

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Ирина Руменова Цанева

на докторска дисертация на тема:

„Роля на HMGB1 в епително-мезенхимния процес (EMT) и метастазирането в 2D и 3D модели на рак на млечната жлеза“

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование: 4. Природни науки, професионално направление: 4.3. Биологически науки, докторска програма: Молекулярна биология

Автор на дисертационния труд: Десислава Валериева Владимирова
редовен докторант в секция „Структура и функция на хроматина“ към
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН

Научен ръководител:

проф.д-р Ива Угринова в секция „Структура и функция на хроматина“,
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН

Данните за докторанта и докторантурата:

Десислава Валериева Владимирова е родена в София, България. Получава висше образование Бакалавър по биомедицина в Университета Съри, Обединено кралство (2014–2017 г.) и Магистър по биомолекулярни науки в Свободен университет Брюксел, Белгия (2017–2019 год.). Започва работа в Института по Молекулярна биология, БАН като биолог (2020-2023 г.) и асистент (2023–2025 г.). От 01/01/2024 г. е зачислена за

докторант в професионално направление 4.3. Биологически науки, Молекулярна биология.

Десислава Владимирова е представила следните документи за докторатурата в съответствие за национални изисквания за образователната и научна степен „доктор“:

1. Биография; 2. Копие на магистърска диплома, копие на превод магистърска диплома Белгия и Удостоверение НАЦИД за магистърска диплома; Сертификати и удостоверения за положените изпити от индивидуалния план; Списък на 4 научни публикации по темата на дисертацията, самите статии и списък на забелязани цитати; 7. Дисертация – документ за липса на плагиатство; Автореферат; Дисертация.

Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен семинар на секция „Структура и функция на хроматина“ към Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, на 21.10.2025 г.

Актуалност на тематиката на дисертацията. Темата на дисертацията е **„Роля на HMGB1 в епително-мезенхимния процес (EMT) и метастазирането в 2D и 3D модели на рак на млечната жлеза“**. Тематиката на дисертацията е актуална и важна, но също е сложността на разработваният труд. Ракът на млечната жлеза е една от най-честите злокачествено заболяване на милиони хора. В епително-мезенхимния процес (EMT) болестта се развива от неконтролирана клетъчна пролиферация до миграция, инвазия, метастазиране и голяма смъртност. При много пациенти злокачественото развитие е различно. Използвани са три подтипове ракови човешки клетки за експериментална работа. Задълбоченото разбиране на молекулярните механизми на метастатичния процес е ключово за разработване на нови стратегии за борба с рака на млечната жлеза. Това може да помогне към индивидуалната терапия на онкологичните заболявания – една от бързоразвиващата област на биомедицинските наука.

Дисертацията включват общо 156 страници, в които съдържат 5 таблици и 57 фигури. Основните части на дисертацията включват увод и литературен обзор 52 страници, цел и задачи 1 страница, материали и методи 18 страници, резултатите и дискусия 57 страници,

изводи и приноси 1 страници, ограничения на изследването и бъдещи перспективи 3 страници. Изпозвани са 238 литературни източници, списък на научни публикации, свързани темата на дисертационния труд и писък на участия на международни и национални конференции.

Познаване на проблема: Литературният обзор е организиран в няколко основни части: Заболяване на рак и рак на млечната жлеза (5 подточки). ЕМТ като двигател на прогресията и терапевтичната резистентност при онкологичните заболявания (3 подточки). Ролята на белтък HMGB1 в активирането на ЕМТ (7 подточки). Метформин и връзката на HMGB1 в рака. (3 подточки). Клетъчни механизми са илюстрирани с 15 фигури и 1 таблица от публикации.

В литературния обзор представя сложната и хетерогенност на клетъчната биология в процеса на метастазиране в рака и важната ролята на високоподвижен белтък от група B1, HMGB1. В централната част на обзора са описани най-подробно структурата и различните функции на HMGB1 и ролята на в епително-мезенхимния преход (ЕМТ), включително скъсения вариант на С-терминална опашка на HMGB1. В литературата има и противоречиви данни. Показани са противораковите свойства за известния антидиабетен медикамент метформин в различни онкологични заболявания. Публикувани са интересни нови данни за връзката на HMGB1 и противораковите свойства на метформин, но молекулярните механизми не са изяснени. Този обзор води логично към целите на дисертацията.

Десислава Владимирова се е справила много добре с литературния обзор, написан е ясен, стегнат и добре илюстрират. В езика има трудностите в терминологията в молекулярната и клетъчна биология - съкращения от английски език. За да помогне на читателите докторантът представя списък на съкращенията преведени на български.

