

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р **Николина Михайлова Михайлова**, Лаборатория по имунохистохимия и имунопатология, Департамент Имунология, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“, Българска Академия на Науките

избрана за член на Научното жури със Заповед № I-81/30.06.2023 г. от Директора на Институт по Микробиология и за рецензент от Научно жури с Протокол №1/09.08.2023г.

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Автор: Кристиана Мирославова Амирова

Тема: Изолитране на природни молекули от растителен произход, модулиращи функцията на транскрипционен фактор Nrf2

Научни ръководители: проф. Милен Георгиев и доц. Петя Димитрова

по област на висше образование 5. Технически науки, направление: 5.11 „Биотехнологии“ докторска програма: „Технология на биологично активните вещества“

1. Общо описание на представените материали

Автор на дисертационния труд е Кристиана Мирославова Амирова – докторантка в редовна форма на обучение към Лаборатория по метаболомика на Департамент „Биотехнология“, Институт по микробиология, БАН, с научни ръководители проф. Милен Георгиев и доц. Петя Димитрова.

Представеният за разглеждане комплект материали на хартиен носител и в електронен вариант, е в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (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“.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Кристиана Мирославова Амирова е родена на 5 май 1993 год., в гр. Пловдив. През 2017 год., Кристиана завършва Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ с квалификация магистър по Молекулярна биология и Биотехнологии и в същата година е назначена на длъжност Биолог в Център по Растителна и Системна Биология и Биотехнология (ЦРСББ), град Пловдив. През 2018год. е зачислена като редовен докторант по направление 5.11. Биотехнология в Институт по Микробиология, БАН, Лаборатория по Метаболомика.

3. Актуалност на тематиката

От векове растенията се използват за лечение и са доказани като източник на природни продукти с множество ползи за здравето на хората. Използвани най-вече въз основа на емпирични знания, без задълбочени изследвания за тяхната фармакологична активност и химичен състав, днес се използват като база за разработване на нови

терапевтични лекарства. Търсенето и доказването на биологична активност на природни молекули изолирани от растения е „*Trendy topic*“ в последните години. Развитието на протеомиката, метаболомиката и биоинформатиката прави възможно изследването на такива природни суровини като потенциални молекули с противовъзпалителна, антибактериална, противогъбична и противотуморна активност и на техния терапевтичен потенциал.

Поради страничните ефекти, свързани с конвенционалните терапии, търсенето на нови и безопасни източници на природни продукти с доказани терапевтични качества е все по-наложително.

Предоставения ми за рецензия дисертационен труд разглежда тематика, която е актуална както от научна, така и от научно-приложна гледна точка. Интересът на докторантката и нейните ръководители е насочен към търсене на вещества с растителен произход, които имат модулиращ ефект върху патогенезата на дегенеративни и възпалителни ставни заболявания, а именно транскрипционен фактор Nrf2.

4. Целесъобразност на поставените цели и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се идентифицират и охарактеризират нискомолекулни съединения от растителни екстракти от *Ballota nigra* L., *Clinopodium vulgare* L., *Leonurus cardiaca* L.p и *Haberlea rhodopensis* Friv., с потенциал за въздействие върху транскрипционен фактор Nrf2 в прицелна популация от неутрофили и да се демонстрира терапевтичното им действие върху функцията на гранулоцитите при модели на ставни възпалителни и дегенеративни заболявания.

Заложените 8 работни задачи систематизирано и логично описват стъпките за постигане на поставената цел.

5. Познание на проблема

Впечатлението от представения литературен обзор е, че Кристиана познава много добре съвременното състояние на изследваните от нея проблеми. Литературният обзор е разделен на шест подраздела, всеки от които разглежда различни аспекти от разработката. Включени са 5 таблици обобщаващи информация на базата на публикувани източници. Докторантката започва с исторически преглед на природолечението и представяне на известните към момента биологично-активни вещества с растителен произход, имащи фармакологичен потенциал. В табличен вид са представени данни за вещества от растителен произход, одобрени за терапевтично приложение и на такива включени в клинични изпитвания. Направен е преглед върху методите за събиране на проби от растения и охарактеризиране на активни вещества от тях, както и методите за изолиране на биологично-активни вещества. Отново в табличен вид, докторантката е извела най-разпространените методи за анализ на биологичната активност на вторични метаболити, като е представила тяхните предимства и недостатъци. Това прави впечатление и показва доброто познаване на методологията от страна на дисертантката. Направено е стегнато описание на растенията, които са тема на настоящия дисертационен труд. В отделен раздел е направен преглед на структурата на транскрипционен фактор Nrf2, механизмите за регулация на генно и протеиново ниво, подходите за активация и експресия на Nrf2 и

значението му в патогенезата на дегенеративните и възпалителните ставни заболявания. Приложена е таблица с известни растителни активатори на Nrf2, като е обобщена информация за механизмите им на действие и моделните системи при които са изследвани.

