим при по-широк спектър неоплазии. С това селективността се превръща от характеристика на отделните съединения в концептуална основа на целия труд.

4.4. От биологично активната молекула до терапевтичното приложение: ролята на полимерните наносистеми

Един от важните изводи на настоящия дисертационен труд е, че идентифицирането на биологично активна молекула представлява само първата стъпка в процеса на разработване на потенциален противотуморен агент. Независимо от високата си биологична активност, много перспективни съединения са ограничени от неблагоприятни физикохимични и фармакокинетични

характеристики, включително ниска водна растворимост, ограничена стабилност, недостатъчна бионаличност и неоптимално вътреклетъчно натрупване.

Този проблем е особено ясно демонстриран при водещото фeroцен-камфор-сулфонамидно производно DK-164. Въпреки изразената му противотуморна активност и селективност, неговата ниска водна растворимост ограничава възможностите за бъдещо фармацевтично приложение. Разработването на биоразградима мицелна форма (DK164-NP) показва, че наноформулирането може да преодолее това ограничение, като същевременно запази биологичната активност на съединението.

Получените резултати показват, че полимерните наносистеми не следва да се разглеждат единствено като пасивни носители на лекарствени молекули. Напротив, те представляват активен инструмент за модифициране на фармакологичното поведение на биологично активните вещества чрез повишаване на тяхната растворимост, стабилност, клетъчно усвояване и контролирано освобождаване.

Тази концепция е потвърдена и от останалите разработени наноплатформи в настоящия труд. Мултифункционалните полимерни носители демонстрират възможност за субклетъчно таргетиране, а рН-чувствителните ниозоми осигуряват контролирано освобождаване в условията на туморната микросреда. Независимо от различията в архитектурата им, всички тези системи са насочени към една обща цел – повишаване на терапевтичния потенциал на активното вещество.

Следователно полимерните наносистеми не представляват самостоятелно изследователско направление, а логично продължение на стратегията за разработване на нови антитуморни агенти. Докато синтетичните и природните съединения осигуряват биологичната активност, наносистемите създават предпоставки тази активност да бъде трансформирана в потенциално приложим терапевтичен подход. В този смисъл те изпълняват ролята на свързващо звено между фундаменталните изследвания върху противотуморните молекули и тяхната бъдеща клинична реализация

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд обединява резултатите от петгодишни изследвания, насочени към идентифициране, биологично охарактеризиране и оптимизиране на нови антитуморни агенти от синтетичен и природен произход. Логиката, която свързва трите тематични направления, не е сходството между агентите, а това на тяхната мишена: ограниченият набор фундаментални уязвимости, които характеризират туморната клетка – нарушената редокс-хомеостаза, зависимостта от поддържането на геномната стабилност и отслабеният контрол върху клетъчната смърт. Изследваните фeroцен-съдържащи производни, хетероциклично-анулирани нафталимиди, молюскни биоактивни вещества, природни продукти и полимерни наносистеми са разгледани именно през тази призма – като различни средства, насочени към общ набор клетъчни слабости.

Получените резултати показват, че независимо от съществените различия в химичната структура и биологичния произход на изследваните агенти, значителна част от тях реализират противотуморния си ефект чрез въздействие върху ограничен брой фундаментални клетъчни процеси.

Особено значение за интерпретацията на получените резултати има системното изследване на ролята на p53 като ключов регулатор на клетъчния отговор към различни видове стрес. Данните показват, че p53-зависимите сигнални пътища представляват важен механизъм за реализиране на противотуморния ефект на редица от изследваните агенти, като същевременно се установява и наличието на алтернативни p53-независими механизми на клетъчна смърт. Това разширява потенциалната приложимост на изследваните съединения при тумори с различен молекулен профил и различен TP53 статус.

Резултатите демонстрират също, че туморната селективност може да бъде постигната чрез експлоатиране на специфични биологични особености на туморните клетки, включително повишения оксидативен стрес, нарушената геномна стабилност и зависимостта от механизмите за справяне с репликационния стрес. По този начин изследваните агенти проявяват способност да въздействат преимуществено върху туморните клетки при относително щадене на нормалните клетъчни популации.

Паралелно с откриването и охарактеризирането на нови биологично активни молекули, проведените изследвания показват значението на съвременните полимерни наносистеми като средство за преодоляване на ограниченията, свързани с разтворимостта, стабилността и бионаличността на перспективни антитуморни агенти. Разработените наносистеми демонстрират възможността за подобряване на техните фармацевтични характеристики и представляват важна стъпка към бъдещото им приложение.

