

## РЕЦЕНЗИЯ

**от доц. Петя Асенова Димитрова, Лаборатория по експериментална имунотерапия,  
Департамент по имунология, Институт по микробиология "Акад. Стефан Ангелов"**

избрана за член на Научното жури със Заповед I-64/29.05.2023 г. от Директора на  
Институт по микробиология, БАН и за рецензент от Научното Жури с Протокол  
№1/20.06.2023

**на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'**

**с автор:** Магистър фармацевт Марина Стоянова Савова

**Тема:** Механизми на модулиране процесите на затлъстяване при ин витро модел на човешки  
адипоцити чрез прилагане на биологично-активни молекули

**с научен ръководител:** проф. Милен Иванов Георгиев

**по направление** 5.11. Биотехнологии (Технология на биологично-активните вещества)

### **1. Общо описание на представените материали**

Авторът на дисертационния труд Марина Савова е докторантка в редовна форма на обучение към Лаборатория по метаболомика на Департамент „Биотехнология“, Институт по микробиология, БАН, с научен ръководител проф. Милен Георгиев. Марина Савова е представила за дисертационен труд, на хартиен носител и в електронен вариант, и съответните документи, според изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИМикБ, БАН, а именно: заявление за допускане до защита, копие от завършена магистърска степен, заповед за зачисляване, протоколи от изпити и курсове по специалността, справка за кредитите, справка според минималните изисквания на ЗРАСРБ и допълнителните изисквания на ИМикБ, БАН, протокол и предварителна рецензия от предзащита, дисертационен труд и автореферат на български и английски, списък на публикациите и цитиранията, декларация за оригиналност и автобиография.

### **2. Актуалност на тематиката**

Според Световната здравна организация (СЗО), затлъстяването е заболяване, което засяга всички възрасти, като данните показват, че при подрастващите на възраст от 5-19 години заболяемостта нараства от 4 до 18%, както и около 39 милиона деца под 5 годишна възраст са със свръх-тегло или със затлъстяване при преброяване през 2020 г. Според инициативата на Global Obesity Observatory в България повече от 20% от възрастното население над 18 години е със свръх-тегло с повече мъже, страдащи от заболяването, отколкото жени. Все още подходите за фармакологична терапия при затлъстяване е ограничена, поради сложната патология на заболяването, която включва аномалии в метаболизма (окислително редуциращи и катаболитно-метаболитни), промени в енергийните депа и клетъчната дихателната активност и подлежащо хронично възпаление. В допълнение при свръхтегло, често се развива метаболитен синдром, при който се появяват симптоми за състояния на повишен риск от сърдечно-съдови заболявания, инсулт и диабет тип 2. Затова считам, че темата на дисертацията засяга актуален проблем, а именно нова фармакологична терапия при затлъстяване. Актуалността на

дисертацията се дължи и на избора на подхода за фармакологична интервенция, а именно използване на вторични метаболити от растителни екстракти, с ниска молекулна маса, но потенциал за селективно действие върху определени сигнални пътища и/или върху ключови механизми, свързани с патофизиологията на заболяването. Показателно за актуалността на проблема е и броя на публикуваните статии - при задаване на термина „затлъстяване“ в PUBMED се идентифицират 12 139 публикации през 2022 г. спрямо 2 488 през 2002 г.

### **3. Целесъобразност на поставените цели и задачи**

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва влиянието на екстракти от *Z. jujuba* (хинап), *P. aviculare* (пача трева), *P. hydropiper* (водно пипериче) и техни вторични метаболити върху диференциацията и формирането на липидни депа в човешки адипоцити, и потвърждение на ефекта на селектиран вторичен метаболит с най-добра ефективност в модел на затлъстяване при нематоди от вида *C. elegans*.

Поставени са 7 задачи, които са формулирани с цел последователно изпълнение на поставената цел. Към задачите е представена фигура, която очертава стъпките на цялостната експериментална стратегия, което прави много добро впечатление за нивото на познаване на проблема и зрялост на научния подход.

### **4. Познаване на проблема**

Докторантката Марина Савова демонстрира отлично познаване на изследванията на други колективи в областта и включва в обзора и дискусията 11 литературни източника, публикувани през 2023 г., 66 публикувани през 2021 г. и 84 – през 2021 г. Литературният обзор е написан компетентно и стегнато, като са приложени 4 фигури, които онагледяват важни механизми и взаимоотношения на молекулно и клетъчно ниво и свързани с изучаване на *C. elegans*. Приложени са и четири таблици за идентифицираните вторични метаболити в различните растителни екстракти според литературни данни. Познаване на материала от докторантката личи и от подраздел Бъдещи насоки, включен след Дискусията.

### **5. Методика на изследването**

Докторантката използва разнообразна методология – използват се биотехнологични подходи, клетъчно култивиране и сигнализиране, подходи за проследяване на адипоцитната диференциация, активност и функция, подходи за изучаване на генната експресия, за отглеждане и проследяване на фенотипа на кълби червеи. Статистическите методи гарантират повторимост и кохезивност на получените данни. Определено, усвоените от докторантката методи биха и дали предимство в бъдещото и кариерно развитие за планиране на нови експериментални задачи при реализиране на научни проекти.

