

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Велизар Костадинов Гочев,
ръководител на катедра „Биохимия и микробиология“,
Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“
по: област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.11 Биотехнологии, докторска програма 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*

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № I-81/30.06.2023 г. на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при Българска академия на науките (ИмикБ – БАН) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „**Изолиране на природни молекули от растителен произход, модулиращи функцията на транскрипционен фактор Nrf2**“ 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 *Кристиана Мирославова Амирова* – редовен докторант към департамент „Биотехнология“ с научни ръководители *доц. д-р Петя А. Димитрова и проф. д-р Милен И. Георгиев* от ИмикБ – БАН.

Представеният от *Кристиана Амирова* комплект материали е в съответствие с изискванията на Правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИмикБ – БАН (ПУРНСАД) и Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), включва следните документи: заявление до Директора на ИмикБ – БАН за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд; автобиография в европейски формат; диплома за висше образование ОКС „магистър“; заповед за зачисляване; протоколи и сертификати, удостоверяващи успешно положени изпити и курсове; справка за получени кредити от обучението; справка за изпълнение на минималните национални критерии за придобиване на ОНС „доктор“; протокол от заседанието на националния

семинар по „Приложна микробиология и биотехнологии“, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварителна защита на дисертационния труд и предварителна рецензия на дисертационния труд; дисертационен труд; автореферат – на български и английски език; списък на научните публикации по темата на дисертацията; списък на забелязани цитирания; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи.

2. Кратки биографични данни за докторанта

През 2016 г., Кристиана Амирова е завършила Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“, придобивайки ОКС „бакалавър“ с квалификация „молекулярен биолог“, а през 2017 г., завършва същия факултет, придобивайки ОКС „магистър“ по специалност “Молекулярна биология и биотехнология“ с квалификация „молекулярен биолог и биотехнолог“. В периода 2017 – 2022 г. работи като специалист – биолог в Център по растителна системна биология и биотехнология в гр. Пловдив, като паралелно, от 2018 до 2021 г., е и редовен докторант в ИМикБ – БАН.

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

Търсенето на нови лекарствени вещества за борба с различни инфекциозни, онкологични, автоимунни и др. заболявания е от съществено значение за разработването на ефективни терапевтични подходи за лечението им. Естествен източник на биологично активни вещества (БАВ) с фармакологична активност са растенията и микроорганизмите, като първите са познати на хората от най-дълбока древност и са в основата на съвременната фармацевтична наука. От друга страна, флората на България изобилства от лечебни и етеричномаслени растения, някои от които ендемитни и/или слабо проучени, с уникални метаболитни характеристики, което ги прави особено подходящи за търсенето на нови БАВ с потенциална фармакологична активност. Дегенеративните и възпалителни ставни заболявания са инвалидизиращи и засягат немалка част от населението, което прави търсенето на нови и ефективни вещества за лечението им особено важни. Всичко това ми позволява категорично да определя темата на разработката като актуална.

Целта на настоящия дисертационен труд е да се идентифицират и охарактеризират нискомолекулни съединения от растителни екстракти от *Ballota nigra L.*, *Clinopodium vulgare, L.*, *Leonurus cardiaca L.* и *Haberlea rhodopensis Friv.* с потенциал за въздействие върху транскрипционния фактор Nrf2 в таргетна популация от неутрофили и да се демонстрира терапевтичното действие на БАВ върху функцията на неутрофилите при модели на ставни възпалителни и дегенеративни заболявания. Целта е ясно формулирана и за постигането и са

поставени 8 изследователски задачи. Считаю, че втора изследователска задача II.2.2, определено би трябвало да е първа, защото тя включва систематичен литературен преглед по въпроса за нискомолекулни съединения от растителен произход, регулиращи Nrf2 и е логично да бъде първа стъпка в изследователския процес. Би било добре, ако в самостоятелна задача бе изведено *in vitro* култивирането на *H. rhodopensis* Friv. и продукцията на вторични метаболити, за да се подчертае биотехнологичния елемент на разработката, която е представена за защита по докторска програма Технология на БАВ. Изпълнението на поставените задачи е предпоставка за успешно изпълнение на целта на дисертационния труд.