В своята цялост дисертационният труд предлага интегрирана концепция за изследване на противотуморни агенти – от откриването на нови биологично активни молекули и изясняването на техните молекулни механизми на действие до разработването на подходи за оптимизиране на тяхната доставка.

6. НАУЧНИ ПРИНОСИ

6.1. Приноси с фундаментален характер

Установено е, че структурно различни синтетични и природни антитуморни агенти реализират противотуморния си ефект чрез въздействие върху ограничен брой фундаментални клетъчни уязвимости, свързани с нарушения в редокс-хомеостазата, геномната стабилност и механизмите за клетъчно оцеляване.

Разкрита е централната роля на p53 като интегриращ молекулен регулатор на клетъчния отговор към различни форми на стрес, включително оксидативен стрес, репликационен стрес и ДНК увреждания, индуцирани от изследваните антитуморни агенти.

Показано е, че противотуморната активност на редица изследвани агенти се запазва и при клетки с нарушена p53 функция, което показва наличието на алтернативни p53-независими механизми за индуциране на клетъчна смърт.

Показано е, че туморната селективност на изследваните агенти отразява насочеността им към специфични уязвимости на туморния фенотип; загубата на механизъм при аналога CC-78 е съпроводена със загуба на селективност ($SI < 1$) — резултат, който утвърждава селективността като индикатор за уязвост-насочено действие.

6.2. Приноси с експериментален характер

За първи път е охарактеризиран противотуморният потенциал и молекулярният механизъм на действие на серия фероцен-камфор-сулфонамидни производни, като е идентифицирано водещото съединение DK-164 с изразена туморна селективност и способност да модулира p53- и NF-κB-зависими сигнални пътища.

За първи път са изследвани хетероциклично-анулирани бензодиоксин- и бензофуран-съдържащи нафталимидни производни и е показано, че техният противотуморен ефект е свързан с индуциране на репликационен стрес, активиране на DDR сигнализацията и последваща апоптотична клетъчна смърт.

За първи път е демонстрирана антитуморна активност на хемолимфни фракции от черноморския охлюв *Rapana venosa* срещу човешки туморни клетки и е установен потенциалът им като хемосенсибилизиращи агенти в комбинация с цисплатин.

Получени са нови данни за противотуморната активност и механизмите на действие на природни продукти от растителен и гъбен произход, включително канабидиол, екстракти от *Croton lechleri* и *Amanita muscaria*, свързани с индуциране на оксидативен стрес и програмирана клетъчна смърт.

6.3. Приноси с приложен характер

Охарактеризирани са биоразградими полимерни наносистеми за доставка на антитуморни агенти, осигуряващи подобрена разтворимост, стабилност и фармацевтична приложимост на биологично активните съединения.

7. ИЗВОДИ

1. Фероцен-камфор-сулфонамидните производни проявяват изразена противотуморна активност срещу модели на рак на гърдата и недребноклетъчен белодробен карцином, като водещото съединение DK-164 показва изразена туморна селективност (SI 2,5–9,6), за разлика от аналога CC-78, който не проявява селективност (SI < 1).

2. Противотуморният ефект на DK-164 е свързан с индуциране на оксидативен стрес, активация на p53-зависими сигнални пътища, модулиране на NF-κB сигнализацията, клетъчен арест и апоптотична клетъчна смърт.

3. Ниската водна разтворимост на DK-164 може успешно да бъде преодоляна чрез включване в биоразградими полимерни мицели, без съществена загуба на биологична активност.

4. Хетероциклично-анулираните нафталимидни производни проявяват силна цитотоксична активност в нисък наномоларен диапазон и висока туморна селективност спрямо нормалните клетки, достигаща индекс на селективност до 32 при бензофурановото производно.

5. Водещите бензодиоксин- и бензофуран-съдържащи нафталимиди индуцират репликационен стрес, потискане на ДНК синтеза, активиране на клетъчния отговор към ДНК увреждания и последваща апоптоза.

6. Клетъчният отговор към нафталимидните производни зависи от TP53 статуса, като p53-компетентните клетки реагират предимно чрез G1 арест, а p53-дефицитните клетки – чрез задържане в G2/M фаза и алтернативни механизми на клетъчна смърт.