Поставени цели и задачи, методи и постигнати резултати. Обзорът е актуален, логичен и води към основната цел на дисертационния труд. Формулирани са две основни цели и за всяка по 5 планирани задачи, които представят логическите етапи към

експерименталната част на дисертационния труд. Първата цел е да се изследва ефектът на пречистен рекомбинантен HMGB1 и скъсен вариант без C-терминална опашка (HMGB1 Δ C) върху в епително-мезенхимния преход (EMT) в подтипове клетки на рак на млечната жлеза. Втората цел е да се оцени потенциалът на метформин като терапевтичен модулатор на HMGB1-зависимия EMT. В целите са подходящи за подадените задачи.

Като основен обект към експериментите са трите клетъчни линии от рак на млечната жлеза: Тройно-негативна на (ER-/PR-/HER2-) клетъчна линия е подходяща за изследване на миграция и инвазия, метастазиране и терапевтична резистентност; MCF-7 е епителоидна експресираща естрогенови рецептори (ER+) и демонстрира ограничена инвазивност и метастатичност; и SK-BR-3 епителоидна линия, HER2+ с метастатичен потенциал. И трите клетъчните линии са използват в 2D модела за рак на млечна жлеза (тест за заздравяване на рани „wound healing“) а 3D клетъчен експериментален модел - 3D сфероиден модел са използвани MDA-MB-231 клетки. В експериментите са използвани пречистени бактериални рекомбинантни HMGB1 и HMGB1 Δ C в различни концентрации.

Методите са описани стартелно и могат да бъдат повторени от други групи. За анализиране на данните стойностите са нормализирани чрез софтуеар ImageJ и са представени в графики и таблици. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения и статистическа значимост.

В експерименталната част в дисертационния труд на Десислава Владимирова са включени разнообразни модерни методи. В групата на проф. Угринова се използват рутинно тези методи в изследванията на HMGB1. В института има ценни апарати като имунофлуоресцентна микроскопия и анализ Zeiss AxioVert 200M, визуализираще посредством дигитална система за изображение на протеини LI-COR C-DiGit Blot Scanner, Varioskan™ мултиплатформен четец и др.

Докторантката е работила в ИМБ като биолог и асистент и много от методите са добре и анализ използвани и усвоени. Получените резултати в дисертационния труд са добре описани и нагледени с подходящи фигури и таблици.

Оценка на миграционната активност между клетъчните линии третирани с HMGB1 и HMGB1ΔC бе използван „wound healing“ тест. Резултатите показват, че тройно негативни клетки млечната жлеза клетки (MDA-MB-231) демонстрират значима клетъчна миграция при третиране на HMGB1, докато HMGB1ΔC предизвика по-слаб миграционен отговор. MCF-7 и SK-BR-3 не показват статистически съществено затваряне на раната спрямо контролните проби. Използвани са широк спектър на различни концентрации на белтъците и бяха избрани оптималните 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1ΔC и 5 ng/mL TGF-β. Данните от Western blot показват експресия на EMT маркери индуцирани от HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β в MDA-MB-231 клетки. HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β не индуцират маркери нито в MCF-7 клетки нито в SK-BR-3 клетки. Тези резултати потвърждават наблюдаваната клетъчна миграция от „wound healing“. Сравнителен анализ на базовата експресия на HMGB1, RAGE и NF-κB в различните молекулярни подтипове на рак на млечната жлеза показана значително по-висока експресия на трите използвани белтъци тройно негативни клетки (MDA-MB-231). От тези резултати само (MDA-MB-231) клетки са използвани за 3D сфероиди за експериментален модел.

За създаването на 3D сфероиди като модел на рак на млечната жлеза са изследвани клетъчна плътност на сфероидите, концентрация на метилцелулоза за жизнеспособността на клетките в сфероидите. Избрани са оптималната комбинация за сфероидите в определени условията в културите. Работа в дисертацията е много важна за създаване на надежден модел *in vitro*, които отразяват биологията на солидните тумори *in vivo*.

Интересни са резултатите върху ефектът на HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β върху инвазия на 3D сфероиди вградени в матрикс от колаген тип I. Използвани са доста по-големи концентрации на HMGB1, HMGB1ΔC в експериментите в сравнение от 2D опитите („wound healing“ тест). Най-висока инвазия бе наблюдавана при 700 ng/mL