От литературната справка, докторантката извежда три важни заключения, които допълнително потвърждават актуалността на темата на дисертационния труд и подсказват за новаторския потенциал на разработката.

6. Методика на изследването

Методологията която е използвана при разработката на дисертационния труд е впечатляваща – използвани са различни биотехнологични методи за получаване на растителни фракции, за фитохимичен анализ чрез високоефективна течна хроматография и ядрено-магнитен резонанс; работа с клетъчни култури, получаване на първични клетъчни култури; разнообразни молекулярно-биологични и имунологични методи - определяне на клетъчна преживяемост, програмирана клетъчна смърт и некроза; флуориметричен анализ на клетъчния фенотип, вътреклетъчни нива на цитокини; сигнализация; имунофлуоресценция, полимеразна верижна реакция в реално време; Докторантката е включила и три от най-използваните *in vivo* модели на възпалителни и дегенеративни ставни заболявания, а именно Модел на зимозан-индуцирано възпаление; Модел на колагеназа-индуциран остеоартрит и Анти-колаген антитяло-индуциран модел на ревматоиден артрит, както и хистологичен анализ на експерименталните животни. За анализа на получените резултати Кристиана е използвала широк набор от статистически тестове.

7. 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
- ❖ Съдържание
- ❖ Използвани съкращения и списък на използваните чисти вещества и наименованията им на латиница
- ❖ Въведение – 1 страница
- ❖ Литературен обзор – 45 страници включващи 4 илюстративни снимки, 3 фигури и 5 таблици и 6 подраздела - Исторически преглед на природолечението; Биологично-активни вещества с фармакологичен потенциал, изолирани от растения; Методи за получаване, охарактеризиране и изолиране на биологично активни вещества; Методи за изучаване на биологичните ефекти на метаболитите; Етнофармакологичен подход за подбор на растения, източници на биологично активни вещества; Структура и функция на Nrf2;
- ❖ Цели и задачи – 1 страница, с поставени 8 задачи
- ❖ Материали и методи – 19 страници, с подробно описание на използваните химикали и реагенти, чисти вещества, антитела и китове систематизирани по производител и с посочени каталожни номера; описание на най-често използваните разтвори и среди с

представяне на техния пълен състав; списък на използваните среди и свързани химикали с информация на производител и каталожен номер; описание на използваната клетъчна линия; описание на използваните лабораторни животни; в частта с използваните методи за описани Метод за системен анализ на литературата, Методи за приготвяне на растителен екстракт, фракциониране и изолиране на чисти вещества, Фитохимичен анализ - Анализ с високоефективна течна хроматография и Анализ с ядрено-магнитен резонанс, Методи за Изолиране, култивиране и диференциация на клетки, Третиране на диференцирани гранулоцити или миши неутрофили с нискомолекулни съединения, Методи за Определяне на клетъчна преживяемост и апоптоза и некроза, Флоуцитометричен анализ за фенотипизиране, експресия на клетъчни рецептори, вътреклетъчна продукция на цитокини, Nrf2, фосфорилиран/нефосфорилиран p38 и β -галактозидаза, *In vitro* хемотаксис към SDF-1, Имуноблот за определяне на NRF2 в неутрофили или гранулоцити, Имунофлуоресценция за определяне на β -галактозидаза и CXCR4, Определяне на β -галактозидазна активност, Полимеразна верижна реакция в реално време (RT-qPCR) на mPNC, Приложена е и таблица с прецизно описание на праймерите използвани в дисертационния труд; *In vivo* експерименти - Модел на зимозан-индуцирано възпаление, Модел на остеоартрит чрез индуциране на нестабилност в ставата с колагеназа, Анти-колаген антитяло-индуциран артрит; Хистологични методи за анализ; Статистически методи за анализ.

