

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд на тема: **“Изследване на екстракти от български растения за приложение в медицината”**, на Ралица Крумчева Велева, докторант на самостоятелна подготовка към Катедра „Клетъчна биология и биология на развитието“ за придобиване на ОНС "Доктор" в научно направление **4.3. Биологически науки (Клетъчна Биология 01.06.18)**

Научни консултанти: Доц. д-р Таня Топузова-Христова, проф. д-р Галя Станева

Рецензент: Проф. дбн Росица Конакчиева, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

Рецензирането на материалите, представени в настоящата процедура, се основава на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилниците за неговото приложение, на Заповед № РД 38-374/11.07.2022 год. на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ за назначаване на Научно жури, и е съобразено с препоръчителните изисквания, приети от Академичния съвет на СУ“ Св. Кл. Охридски“ за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности. Докторантката Ралица Велева е представила за процедурата по защитата всички необходими материали, справки и документи. Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на кандидатката.

Биографични данни

Ралица Велева се дипломира през 2014 год. в СУ „Св. Климент Охридски”, Биологически факултет, като магистър по Клетъчна биология и патология след завършена ОКС „бакалавър“ по специалност Биотехнологии. Професионалната и кариера включва работа първоначално като медицинска сестра в Първа МБАЛ - София “Св. Йоан Кръстител”, МЦЕПХКД “Есте Клиник” ООД, биолог в Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН в периода след дипломиране до 2020. От м. март 2020 е назначена на длъжност асистент в катедра “Клетъчна биология и биология на развитието”, Биологически факултет при СУ “Св. Климент Охридски”. В Катедрата Ралица Велева води практическите занятия към курсовете по Хистология, Ембриология и Животински клетъчни култури и хибридомни технологии. В периода

2016-2019 разработва дисертационния си труд като редовен докторант и е отчислена с в срок с право на защита.

Актуалност на разработвания проблем

Представеният дисертационен труд попада в съвременна област на клетъчната биология с перспективи за приложение във фармакологията и разработването на нови лекарствени средства. Фокусът е върху лечебните растения като важен източник на нови химични формули за модерни терапевтични подходи. Човешкият организъм притежава развити механизми за метаболизиране на растителни субстрати, което прави препаратите на растителна основа лесни за усвояване и от екологична гледна точка предпочитани пред синтетичните препарати. Медицинските растения, намиращи приложение в традиционната медицина се проучват интензивно тъй като за много от тях е доказано благоприятно въздействие върху организма. Лечебният им ефект се отдава на съдържащите се в тях вторични метаболити - разнородна група биологично активни органични съединения, които не участват пряко в жизненоважните клетъчни биохимични процеси, но изпълняват важни екологични функции (репеленти, атрактанти и др.) и са част от защитните механизми срещу оксидативен стрес. Изследванията, включени в настоящата дисертация имат за цел проучване на биологичната активност на растителни екстракти от различни български видове с доказано медицинско значение. Интересът на авторката е насочен към действието на конкретни видове екстракти, обогатени с определени групи биологично активни вещества (БАВ).

Обща характеристика на дисертационния труд

Представената дисертация е структурирана и оформена според изискванията. Дисертационният труд е написан на 172 страници, съдържа 42 фигури и 5 таблици. Въведението в темата съдържа мотивите за разработване на дисертацията и е последвано от Литературен обзор от 44 стр. , следван от Цел и задачи – 1 стр. Глава Материали и методи – 18 стр. Най-голяма част от труда заема глава Резултати и дискусия – 64 стр., следвана от Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Списък на научните трудове и участия в конгреси, Списък на използваната литература – 31 стр. Използвани са 356 литературни източника, включващи както по-стари (преди 1990) така и нови изследвания по темата. Това е свидетелство за желанието на кандидатката да представи подробно тази област на науката, като най-вероятно броят на цитиранията е могъл да бъде по-обобщен.

