

## С Т А Н О В И Щ Е

от доц. д-р Златка Милчева Алексиева  
Департамент „Обща микробиология“ – секция „Генетика“  
Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ - БАН

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на научна и образователна степен “Доктор” по Професионално направление 5.11. Биотехнологии, Научна специалност „Технология на биологично активните вещества“

Тема: **„Изолиране на природни молекули от растителен произход, модулиращи функцията на транскрипционен фактор Nrf2“**

Автор: **Кристиана Мирославова Амирова**

Научни ръководители: доц. д-р Петя Димитрова и проф. д-р Милен Георгиев  
от Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН

От древността и до наши дни са известни практики, прилагани по целия свят, за използване на растенията за лечение на множество заболявания. Съвременното методологично ниво и научно-технологични алгоритми за анализ създават реални възможности за идентифициране и охарактеризиране на природни продукти с противовъзпалителна, антибактериална, противогъбична, противотуморна и др. активности и приложението им във фармацевтичната и терапевтична практика.

Ефектите от фармакологично повлияване на транскрипционния фактор Nrf2 при редица трудно лечими, хронични заболявания се основават от наличието на множество различни гени, повлиявани от него. Използването на природни растителни молекули, с високо селективно действие и подходящ фармакокинетичен профил, за модулиране на функционалността на Nrf2 е иновативен подход за изследване и терапия на такива заболявания и съпътстващите ги патологии.

Неутрофилите са ключови клетки за вродения имунитет. Неутрофилите са сред кръвните клетки, играещи значителна роля в едни от най- разпространените възпалителни и дегенеративни заболявания на ставите. Изследването на влиянието на Nrf2 върху функцията им е от важно научно и научно-приложно значение.

В Литературния обзор на дисертацията, в рамките на 52 страници, което е около 1/3 от представеният материал е включена подробна информация за всички описани в литературата биологично-активни вещества с растителен произход и фармакологичен потенциал. Сред тях са вещества от растителен произход, одобрени за терапевтично приложение и преминаващи клинични изпитвания. Направена е подробна справка за методите за получаване, охарактеризиране и изолиране на биологично-активни вещества. Подробно са описани растителните обекти *B. nigra*, *C. vulgare*, *H. rhodopensis* и *L. cardiaca* и идентифицираните в тях биологично-активни вещества и биологичната им активност.

Значително внимание е отделено на структурата, функцията и механизмите за модулиране активността на транскрипционния фактор Nrf2. В заключителната част на обзора е описана ролята на експресията на Nrf2 при дегенеративни и възпалителни ставни заболявания.

Към ясно формулираната в дисертацията основна цел следват 8 основни задачи, които очертават акцентите на дисертацията, а именно да се идентифицират нискомолекулни съединения от растителни екстракти от *Balota nigra L*, *Clinopodium vulgare L*, *Leonurus cardiaca L* и *Haberlea rhodopensis Friv.*, въздействащи върху експресията и активацията на транскрипционния фактор Nrf2 в неутрофили и да се изследва терапевтичното им действие при модели на ставни възпалителни и дегенеративни заболявания.

В глава „Материали и методи” са включени и съчетани по-стандартни култивационни, химични и биохимични методи с някои от най-модерните методи за анализи в областта на съвременните биотехнологии, като изолиране, култивиране и диференциация на клетки, високо ефективна течна хроматография (ВЕХТ), флоуцитометричен анализ, имунофлуоресценция, RT-qPCR, ЯМР, методи за идентифициране на експресията на Nrf2 на транскрипционно и транслационно ниво, статистически анализи и др. Важен методичен елемент в разработката е въвеждането на метод за *in vitro* култивиране на *H. rhodopensis* Friv с цел запазване на този ендемичен вид в природата. Използването на всички описани методи за разработката на настоящата дисертация характеризира докторантката като изграден специалист с широк и специализиран арсенал за изследователска дейност в областта на Технологиите на биологично активни вещества.

Глава “Резултати” започва с резултатите от метаболомния анализ на екстракти и чисти вещества, изолирани от *H. rhodopensis*, *B. nigra*, *C. vulgare* и *L. cardiaca*. Важно е да се изтъкне логичната обосновка на определяне на вида екстракти и съдържащите се в тях биологично активни молекули, които ще се използват в разработката, както и обектите на тяхното въздействие.

Получените оригинални резултати се дължат на оптимизирането на методите за измерване на протеиновата и генна експресия на Nrf2 в неутрофили. За тази цел е използван тритерпеноид CDDO-Me, активатор на Nrf2. Ефектът на CDDO-Me върху апоптозата е оценен в неутрофили от костния мозък на мишки и в човешки гранулоцити. Активаторът на Nrf2 в нестимулирани неутрофили, подобрява преживяемостта на клетките. Доказано е, че CDDO-Me инхибира фенотипа на чувствителност към стареене при Ly6G+CD11b+ неутрофили. може да действа като мощен регулатор на стареенето на неутрофилите по време на прогресирането на увреждането на коляната става.

Изследван е и ефекта на локалното приложение на CDDO-Me върху модел за индуциране на остеоартрит и върху фенотипа на неутрофилите в този модел. Установено е подобряване на хистологичните параметри, наред с инхибиране на локалната секреция на металопротеиназа MMP-9 и факторът на туморна некроза TNF- $\alpha$ . Математическият анализ е показал добра корелация между активността на заболяването и експресията на хемокиновия рецептор CXCR4 при неутрофили.

