

СТАНОВИЩЕ

от чл.-кор. проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн

Институт по биология и имунология на размножаването
„Акад. Кирил Братанов“ – Българска академия на науките

относно дисертационния труд на проф. д-р Ива Угринова Златкова

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

за придобиване на научната степен „доктор на науките“
в професионално направление 4.3. Биологически науки,
научна специалност „Молекулярна биология“

1. Общо представяне на процедурата и кандидата

Представеният за оценка дисертационен труд е разработен в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при БАН. Запознах се с дисертацията, автореферата, включените научни публикации, автобиографията и приложените справки за научната дейност и съответствието с критериите. Оценявам високо научното съдържание на труда, като основанията за тази оценка излагам по-долу.

Проф. Ива Угринова е завършила специалност „Биотехнологии“ в Софийския университет „Св. Климент Охридски“ и през 2002 г. е придобила образователната и научна степен „доктор“ с изследване върху постсинтетичното ацетилиране и ДНК-свързващите свойства на HMGB1. От 2019 г. заема академичната длъжност „професор“. Научното ѝ развитие включва продължителна работа върху структурата и функцията на хроматина, международни специализации и ръководство на научно звено и изследователски проекти. Този опит обяснява последователното насочване на представените изследвания към молекулните механизми на клетъчния отговор към противотуморни агенти.

Настоящата дисертация има различен предмет от труда за ОНС „доктор“. В представените списъци публикациите за двете степени са обособени отделно и не се припокриват библиографски. Изследователската тематика на научния труд за присъждане на НС „доктор на науките“ обхваща нови синтетични съединения, природни продукти и системи за доставка, обединени чрез анализ на туморната селективност и механизмите на клетъчен стрес.

2. Актуалност на тематиката

Проблемът за селективното увреждане на туморните клетки остава основен при разработването на противотуморни средства. Високата цитотоксичност сама по себе си не е достатъчна, ако не е съпроводена с разграничаване на ефектите върху туморни и нетуморни клетки и с разбиране на процесите, които определят чувствителността им. В този смисъл намирам за обоснован избора на темата: да се изследват структурно различни агенти чрез общи функционални характеристики на клетъчния отговор.

Научната актуалност се определя от връзката между редокс хомеостазата, репликационния стрес, отговора към ДНК увреждания и механизмите за клетъчно оцеляване. Приложната актуалност е свързана с възможността тези зависимости да подпомогнат подбора на водещи съединения и оптимизирането на тяхната доставка.

Дисертацията разглежда едновременно биологичната активност и част от ограниченията, произтичащи от физикохимичните свойства на изследваните агенти.

3. Познаване на проблема

Литературният обзор създава необходимата основа за поставяне на експерименталните задачи. Разгледани са регулацията на клетъчния цикъл, p53 и NF-κB сигнализацията, апоптозата, автофагията и отговорът към увреждания на ДНК. Тези механизми са свързани с особеностите на изследваните химични класове и природни продукти, както и с възможностите за използване на наноносители.

Положително оценявам обсъждането на резултатите от отделните публикации в общ биологичен контекст. Проф. Угринова показва задълбочено познаване на проблема и умение да съпоставя различни експериментални наблюдения. Литературният анализ е свързан с интерпретацията на собствените резултати и подпомага формулирането на научните обобщения.

4. Методика на изследването

Използваният методичен подход е подходящ за поставените задачи и съчетава оценка на жизнеспособността и пролиферацията с анализ на клетъчния цикъл, клетъчната смърт и молекулни маркери на стресовия отговор. Особено значение имат съпоставянето на туморни и нетуморни клетъчни модели и изследването на белодробните карциномни линии A549 и H1299 с различен TP53 статус. Изчисляването на индекси на селективност позволява активността да се оцени спрямо съответния нетуморен модел.

Съчетаването на метаболитни тестове с клоногенен анализ разширява оценката отвъд краткосрочното потискане на клетъчната жизнеспособност. Анализът на включването на EdU, γH2AX, разпределението по фази на клетъчния цикъл и апоптотичните маркери позволява да се проследи връзката между потиснатия ДНК синтез, натрупването на увреждания и последващия клетъчен отговор. Annexin V/PI и измерването на каспазна активност допринасят за по-обосновано характеризиране на клетъчната смърт.

При природните продукти биологичните изследвания са допълнени с фракциониране и химично характеризиране, а при системите за доставка – с физикохимични анализи. Тази комбинация позволява наблюдаваният ефект да се разглежда във връзка със състава или формулировката на изпитвания материал. Методичният обхват и съчетаването на допълващи се подходи са сериозно достойнство на труда.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд обединява три взаимносвързани направления: изследване на синтетични противотуморни агенти, биологично охарактеризиране на природни продукти и разработване на системи за доставка на активни вещества. Общият научен проблем е изясняването на връзката между противотуморната активност, селективността и клетъчните процеси, които определят чувствителността към тези въздействия. Представените публикации са свързани чрез литературен обзор и общо обсъждане, които проследяват развитието на изследованото направление.

