

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”

**Автор на дисертационния труд:** Златина Иванова Господинова, докторант на самостоятелна подготовка в ИФРГ- БАН

**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:** проф. д-р Любомир Манолов Стоилов

Представеният ми за рецензия дисертационен труд от докторант на самостоятелна подготовка Златина Господинова, озаглавен „Антитуморно действие на българските лечебни растения *Cotinus Cogyria* Scop., *Tanacetum vulgare* L. и *Cichorium intybus* L. върху човешки ракови клетъчни линии”, е изработен практически изцяло в лабораторията по Геномна динамика и стабилност към Институт по физиология на растенията и генетика (ИФРГ) – БАН, с научен консултант гл. ас. д-р Мария Кръстева.

Дисертационният труд на Златина Господинова представлява комплексно проучване в една много актуална и перспективна област от съвременните медико-биологични и онкогенетични изследвания, свързана с профилактиката и неинвазивната терапия на онкологичните заболявания, и по-конкретно с разкриване на потенциала и прилагането на някои природни продукти от растителен произход за ефективна борба с раковите заболявания. Известно е, че богатството на българския растителен генофонд, отнесено към размерите на страната и нейните природни дадености, е значително - флората на България съдържа над 4000 висши растения, като лечебните растения са около 20% от тях, но ефективно се използват (най-вече за стопански цели) не повече от 200-250 вида, а потенциалът на останалите все още е обект на проучвания.

Едно от най-големите предимства на лечебните растения по отношение на антитуморното им действие е, от една страна, липсата на странични увреждащи

ефекти, характерни за широк спектър от прилаганите в текущата медицинска практика химиотерапевтични подходи и лъчевата терапия като цяло, а от друга страна очакваният им потенциал за насочено въздействие върху някои ключови фактори, влияещи върху неопластичната трансформация, например имунният отговор на организма. Не е за пренебрегване и доказаната им вече роля на модулатори на класическите химио- и радиотерапевтични подходи. В тази връзка те представляват определен интерес и за една много перспективна и бурно развиваща се област на съвременните медико-биологични изследвания - т.н. персонализирана медицина. Всичко това ми дава основание да оценя много високо актуалността и перспективността на дисертационната разработка на Златина Господинова.

Докторската дисертация на Златина Господинова е представена на 163 страници, включително таблици, фигури и библиография, като е изградена принципно по класическата за дисертационните разработки в България схема, включваща увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, както и литературна справка, базирана на 293 цитирани източника, почти всички на латиница. Въз основа на получените в хода на работата експериментални резултати са формулирани 5 основни извода, както и 3 научни приноса с фундаментален характер. Списъкът на научните публикации, свързани с дисертационния труд, включва 4 публикации в пълен текст на английски език, две от тях в авторитетно международно списание и 2 в български реферирани списания с online достъп, както и 4 участия с постери и резюмета в научни конференции у нас и в чужбина.

Литературният обзор, обхващащ около една трета от общия обем на дисертацията, се отличава със стегнат стил и изчистен език (характеристика, присъща на дисертацията във всички нейни компоненти), структуриран е подходящо и е достатъчно информативен. Разгледани са в синтетичен, но същевременно аналитичен план ключови аспекти от епидемиологията на раковите заболявания, молекулярно-генетичните основи на канцерогенезата, както и алтернативните терапевтични подходи, прилагани в съвременната онкологична практика. Оправдано голям дял от прегледа на състоянието на проблема заемат характеристиките на трите анализирани в дисертацията лечебни растения - *Cotinus coggyria scop* (смардлика), *Tanacetum vulgare L.* (вратига) и *Cichorium intybus L.* (цикория или синя жлъчка), обхващащи тяхното

разпространение и ботанически профил, фитохимичен състав и приложение в народната медицина, както и биологичната и антитуморната им активности. Логично в обзора са разгледани и някои ключови механизми на антитуморното действие, свързани с баланса между клетъчната пролиферация и апоптозата, генотоксичните ефекти на онкотерапевтиците, както и ролята на епигенетичните модификации в канцерогенезата. За разлика от изчерпателният преглед на първите два механизма, ролята на първичните повреди в ДНК заедно с епигенетичните аспекти на антитуморното действие биха могли да бъдат обект и на по-обстойно внимание въпреки сравнително оскъдната литература.