### **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Дисертационния труд има структура според изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ИМикБ, БАН, а именно съдържа следните глави:

- Заглавие
- Използвани съкращения
- Въведение – 3 страници с ясно очертаване на проблема
- Литературен обзор – 24 страници, с подраздели за мастна тъкан, патофизиология на затлъстяването, съвременни подходи за профилактика и терапия на затлъстяване, експериментални модели на затлъстяване, терапия и етнофармакологични подходи при

затлъстяване. Мартина е използвала 4 фигури и 4 таблици за по лесно и систематично обобщение на литературата.

- Цели и задачи – 2 страници, с поставени 7 задачи и илюстративна фигура
- Материали и методи – 11 страници, с използвани методи за спектроскопия с ядрено-магнитен резонанс (ЯМР), високо-ефективна течна хроматография (ВЕТХ), *in silico* докинг анализ, *in vitro* оценка на анти-адипогенен потенциал, клетъчно култивиране, анализ за вътреклетъчно натрупване на липиди (адипогенеза) и освобождаване на глицерол (адиполиза), полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) за количествено определяне на иРНК и микроРНКи, *in vivo* модел на затлъстяване, индуцирано при хипергликемичен шок в *C. elegans*, индуциране на липидно натрупване и третиране при *C. elegans*, оценка на жизнестойност и фенотипни показатели, оцветяване на натрупани липиди, идентифициране на микроРНКи. Използани са и таблици за прецизно описание на праймерите за RT-qPCR на иРНК и микроРНКи, включени в дисертационния труд.
- Резултати – 37 страници, 28 фигури с по няколко панела (обикновено 4-6 панела), а при изследване на ефекта на метаболитите върху експресията на гени, свързани с метаболизма – до 14 панела. Приложени в резултатите са 2 таблици.
- Дискусия – 15 страници с 3 фигури, синтезиращи най-важните механизми, открити и описани в дисертационния труд.
- Бъдещи насоки – 3 страници с очертаване на изследователската значимост на данните в докторската дисертация
- Изводи – 1 страница с шест извода от експерименталната работа
- Приноси – 1 страница с 5 научно-фундаментални приноса и 3 научно-практически приноса

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

### **Потвърдителни приноси**

- Докторантката предоставя експериментални данни за фитохимичния профил на екстракти от листа от *Z. jujuba*, от надземни части от *P. aviculare* и *P. hydropiper*. Нейните изследвания са с потвърдителен характер, като тя идентифицира подобно на други изследватели, тритерпени – вкл. бетулинова киселина, както апигенин и розмаринова киселина. Литературната база данни показва, че съединенията са вторични метаболити с потенциал за регулация на адипогенезата.
- Данните в дисертацията потвърждават, силно-изявеното инхибиращо действие на екстракт от *Z. jujuba* върху на процесите на адипогенеза и липолиза.

### **Дисертационния труд представя следните приноси с фундаментален характер**

- За първи път е охарактеризирано инхибиращото действие на розмаринова киселина върху два паралелни процеса - адипогенезата и липогенезата и върху експресията на възпалителни фактори по време на адипоцитната диференциация.
- За първи път е доказано, че инхибиторният ефект на ниска доза бетулинова киселина върху липидните депа при *C. elegans* е свързан със стимулиране на експресията на *NHR-49* и *ACS-2*.
- За първи път е доказано, че действието на висока концентрация бетулинова киселина повлиява експресията на гени, свързани с процеси за хидролиза на липидите при *C. elegans* и действието на десатурази.

- За първи път е доказан механизъм на действие на бетулинова киселина върху микроРНКи, чийто таргетни гени, участват в процесите на липолизата при *C. elegans*.

#### Приноси с научно приложен характер

- Въведен и оптимизиран е ин витро модел на човешка адипоцитна диференциация с потенциал за скринингова платформа за анти-адипогенен потенциал на растителни екстракти и природни молекули.
- Въведен и експроатиран е модел за изучаване на фенотипа, липидното натрупване при индуциране на затлъстяване в кръгли червеи при хипергликемични условия. Моделът е чудесна *in vivo* платформа за оценка на анти-обезогенния потенциал на природни съединения молекули при моделен организъм *C. elegans*.

#### 8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантката има **6 публикации**, от които в **3 е първи автор** и трите статии са базирани на резултатите на докторантката от експерименталните изследвания по дисертацията и две от тях са с **импакт фактор над 7, (Q1)**. В останалите статии Мартина допринася отново в експерименталната работа и в дискусията и написването на статиите (според описанията в раздел Contribution of the authors на всяка статия). Мартина има **над 80 цитата** на публикуваните статии.

#### 9. Въпроси към докторанта

Моят въпрос към Мартина Савова е: Защо съвременните терапии на затлъстяване не са ефективни?

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд **съдържа научни, научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката** и отговарят 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 дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилник на ИМикБ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че Мартина Савова **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, и **предлагам присъждане на образователната и научна степен 'Доктор' направление 5.11. Биотехнологии (Технология на биологично-активните вещества) на Мартина Савова.**

11/08/2023 г.

Рецензент: .....

Доцент Петя Димитрова