

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Милена Петкова Попова
Институт по органична химия с Център по фитохимия-Българска Академия на
Науките (ИОХЦФ-БАН)

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.11. Биотехнологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества“

Автор: Кристиана Мирославова Амирова

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

Научни ръководители: доц. д-р Петя А. Димитрова и проф. д-р Милен И. Георгиев от Институт по микробиология „Стефан Ангелов“-БАН (ИМикБ-БАН)

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № I-81/30.06.2023 г. на Директора на ИМикБ-БАН съм определена за член на научното жури по процедурата за защита на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

Представеният от Кристиана Амирова комплект материали е в съответствие с Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности на ИМикБ-БАН и отговаря на критериите на института за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

Докторантката е приложила 4 броя публикации по темата на дисертацията и съответния доказателствен материал, списък на цитиранията на научните трудове, списък за участия в научно-изследователски проекти и научни конференции и за получени награди. *Общата ѝ научна продукция е 11 публикации в международни списания, цитирани 152 пъти; h-индексът на докторантката е 6, което е забележително.*

Кристиана Амирова придобива магистърска степен по Молекулярна биология и Биотехнологии, департамент Физиология на растенията и молекулярна биология, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ през 2017 г. В периода 2017-2022 г. работи в Център по Растителна и Системна Биология и Биотехнология (ЦРСББ), Пловдив като биолог. Зачислена е като редовен докторант към отдел „Приложна микробиология“ към ИМикБ-БАН на 01.10.2018 г.

2. Актуалност на тематиката

Темата на дисертацията е във важна и актуална област, свързана с търсенето и оценката на растителни видове и техни метаболити като потенциални „химични агенти“ за терапия на хронични заболявания и съпътстващите ги патологии. Фокусът на дисертацията е върху ставни възпалителни и дегенеративни заболявания, и съответно върху транскрипционния фактор Nrf2 играещ роля при регулацията на метаболизма, диференциацията и функцията на участващи в патогенезата на тези заболявания имунни и костни клетки, и модулиране на функцията му чрез използване на вещества с растителен произход. Целта е ясно формулирана, а конкретните научни задачи за нейното постигане са добре и логически дефинирани.

3. Познаване на проблема

Дисертационният труд включва общо 217 литературни източника. Литературният обзор е написан ясно и стегнато. Броят на цитираните източници и фактът, че голям брой от тях са от последни години е показателно, че докторантката познава отлично съвременното

състояние на изследванията в различните области и проблемите/неизвестностите, разглеждани и проучени в дисертационния труд, и умее до обобщава наличната литература.

4. Методика на изследването, характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен на 175 страници и е конструиран в класически стил с добър баланс между отделните раздели. Резултатите са онагледени с 36 фигури, 7 таблици и 4 илюстрации. Включени са и списъци с публикации по темата, цитати, участие в проекти и конференции и за получени награди.

Резултатите от собствените научни изследвания са представени в седем подраздела, съгласно последователността на изследванията, като са представени детайлни данни за проведените фитохимични и фармакологични изследвания с използване на широк набор от методи. Дискусията е представена в два подраздела, отразяващи логично насоката на дисертационния труд, включваща подбор на растителни видове и продуцирани от тях метаболити, проследяване и анализиране на ефектите, *in vitro* и *in vivo*, от приложението на получени екстракти, фракции и индивидуални съединения (вкл. изолирани в хода на работата) върху транскрипционния фактор Nrf2 в избраната целева популация от неутрофили при модели на ставни възпалителни и дегенеративни заболявания, както и механизма на действие на вещества върху Nrf2 при модел на ставно хронично възпаление. Всички изследвания следват добре обмислен последователен подход, основаващ се на етнофармакологични данни и прецизна литературна справка за растения и техни метаболити с противовъзпалително действие.

Метаболитното профилиране на получените растителни екстракти и идентифицирането на изолираните съединения е осъществено чрез ЯМР спектроскопия (1Д и 2Д експерименти), а за целите на отчитане съдържанието на отделните компоненти в екстракти и фракции - ВЕТХ. За *in vitro* и *in vivo* оценката на биологичната активност и терапевтичния потенциал – флоуцитометрия, имунофлуоресценция, ELISA, RT-qPCR и др. Приложените инструментални методи са актуални и съвременни.

Несъмнено е, че дисертационният труд представлява сериозно и задълбочено изследване, проведено на високо научно ниво. Безспорен принос за тематиката, подхода и отличните резултати има и високата компетентност на научните ръководители доц. д-р Петя Димитрова и проф. д-р Милен Георгиев.

Изследванията, представени в дисертационния труд, и получените оригинални резултати за ефекта от фармакологично модулиране на експресията на Nrf2 в неутрофили при дегенеративни и възпалителни ставни заболявания са с подчертан научен и научно-приложен характер.

Основните приноси на дисертационния труд могат да бъдат обобщени, както следва:

✓ Анализирани са химичният състав на 4 растителни вида *Ballota nigra*, *Clinopodium vulgare*, *Leonurus cardiaca* и *Haberlea rhodopensis* чрез ЯМР профилиране; от екстракт от *H. rhodopensis* са изолирани основни биологично активни компоненти;

✓ Потвърдено е, че локалното приложение на олеанановия тритерпен 2-циано-3,12-диоксо-1,9(11)-олеадиен-28-ова киселина метил естер (CDDO-Me) като активатор на Nrf2 има терапевтичен ефект при модел на дегенеративно ставно заболяване (колагеназа-индуциран остеоартрит при мишки), като за първи път е доказано, че активирането намалява чувствителността на миши неутрофили към стареене;

✓ Установено е, че прогресията на остеоартрит е съпроводена с придобиване на стареещ фенотип на неутрофилите;

