

До Председателя на научно жури,
определено със Заповед № I-64/29.05.2023
на Директора на Институт по микробиология
“Стефан Ангелов” - БАН

РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. Д-р Цветалина Иванова Танкова, д.м.н.,
научна специалност – ендокринология
Ръководител на Катедра по ендокринология, Медицински факултет,
Медицински университет- София,

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор”
в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление
5.11. Биотехнологии, докторска програма Технология на биологично-активните
вещества

на магистър фармацевт Мартина Стоянова Савова, редовен докторант в
Департамент Приложна микробиология, Институт по микробиология
“Стефан Ангелов” - БАН,

на тема: “Механизми на модулиране процесите на затлъстяване при ин витро
модел на човешки адипоцити чрез прилагане на биологично-активни молекули”
с научен ръководител Проф. д-р Милен Иванов Георгиев,
Институт по микробиология “Стефан Ангелов” - БАН

1. Общо представяне на процедурата

С решение на НС на Институт по микробиология „Стефан Ангелов” – БАН,
Протокол №46/25.05.2023 и Заповед № I-64/29.05.2023 на Директора на Институт
по микробиология „Стефан Ангелов” – БАН, съм определена за член на научно
жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема “Механизми на
модулиране процесите на затлъстяване при ин витро модел на човешки адипоцити
чрез прилагане на биологично-активни молекули“ за придобиване на
образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 5.
Технически науки, професионално направление 5.11. Биотехнологии, докторска
програма Технология на биологично-активните вещества.

Автор на дисертационния труд е магистър фармацевт Мартина Стоянова
Савова, докторант в редовна форма на обучение към Департамент Приложна
микробиология, Институт по микробиология “Стефан Ангелов” на БАН, с научен
ръководител Проф. д-р Милен Иванов Георгиев, Институт по микробиология

“Стефан Ангелов” – БАН. Мартина Савова е отчислена с право на защита със Заповед № I-136/27.09.2022 г. на Директора на Институт по микробиология – БАН.

Представеният от Мартина Стоянова Савова комплект материали на хартиен носител и в електронен вариант е в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на БАН за прилагане на ЗРАСРБ и отговаря на критериите на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология “Стефан Ангелов” при БАН за придобиване на образователна и научна степен „доктор“.

Дисертационният труд на тема: “Механизми на модулиране процесите на затлъстяване при ин витро модел на човешки адипоцити чрез прилагане на биологично-активни молекули” е преминал предварителна защита на заседание на семинар “Приложна микробиология и микробни биотехнологии” при Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН на 18.05.2023 г., на който е преценено, че отговаря на минималните изисквания на БАН и на изискванията на Института по микробиология. Дисертационният труд е насочен за публична защита с решение на НС на Институт по микробиология при БАН, Протокол № 46/25.05.2023 г.

Рецензията е съставена в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Глава II, Раздел II от ППЗРАСРБ.

2. Представяне на докторанта

Мартина Стоянова Савова е родена на 10.08.1994 г. в гр. Пловдив. Магистър по фармация от Фармацевтичен факултет, МУ-Пловдив от 2019 г. От 2019 г. работи като биолог в Център по растителна системна биология и биотехнология, Пловдив. Редовен докторант по направление 5.11. Биотехнологии в Лаборатория по метаболомика към Департамент Приложна микробиология, Институт по микробиология “Стефан Ангелов” - БАН от 2019 г. Съавтор в 14 публикации, реферирани в Scopus, цитирани 176 пъти в същата база данни. Има h-index 7. Има 14 участия на научни конференции и конгреси досега. Мартина Савова е получила награда „Иван Евстратиев Гешов“ за най-млади учени в направление „Биомедицина и качество на живот“ през 2021 г.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Затлъстяването е прогресиращо хронично заболяване, което е в основата на над 230 съпътстващи заболявания. 1.9 милиарда души ще живеят със затлъстяване

през 2035 г., като се очаква всеки втори възрастен да е с наднормено телесно тегло, а всеки четвърти възрастен да е със затлъстяване. Между 2020 и 2035 г. се очаква увеличаване на затлъстяването в детска възраст със 100%. Тази прогноза налага да се предприемат усилия на глобално ниво за намаляване, превантиране и лечение на затлъстяването.