Като цяло аналитичният подход на представяне на този раздел показва, че докторантката не само познава отлично съвременното състояние на проблема, но е в състояние и критично да оцени получените до сега резултати, както и да открие нерешените проблеми. В този контекст и въз основа на липса на данни относно антитуморното действие на екстракти или фракции от смрадлика, вратига и цикория от българската популация са формулирани и двете основни цели на дисертацията - да се анализира антитуморният потенциал на тези лечебни растения чрез използване на подходящи туморогенни и нетуморогенни клетъчни линии и да се направи оценка на предполагаемите механизми, обуславящи тяхното действие, свързани с влиянието им върху клетъчния цикъл, програмираната клетъчна смърт и някои генотоксични и епигенетични аспекти на антитуморното им действие. Изключително добър и сравнително рядко срещан подход е дефинирането на жизнеспособна работна хипотеза, въз основа на която са оформени много удачно както основните цели, така и конкретните изследователски задачи в дисертацията, като формулировките и тяхната последователност са логични и обосновани, както от концептуална, така и от методологична гледна точка.

Раздел „Материали и методи“ като познавателен заряд и структура съответства на изискванията на дисертация за научната и образователна степен „доктор“. Оценката на антитуморния потенциал на трите лечебни растения е базирана на 4 човешки клетъчни туморни линии, произхождащи от пациенти с някои от широко срещаните онкологични заболявания при жените - рак на млечната жлеза, яйчниците и маточната шийка - MCF7, T47D, A2780 и HeLa, а като контрола - спонтанно обезсмъртената клетъчна линия MCF10A с гърдно-епителен произход. Приложените методи за клетъчно култивиране са адекватни

на характеристиките на тези линии и описанието им показва, че докторантката владее добре тяхното рутинно приложение. Тази теза е приложима напълно и за останалия широк спектър от методологични подходи и техники, използвани в дисертацията за оценка на клетъчната преживяемост, пролиферация и клоногенен потенциал, флуоресцентна микроскопия, кометен анализ като тест за генотоксичност, флуоцитометрия и диференциална сканираща калориметрия, както и количествена полимеразна верижна реакция, предхождана от обратна транскрипция (qRT-PCR), приложена за оценка на експресията на генни, кодиращи метилтрансферази и метил-асоциирани протеини. Подбрани и използвани са и адекватни статистически подходи. Това ми дава основание да констатирам, че експерименталните умения на докторантката са с многопрофилно естество и на високо ниво.

Изложението на експерименталните резултати удачно е предхождано от подробна и добре онагледена схема на изследователската стратегия и нейната етапност, приложена за постигането на поставените цели и конкретни задачи. Анализирани са последователно антитуморното действие *in vitro* на екстракти и фракции от трите български лечебни растения, обект на изследване в дисертацията - смрадлика, вратига и цикория, по отношение на цитотоксичните и антипролиферативните ефекти, като на тази основа е направен подбор на екстракти или фракции с най-висок антитуморен потенциал. Въз основа на тези резултати са изследвани подробно механизмите на антитуморното действие на тотален екстракт от смрадлика, свързани с баланса между клетъчната смърт и пролиферацията на клетките, генотоксичното действие, формирането на колонии и клетъчната термодинамика, както и метилирането на ДНК като епигенетична модификация. Проучени са и някои от механизмите, обуславящи антитуморното действие на хлорофилната фракция от екстракт на вратига, насочени към ефектите по отношение на клетъчния цикъл, апоптозата и автофагията. Бих искал да подчертая отличното качество и илюстративност на фигурите, таблиците и снимковия материал, както и високата езикова култура и внимание към детайла, без това да води до многословие.

