

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на научната степен
„Доктор на науките” в професионално направление 4.3. Биологически науки
(Молекулярна биология)

Тема на дисертацията: „Обща мишена, различни агенти: фундаменталните уязвимости на туморната клетка като основа за селективно противотуморно действие”

Автор: проф. д-р Ива Угринова Златкова

Рецензент: акад. проф. дбн Румен Георгиев Панков, член на научното жури, определено със заповед на Директора на Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“ – БАН, №150-ОБ/13.07.2026 год.

Кратки биографични данни за кандидата

Професор д-р Ива Угринова е родена през 1968 година в гр. София. Завършва висшето си образование в Софийски университет „Св. Климент Охридски”, с бакалавърска специалност „Биотехнология” и магистърска специализация по „Генно и клетъчно инженерство” през 1992 год. Професионалното ѝ развитие почти изцяло преминава в Института по молекулярна биология „Академик Румен Цанев”, където през 2002 год. успешно защитава дисертационен труд и последователно преминава през длъжностите гл. асистент, доцент и от 2019 година – професор. От 2013 год. досега е завеждащ секция „Структура и функция на хроматина”, през периода 2014 – 2022 е избрана за директор на ИМБ, а от 2022 год. досега е зам. директор на същия институт.

Общи данни за документацията свързана с дисертационния труд

Дисертационният труд, авторефератът и приложените документи по защитата са изготвени в пълно съответствие със Закона за развитие на академичния състав на РБ и Правилника за приложението му, приет от ИМБ. За оформяне на дисертационния си труд проф. Угринова е използвала формата „сборник от научни публикации съпроводен от изчерпателен литературен обзор и свързваща дискусия”, визирана в т. 2.2. от Правилника за прилагане на ЗАРСБ на ИМБ. Представената научна продукция отговаря напълно на профила на обявения конкурс.

Дисертационният труд съдържа 281 страници и се състои от Въведение, Литературен обзор, Цели и задачи, Резултати - представени под формата на 10 научни статии в пълен текст, Обобщено обсъждане, Заключение, Научни приноси, Изводи, Перспективи и бъдещо развитие на изследванията и Цитирана литература, включваща 158 източника.

Актуалност на дисертационната тема

Дисертационният труд на проф. Угринова поставя ясна обща идея: различни по природа антитуморни агенти действат върху едни и същи основни уязвимости на туморната клетка. Това не е просто описание на отделни съединения. Това е опит за обобщение – всички изследвани агенти, независимо от произхода си, засягат сходен кръг от процеси: оксидативен стрес, увреждане на ДНК, нарушения в клетъчното оцеляване.

Тази идея е близка до една добре позната в съвременната онкология концепция. От началото на 2000-те години в областта се налага представата, че всички видове рак, при цялото си разнообразие, споделят общ, ограничен набор от функционални характеристики. Туморната клетка трябва да "постигне" няколко неща, за да оцелее и да се размножава неконтролируемо – да си осигури постоянен сигнал за делене, да заобиколи механизмите, които спират делението, да избегне програмираната клетъчна смърт, да си осигури кръвоснабдяване, да стане способна да се разпространява в тялото. По-късно към този списък се добавят и други страни на туморната клетка – нестабилност на генома, хроничен възпалителен отговор, промени в енергийния обмен. Всяка от тези характеристики представлява своеобразно "слабо място" – процес, от който туморната клетка е станала зависима, за да оцелее и именно затова е удобна мишена за лечение. Тази рамка промени начина, по който се търсят нови лекарства – вместо да се търси действие само върху един-единствен ген или белтък, все повече се търси действие върху процеса, от който туморната клетка е станала зависима.

Темата на дисертационния труд се вписва точно в тази логика – изследваните агенти са химически различни, но действието им опира до сходни, добре познати уязвимости на туморната клетка. Темата е актуална и защото съвременната фармакология все по-рядко търси едно-единствено, тясно мишенно действие, а все повече избирателност чрез няколко засегнати процеса едновременно – посока, в която се вписват и изследванията в дисертацията.