4. Познание на проблема

Литературният обзор е представен на 45 страници и се основава на 217 актуални литературни източника. Условно може да бъде разгледан като съставен от две основни части – първата, фокусирана върху растителните БАВ и фитохимична характеристика на изследваните видове и втора, посветена на структурата, функцията и подходите за модулиране на активността на Nrf2 фактора. В първата част на обзора са изброени различни растителни БАВ, обект на клинични изследвания и одобрени са терапевтична употреба. Описани са методи за определяне на качествения и количествен състав на растителни екстракти, техники за *in vitro* култивиране и трансформация на растителни култури, както и методи за изучаване на биологичния ефект на БАВ, изолирани от растения (*in silico* анализ, *ex vivo* анализ на безклетъчен филтрат, *in vitro* клетъчен анализ, *in vitro* анализ на фенотип, *in vivo* експериментални модели и др.). Оценявам положително факта, че докторантката е представила информацията аналитично, като е изтъкнала предимствата и недостатъците на различните методи и възможностите за приложението им за целите на конкретното изследване. Втората част на обзора е изключително детайлна и представя различните регулаторни механизми и природни БАВ, действащи като активатори на Nrf2 фактора. И двете части на обзора завършват с кратки заключения, които мотивират необходимостта от разработване на настоящия дисертационен труд и дефинират целта на изследването. В известна степен информацията в обзора е ненужно фрагментирана на множество точки и подточки и на места се наблюдават разминавания между заглавия на раздели и съдържанието на текста в тях, например в раздел II.33 *Изолиране на БАВ от растения*, са описани техники за *in vitro* култивиране и трансформация на растителни култури и нито един метод за изолиране на БАВ. Като цяло, съдържанието, начинът на оформяне на обзора и неговата изчерпателност показват, че докторантката е много добре запозната с разработвания изследователски проблем.

5. Методика на изследването

За постигане на основата цел и проверка на изследователската хипотеза е разработена и изпълнена логично структурирана експериментална схема. За реализация на изследователските задачи са използвани широк набор съвременни спектрофотометрични, имунологични, молекулярно-биологични, цитологични, хистологични, инструментални, биотехнологични и микроскопски методи, описани детайлно, по начин, който гарантира точност и позволява възпроизводство на получените резултати. Докторантката е овладяла и приложила впечатляващ набор от методи, което показва, че по категоричен начин е изпълнена образователната компонента на степента „доктор“.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран по възприетия начин, включващ разделите Въведение (1 стр.), Литературен обзор (45 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (20 стр.), Резултати (54 стр.), Дискусия (15 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (2 стр.) и Литература (2 стр.). Между отделните раздели на дисертацията са спазени оптимални съотношения. Въведението по категоричен начин заявява актуалността на разработката и в този смисъл напълно изпълнява функцията си. Както вече отбелязах, Литературният обзор е изчерпателен, демонстрира познаване на състоянието на изследователския проблем и позволява мотивирано да се определи целта на дисертационния труд. Изпълнението на поставените задачи е предпоставка за успешно изпълнение на целта. Приложената експериментална схема и описанието на приложените методи са коректни. Експерименталната работа започва с получаване на екстракти от диворастващи *B.nigra L.*, *C.vulgare, L.*, *L.cardica L.* и *H.rhodopensis Friv.*, като от родопския силивряк са получени екстракти от *in vitro* култивирани растения. Приложени са два режима на екстракция с 50 % метанол/d H₂O в съотношение 1:20 и 1:30 в съчетание с ултразвук. Получените екстракти от *H.rhodopensis Friv.* са фракционирани хроматографски и разделени на 10 фракции (от А до J). От фракция В е получен чист миконозид, от фракция Е – калцеоларозид Е, а от фракция Н – хиспидулин. Съставът на всички получени растителни екстракти е определен чрез NMR и HPLC и е установено наличие на аминокиселини, въглеhidрати, органични киселини, флавоноиди, фенилпропаноиди и др. При *in vitro* култивирането е постигнато 12-кратно повишение в съдържанието на миконозид и 30-кратно повишение в съдържанието на калцеоларозид Е в екстрактите. За съжаление нито в раздела *Резултати*, нито в раздел *Дискусия* се коментират условията за култивиране, състав на средите, оптимизация на състава и условията на култивиране, чрез които по някакъв начин да бъде обяснено 12 и 30-кратното повишение в съдържанието на миконозид и калцеоларозид Е, съответно. С получените екстракти, отделни фракции и чисти вещества са третирани диференцирани гра-

