

Р-НО-56/15.01.2025

СТАНОВИЩЕ

от

Доц. Лилия Владимирова Михайлова, маг.-фарм., д.м.

Лаборатория метаболомика, Департамент биотехнология,

Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, Българска академия на науките
на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен “доктор”
в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление
7.3 Фармация, докторска програма Фармацевтична химия

Автор: маг.-фарм. Велислава Димитрова Годорова

Форма на докторантурата: редовна подготовка

Катедра: Фармакогнозия и фармацевтична химия

Тема: Фармакоаналитичен контрол на субстанции с адаптогенни свойства от
Rhaponticum carthamoides Willd.

Научен ръководител: доц. Калин Валентинов Иванов, дф – Медицински университет -
Пловдив

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

След предварително обсъждане от разширен Катедрен съвет (пр. № 8/14.11.2024 г.) и приемане от Факултетен съвет (пр. № 10/27.11.2024 г.) на ФФ, съм определена със заповед № Р-2121/23.12.2024 на проф. д-р Мария Токмакова – зам. ректор по научно-изследователска дейност на МУ-Пловдив за член на научно жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема “Фармакоаналитичен контрол на субстанции с адаптогенни свойства от *Rhaponticum carthamoides* Willd“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.3 Фармация, докторска програма Фармацевтична химия.

Представеният комплект материали на хартиен/електронен носител е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ, както и с чл.70 (1) от I. Раздел. Придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР“ и научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“ в МУ-Пловдив; Правилник на МУ-Пловдив от 28.01.2021 г. и включва следните документи:

- Заявление до Ректора на МУ-Пловдив за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд
- Автобиография в европейски формат с подпис на докторанта

- Нотариално заверено копие от диплома за висше образование
- Заповеди за записване в докторантура и за отчисляване с право на защита
- Заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан изпит или докторантски минимум по специалността
- Протокол от катедрен съвет за предварително обсъждане на дисертационния труд и взетите решения за разкриване на процедура и за състав на научно жури
- Дисертационен труд
- Автореферат
- Списък на научните публикации по темата на дисертацията
- Копия на научните публикации
- Списък на участията в научни форуми
- Списък на забелязани цитирания
- Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи
- Други документи, свързани с хода на процедурата

Докторантката е приложила 3 броя научни публикации с общ импакт фактор 14.306 (ИФ), с общ брой цитирания 58 без автоцитатите. Докторантката е първи автор на всички представени публикации.

Велислава Димитрова Тодорова е родена на 7 септември 1995 г. и завършва своето средно образование с хуманитарен профил в гр. Пловдив. През 2020 г. се дипломира с отличие като Магистър по Фармация във Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив. Същата година е спечелила конкурс за асистент по Фармацевтична химия и фармацевтичен анализ в катедра „Фармакогнозия и фармацевтична химия“ на Фармацевтичен факултет при Медицински университет – Пловдив където преподава и до момента. От 2021 г. Велислава е зачислена като редовен докторант към същата катедра под ръководството на доц. Калин Иванов. Професионалното израстване на докторантката е съпътствано от придобиване на специалност „Анализ на лекарствените продукти“ през 2024 г. Нейната усилена и впечатляваща със своята отдаденост научна работа е отличена от Министерството на образованието и науката с награда „Питагор“ за млад учен в областта на науките за живота и медицината през 2024 г.

Становището е съставено в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и Глава II, Раздел II от ППЗРАСРБ.

2. Актуалност на тематиката

Хроничното излагане на стрес в ежедневието е сред водещите рискови фактори за преждевременно стареене на организма както и развитие на редица хронични заболявания, като затлъстяване, инсулинозависим диабет и сърдечно-съдови. Това определя и устойчивият интерес към биологичната активност и фитохимичните характеристики на

адаптогенните растения. Адаптогените имат потенциал да нормализират биологичните функции на организма и да го укрепват в условия на стрес. Сред най-добре изследваните растения, които са класифицирани като адаптогени, са: *Panax ginseng* C.A.Mey. (Araliaceae), *Eleutherococcus senticosus* Max. (Araliaceae), *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae), *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail, както и *Rhaponticum carthamoides* (Wild.) Пjin (Asteraceae). Левзея, както е популярно растението *R. carthamoides* се откроява като ценен източник на активни съединения с доказано адаптогенно действие.

Епидемиологични данни за разпространението на наднорменото тегло и затлъстяването сочат че до 2035 г. се очаква всеки втори възрастен да е с наднормено телесно тегло, а всеки четвърти възрастен да е със затлъстяване. Тази прогноза налага да се предприемат усилия на глобално ниво за намаляване, превантиране и лечение на затлъстяването. Съвременният подход при затлъстяване включва промяна в начина на живот с хранителен режим и физическа активност, медикаментозна терапия и метаболитна хирургия. В Европа са регистрирани 4 медикамента за лечение на затлъстяване – орлистат, налтрексон/бупропион, лираглутид в доза 3.0 мг дневно и семаглутид в доза 2.4 мг седмично.