Структура и цели на дисертационния труд

Литературният обзор, подкрепен със 158 литературни източника, е балансиран като обем и като съдържание и макар и стегнат, предоставя много информативен анализ на съществуващите данни. Той е изграден в четири логически свързани части, които постепенно извеждат читателя от общата клетъчна биология на туморния отговор до конкретните агенти, изследвани в дисертацията. Първата част разглежда клетъчния отговор към антитуморно въздействие – ролята на p53 като централен туморен супресор, апоптозата като основен механизъм на клетъчна смърт и NF-κB като фактор, свързан както с клетъчното оцеляване, така и с терапевтичната резистентност. Втората част навлиза по-дълбоко в геномната стабилност – клетъчния цикъл и неговите контролни точки, видовете ДНК увреждания и механизмите за тяхната репарация, както и репликационния стрес като конкретен вид клетъчна уязвимост. Третата, по-кратка част разглежда автофагията като адаптивен механизъм с двойствена роля – защитна или водеща до клетъчна смърт, в зависимост от контекста. Четвъртата част представя самите изследвани агенти – фeroцен-съдържащи съединения, анулирани нафталимидни производни, биоактивни вещества от морски молюски, природни продукти от растителен и гъбен произход, и полимерни наносистеми за доставка. Особено добро впечатление прави и включването към тази част на секция „Собствен принос“, в която са очертани основните резултати от проведените изследвания. Това, заедно с посочването на методите за установяване състоянието на ключови молекули – използвани като маркери за активността на изследвания сигнален път, дава ясна представа за експерименталните подходи и добре очертава параметрите на проведените проучвания. Добро допълнение към обзора са и 18те авторски или модифицирани схеми, които са много информативни и визуално издържани.

Целта на дисертационния труд е формулирана ясно и с два ясно разграничени компонента: от една страна – да се покаже, че структурно различни синтетични и природни агенти могат да действат чрез общ набор от фундаментални уязвимости на туморната клетка; от друга – да се разработят подходи за подобряване на тяхната фармацевтична приложимост чрез полимерни наносистеми. Тази двойственост на целта е логична предвид структурата на самия труд. Формулираните 5 задачи (въпреки, че в текста са посочени като шест) са солидна основа за постигане на поставените цели.

Анализ на експерименталните резултати, изводи и приноси

Представените научни резултати обхващат последователна и тематично свързана група от изследвания, насочени към откриването, характеризиране и механистично изследване на нови биологично активни съединения с потенциално противотуморно действие, както и към разработването на подходи за тяхното по-ефективно доставяне до туморните клетки.

Получените експериментални данни са изложени и дискутирани в добре избран от автора ред, който аз също ще спазя, като ще обобща основните научни достижения.

Първата група включва две публикации, посветени на фeroцен-камфор-сулфонамидните производни DK-164 и CC-78, обхващащи синтеза им, изследването на противотуморната им активност, изясняването на молекулния механизъм на действие, както и разработването на подходяща наноформулировка за приложението им. Двете статии образуват ясна двуетапна линия на една и съща изследователска посока. Първата статия въвежда и характеризира нов фероценов камфорсулфонамид, обозначен CC-78, като го сравнява директно с вече синтезираното преди това съединение DK-164. Втората статия поема оттам и решава конкретен практически проблем на DK-164, а именно ниската му водна разтворимост.

Същинският научен принос на първата статия е в структурно-функционалната съпоставка между двете сходни по скелет съединения. Промяната само на един структурен елемент, заместването на *tert*-бутиловата група на DK-164 с пиперазинова в CC-78, води до набор от биологични последици. Промяната води до повишена обща цитотоксичност, но и пълна загуба на туморна селективност (CC-78 се оказва по-токсичен за нормалните MRC5 клетки, отколкото за туморните линии). Установена е и смяна на преобладаващия механизъм на клетъчна смърт от апоптоза (при DK-164) към некроза (при CC-78) и най-показателно, пълна загуба на способността да предизвиква ядрена транслокация на NF- κ B, докато способността за активиране на p53 остава непроменена и при двете съединения. Именно тази съвкупност от съпътстващи промени, а не изолирано наблюдение, е това, което прави сравнението стойностно и добре обосновава твърдението от дисертационния труд, че загубата на определен молекулен механизъм съвпада със загубата на селективност.