Съвременният подход при затлъстяване включва промяна в начина на живот с хранителен режим и физическа активност, медикаментозна терапия и метаболитна хирургия. В Европа са регистрирани 4 медикамента за лечение на затлъстяване – орлистат, налтрексон/бупропион, лираглутид в доза 3.0 мг дневно и семаглутид в доза 2.4 мг седмично.

Трябва да се има предвид, че под 40% от хората със затлъстяване имат поставена диагноза, като под 20% провеждат лечение, а на медикаментозна терапия, въпреки наличните възможности за лечение на затлъстяването, са едва около 1% от тях.

Значителен процент от хората със затлъстяване не постигат значим ефект по отношение на телесното си тегло със съвременните терапевтични средства. Сериозен проблем се оказва и поддържането на постигнатата редукция на телесно тегло във времето. Необходимо е да се познават съвременните възможности за лечение на затлъстяването, за да се подобри прогнозата при хората с това заболяване. Комплексният характер на затлъстяването като заболяване налага необходимостта от търсене на терапевтични възможности, насочени към различни механизми, участващи в патогенезата му. Ето защо изключително интензивно се работи в насока на намиране на нови средства за контрол на телесното тегло. Естракти от растения и техни вторични метаболити са с потенциал да повлияят сигналните пътища и механизми, които са в основата на функцията и физиологията на мастните клетки, като основни структурни единици на мастната тъкан, и съответно да окажат влияние върху развитието на затлъстяване.

Неизяснените въпроси около ефективността на прилаганите терапевтични средства при затлъстяване определят актуалността на представения дисертационен труд на Мартина Савова, която си поставя за цел да изследва влиянието на екстракти от *Z. jujuba* (хинап), *P. aviculare* (пача трева), *P. hydroperg* (водно пипериче) и техни вторични метаболити върху процесите на адипогенеза и натрупване на липиди *in vitro* в модел на човешки адипоцити и валидиране на ефекта на най-обещаващите сред получените метаболити в *in vivo* модел на затлъстяване при нематоди от вида *C. elegans*. За реализиране на основната цел на

настоящия дисертационен труд са формулирани точно и ясно 7 основни задачи, които се отнасят до подбор на растения, според налични етнофармакологични данни за ефект при затлъстяване; определяне на фитохимичния състав на избрани растителни екстракти чрез метаболитно профилиране посредством ядрено-магнитен резонанс (ЯМР); изследване на влиянието на екстракти от *Z. jujuba*, *P. aviculare* и *P. hydropiper* върху процесите на адипогенеза и липолиза при ин витро модел на човешки адипоцити; изучаване на механизма на действие на екстракти от *Z. jujuba*, *P. aviculare* и *P. hydropiper* върху човешки адипоцити; провеждане на ин силико докинг симулация с природни молекули, избрани според данните за фитохимичния състав на изследваните екстракти; установяване на механизма на действие на селектирани вторични метаболити – апигенин, бетулинова и маслиненна киселина в ин витро модел на човешки адипоцити; потвърждаване на анти-адипогенния ефект на бетулинова киселина и изясняване на сигналните механизми при модел на затлъстяване *C. elegans*.

4. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 131 страници, като е добре оформен в следните основни раздели: Заглавна страница (1 страница), Съдържание (4 страници), Използвани съкращения (2 страници), Въведение (3 страници), Литературен обзор (25 страници), Цел и задачи (2 страница), Материал и методи (12 страници), Резултати с 3 таблици и 29 фигури (38 страници), Обсъждане на резултатите, онагледено с 3 фигури (19 страници), Изводи (1 страница), Приноси (1 страница), Благодарности (1 страница), Библиография с 218 литературни източници (20 страници).