Следва да се вземе под внимание, че под 40% от хората със затлъстяване имат поставена диагноза, като под 20% провеждат лечение, а на медикаментозна терапия, въпреки наличните възможности за лечение на затлъстяването, са едва около 1% от тях.

Значителен процент от хората със затлъстяване не постигат значим ефект по отношение на телесното си тегло със съвременните терапевтични средства. Сериозен проблем се оказва и поддържането на постигнатата редукция на телесно тегло във времето. Необходимо е да се познават съвременните възможности за лечение на затлъстяването, за да се подобри прогнозата при хората с това заболяване. Комплексният характер на затлъстяването като заболяване налага необходимостта от търсене на терапевтични възможности, насочени към различни механизми, участващи в патогенезата му. Ето защо изключително интензивно се работи в насока на намиране на нови средства за контрол на телесното тегло. Естракти от растения и техни вторични биологично-активни метаболити са с потенциал да повлияят сигналните пътища и механизми, които са в основата на функцията и физиологията на мастните клетки, като основни структурни единици на мастната тъкан, и съответно да окажат влияние върху развитието на затлъстяване.

Неизяснените въпроси около фармакоаналитичния контрол на качествения състав и ефективността на прилаганите адаптогени определят актуалността на тематиката на дисертационния труд на Велислава Тодорова, която има за цел да оцени терапевтичния потенциал на *R. carthamoides* и съдържащите се в него екидистероиди при затлъстяване, наднормено тегло и стареене. За реализиране на основната цел на настоящия дисертационен труд са формулирани точно и ясно 7 основни задачи, които се отнасят до подбор на растения и определяне на макроскопски хистохимичен анализ на корени; охарактеризиране на

етеричните малса изолирани в култивирана популация *R. carthamoides*; разработване и валидиране на аналитични методи за количествено определяне на избрани фитоекдистероиди в екстракта от *R. carthamoides* посредством HPTLC; HPLC-UV и LC-PDA-MS; оценка на влиянието на екстракт от *R. carthamoides* и чистите съединение ексидстерон, туркестерон и понастерон А върху процесите на адипогенеза и липолиза при *in vitro* модел на човешки адипоцити; както и оценка на влиянието на екстракта от левзея и екдистерон върху продължителността на живот при моделния организъм *Caenorhabditis elegans*. Добре формулираните задачи напълно съответстват на поставената цел на дисертационния труд и включват съвременни фармакоаналитични методи и адекватни моделни системи за оценка на биологичната активност.

3. Познаване на проблема

Литературният обзор е много добре структуриран и представя актуална информация за фитохимичната характеристика и наличните данни за биологична активност на адаптогенни растения. Задълбочено е анализирана ролята на фитоекдистероидите в ефекта на адаптогенните растения: *Panax ginseng* C.A.Mey. (Araliaceae), *Eleutherococcus senticosus* Max. (Araliaceae), *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae), *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail, както и *Rhaponticum carthamoides* (Wild.) Пјин (Asteraceae). Специален акцент е поставен върху употребата на адаптогенни растения и фитоекдистероидите под формата на екстракти, хранителни добавки и т.нар. „суперхрани“ за повишаване устойчивостта към стрес и подобряване на общата хомеостаза в организма, оценка на качеството и състава на адаптогенни растителни продукти. Представени са предимствата и недостатъците на хроматографските методи за анализ на екдистероидите, които са много добре описани. Анализиран са растения богати на 20-хидроксиекдистерон, които са ядливи и често препоръчвани в здравословни хранителни режими, а именно свежи листа от спанак, стъбла от аспержи и семена от киноа, с цел да се гарантира безопасната им употреба. Подробно е представена обща информация, фитохимичен състав, биологична активност и са идентифицирани вторични метаболити в екстракти от посочените растения, групирани според химичната им структура.

Цитирани са 387 литературни източника, като над 40% от тях са от последните 10 години; те са от международни списания, като са посочени и автори от страната с техни публикации в реферирани научни издания, цитирани са и регулаторни документи на Европейската агенция по лекарствата (EMA) и Световната антидопингова агенция (WADA).

Докторантката познава много добре състоянието на проблема и е представила задълбочена творческа оценка на анализирания литературен материал, като е идентифицирала добре необходимостта от разширяване на научното познание в областта.

4. Методика на изследването

В дисертационния труд е използвана стратегия, която включва няколко етапа: охарактеризиране на растителния материал от *R. carthamoides*; изолиране и анализ на етерично-масления профил на екстракт от левзея посредством газова хроматография в тандем с масспектрометрия (GC-MS); разработване и валидиране на фармакоаналитични методи за количествено определяне посредством HPTLC, HPLC-UV; LC-PDA-MS хроматографски техники; съвременни и надеждни методи за определяне на биологична активност - оценка за анти-адипогенен потенциал на растителния екстракт, както и на избрани вторични метаболити в човешки адипоцити, и оценка на ефекта на екстракта от левзея и екдистерон *in vivo* в *C. elegans*.