Втората статия носи различен по характер принос, не толкова свързан с биологичен механизъм, колкото решаване на конкретна фармацевтично-технологична бариера. Капсулирането на DK-164 в мицели на база триблоков съполимер PEO-*b*-P(CyCL-co-CL)-*b*-PEO постига висока ефективност на инкапсулиране (около 98%), наночастици с малък хидродинамичен диаметър и най-

важно, забавено освобождаване на активното вещество. Биологичната активност на капсулираната форма запазва характеристиките на свободното вещество. Съхранена е избирателността му към туморни клетки и способността му да активира NF-κB и p53 макар и с леко отслабен ефект, обясним с по-бавното освобождаване.

Методологично и в двете статии е използван широк набор от методи (цитотоксичност, проточна цитометрия, имунофлуоресценция за LC3/p53/NF-κB, ROS и митохондриален мембранен потенциал), което прави сравнението между свободното и капсулираното вещество коректно и пряко съпоставимо.

Като ограничение в тези резултати бих посочил липсата на ин vivo данни, но това е напълно логично за фазата, в която се намира изследването.

Втората група също е представена от две статии, публикувани през настоящата година, които са посветени на изследване на нови анулирани нафталимидни производни с противотуморна активност. В двете работи е използван подход, при който структурната модификация на нафталимидното ядро чрез анулиране на бензодиоксинов или бензофуранов фрагмент, комбинирана с промени в електронните свойства и позицията на заместителите, е използвана за проучване на връзката между химичната структура, клетъчната селективност и биологичния ефект. По този начин изследванията надхвърлят рамките на обикновеното скриниране за цитотоксичност и формират цялостна структура–активност–механизъм.

Съществен принос в тези изследвания е идентифицирането на високоефективни съединения с наномоларна цитотоксичност и добра селективност към туморни клетки. Структурно-активностният анализ показва, че видът на анулирания хетероциклен фрагмент и характерът и позицията на заместителите, особено на нитро групата, имат определящо значение за противотуморната активност и селективността. Особено значим е и механистичният резултат, показващ, че активните съединения потискат синтеза на ДНК и предизвикват репликационен стрес, съпроводен с натрупване на γH2AX, нарушения в клетъчния цикъл и последваща каспазо-зависима апоптоза. Този механистичен аспект е особено съществен, тъй като поставя разработените съединения в контекста на съвременните стратегии за селективно насочване към повишената репликационна уязвимост на туморните клетки. Заслужава да се подчертае и установената зависимост на клетъчния отговор от функционалния статус на p53. Сравнението между p53-компетентни и p53-дефицитни клетъчни модели показва, че противотуморният ефект не се изчерпва с класически p53-зависим механизъм. Данните подкрепят едновременно участие на p53-зависими и p53-независими пътища, което има потенциално значение за приложимостта на този клас съединения при тумори с нарушена функция на p53. В този контекст различията в характера на клетъчния цикъл са особено интересни, тъй като показват, че клетъчният отговор към индуцирания репликационен стрес може да бъде модифициран от генетичния контекст на клетката. Данните от втората публикация допълват механистичната характеристика с установяване на LC3-свързан клетъчен отговор, насочващ към участие и на автофагично-свързани процеси.

В тези изследвания отново е приложен комплекс от взаимно допълващи се подходи, демонстриращ отново висок професионализъм. Използвани са химичен синтез и структурно характеризирани съединенията, количествено определяне на клетъчната жизнеспособност, анализ на клоногенния потенциал, проточна

цитометрия за изследване на клетъчния цикъл и апоптозата, имуофлуоресцентно проследяване на синтеза и увреждането на ДНК, както и анализ на ключови белтъчни маркери. Именно съчетаването на тези независими методологични нива позволява по-надеждно свързване на химичната структура с наблюдавания клетъчен фенотип и с предполагаемия механизъм на действие.