5. Познаване на проблема

Литературният обзор е много добре структуриран и представя актуална информация за епидемиологията, етиологията, патогенезата, усложненията, превенцията и фармакологичното лечение при затлъстяване. Подробно е разгледана структурата и функцията на мастната тъкан, както и особеностите на бялата, кафявата и бежова мастна тъкан. Задълбочено е анализирана ролята на висцералната мастна тъкан като ендокринен орган. Представени са молекулярните механизми на диференциацията на адипоцитите, ролята на ключови транскрипционни фактори, сигнални пътища и микроРНКи, които са много добре онагледени. Анализирани са експериментални модели на затлъстяване – ин витро модел при човешки адипоцити (клетъчна линия 3T3-L1), както и ин vivo моделна

система при нематод *C. elegans*. Специален акцент е поставен върху етнофармакологични решения при затлъстяване, оценка на качеството и състава на растителни продукти, като алтернатива в терапията на затлъстяването, с цел да се гарантира безопасната им употреба. Разгледано е приложението на лечебни растения при затлъстяване и свързаните с него метаболитни нарушения, като са представени три растения - *Polygonum aviculare* L (пача трева), *Polygonum hydropiper* L (водно пипериче) и *Z. Jujuba*. Mill (хинап) Подробно е представена обща информация, фитохимичен състав, биологична активност и са идентифицирани вторични метаболити в екстракти от посочените растения, групирани според химичната им структура.

Цитирани са 218 литературни източника, като 61% от тях са от последните 5 години, 89% от последните 10 години; те са от чуждестранни списания, като са посочени и автори от страната с публикации в международни издания.

Докторантката познава много добре състоянието на проблема и е представила задълбочена творческа оценка на анализирания литературен материал.

6. Методика на изследването

В дисертационния труд е използвана стратегия, която включва няколко етапа: етнофармакологичен подход при избор на растения и метаболитно профилиране на получените екстракти; скрининг за анти-адипогенен потенциал на растителните екстракти, както и на избрани вторични метаболити в човешки адипоцити, и потвърждаване на ефекта на избрани вторични метаболити *ин виво* в *C. elegans*.

Подробно е описано събирането на растителен материал и процесите на екстракция. Проведена е *ин витро* оценка на анти-адипогенен потенциал в човешки адипоцити, като подробно е описано клетъчното култивиране и третиране, оценката на жизнеспособността на клетките, анализа за вътреклетъчно натрупване на липиди. Използван е *ин виво* модел на затлъстяване, предизвикано от глюкоза при *C. elegans*.

Използвани са съвременни методи - високоефективна течна хроматография (ВЕТХ), ядрено-магнитно-резонансна (ЯМР) спектроскопия, *ин силико* докинг анализ, полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) на иРНК и микроРНКи, Western блот техника. Статистическият анализ на данните е осъществен чрез SigmaPlot v11.0 от Systat Software GmbH (Erkrath, Germany).

Избраната методика на изследване позволява постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

В настоящия дисертационен труд са получени данни за фитохимичния състав на екстракти от листна маса на *Z. jujuba* (хинап), и надземни части от *P. hydroper* (водно пипериче) и *P. aviculare* (пача трева) чрез извършване на метаболитно профилиране с ЯМР.

С приносен характер е въвеждането за първи път в България на ин витро модел на затлъстяване при човешки SGBS адипоцити като скринингова платформа за оценка на анти-адипогенния потенциал чрез повлияване на липидното натрупване (липогенеза) и разграждане (липолиза) на растителни екстракти и природни молекули. Установено е, че и трите растителни екстракти (хинап, водно пипериче и пача трева) водят до потискане на диференциацията и натрупването на липиди в мастните клетки, което е в подкрепа на потенциалния им терапевтичен ефект при затлъстяване. Най-изразена анти-адипогенна активност и най-силен инхибиращ ефект върху процесите на адипогенеза и липолиза са наблюдавани при екстракт от *Z. jujuba*. Така структурираната експериментална платформа позволява установяване и на молекулярните механизми на действие на природни молекули. Резултатите от проведените в настоящия труд експерименти за първи път предоставят данни за механизма на действие на екстракт от листа на хинап в модел на затлъстяване при човешки адипоцити. Установено е, че анти-адипогенният му ефект е свързан с инхибиране на PPAR γ , C/EBP α , адипонектин и P13K/AKT сигналния път, докато екстракти от пача трева и водно пипериче повлияват само P13K и PPAR γ . Инхибирането на P13K/AKT сигналния път е идентифициран като основен молекулярен механизъм на ефекта на екстракт от хинап върху адипогенезата. Наблюдаваното повлияване на експресията на PPAR γ и C/EBP α показва участието на тези транскрипционни фактори в установения анти-адипогенен ефект.