7. Хемолимфните фракции от *Rapana venosa* проявяват туморно-селективна антипролиферативна активност и потенцират ефекта на цисплатин при клетъчни модели на рак на гърдата.

8. Антитуморният ефект на активната фракция HRv 50–100 kDa е свързан с индуциране на оксидативен стрес, активация на p53 и автофагичен отговор.

9. Канабидиолът проявява противотуморна активност срещу белодробни карциномни клетки чрез индуциране на клетъчен стрес и

програмирана клетъчна смърт, като типът клетъчен отговор (апоптоза спрямо некроза) зависи от p53 статуса на клетките.

10. Екстрактите от български гъбни видове, включително *Amanita muscaria*, проявяват ниско-токсичен антипролиферативен потенциал, като ефектът им е свързан с повлияване на пролиферативната активност на туморните клетки и зависи от клетъчния тип.

11. Етаноловият екстракт от *Croton lechleri* проявява селективна цитотоксичност спрямо меланомни клетки и индуцира апоптотична клетъчна смърт при минимално засягане на нормалните клетки.

12. Разработените рН-чувствителни ниозоми представляват ефективни платформи за доставка на биологично активни молекули и позволяват подобряване на техните фармацевтични характеристики.

13. Получените резултати показват, че структурно различни синтетични и природни агенти могат да реализират противотуморен ефект чрез въздействие върху ограничен брой фундаментални клетъчни процеси, свързани с нарушения в редокс-хомеостазата, геномната стабилност и механизмите за клетъчно оцеляване.

14. Туморната селективност на изследваните агенти отразява насочеността им към специфични уязвимости на туморния фенотип; загубата на NF-κB-зависимия механизъм при аналога CC-78 е съпроводена със загуба на селективност ($SI < 1$).

15. Интегрираният подход, съчетаващ разработване на нови антитуморни агенти, изясняване на молекулните механизми на действие и оптимизиране на тяхната доставка чрез полимерни наносистеми, представлява ефективна стратегия за създаване на перспективни противотуморни кандидати.

8. ПЕРСПЕКТИВИ И БЪДЕЩО РАЗВИТИЕ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Получените резултати очертават няколко перспективни направления за бъдещо развитие на представената изследователска програма. Те са насочени както към задълбочаване на познанията за молекулните механизми на действие на идентифицираните антитуморни агенти, така и към подобряване на тяхната фармацевтична приложимост чрез съвременни подходи на наномедицината.

8.1. Развитие на нафталимидната платформа

Сред най-перспективните резултати в настоящия труд са тези, свързани с хетероциклично-анулираните нафталимидни производни. Бъдещите изследвания са насочени към детайлно изясняване на механизмите, свързани с репликационния стрес, ДНК уврежданията и взаимодействието с топоизомеразите, както и към установяване на структурно-активностни зависимости при нови представители на този клас съединения. Тези изследвания ще бъдат обобщени в две самостоятелни публикации, посветени съответно на биологичната активност и на молекулните механизми на действие на водещите производни.

8.2. Полимерни наносистеми и таргетирана доставка

Полимерните носители, разработени в настоящия труд, създават основа за бъдещо развитие на платформи за доставка на siRNA, насочени към ефективно вътреклетъчно транспортиране на терапевтични нуклеинови киселини и потискане на ключови регулатори на клетъчния цикъл. Бъдещите изследвания ще бъдат насочени към създаване на ново поколение функционализирани полимерни наносистеми за комбинирана доставка на siRNA, противотуморни лекарства и природни биологично активни молекули. Особен интерес представлява разработването на таргетиращи и стимул-чувствителни платформи, позволяващи повишена селективност и намалена токсичност към нормалните клетки.

8.3. Морски биоресурси и *Rapana venosa*

Получените резултати показват значителния потенциал на *Rapana venosa* като източник на нови антитуморни молекули. Бъдещите изследвания са насочени към допълнително фракциониране и идентифициране на активните компоненти на хемолимфата и към изясняване на механизмите, определящи тяхната туморна

селективност. Особен интерес представлява разработването на наночастици и хибридни полимерни наносистеми, базирани на хемолимфни компоненти, както и изследването на възможностите за комбинирането им със съществуващи противотуморни средства с цел повишаване на терапевтичната ефективност и преодоляване на лекарствената резистентност.