При фeroцен-съдържащите камфорсулфонамиди е изследвано как структурните различия между съединенията се отразяват върху активността, селективността и характера на клетъчната смърт. Сравнението между DK-164 и CC-78 показва различни профили на клетъчен отговор. DK-164 се откроява със селективна активност в изследваните модели, съпроводена с оксидативен стрес, промени в p53 и NF-κB сигнализацията и преобладаващо апоптотична клетъчна смърт. CC-78 проявява различен профил на селективност и преобладаващи некротични характеристики. Тези резултати обосновават избора на DK-164 като водещо съединение за последващо развитие.

При хетероциклично анулираните нафталимиди основният проблем е връзката между потискането на ДНК синтеза, нарушенията в геномната стабилност и селективното противотуморно действие. Бензодиоксиновите и бензофурановите производни показват активност в ниския наномоларен диапазон. За водещото бензофураново производно са представени стойности на IC₅₀ от 61 nM при A549 и 11 nM при H1299 спрямо 352 nM при MRC-5, с индекс на селективност до 32 в съответното сравнение. Потиснатото включване на EdU, повишеният сигнал за γH2AX, промените в клетъчния цикъл и апоптотичните маркери свързват тази активност с репликационен стрес и отговор към ДНК увреждания. Установени са различия в клетъчния отговор между моделите с различен TP53 статус и запазена активност в p53-дефицитните клетки.

Изследванията на *Rapana venosa* разглеждат морските биоресурси като източник на компоненти със селективна противотуморна активност и възможност за усиляване на действието на утвърдени противотуморни средства. Охарактеризирани са хемолимфни фракции с активност в клетъчни модели на рак на гърдата и е показано потенциране на ефекта на цисплатин. За активната фракция HRv 50–100 kDa са получени данни за оксидативен стрес, активиране на p53 и промени в автофагичния отговор. Работата съчетава биологичното изпитване с характеризиране на състава на изследваните фракции.

При растителните и гъбните продукти е поставен въпросът как съставът на изпитвания материал и особеностите на клетъчния модел определят активността и характера на клетъчния отговор. Изследванията на канабидиола показват различия в проявите на клетъчна смърт при A549 и H1299. При екстрактите от български гъби, включително *Amanita muscaria*, са установени зависимости от клетъчния модел антипролиферативни ефекти. Самостоятелното изследване на *Amanita muscaria* съчетава оценката на цитотоксичността с аналитично изследване на съдържанието на иботенова киселина, мусцимол и ергостерол, като допълва биологичните наблюдения с конкретни данни за състава на екстракта. За етаноловия екстракт от *Croton lechleri* са представени данни за селективна цитотоксичност и апоптотичен отговор в меланомния модел A375 спрямо използваната нетуморна контрола HaCaT. Сравнението на конвенционални и съвременни екстракционни подходи при *Croton lechleri*, допълнено с химично характеризиране, позволява биологичната активност да се разглежда във връзка с начина на получаване и състава на екстрактите. Така природните продукти разширяват сравнителното изследване с агенти с различен произход и състав.

Направлението, посветено на системите за доставка, разглежда преодоляването на физикохимичните ограничения на биологично активните вещества. При DK-164 ниската водна разтворимост е подобрена чрез включване в полимерни мицели при запазване на

биологичната активност. Разработени и охарактеризирани са също рН-чувствителни ниозоми за доставка и контролирано освобождаване на активни вещества. При ниозомната форма на куркумин е показана подобрена цитотоксична и проапоптотична активност спрямо свободното вещество в изследваните туморни клетъчни модели. Тези резултати свързват избора на перспективни съединения с оптимизирането на техните формулировки и последващото им предклинично развитие.

Разгледани в тяхната цялост, направлението формират последователен подход: подбор и охарактеризиране на активни агенти, съпоставяне на ефектите върху туморни и нетуморни клетъчни модели, проследяване на процесите, свързани с чувствителността и клетъчната смърт, и оптимизиране на доставката. Добавената им научна стойност е в свързването на активността с биологичния контекст на нейното проявление. Това позволява резултатите от отделните изследвания да се използват за обоснован избор на кандидати и за определяне на посоките за тяхното развитие.

В обобщеното обсъждане проф. Угринова свързва действието на изследваните агенти с три взаимодействащи групи процеси: редокс хомеостазата, поддържането на геномната стабилност и регулацията на клетъчното оцеляване и смърт. Експерименталните резултати подкрепят функционална общност между част от клетъчните отговори към структурно различни агенти. Сравнителните данни очертават значението на клетъчния контекст за селективността и начина на реализиране на противотуморния ефект. Получените нови данни за участието на p53, заедно със запазената активност в p53-дефицитни модели, допълват разбирането за отговора към конкретните изследвани съединения. Резултатите от наноформулирането показват как подобряването на физикохимичните характеристики може да се съчетае със запазване на биологичната активност.