В дисертационния труд е проведен скрининг за оценка на анти-адипогенния потенциал на растителни вторични метаболити - апигенин, бетулинова, маслиненна и розмаринова киселина. Сред природните молекули от състава на екстракта от хинап, с най-изразено анти-адипогенно действие се очертава бетулиновата киселина. Получените резултати показват, че бетулиновата киселина има ефект

върху ключови сигнални пътища - взаимодействия с РІЗК/АКТ сигналната каскада и модулира PPAR γ в ин витро модел на затлъстяване при човешки адипоцити.

С приносен характер от научно-фундаментален характер са идентифицираните молекулярни пътища, участващи в механизма на анти-адипогенно действие на апигенин, бетулинова и маслинова киселина в човешки адипоцити.

В настоящия дисертационен труд за първи път в България е въведен ин vivo модел за изучаване на фенотипа и липидното натрупване при затлъстяване в нематоди от вида *C. elegans*, който представлява ин vivo платформа за изучаване на метаболитни заболявания и оценка на анти-обезогенния потенциал на молекули с различен произход.

Сред изследваните чисти молекули от екстракт от хинап, бетулиновата киселина показва изключителен потенциал за понижаване на липидното натрупване на клетъчно ниво, което налага провеждане на експеримент на организмово ниво – в глюкозо-предизвикан модел на затлъстяване *C. elegans*, за валидиране на получените ин витро резултати. Потвърдено е, че бетулиновата киселина повлиява различни аспекти на липидния метаболизъм както при използвания клетъчен модел, така и на организмово ниво, и представлява природно съединение с потенциал за приложение във фармакотерапевтичния подход за лечение и превенция на затлъстяване. В най-високата използвана концентрация, бетулиновата киселина потиска натрупването на липиди до степен, сравнима с резултатите, постигнати при третиране с референтно лекарство за лечение на затлъстяване – орлистат.

Във финалния за настоящия труд експеримент е изследвана експресията на панел от гени, участващи както в липогенезата, така и в хидролизата на липидите и окислителното им разграждане. Установено е, че бетулиновата киселина потиска липидния метаболизъм ин vivo при моделен организъм *C. elegans* чрез модулиране на транскрипционен фактор *nhr-49*, регулиращ процесите на липиден синтез и хидролиза.

Със сериозен научно-приложен приносен характер е доказаният инхибиторен ефект на бетулинова киселина (10 μ M) върху липидните депа, свързан със стимулиране на експресията на *nhr-49* и *acs-2*, докато в концентрация от 50 μ M бетулиновата киселина повлиява гени, свързани с липидната хидролиза и действието на десатуразите при *C. elegans*. От сериозно значение е и установеният ефект на бетулиновата киселина върху експресията на микроРНКи, чиито таргетни

гени участват в процесите на липолиза и липогенеза при *C. elegans*. Обобщено е, че бетулиновата киселина регулира инсулин-медираната адипоцитна диференциация посредством PI3K/AKT сигналния път, експресията на транскрипционен фактор *nhr-49*/PPARs и микроРНКи, свързани с липидния метаболизъм. Така получените данни за молекулярния механизъм на действие на бетулиновата киселина биха могли да послужат като основа за разработване на препарати за контрол на телесното тегло и за профилактика на затлъстяването. Бетулиновата киселина се очертава като най-обещаващата природна молекула сред изследваните в настоящия дисертационен труд, чийто ефект е валидиран и на организмово ниво.