- ❖ Резултати – 46 страници, 1 таблица и 32 комплексни фигури с добро качество.
- ❖ Дискусия – състояща се от 15 страници, синтезирана и обобщена информация от получените резултати в дисертационния труд.
- ❖ Изводи – 1 страница, 11 на брой напълно отговарят на получените резултати и са в съответствие с поставените цели и задачи
- ❖ Приноси – 1 страница

8. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Формулирани са общо 12 на брой приноси, като са разделени на Приноси с потвърдителен характер (3 на брой), Приноси с научно-фундаментален характер (6 на брой) и Научно приложни приноси (3 на брой).

Приноси с потвърдителен характер

1. Метоболомният анализ на проби от растителни екстракти, приготвени от *B. nigra.*, *C. vulgare.*, *L. cardiaca* и *H. rhodopensis* потвърди данните от литературата за наличие на вторични метаболити – фенолни киселини (кафеена, хлорогенова, катехин), фенилетаноидни гликозиди (миконозид, калцеолариозид E) и дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол).
2. Локалното приложение на Nrf2 активатор CDDO-Me има терапевтичен ефект при модел на дегенеративно ставно заболяване.
3. Човешките гранулоцити и миши неутрофили имат повишена експресията на Nrf2 на транскрипционно и протеиново ниво при активиране на Nrf2 от CDDO-Me.

Приноси с научно-фундаментален характер

1. За първи път са представени доказателства, че фармакологичното активиране на Nrf2 с CDDO-Me намалява чувствителността към стареене – senescence на миши неутрофили
2. Установено е, че прогресията на остеоартрит е съпроводена с придобиване на стареещ фенотип на неутрофилите.
3. Екстрактът на *C. vulgare* и активните метаболити кафеена и хлорогенова киселина потискат експресията на циклооксигеназа COX-2.
4. Фракция D, миконозид и калцеолариозид E повлияват експресията на *NFE2L2* гена и процента на Nrf2 позитивни неутрофили.
5. Установен е различен механизъм на действие на двете чисти вещества върху Nrf2, който дължи на особеностите на тяхната структурата, селективното им действие върху Nrf2 сигнализирането и експресията на PI3K.
6. Приложението на фракция D, миконозид и калцеолариозид E подобрява симптомите и патологичните промени в модел на артрит чрез модифициране на експресията на Nrf2 и Nrf2 таргетни гени (*SOD-1* и *PRX1*) в синовиални екстракти и чрез намаляване на броя на TNF- α + неутрофили в циркулацията.

Научно приложни приноси

1. Въведен е полезен модел за култивиране на *Haberlea rhodopensis* Friv *in vitro*, при който нивото на миконозид в екстракт на *Haberlea rhodopensis* Friv неколkokратно надвишава това в сравнение с диворастящия вид.
2. Растителният екстракт *Haberlea rhodopensis* Friv може да служи за получаване на фракции с различно съотношение на метаболитите миконозид и калцеолариозид E.
3. Миконозид и калцеолариозид E може да се приложат в комбинация за ефективно фармакологично модифициране на Nrf2.

9. Преценка на публикациите по дисертационния труд

То темата на дисертацията има публикувани четири статии в реферирани международни научни списание (всички в Q1), с впечатляващ общ IF 27.222, в три от които, Кристиана е първи автор. В Scopus се откриват 26 цитирания при изключване на автоцитатите.

По време на дисертацията си, Кристиана Амирова е участвала в два проекта, има получени три награди и 5 участия с международни научни мероприятия с постерни презентации

10. Автореферат

Авторефератът към дисертационния труд на Кристиана Мирославова Амирова отразява основните резултати, постигнати в дисертационния труд и отговаря на всички общоприети изисквания в Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Република България (ППЗРАСРБ) за изготвянето му.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни и 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 Кристиана Амирова **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения като **демонстрира** качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Въз основа на изложеното, убедено давам своята *положителна оценка* за проведеното изследване, и *предлагам на уважаемото жури да присъди на Кристиана Амирова образователната и научна степен „Доктор“ в направление 5.11 Биотехнологии.*

25.09.2023г.

Рецензент:

(доц. д-р Николина Михайлова)