HMGB1, докато HMGB1ΔC индуцира максимална инвазия при по-ниска концентрация (500 ng/mL). Виждат се разликите между опитите в 2D и 3D среда, наподобяваща *in vivo* условия. Интересни са опитите с потисната експресия на RAGE. Резултатите показват, че при оптимална концентрация на HMGB1 клетките с потисната експресия на RAGE се наблюдава значително намаление както на клетъчната подвижност („wound healing“ тест), инвазията (3D сфероиди) и експресията на Vimentin. В същото време заглушаването на RAGE не оказва съществено влияние върху миграцията, инвазията и експресията на Vimentin при третиране с HMGB1ΔC. Имунофлуоресцентен анализ и субклетъчно фракционирание показва значително по-високо ниво на фосфорилиран p65 NF-κB в ядрото при третиране с 300 ng/mL HMGB1ΔC, докато при 100 ng/mL HMGB1 е по-умерено. Това показват, че HMGB1ΔC индуцира по-силна ядрена транслокация на фосфорилирания p65 NF-κB, което съответства на по-изразен ефект върху ЕМТ и клетъчната миграция. Интересни и важни са изследванията на метформин върху активация на HMGB1, HMGB1ΔC и NF-κB в 2D и 3D модели на MDA-MB-231 клетки. Бяха подбрани подходяща субинхибиторна доза метформин и оптимални концентрации на HMGB1 и HMGB1ΔC за да се потискащо действие на индуцираните клетъчни процеси. Данните показаха, че метформин самостоятелно предизвиква умерено потискане на клетъчната подвижност, инвазивност и експресията на ЕМТ-маркерите. В 2D модела комбинираното метформин и 100 ng/mL HMGB1 се наблюдава инхибиране на клетъчната подвижност, но не в 300 ng/mL HMGB1ΔC клетките. Данните от клетъчна инвазия с сфероиди (3D модел) показва, че комбинация на метформин и 700 ng/mL HMGB1 значително намаляване на инвазията. За разлика от това, 300 ng/mL HMGB1ΔC в клетките нямаше ефект на метформин. Това предполага, че инхибиращо действие е зависимо от присъствието на С-терминалната опашка на HMGB1. Чрез ко-имунопреципитация и Western blot ясно се показва, че в 100 ng/mL HMGB1 клетките се образува HMGB1–RAGE комплекс. В присъствие на метформин не се наблюдава този комплекс. Няма и комплекс в клетките третирани с 300 ng/mL HMGB1ΔC. Това потвърждава, че липсата на С-терминалната опашка елиминира свързването му с рецептора и посочва, че вероятно биологичните ефекти на HMGB1ΔC се осъществяват чрез RAGE-независими механизми.

Във всичките опитите са използвани различни концентрации рекомбинантните HMGB1, HMGB1ΔC белтъци - избрани като оптимални. Това е малко притеснително особено при големите концентрации. Имам въпроси към докторанта по-долу.

Резултатите са написани и представени стегнати и ясни. В опитите с метформин резултатите са твърде кратки - представени под фигурите. В следващата глава на дисертацията има подробна дискусия върху получените резултати, вероятните клетъчни механизми и бъдещи изследвания.

Публикации и личен принос на докторанта:

Десислава Владимирова има 4 публикации свързани с дисертацията. Три от публикациите е първи автор (едното е глава от *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*). Има участие с постер в 3 научни международни форуми. Нямам никакво съмнение, че тя лично е участвала в изследвания, направени са точни изводи и дълбочената дискусия. Публикации напълно покриват и надвишават минималните национални изисквания за защита на дисертация.

От проведените експерименти са направени 3 основни изводи и 5 основни приноси към дисертационния труд.

Автореферат. Отразява изцяло и коректно същността на дисертацията. Включва 62 страници заедно с представените таблици и фигури. Формулираните изводи и принос съответстват в дисертацията.

Имам няколко въпроса към дисертанта:

1. Не е показана каква е част от С-терминалната опашка на HMGB1 (скъсения вариант (HMGB1ΔC)). Има ли данни за аминокиселини от отрязаната опашка, какви са, важни ли са? Какви нови опити могат да се направят , например мутации в опашката?
2. След в третирането на HMGB1 и HMGB1ΔC в клетките как и каква част от белтъците влизат в клетките? Очаква ли се да има скъсвания?

На микроскопски снимки не са сложени линии на скалата (фигурите 18 до 24, 30 и 31, Скала: 500 μm). Останалите са както трябва. Добро е да се добавят линиите на скалите в снимките (както във Фигура 32) или под снимки (например във Фигура 35).

Имам несъществени забележки към текста на дисертацията (съкращенията, грешки и български думи, които не съществуват). Списък е предаден на докторанта.

Заклучение:

В научното изследване на работа на Десислава Владирова по дисертацията са направени много разнообразни експерименти, представени са нови добри резултати. Тя показва умението да планира и провежда опити, да анализира качествени и количествени резултати и да ги обсъжда. Дисертационният труд е актуален, използвани са съвременни методи и е насочен към целите и задачите. Има безспорни значими резултати и изводи. Десислава Владимирова напълно отговаря на изискванията на правилника на реда и придобиване на научни степени и за заемане на академичните длъжности в ИМБ.

В заключение давам своята напълно положителна оценка и препоръчвам уважаемото научно жури да присъди на Десислава Владимирова образователната и научна степен „доктор“ по програмата „молекулярна биология“.

20.01.2026

София

Рецензент:

/проф. Ирина Цанева, дб/