Авторефератът е изготвен според изискванията и отразява коректно материала и основните достижения в дисертационния труд. Номерата на таблиците, фигурите и цитиранията в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд поради наложеното преструктуриране.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор е достатъчно информативен, фокусиран и компетентно съставен. Разгледани са подробно избрани растителни видове с потенциал за приложение в медицината, обект на дисертационния труд като семейство Lamiales (Устноцветни) с основен представител *Lamium album* L. (Бяла мъртва коприва), род *Inula* (сем. Asteraceae (Сложноцветни)). Специално внимание е отделено на характерните биологично активни вещества, съдържащи се в подбраните за обект видове, както и на известните за науката фармакологични ефекти на техни екстракти, методите за ин-витро култивиране с техните особености и предимства и др. Представена е справка за биологично активните вещества, открити в избраните растителни видове. Най-важните от тях с доказано медицинско значение – полифеноли и сесквитерпенови лактони са обсъдени подробно. Отделен раздел представя основния обект на изследване – клетъчната мембрана като важна функционална бариера и място за активиране на сигнални пътища свързани с въздействието на биологично активни вещества. Мотивирането на научния труд се определя от стремеж на дисертантката да работи за изясняването на молекулните мишени на БАВ на клетъчно ниво. Анализирани са малкия брой изследвания, ориентирани към мишени като клетъчните контакти и мембранните домени. Проучванията се ограничават предимно до физиологията на мембранните рафтове в норма, без да е проследено влиянието върху тях при фармакологично въздействие. Резултатите биха били от съществено значение за разбирането на механизма на действие на БАВ, което е формулирано в обосновката на дисертационния труд.

Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на дисертационния труд е да се извършат собствени проучвания върху биологичната активност на екстракти от растения от род *Inula* и *Lamium* по отношение на селективна цитотоксичност към ракови клетки, промени в мембранната организация и клетъчната морфология.

Избрани са адекватни подходи като: изследване на цитотоксичност на БАВ ин-витро в различни клетъчни линии с туморен и нетуморен произход; анализ на промени в морфологията на клетките вкл. въздействие върху актиновия цитоскелет; изследване ефекта на екстрактите върху интегритета и подредеността на клетъчните мембрани посредством рутинни и флуоресцентно – базирани анализи за качествена и количествена оценка; изследване на генотоксичност; оценка на антиоксидантния капацитет на екстрактите и тяхното влияние върху подредеността на липидния бислой в моделни мембранни системи.

Оценка на глава Материал и методи

Раздел Материал и методи е обстойно изложен и дава обективна представа за един обемен и богат в методично отношение експериментален труд, както и за натрупания опит от страна на докторантката. Обектът на изследване е труден и многолик и са търсени решения за най-адекватна методична оценка на изследваните показатели. Използван е богат арсенал от методи на клетъчната биология и биофизиката. За изследванията са използвани няколко подбрани клетъчни линии от различни клетъчни типове, с раков и нераков произход, преведено е сравнение за ефектите на БАВ от хлороформени и метанолови екстракти на растения отглеждани ин-витро и такива от естествени условия. Освен рутинни методи за клетъчно култивиране, изследване на цитотоксичност и клетъчна морфология чрез оцветяване с кристал виолет, изследване на пермеабилитета на плазмената мембрана посредством тест с трипаново синьо, са използвани методи за наблюдение на промените в актиновия цитоскелет, изследване за генотоксичност чрез кометен тест, създаване на моделни мембранни с-ми като липозоми и др. Приложени са цяла гама от флуоресцентно – базирани анализи за проследяване промените в моделни и нативни клетъчни мембрани обект на изследване при въздействие с БАВ като Лаурдан флуоресцентна спектроскопия, TEMPO-DPH флуоресцентна спектроскопия, DPH - флуоресцентна поляризационна спектроскопия, флуоресцентна микроскопия на клетъчни мембрани, белязани с di-4-ANEPPDHQ и Лаурдан др.

Методите са описани добросъвестно и информативно. За повечето от тях е дадена теоретична обосновка което надхвърля изсикванията за тази глава, от друга страна безспорно последователно въвежда читателя в методологията на изследването, Свободното и ясно боравене с терминологията и адекватното описание на методите говорят за натрупания от дисертантката богат експериментален и методичен опит.

Описанието на този раздел дава кратка представа за извършената огромна по обем и трудоемкост работа, в резултат на която са получени оригинални данни позволяващи да бъдат формулирани приноси от този труд. За съжаление, липсва раздел или описание на използвани методи за статистическа обработка, избор на интервал за достоверност при сравнителните изследвания на цитотоксичност, генотоксичност и др.