нулоцити и миши неутрофили. Определена е експресията на гена NFE2L2 в диференцирани гранулоцити, третирани с растителните екстракти, чисти вещества CDDO-Me, миконозид, вербаскозид, форситозид и др. Изследвано е влиянието на екстракти от *H.rhodopenis Friv.*, отделни фракции и чисти вещества върху експресията на Nrf2 на протеиново и транскрипционно ниво на човешки гранулоцити и на протеиново ниво в миши неутрофили. Получените резултати са коректно дискутирани на фона на изследванията на други автори. Формулирани са 12 извода, които се базират на получените резултати. Приемам формулираните потвърдителни и оригинални приноси, като някои определено се нуждаят от редакция, например потвърдителен принос 1. Приемам научно-приложен принос 1, който е много важен, с известни резерви, защото в дисертационния труд липсват резултати от такива изследвания.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Във връзка с дисертационния труд са представени четири научни публикации, всички в списания от квартал Q1. Три от публикациите, с водещ автор докторант Кристиана Амирова, са свързани с дисертацията, но една от статиите, с водещ автор доц. д-р Марчев, публикувана в *Cellular and Molecular Science Life Science*, е обзорна и в нея не са включени никакви резултати от представения ми рецензиран дисертационен труд. За по-малко от две години, две, от трите публикации по дисертацията, са получили 9 положителни цитирания, което е безспорен атестат за високото качество и оригиналност на получените резултати.

8. Лично участие на докторантката

Считам, че личното участие на докторантката в реализацията на експерименталната работа, обсъждането на резултатите, оформянето на дисертационния труд и публикациите към него е релевантно на нивото на компетентността ѝ, като държа да подчертая, че във всеки от изброените елементи ясно личи екипната работа в голям колектив, включващ разнообразни специалисти с висока степен на компетентност в сфери като имунология, инструментален анализ и др.

9. Автореферат

Авторефератът е изготвен според изискванията на съответните правилници и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

10. Критични забележки и препоръки

Бележките и препоръките към отделните части на дисертационния труд са посочени в раздели 3, 4 и 7 на рецензията. Като цяло бих си позволил да препоръчам на докторантката и екипа да разширят относителния дял на биотехнологичните експерименти и резултатите от

тях, защото имат безспорна експертиза в това отношение, с цел намиране на по-добър баланс между биотехнология и имунология, особено в дисертационен труд, представен за придобиване на ОНС „доктор“ по Технология на БАВ.

Към докторантката има следния въпрос: С какво ще обясните драстичното повишение в продукцията на миконозид и калцеоларозид Е от *in vitro* култивирана *H.rhodopenis* Friv., в сравнение с диворастящи растения?

11. Лични впечатления

Впечатленията ми от Кристиана Амирова, в качеството ми на неин преподавател по Микробни биотехнологии в Биологическия факултет на ПУ „П. Хилендарски“, са изцяло положителни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и ПУРНСАД на ИМикБ – БАН. Дисертационният труд показва, че докторантката Кристиана Мирославова Амирова притежава теоретични знания и демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Поради гореизложеното, давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди на Кристиана Мирославова Амирова 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“.

18.09.2023 г.

Рецензент:

(проф. д-р Велизар Гочев)