

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: Златина Иванова Господинова,
лаборатория “Геномна динамика и стабилност”,

Институт по физиология на растенията и генетика – БАН

Научен консултант: гл. ас. д-р Мария Кръстева

Тема на дисертационния труд: АНТИТУМОРНО ДЕЙСТВИЕ НА БЪЛГАРСКИТЕ
ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ COTINUS COGGYGRIA SCOP., TANACETUM VULGARE L. И
CICHORIUM INTYBUS L. ВЪРХУ ЧОВЕШКИ РАКОВИ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ

Рецензент: доц. Милена Сергеева Мурджева, секция “Молекулярна имунология”,

Институт по биология и имунология на размножаването, БАН

Обем и структура. Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е с класическа структура от увод (2 стр.), литературен обзор (51 стр.), цел и задачи (3 стр.), материали и методи (24 стр.), резултати (39 стр.), обсъждане (18 стр.), изводи и приноси (2 стр.) и списък на цитираната литература от 293 източника. Не липсват и разделите съдържание, използвани съкращения, публикации, цитирания, конгреси, участия в проекти, специализации във връзка с дисертацията. Дисертационният труд съдържа 40 фигури и 10 таблици. Съотношението между отделните части е добро, като единствено литературният обзор на места е излишно подробен по отношение на детайли, които нямат пряко отношение към получените резултати. Дисертацията е написана изключително четивно, на много добър език. Текстът в цялата работа е последователен и логичен. Структурата на отделните части също е подходящо избрана и подзаглавията съответстват на логиката на работата и коментирания резултати.

Актуалност. В тази дисертация е изследван потенциалът на български лечебни растения да бъдат предложени за терапия на злокачествени заболявания, поради способността на активните компоненти с растителен произход да редуцират страничните ефекти, да повишат ефективността на химио- и лъчетерапията, и да редуцират устойчивостта на раковите клетки спрямо лекарствени агенти. Авторите са избрали един от двата алтернативни подхода в търсенето на нови фитосъединения с медицинско приложение –

изследване ефектите на комбинацията от активните съставки на едно растение, съществуваща под формата на тотален екстракт или фракция върху няколко моделни туморни линии. Предимството на този подход е синергичното действие на няколко вещества върху туморните клетки. Получените нови данни за действието на български лечебни растения имат пряк ефект върху приложението им, което е в помощ на пациентите, но също така е от значение за производството на тези продукти, както и за разширяването на пазара им. Подобни изследвания са пример за възможността научни изследвания да бъдат обвързани с бизнеса.

Представен е подробен **исторически преглед** на онкотерапевтици с природен произход, като е обхванат периода от 50-те години на миналия век до днес, включително такива в етап на клинично проучване. Темата е разгледана систематично и изчерпателно. Обоснован е изборът на изследваните растения: **смрадлика** (широка употреба в народната медицина на Балканския полуостров, една от най-често използвани лечебни растения в България), **вратига** и **цикория**. Анализирани са известните ефекти, като е обърнато внимание и на специфики в географския произход на растенията. В тази връзка логично възниква въпросът дали освен географски, има описани и климатични разлики при билки, събирани през различни години.

Особено добро впечатление прави анализът на механизмите на антитуморно действие на природните субстанции. На негова база е изготвен подробен алгоритъм на характеристика на ефекта на изследваните продукти, което е едно от големите достойнства на тази дисертация, което искам да подчертая. В работата е предложена и впоследствие успешно приложена **матрица от изследвания**, които отговарят на редица въпроси:

- Дали дадено вещество има цитотоксичен ефект, селективен по отношение на туморни клетки?
- Каква е оптималната доза и време на въздействието му?
- Има ли ефект върху други туморни линии?

Втората група изследвания е по-специфична, някои от предложените подходи са иновативни. Прилагането им разкрива подробности за механизма на действие – дали са повлияни клетъчният цикъл, апоптозата и/или автофагията, дали има генотоксичен ефект, дали е повлияно термодинамичното поведение на клетките, има ли промени в метилационния статус на третираните клетки. Дали е засегната способността на

туморните клетки да формират колонии, а от тук – дали са засегнати туморните стволови клетки – едно от сериозните предизвикателства пред онкотерапиите, поради по-трудната им податливост на въздействие и възникващите при запазването им рецидиви.

За два от методите, обаче, бих предложила да бъдат допълнително оптимизирани, така че да дават обективна оценка на ефекта. Оценката на автофагията може да бъде представена като процент позитивни клетки, след анализ на фотографиите (с ImageJ например). Аналогичен е случаят с теста за клоногенност – можете да представите резултата като брой колонии на брой изходни клетки. По отношение на теста за клоногенност имам и следното притеснение – предварително сте изследвали цитотоксичния ефект на екстракта от смрадлика в продължение на 72 часа и показвате, че той няма линеен ход. Ефектът върху образуването на колонии изследвате след 11 дни третиране, без да знаете какъв е цитотоксичният ефект при толкова продължително третиране. Имате ли данни за ефекта върху образуването на колонии при третиране за различни времеви интервали? Без значение от забележките към тази част си мисля, че бъдещи изследвания върху туморни стволови клетки, третирани със смрадлика биха били интересни с оглед на получените от вас резултати.