Доказано е, че под въздействието на различните растителни екстракти и чисти вещества се променя нивото на експресия на NFE2L2 гена. Прилагането на миконозид, форситозид, вербаскозид и балонигрин водят до по-висока експресия в сравнение с растителния екстракт от *H. Rhodopensis*, а леонури и стахидрин понижават нивото ѝ в сравнение с екстракт от *L. cardiaca*.

Значителна по обем работа е извършена в частта, отразяваща ефекта на екстракт от *H. rhodopensis*, фракции и чисти вещества върху експресията на Nrf2 на протеиново и транскрипционно ниво в човешки гранулоцити. Проучени са фракции от екстракт на *H. Rhodopensis*, различаващи се по съотношението на миконозид и калцеолариозид Е в тях (D - 1:0.6, E - 0.25:1 и B - съдържа предимно миконозид). Чрез RT-qPCR са зледвани PMA-индуцираната иPHK експресия на ген NFE2L2 и на таргетните за Nrf2 гени PRDX1 и SOD-1 и ефектът на фракция D 200 µg/mL, миконозид 32 µg/mL и калцеолариозид Е 20 µg/mL върху експресията на NFE2L2 гена.

Установено е около 1.5 пъти понижение в експресията на PRDX1 след третиране със CDDO-Me, спрямо недиференцираните (pre) клетки, и 1.6 пъти намаление в транскрипцията на SOD-1 в диференцирани гранулоцити, и спрямо диференцираните, но нетретирани с веществото клетки. Представените данни показват, че калцеолариозид Е предизвиква PMA индуцирана експресия на NFE2L2 гена, като повиши и протеиновото ниво на Nrf2, а миконозид показва противоположно действие, подобно на това на CDDO-Me - намаляват транскриптите за Nrf2 в PMA-стимулирани клетки, но нивото на Nrf2 протеина остава стабилно и се повишава експресията на PI3K. Миконозидът повлиява позитивно PMA-индуцираната експресия на гените PRX1 и SOD-1, докато калцеолариозид Е има обратен ефект. В заключение може да се каже, че CDDO-Me, фракция D, миконозид и калцеолариозид Е предизвикват модификация на експресията на Nrf2 в неутрофили, промяна в миграционната им способност, индуциране на старене и инхибиране на продукцията на цитокин TNF-α, с важна роля при хронични възпаления.

Раздел „Дискусия“ се отличава със задълбочено познаване на предшестващите данни за изследваните процеси, сериозен анализ на получените резултати, обосновани хипотези и разкриване на огромния потенциал на голяма част от изследваните растителни екстракти като източник на метаболити с противовъзпалителна активност при активирани неутрофили и съответна терапевтичната значимост.

На основата на получените резултати са формулирани 11 изводи и 9 основни приноса с оригинален характер (6 – с научно-фундаментални и 3 – научно-приложни), както и 3 – с потвърдителен. И изводите и приносите отразяват обективно получените резултати.

В настоящата дисертация за първи път е направено проучване за влиянието на Nrf2 при неутрофили, като е изследвана връзката между senescence и CXCR4. Установено е, че, активаторът на Nrf2 CDDO-Me понижава експресията на CXCR4 върху повърхността на неутрофилите, получени от кръв и ВМ, след стимулиране с LPS in vitro и по време на прогресиране на патологията на ставното увреждане.

Получените данни показват, че синтетичният метилов естер на 2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9(11)-диен-28-оева киселина (CDDO-Me) може да действа като мощен регулатор на стареенето на неутрофилите по време на прогресирането на увреждането на колянната става.

Резултатите показват, че вътреклетъчната експресия на Nrf2 се стимулира от използването на миконозид или калциоларозид E, самостоятелно или в комбинация. Продължаването на тези изследвания ще утвърди терапевтичното приложение на изолираните съединения, или на фракциите на *H. rhodopenis* при патологии, свързани с неуспех/дисфункция в активността или експресията на Nrf2.

Трябва да се изтъкне и фактът, че при *in vitro* култивирани растения *H. rhodopenis* съдържанието на миконозид и калцеоларозид E се увеличава повече от 12 и 30 пъти в сравнение с количествата в диворастящия вид, при по-благоприятно съотношение на тези молекули.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обобщение може да се заключи, че представената дисертация има характеристиките на значим фундаментален труд. Извършена е огромна експерименталната и анализаторска дейност на много високо научно ниво. Ролята на докторант Кристиана Амирова е неоспорима, както не буди съмнение и постигнатата от нея висока професионална квалификация. Категорично може да се каже, че дисертационният труд съдържа както научни, така и научно-приложни оригинални и значими резултати.

На основата на получените резултати докторант Кристиана Амирова участва като първи автор в написването на 3 статии, които отпечатани в реферирани списания с високи наукометрични показатели. Представеният за официална защита дисертационен труд на тема „Изолиране на природни молекули от растителен произход, модулиращи функцията на транскрипционен фактор Nrf2“ на докторант Кристиана Амирова напълно съответства на всички основни и допълнителни критерии, отразени в ЗРАСБ и Правилниците за приложението му в БАН и в Институт по микробиология към БАН. На основата на всичко изтъкнато до тук, убедено предлагам на колегите от Научното жури да гласуват за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“ на Кристиана Мирославова Амирова в професионално направление 5.11 Биотехнологии.

15.09.2023 г.

Подпис:

/доц. д-р Златка Алексиева/