Научната стойност на двете работи се определя от съчетаването на оригинален химичен дизайн, анализ на връзката структура–активност и комплексна клетъчно-механистична характеристика. По този начин те допринасят за разработването на нови нафталимидни производни, насочени към повишената уязвимост на туморните клетки към репликационен стрес. Следва да се отбележи, че първичното молекулно събитие, предизвикващо репликационния стрес, не е установено пряко. Въпреки това съвкупността от получените резултати предоставя убедителна основа за предложената механистична последователност и определя двете публикации като оригинални и със съществен научен принос към разработването на нови стратегии за фармакологично насочване към репликационната уязвимост на туморните клетки.

Последната, трета група, обединяваща шест публикации е тематично свързан комплекс от изследвания, насочени основно към идентифициране и характеризиране на антитуморния потенциал на природни биоактивни продукти от различен произход – морски организми, гъби и растения, допълнен от разработването на pH-чувствителни наносистеми за доставка на противотуморни агенти. Общата характеристика на тези изследвания е стремежът към откриване на слабо проучени природни източници и превръщането им от обект на първичен цитотоксичен скрининг в по-задълбочено характеризирани потенциални източници на биоактивни молекули.

Сред по-съществените приноси в тази група се откроява идентифицирането на антитуморна активност на нискомолекулна протеинова фракция от хемолимфата на черноморския охлюв *Rapana venosa*, включително изразен синергичен ефект с цисплатин. Идентифицирането чрез MALDI-MS/MS на конкретни протеинови компоненти в тази фракция разширява познанията за биоактивните молекули на вида отвъд добре проучения хемоцианин. Друг аспект на оригиналност представлява изследването на български диворастващи гъбни видове като потенциален източник на цитотоксични вещества. Последващото задълбочено изследване на *Amanita muscaria* е особено ценно с това, че чрез използване на независими аналитични подходи показва, че наблюдаваният цитотоксичен ефект не се дължи на основните психоактивни компоненти ибенова киселина и мусцимол, насочвайки търсенето към други, все още неидентифицирани биоактивни съставки.

Съществен принос има и изследването на *Croton lechleri*, при което е реализиран комплексен подход, съчетаващ различни екстракционни технологии, химична характеристика на получените фракции и многостранна оценка на биологичната им активност. Особено значими са идентифицирането на непроучавани до момента производни и установената селективност на определени екстракти към меланомни клетки спрямо нормални кератиноцити. По този начин работата има принос както към търсенето на нови природни противотуморни агенти, така и към оползотворяването на растителен материал, представляващ страничен продукт.

Изследването на канабидиола в белодробни туморни клетъчни модели допълва тази научна линия с анализ на зависимостта на клетъчния отговор от p53-

статуса. Установеното различие между преобладаващата апоптоза в p53-позитивни клетки и по-силно изразения некротичен отговор в p53-дефицитни клетки представлява интересен резултат, макар приносът на тази работа да е по-скоро в детайлизирането на вече известни биологични ефекти на канабидиола, отколкото в откриването на принципно нов механизъм.

Отделен, но логично допълващ тематичния блок принос е разработването на pH-чувствителни ниозомни системи за доставка на куркумин. Създаването на нови хексадецил-поли(акрилова киселина) съполимери за модификация на ниозомните носители представлява оригинален подход в областта на лекарствената доставка и разширява изследователската програма отвъд идентифицирането на природни биоактивни вещества към разработването на системи за тяхното целево доставяне. Методологично шестте публикации показват развитие от първоначален цитотоксичен скрининг към все по-комплексна характеристика на биологичния ефект. Наред с оценката на клетъчната жизнеспособност са използвани клоногенен анализ, проточна цитометрия, Annexin V/PI, анализ на клетъчния цикъл, EdU, имунофлуоресцентни и молекулярно-аналитични методи. Особено положително впечатление прави използването на независими методи за потвърждаване на ключови изводи – например два различни подхода за оценка на лекарствен синергизъм при *Rapana venosa* и няколко независими аналитични платформи за идентифициране и количествено определяне на компонентите на *Amanita muscaria*. В изследването на *Croton lechleri* съчетаването на анализ на клетъчния цикъл с EdU и wound-healing assay позволява по-коректно разграничаване на антипролиферативния от чисто миграционния ефект.