Оценка на получените резултати

Резултатите от дисертационния труд са представени върху 64 страници и следват адекватно поставените задачи. По-важните резултати се отнасят до сравнително проучване на ефектите на БАВ от хлороформени и метанолови екстракти на растения отглеждани ин-витро и такива от естествени условия върху клетъчната морфология и преживяемост и състав и флуидитет на липидните мембрани. За съжаление в много фигури липсва статистическа обработка на получените данни или такава не е представена. Това обстоятелство не дава възможност да бъде обективно дефиниран количествен израз на получените резултати особено по отношение на сравнителни анализи за цитотоксичност и генотоксичност.

Въз основа на обобщението на огромен брой данни по отделните задачи са формулирани 8 извода и 3 приноса, които не са номерирани и това затруднява тяхното цитиране. Намирам че формулирането на изводите е могло да бъде по-стегнато без сегашната обстоятелственост, за да изпъкнат достойнствата и конкретните достижения на научния труд. Например: Първи извод има нужда от по-ясно формулиране; Вторият извод е било добре да цитира получени данни от изследването, в този вид не е достатъчно информативен, което намалява научната му стойност. Втората част на извод 5 намирам за излишна и не на място - като цяло този извод не звучи убедително; Приемам значимостта на изводи 6 и 7; Последният извод има необходимост от по-конкретна формулировка която да отразява постигнатото ново знание в дисертационния труд. Приемам, че по-важните оригинални изводи които очертават достойнствата на дисертационния труд са:

- Хлороформеният екстракт от *Lamium album* отглеждан ин-витро се отличава със селективно цитотоксично въздействие към раковите клетки (A549, HEPG). Този ефект не се наблюдава при отглеждане на растението в естествени условия;
- Екстрактите от *Lamium album* проявяват генотоксичност върху неракови клетки определено чрез Комет анализ.

- Установена е селективност към раковите клетки на хлороформени екстракти от *Inula oculus-christi*, *Inula aschersoniana* и екстрактът от листа на *Inula germanica*.
- Флавоноидните гликозиди и фенолните киселини от фракционирани екстракти проявяват селективно действие върху структурната организация на мембраните и актиновия цитоскелет на ракови клетки.
- Двата полифенолни екстракта проявяват подреждащ ефект върху моделни мембранни системи, изградени от фосфатидилхолин, докато върху мембраните от сфингомиелин екстрактите имат разнопосочно действие – флавоноидните гликозиди подреждат липидите в бислоя, докато фенолните киселини ги флуидизират.
- Двата полифенолни екстракта флуидизират мембраните в липозоми и оказват подобен на холестерола ефект върху мембраните.

Формулираните приноси са три като съдържат също елемент на излишна обстоятелственост, като приемам по същество първите два от тях. Имам резерви по отношения на третият принос – провеждането на пилотни изследвания само по-себе си не е научен принос ако не са цитирани оригинални нови данни за науката.

Представени са седем публикации свързани с темата на дисертацията, от които две в реферирани и индексирани издания в бази данни Scopus и/или WoS, съответно с квантил Q2 (1 бр.) и Q4 (1 бр.). Резултати от дисертационния труд са представени в седем доклада и 7 постера на 14 научни форума, проведени в България.

Изложените бележки не омаловажават качествата на един обемен и многолик оригинален научен труд изпълнен с най-съвременни методи за наблюдение и анализ. В съвкупност, получените резултати дават основание той да бъде възприеман като значително научно постижение с перспективи за приложение в биомедицината и разработването на нови лекарствени формули.

Заклучение

Рецензираният дисертационен труд отразява задълбочена самостоятелна научна разработка, реализирана с широк арсенал от методи на съвременната клетъчна биология, които са позволили реализирането на научно-приложни резултати чрез получаването на информация на съвременен научно ниво. Използвайки последователен и целенасочен подход изследванията са довели до получаването на оригинални данни с медико-приложно значение. Имайки предвид професионалните качества на докторантката и научните постижения в настоящия труд, изразявам своята положителна оценка за

представения дисертационен труд и убедено препоръчвам на членовете на Научното жури, назначено със Заповед № РД 38-374/11.07.2022 год. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ да присъдят на Ралица Крумчева Велева образователната и научна степен ”Доктор” в професионално направление 4.3. „Биологически науки“, научна специалност Клетъчна биология 01.06.18.

21.09.2022 год.

Рецензент:

София

проф. дбн Росица Конакчиева