Дискусията на данните, получени в дисертацията, е концентрирана върху богатия експериментален материал, получен предимно относно антитуморния потенциал и различни аспекти от механизмите на действие на смрадликата, като обект на обсъждане са и първоначалните данни, получени в това отношение при

вратигата. В тази връзка са формулирани и основните изводи в дисертацията, които отразяват най-съществените резултати и констатации, получени в хода на разработката, както по отношение на ефектите от приложението на използваните лечебни растения, така и относно вероятните механизми на тяхното антитуморно действие. Трябва да подчертая, че извършените комплексни проучвания на ефективността на екстракта от *Cotynus coggyria* имат оригинален характер, например пионерните изследвания върху способността на смрадликата да повлиява някои епигенетични модификации, имащи отношение към експресията на ключови гени в хода на канцерогенезата. Тази констатация важи принципно и за другите две лечебни растения от българската популация, обект на проучване в дисертацията – вратигата и цикорията, което правомерно е намерило отражение и във формулирането на приносите. Приоритетен характер в световната литература имат и данните относно антитуморното действие на екстракти или фракции от смрадлика при клетъчната линия T47D (клетки от рак на млечната жлеза), както и изследванията върху генотоксичния потенциал на тотален екстракт от това растение при клетъчната линия MCF7 с аналогичен произход.

Въз основа на гореизложеното приемам, че основният постулат на работната хипотеза, лежаща в основата на това изследване - наличието на антитуморен потенциал на екстракти или диференциални компоненти от българските лечебни растения смрадлика, вратига и цикория, е намерил своята успешна експериментална реализация и потвърждение. Адекватно са подбрани и използвани и широк спектър от експериментални подходи от арсенала на клетъчната биология, физиология, биохимия, молекулярна биология и генетика, даващи възможност за едно добро „паспортизиране“ на антитуморния потенциал на изследваните лечебни растения. В това според мен се изразяват и основните научни и научно-приложни приноси на дисертацията. В тази връзка имам и един въпрос към докторантката – на какви принципи би трябвало да се изгражда стратегията за използване на първоначалните резултати от лабораторните изследвания и анализи на антитуморния потенциал на лечебните растения с оглед на бъдещото им успешно въвеждане в клиничната практика.

Изложените дотук факти, тяхната достоверност и значимост са предпоставка да оценя високо дисертационния труд на докторант Златина Господинова. В тази връзка принципно приемам и основните изводи и приноси, формулирани в дисертацията. Обемът, качеството и интерпретацията на

експерименталния материал, представен в публикациите във връзка с дисертационния труд - 4 статии в авторитетни международни и наши издания, в които Златина Господинова е първи автор, както и цитируемостта на някои от публикациите представляват убедително доказателство, както за неоспоримия личен принос на дисертантката, така и за международния отзвук и признание на получените резултати. Запознат съм с автореферата на дисертацията, който е изготвен съгласно изискванията, онагледява много добре (с изключение на фиг. 7) и отразява коректно най-важните научни резултати, изводи и приноси на дисертационната разработка.

Считам, че в хода на докторантурата Златина Господинова е придобила и надградила необходимата за реализацията на заявената докторска теза в областта на онкогенетиката обща и специализирана молекулярно-биологична и генетична теоретична подготовка, овладяла е и е приложила успешно широк спектър от съвременни и иновативни методични подходи и техники. Разработената дисертация е убедително доказателство, че Златина Господинова притежава способност не само за усвояване и осмисляне на теоретични познания, но и за творческа интерпретация на получените резултати. Тя е положила с отличен успех изпита за докторантския минимум и другите изискуеми от закона изпити, посетила е голям брой специализирани и езикови курсове, има и изнесени семинарни занятия. Въз основа на тези активности, както и на публикационната си дейност във връзка с дисертацията е акумулирала брой кредити, значително надвишаващ изискванията на ЗРАС и Центъра за обучение на БАН. Всичко това дава основание да считам, че представеният дисертационен труд както по форма, така и по съдържание съответства напълно, а в някои аспекти и надвишава критериите на ЗРАС, правилникът за неговото приложение, както и правилниците на БАН и ИФРГ. Въз основа на това убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди на докторант на самостоятелна подготовка Златина Иванова Господинова образователната и научна степен "доктор" в професионално направление Биологични науки, научна специалност Генетика.

София, 09.11.2017 г.

/Любомир Стоилов/