Считам, че общата стойност на публикациите в тази група се определя не толкова от установяването на принципно нови механизми на клетъчна смърт, колкото от системното прилагане на съвременни клетъчни, аналитични и технологични подходи към недостатъчно проучени природни ресурси и от постепенното преминаване от фенотипен скрининг към механистична и структурна характеристика. В този смисъл шестте статии формират последователен и научно продуктивен комплекс, който допринася за разширяване на базата от потенциални природни противотуморни агенти и за развитието на подходи за тяхното фармацевтично приложение.

Представеното „Обобщено обсъждане“ мога да определя като силна страна на дисертационния труд. То надхвърля механичното обобщаване на резултатите от отделните публикации и ги интегрира в единна концептуална рамка, основана на общите биологични уязвимости на туморната клетка – нарушената редокс-хомеостаза, зависимостта от поддържането на геномната стабилност и нарушения контрол върху клетъчната смърт. Особено сполучливо е разглеждането на p53 като интегратор на различни стресови сигнали и анализът на туморната селективност като общ резултат от въздействието върху тези уязвимости. Убедително е и включването на полимерните наносистеми като логично продължение на изследванията върху биологично активните молекули към оптимизиране на тяхното потенциално приложение. Дискусията демонстрира способност за цялостен научен синтез и за извеждане на общи закономерности от резултати, получени с химично и биологично различни агенти.

От извършените изследвания са изведени 15 обобщени извода и са формулирани четири приноса с фундаментален характер, четири приноса с

приложен характер. Формулираните научни приноси и изводи са логично свързани с поставените цели и получените експериментални резултати и убедително отразяват научната стойност на дисертационния труд.

Афторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

Съответствие на представената документация със ЗРАСБ и наукометрични показатели

В дисертационния труд са включени десет научни статии, публикувани в петгодишен период (2021-2026) като в 9 от тях проф. Угринова е кореспондиращ автор. Осем от статиите са публикувани в списания с квантил 1 (Q1), а общият импакт фактор на статиите е 48.9. Макар и съвсем скоро публикувани, резултатите от тези изследвания са много добре приети от научната общност и вече са цитирани 87 пъти.

Справката за изпълнението на минималните национални изисквания по чл. 26 от ЗРАСРБ за научна област 4. Природни науки, математика и информатика професионално направление: 4.3 Биологически науки, представена от проф. Угринова включва следните показатели: група А - 50 т.; група В - 100 т.; по показател Г – 227т. при изискуеми 100 т., а по показател Д (цитирания) събира 174 т. при минимум 100 т. Така, при изискуем минимум от 350 т. за научната степен „Доктор на науките“, съгласно ППЗРАСРБ, проф. Угринова формира 551 т., с което не само покрива, но и сериозно надхвърля минималните национални изисквания, необходими за тази научна степен.

Заклучение:

Представеният от проф. Угринова дисертационен труд на тема „Обща мишена, различни агенти: фундаменталните уязвимости на туморната клетка като основа за селективно противотуморно действие“ представлява задълбочено монографично изследване с висока научна стойност, което напълно покрива критериите за присъждане на научната степен „Доктор на науките“. Трудът е плод на последователна и целенасочена изследователска работа и разглежда ключови проблеми, свързани с идентифицирането на основните уязвимости на туморните клетки, откриването на нови противотуморни агенти и разработването на подходи за тяхното доставяне. В рамките на изследването са осъществени редица новаторски проучвания, чиито резултати са получили значителен отзвук както в българската, така и в международната научна общност — факт, който утвърждава автора като висококвалифициран специалист в областта на молекулярната биология.

Въз основа на всичко изложено дотук, давам положителна оценка и убедено препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на проф. д-р Ива Угринова Златкова научната степен „Доктор на науките“.

10.09.2026 г.

Рецензент:

/акад. проф. дбн Румен Панков/