8.4. Природни продукти и зелени биотехнологии

Друго перспективно направление е изследването на природни продукти, получени чрез съвременни екологично съобразни технологии. В тази връзка са разработени проектни предложения, насочени към биологичното охарактеризиране на екстракти от *Achillea millefolium*, *Cornus mas* и гъбни източници на биологично активни вещества. Основен акцент ще бъде поставен върху връзката между химичния състав, противотуморната активност и механизмите на клетъчен отговор към оксидативен и генотоксичен стрес.

9. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Vlahova, Z., Lazarov, L., Petrova, M., Yusein-Myashkova, S., Mutovska, M., Stoyanov, S., Zaganyarski, Y. and **Ugrinova, I.**, 2026. **Benzofuran-Annulated Naphthalimides Trigger Replication Stress, DNA Damage, and p53-Dependent Cell Cycle Arrest** *Pharmaceutics*, 18(6), p.754. **IF 6.9 Q1**
2. Vlahova, Z., Lazarov, L., Petrova, M., Yusein-Myashkova, S., Mutovska, M., Stoyanov, S., Zaganyarski, Y. and **Ugrinova, I.**, 2026. **Benzodioxin-Annulated Naphthalimides as Potent DNA Replication Stress Inducers with Dual p53-Dependent and Independent Antitumor Activity.** *Pharmaceutics*, 18(2), p.167. **IF 6.9 Q1**
3. Tzintzarov, A., Boyadzhieva, S. S., Coelho, J. A., Tsvetanova, F., Petrova, M., Stoev, G., ... **Ugrinova, I** & Stateva, R. P. (2024). **Novel Insights into the Biological Activity of Croton lechleri Twigs Extracts and Advancements in Their Sustainable Recovery.** *Molecules*, 29(17). **IF 4.6 Q1**
4. Gugleva, V., Mihaylova, R., Momekov, G., Kamenova, K., Forsy, A., Trzebicka, B., **Ugrinova, I** ... & Petrov, P. D. (2024). **pH-responsive niosome-based nanocarriers of antineoplastic agents.** *RSC advances*, 14(16), 11124-11140. **IF 4.6 Q1**
5. Dushkov, A., Vosáňlová, Z., Tzintzarov, A., Kalíková, K., Křížek, T., & **Ugrinova, I** (2023). **Analysis of the Ibotenic acid, Muscimol, and Ergosterol content**

of an amanita Muscaria Hydroalcoholic extract with an evaluation of its cytotoxic effect against a panel of lung cell lines in vitro. *Molecules*, 28(19), 6824. [IF 4.6 Q1](#)

6. Schröder, M., Petrova, M., Dobrikov, G. M., Grancharov, G., Momekova, D., Petrov, P. D., & [Ugrinova, I](#) (2023). **Micellar Form of a Ferrocene-Containing Camphor Sulfonamide with Improved Aqueous Solubility and Tumor Curing Potential.** *Pharmaceutics*, 15(3), 791. [IF 5.5 Q1](#)

7. Petrova, M., Vlahova, Z., Schröder, M., Todorova, J., Tzintzarov, A., Gospodinov, A., ... & [Ugrinova, I](#) (2023). **Antitumor activity of bioactive compounds from Rapana venosa against human breast cell lines.** *Pharmaceutics*, 16(2), 181. [IF 4.6 Q1](#)

8. Schröder, M., Petrova, M., Vlahova, Z., Dobrikov, G. M., Slavchev, I., Pasheva, E., & [Ugrinova, I](#) (2022). **In vitro anticancer activity of two ferrocene-containing camphor sulfonamides as promising agents against lung cancer cells.** *Biomedicines*, 10(6), 1353. [IF 4.1 Q1](#)

9. Todorova, J., Lazarov, L. I., Petrova, M., Tzintzarov, A., & [Ugrinova, I.](#) (2021). **The antitumor activity of cannabidiol on lung cancer cell lines A549 and H1299: the role of apoptosis.** *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 873-879. [IF 1.7 Q3](#)

10. Dushkov, A., Petrova, M., Todorova, J., Gospodinov, A., & [Ugrinova, I.](#) (2021). **Natural medicine: An evaluation of the in vitro cytotoxic effect of several Bulgarian fungal species on two panels of cancer cell lines.** *Bulg. Chem. Commun*, 53, 35-41. [SJR Q4](#)