✓ Установено е, че екстрактът от *C. vulgare* и неговите метаболити кафеена и хлорогенова киселини потискат експресията на циклооксигеназа COX-2;

✓ За фракция от екстракт от *H. rhodopensis*, съдържаща миконозид и калцеолариозид Е (1:0.6), както и за индивидуалните компоненти е установено: повлияване на експресията на *NFE2L2* гена и процента на Nrf2 позитивни неутрофили; механизмът на действие на двете

чисти вещества върху Nrf2; подобряване симптомите и патологичните промени в модел на артрит. *Резултатите водят до заключението, че комбинация от активните компоненти е приложима за ефективно фармакологично модифициране на Nrf2;*

✓ Разработен е биотехнологичен подход, защитен с полезен модел, за култивиране на *H. rhodopensis* Friv, при който биопродукцията на фармакологично активния фенилетаноиден гликозид миконозид неколккратно надвишава тази в диворастящия вид.

5. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Изследванията по темата на дисертацията са обобщени в 4 публикации в научни списания от квантил Q1 и с висок импакт фактор: *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₁₋₂₀₂₂ 6.208), *Cellular and Molecular Life Sciences* (IF₂₀₂₁ 9.234) и *Food and Chemical Toxicology* (IF₂₀₁₉ 4.679). Това, както и забелязаните 25 цитата, е достатъчно показателно за актуалността, качеството и значимостта на проведените изследвания. Представянето на резултатите на международни конференции и отличаването на трудовете с общо 3 награди, също е показателно за това. Докторантката е първи автор в три от научните трудове и съответно трета в един, което безспорно потвърждава личния ѝ принос в извършените изследвания.

6. Автореферат

Представеният автореферат е изготвен според изискванията и отразява структурата на дисертационния труд.

7. Критични забележки

Нямам критични забележки към проведените изследвания. Към дисертационния труд, извън забелязването на правописни грешки и неточности в изказа, имам бележки, свързани с терминологични и фактологични неточности:

- некоректно описание: „корова структура“ (**правилно е основна структура**); в Таблица 1 - „константа на химично отместване“ (*химично отместване*), „константа на сдвояване“ (мултиплетност, *константа на взаимодействие*); „тритерпеноид CDDO-Me, който съдържа β -ненаситени карбонилни групи в пръстени А и С“ (*тритерпеноид CDDO-Me, който съдържа α,β -ненаситен карбонилен фрагмент в пръстени А и С*);

- некоректно класифициране: „фенолни киселини (кафеена, хлорогенова, катехин)“ – катехинът е от групата на флавоноидите, следва да е *розмаринова киселина*; „фенилетаноидни гликозиди (миконозид, розмаринова киселина, форситозид В)“ – розмариновата киселина не е гликозид; „дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол)“ – балотетрозидът е фенилетаноиден гликозид; най-вероятно е балотенол или балотинон, а не балотинол;

- в т. V.2. няма данни за идентифициране на форситозид В, „балотинол“ и балотетрозид, както е посочено на стр. 133, 134, 143 и 145. Извод VII.2., и съответно Принос 1., е некоректен, и непълен по отношение на всички идентифицирани метаболити;

- за резултатите от ЯМР профилирането на екстрактите се препраща към Таблицы 7 и 1, съответно в дисертационния труд и автореферата. В нея обаче отсъстват данни за съединенията балонигрин, вербаскозид, леонуин, стахидрин, миконозид и калцеолариозид Е. Извън липсващите данни в таблицата, за тези съединения като едни от основните биологично активни вещества в подбраните растителни обекти, са описани/представени/цитирани ЯМР данни в дисертацията, но не и в автореферата, което внася допълнителна неяснота;

- на Фигури 5b, 6 и 7 не са представени структурните формули на съответните съединения, а подробното представяне и дискусията на ЯМР данни в текста изисква това; стрелките на Фигура 6 не посочват пресечните сигнали, отговарящи на описаните в текста взаимодействия; Фигури 7b и 7c са идентични, а обхватът (до 4.5 ppm и 85 ppm) е показателен само за наличието на стахидрин;

- за *H. rhodopensis* – на места е посочено, че е идентифициран пауцифлозид (стр. 83 и 132), правилно е пауцифлозид, но е представена структурна формула и са дискутирани данни за калцеолариозид Е, което е и вярното;

- на стр. 134 на две места се посочва връзка между *L. cardiaca* и лабданови дитерпени, едно от тях е „Екстрактите на *H. rhodopensis* съдържат различни по структура съединения, фенилетаноидни гликозиди (миконозид, калцеолариозид Е), от тези на *L. cardiaca*, където идентифицираме дитерпени (балотетрозид, балонигрин, балотинол)“ – балотетрозидът е фенилетаноиден гликозид, а комбинацията от балотетрозид, балонигрин и балотенол/балотинон е характерна за *B. nigra*. Ето защо не е ясно кой екстракт е бил тестван - съгласно т. V.2 в *L. cardiaca* са идентифицирани алкалоиди и фокусът е върху тях.

Изброените забележки не омаловажават постигнатите от докторантката оригинални резултати, не засягат същността на работата и цялостното отлично впечатление и достойнства на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Кристиана Амирова съдържа оригинални научни и научно-приложни приноси и разработки, които покриват и надхвърлят изискванията 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 на изискванията на Правилника на ИМикБ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Въз основа на горе-изложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведените изследвания, постигнатите резултати и приноси и **предлагам на Уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“** на Кристиана Мирославова Амирова в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.11. Биотехнологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества“.

25.09.2023 г.
гр. София

Изготвил становището:
/проф. д-р Милена Попова/