При оценката на приносите основния акцент може да се постави върху научното обобщение, подкрепено от сравнителните експериментални изследвания. В този смисъл считам следните обобщения като съществени приноси на труда.

Резултатите за синтетични и природни агенти са обединени в научна рамка, която свързва противотуморната активност и селективността с промените в редокс хомеостазата, геномната стабилност и регулацията на клетъчната смърт. Това обобщение придава цялостност на изследванията и създава основа за сравнителна оценка на перспективни противотуморни кандидати.

Характеризирането на фeroцен-съдържащите камфорсулфонамиди установява връзки между структурните различия, профила на селективност и клетъчния отговор и обосновава избора на DK-164 за последващо развитие.

Изследването на бензодиоксиновите и бензофурановите нафталимиди установява съчетание от висока активност и селективност в използваните модели и свързва действието им с потискане на ДНК синтезата, маркерите за ДНК увреждания, промените в клетъчния цикъл и апоптозата.

Сравнителните изследвания дават нови данни за участието на p53 в отговора към конкретните агенти и за различията между клетъчни модели с различен TP53 статус. Запазената активност в p53-дефицитни клетъчни линии разширява експерименталната основа за изследване на чувствителността към водещите съединения.

Получени са сравнителни данни за клетъчен отговор свързан с промени в автофагията към фeroценови производни, мицелната форма на DK-164,

бензофурановото нафталимидно производно 5d и хемолимфна фракция от *Rapana venosa*. Анализът на LC3-позитивните структури, допълнен при 5d с Western блот проследяване на LC3-I/LC3-II, е съпоставен с показатели за жизнеспособност и клетъчна смърт, включително апоптотичен отговор. Установените различия свързани с клетъчния модел и концентрацията на агента разширяват характеризирането на промените в автофагията в контекста на клетъчния стрес и механизмите на клетъчна смърт.

Охарактеризирането на хемолимфните фракции от *Rapana venosa* установява тяхната противотуморна активност и възможността за потенциране на ефекта на цисплатин в клетъчни модели на рак на гърдата. Резултатите обосновават развитието на тези фракции като източник на биологично активни компоненти.

Изследванията на канабидиола и растителните и гъбните екстракти разширяват данните за зависимостта на биологичната активност и клетъчната смърт от състава на изпитваните продукти и особеностите на клетъчния модел.

Разработването и охарактеризирането на мицелни и ниозомни системи показва възможности за подобряване на разтворимостта и контролиране на освобождаването на активни вещества. Запазването на биологичната активност на мицелния DK-164 свързва този научноприложен резултат с основната тема на изследванията.

6. Преценка на публикациите и личния принос на кандидата

Самостоятелният списък включва 10 публикации за периода 2021–2026 г., представени като основа на дисертационния труд. По предоставената наукометрична справка осем са отнесени към Q1, една към Q3 и една към Q4. Посочени са 227 точки по група Г и 87 цитирания, съответстващи на 174 точки по група Д, от критериите за присъждане на НС „доктор на науките“. Заявените стойности надхвърлят праговете от по 100 точки за тези групи в приложения правилник. Окончателното отчитане следва да се основава на уеднаквени списъци и проверено отнасяне на публикациите и цитиранията към съответните показатели.

Публикациите са дисеминирани и приети от специализираната научна общност, като в приложеният списък са посочени и 20 конферентни участия с резултати по темата. Личния принос е ясно изразен от посочените в публикациите данни, от които става ясно, че проф. Угринова е участвала в дефиниране на концепцията и методологията, в научното ръководство, интерпретацията и подготовката на текстовете, както и в управлението и финансирането на голяма част от проектите. Тези данни подкрепят съществения и личен принос и водеща роля в развитието на изследванията.

7. Автореферат

Авторефератът представя целта и задачите, основните резултати, обобщението, изводите и приносите на дисертацията. Той позволява да се проследи логиката на изследванията и връзката между отделните направления. Намирам, че отразява същественото научно съдържание на труда. Препоръката за уеднаквяване на библиографските данни се отнася и за окончателната му редакция.

Заклучение

Представеният дисертационен труд съдържа оригинални експериментални резултати и научни обобщения по значим проблем на молекулярната биология на туморната клетка. Определяща тежест в положителната ми оценка има обединяването на изследванията върху различни агенти чрез връзката между селективността, клетъчния стрес и регулацията на клетъчната смърт. Това обобщение е подкрепено от характеризирането на перспективни противотуморни кандидати, новите данни за участието на p53 в отговора към тях и резултатите от оптимизирането на доставката. Съвкупността от тези приноси обосновава значителен оригинален научен принос и съответства по научно съдържание на изискването за теоретични обобщения и решения на големи научни или научноприложни проблеми за НС „доктор на науките“.

Въз основа на изложеното давам положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на проф. д-р Ива Угринова Златкова научната степен „доктор на науките“ в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Молекулярна биология“.

Дата: 13.09.2026 г.

София

Изготвил становището:
чл.-кор. проф. д-р Сорен Бохос Хайрабедян, дбн