С научно-фундаментален приносен характер е охарактеризирането на ефекта на розмаринова киселина върху адипогенезата и липолизата при SGBS адипоцити чрез инхибиране на ключови за адипогенезата фактори като *C/EBP α* , *PPAR γ* и адипонектин., както и върху експресията на фактори на възпалението по време на адипоцитната диференциация, което очертава бъдещи възможности за включването и на този растителен вторичен метаболит в терапевтичните подходи при затлъстяване.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с темата на дисертационния труд Мартина Савова е представила 6 публикации в международни научни списания, 4 от които с импакт фактор – общ IF 28.068, индивидуален IF 5.06, всички в Q1. Мартина Савова е първи автор в три от публикациите, две от които с импакт фактор в Q1, което е доказателство за водещата ѝ роля в проведените изследвания. 4 от научните публикации по темата на дисертационния труд на Мартина Савова имат 79 цитирания (Scopus). Отделни фрагменти от дисертационния труд на Мартина Савова са представени на 6 международни научни прояви, 2 като доклади и 4 като постери, като Мартина Савова е водещ автор в 5 от участията си. Мартина Савова е участвала в един национален научен проект, финансиран от ФНИ (КП 06-H51/14) и в един международен научен проект, финансиран от Европейската комисия по програма “Хоризонт 2020” (739582 PlantaSYST).

9. Лично участие на докторантката

От предоставената документация е видно личното участие на Мартина Савова в проведеното дисертационно изследване. Получените резултати и формулираните приноси са нейна лична заслуга.

10. Автореферат

Авторефератът към дисертационния труд на Мартина Стоянова Савова отразява основните резултати, постигнати в дисертационния труд и отговаря на всички общоприети изисквания в ППЗРАСРБ за изготвянето му.

11. Критични забележки и препоръки

Към дисертационния труд нямам забележки.

12. Съответствие с изискванията на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология "Стефан Ангелов" при БАН

Приложение 1. Брой точки по показатели - 5. Технически науки

Група от показатели	Показател	Необходим брой точки по ЗРАСРБ	Мартина Савова
А	1. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор"	50	50
Г	7. Научна публикация в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация	30	42.3
	8. Научна публикация в нереперирани списания с научно рецензиране или в редактирани колективни томове		5
Д	12. Цитирания или рецензии в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация, или в монографии и колективни томове		790
Е	18. Участие в национален научен или образователен проект		10
	19. Участие в международен научен или образователен проект		20
Общ брой		80	917.3

Според Приложение 1, в Групи показатели А и Г са необходими общо 80 точки, като Мартина Савова е представила общо 917.3 точки.

Според Приложение 2 са необходими две публикации в списание с импакт фактор, глави от монографии, сборници от международни форуми, публикувани в пълен текст, патенти, като Мартина Савова е представила 4 публикации в списания с импакт фактор, всички в Q1.

Така с представените данни Мартина Савова многократно надвишава минималните национални изисквания, както и изискванията в Правилник за

условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология “Стефан Ангелов” при БАН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, считам, че дисертационният труд на Мартина Стоянова Савова е напълно завършен, съвременен, задълбочен, добре структуриран и оформен, с ясни и точно формулирани и изпълнени задачи, с определени изводи и сериозни научно-фундаментални и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката в една интересна област – експериментално затлъстяване, по която относително малко е работено в нашата страна.

Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват и значително надвишават специфичните изисквания на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Институт по микробиология “Стефан Ангелов” при БАН.

Дисертационният труд показва, че докторантката Мартина Стоянова Савова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Технология на биологично-активните вещества, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на членовете на уважаемото научно жури да присъдят образователната и научна степен ‘доктор’ на Мартина Стоянова Савова в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.11. Биотехнологии, докторска програма Технология на биологично-активните вещества.

12.08.2023г.

София

Рецензент:

Проф. Д-р Цветалина Танкова, д.м.н.