В дисертацията на госпожа Господинова са представени **резултати** от изследвания на ефекта на тотални екстракти от три български лечебни растения (смрадлика, вратига и цикория) и водно-метанолова и хлороформна фракции от вратига върху клетъчни линии от рак на гърдата, на яйчниците и на маточната шийка. За да се потвърди селективното им действие спрямо туморни клетки е използвана контролна нетуморогенна епителиална клетъчна линия. Извършени са впечатляващи по обем и методично богатство изследвания. Получени са убедителни резултати, които са онагледени подробно с графики и таблици, анализирани са подробно и в раздел дискусия са коментирани много умело в съпоставка с наличната литература. Наред с безспорните достойнства на работата имам и следните забележки – в различните изследвания понякога са използвани различни концентрации на изследваните вещества и време на третиране, което създава известна хаотичност и е проблем при съпоставка. Например: защо след получените резултати за наличие на значителен концентрационно- и времезависим цитотоксичен потенциал на тоталния екстракт от вратига, експериментите за оценка на антипролиферативния ефект при панела от туморни линии са проведени с концентрации на екстракта под първоначално

използваните? Синхронизирани ли са клетъчните линии преди третиранията за определяне на фазите на клетъчния цикъл? При показани значителни цитотоксични ефекти, апотозата и задържането на клетъчния цикъл се наблюдава при малък процент клетки, докато ДНК скъсванията, отчетени чрез генотоксичния тест са значителни. Как бихте коментирали?

Приноси. Представените данни са от първото изследване на *in vitro* анти туморните свойства на лечебните растения смрадлика, вратига и цикория от България, като и от първия комплексен анализ на механизмите на анти туморния ефект на тотален водно-етанолов листен екстракт от смрадлика върху човешки туморни клетъчни линии. Получените данни допринасят за разширяване на познанията за биологичните ефекти на екстракти от смрадлика и на хлороформен екстракт от вратига и подпомагат оценката на фармакологичния им потенциал. За първи път е проучвано влиянието на екстракт от лечебното растение върху епигенетични фактори в контекста на регулцията на експресията на ключови за канцерогенезата гени. Един от съществените за мен приноси, които може да бъде добавен към тези, посочени в дисертацията е разработването на **модел за изследване на вещества за анти туморни свойства**. Това само по себе си е продукт, които би бил от интерес за фармакологичната индустрия.

Прави впечатление също така, че докторантката е работила в няколко лаборатории и в различни колективи при изготвяне на представените данни. Това показва колаборативност, възможност за работа в екип, търсене на възможности за разширяване на изследванията, комбинативност на възможности и дадености. Освен основа на богатата работа, която е представена тук, това е и предпоставка за много добро бъдещо развитие на темата, както и на учения. Искрено пожелавам продължаване на работата в този дух!

Представени са четири **публикации във връзка с дисертацията**, като и на четирите Златина Господинова е първи автор. Статиите са в списания с отворен достъп и лесно могат да бъдат намерени в пълен текст, което е добра предпоставка за цитируемостта им, както и за видимостта на получените резултати. Открити са **6 цитирания** до момента. Приложен е списък на четири **конгресни представяния** с постери. Докторантката е участник в три научни **проекта**, свързани с темата на дисертацията.

Авторефератът отразява основните резултати и научни приноси на дисертационния труд. В пълен обем и без никакви промени са отразени разделите „увод“, „цел и задачи“ и

„изводи и приноси”. Литературният обзор е пропуснат, но тъй като „Цел и задачи” съдържа въвеждаща част, която изяснява състоянието на изследванията по проблема и необходимостта от извършените изследвания. Останалите части са по-малко или повече съкратени, но без това да се отразява на логиката на работата и без да ощетява същността на получените резултати. Методите са значително обобщени, по разпространените са изпуснати, като е останал акцент върху по-специфичните, което смятам за правилен подход. От резултатите са представени основните фигури без изключение, като са пропуснати таблиците със конкретни стойности към тях, което наистина е до някъде дублираща информация. С основание са спестени и кривите от PCR реакциите (фиг. 35-38), които могат да бъдат представени като доказателствена част в анекс или към материали и методи, но по-съществения резултат от проведените PCR-анализи е представен в основните фигури. Това разместване на фигурите, обаче води до неминуемо разминаване в номерата им между дисертацията и автореферата. Обсъждането също е представено с незначителни съкращения. Наложителна е изпълнената преработка на цитираните източници. От 293 цитирани източника в дисертацията, тук са посочени само цитираните след направените съкращения, което е коректно и не дава основание за объркване, поради избрания адекватно формат на цитиране с името на автора и текста и подреждане на литературата в азбучен ред.

Категоричното ми **заключение** е, че дисертационният труд отговаря на научните и образователни критерии за докторска степен. Убедено препоръчвам на членовете на Научното жури да вземат решение за присъждане на образователна и научна степен “доктор” в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. „Биологически науки”, научна специалност „Генетика“ на Златина Иванова Господинова.

10 ноември 2017

София

Доц. Милена Мурджева