Подробно е описано събирането на растителен материал и процесите на екстракция. Ясно и детайлно описан процес на разработване и валидиране на аналитичните методи, с изведени прецизно формулите използвани за определяне на линейност, точност, прецизност и граници на откриване и количествено определяне. Проведена е *in vitro* оценка на анти-адипогенен потенциал в човешки адипоцити, като подробно е описано клетъчното култивиране и третиране, оценката на жизнеспособността на клетките, анализа за вътреклетъчно натрупване на липиди. Използван е *in vivo* модел на стареене при *C. elegans*.

Използвани са стандартни методи от фармакогностичния и фармакохимичния анализ, включително съвременни методи от високоефективна течна хроматография, прецизни методи за определяне на клетъчна жизнеспособност, натрупване на липиди и липолиза при човешки мастни клетки и съвременен подход за оценка на потенциала за повишена устойчивост към различни по произход стресови стимули и удължаване продължителността на живот при *in vivo* моделна система на *C. elegans*. Статистическият анализ на данните е осъществен чрез SigmaPlot v11.0 от Systat Software GmbH (Erkrath, Germany).

Избраната методика на изследване позволява постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, решавани в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 178 страници, като е добре оформен в следните основни раздели: Заглавна страница (1 страница), Съдържание (3 страници), Използвани съкращения (2 страници), Въведение (2 страници), Литературен обзор (49 страници), Цел и задачи (1 страница), Материал и методи (16 страници), Резултати и обсъждане онагледени в 24 таблици и 39 фигури (58 страници), Обсъждане на резултатите, онагледено с 3 фигури (19 страници), Изводи (1 страница), Приноси (1 страница), Списък на публикациите свързани с дисертационния труд (2 страници), Библиография с 387 литературни източници (38 страници), от които 114 от последните 5 години.

В изпълнение на задачите на дисертационния труд са изследвани въздействията на екстракт от *R. carthamoides*, 20-ХЕ, ТС и ПС върху адипогенезата при *in vitro* модел на човешки адипоцити и процесите на стареене при *C. elegans*. Установено е, че екстракти от *R. carthamoides* и 20-ХЕ намаляват адипогенезата и стимулират липолизата, ТС повлиява само адипогенезата, а ПС няма такива ефекти. В допълнение, екстракт от *R. carthamoides* повлиява липидния метаболизъм при глюкозно хранени *C. elegans*. Установено е, че екстрактът от *R. carthamoides* удължава продължителността на живота и забавя физиологичното стареене при *C. elegans*, също така повишава устойчивостта към топлинен стрес и преживяемостта при оксидативен стрес. За разлика от това, 20-ХЕ повишава преживяемостта при *C. elegans*, изложени на оксидативен стрес, и подобрява устойчивостта към топлинен стрес.

Резултатите от проведените изследвания поставят нови основи за по-нататъшни проучвания върху молекулярните механизми на действие на 20-ХЕ, ТС и *R. carthamoides* и тяхното потенциално приложение като средство за подобряване на качеството на живот

В настоящия дисертационен труд са получени данни от проведен сравнителен анализ на етерично малсо от диворастяща и култивирана проба *R. carthamoides*, който показва различия в компонентния състав, дължащи се вероятно на различните климатични условия на растеж. С приносен характер е въвеждането метод за първи път в България за извличане и охарактеризиране на етерично масло от *R. carthamoides*, култивирано в България и за първи път е проведено хистохимично локализиране на секреторни канали и липидни натрупвания в корени и коренище от *R. carthamoides*.

Със сериозен научно-приложен приносен характер са резултатите от проведените в настоящия труд експерименти за разработване и валидиране на НРТLC, НPLC-UV и LC-PDA-MS методи за идентифициране и количествено определяне на 20-хидроксиекдистерон, туркестерон и понастерон в растителни екстракти, „суперхрани“ и хранителни добавки. Посредством валидираните методи за първи път е определено количественото съдържание на посочените фитоекдистероиди в екстракт от *R. carthamoides*, от растение култивирано в България.

Като принос от научно-фундаментален характер са представените данни за биологична активност на идентифицираните 20-хидроксиекдистерон, туркестерон и понастерон, като участващи в механизма на анти-адипогенно действие на екстракт от левзея в човешки адипоцити. Резултатите подкрепят направените изводи, че екстрактът от *R. carthamoides* намалява адипогенезата и стимулира липолизата в *in vitro* модел на човешки адипоцити, а сред изследваните негови чисти съединения 20-хидроксиекдистерон намалява адипогенезата и стимулира липолизата, ТС повлиява само адипогенезата, а ПС не повлиява нито адипогенезата, нито липолизата в *in vitro* модел на човешки адипоцити. В допълнение, данните от *in vivo* моделната система показват потенциала на екстракт от *R. carthamoides* да намалява липидните натрупвания при *C. elegans*, хранени с глюкоза. Екстрактът от

адаптогенното растение левзея има потенциал и за удължаване продължителността на живота, забавяне физиологичното стареене, повишаване устойчивостта към топлинен стрес и оксидативен стрес при *C. elegans*. От изследваните вторични метаболити се откроява биологичната активност на 20-хироксикидон по отношение повишаване преживяемостта при *C. elegans*, изложени на оксидативен стрес и топлинен стрес. Установената антиадипогенна активност и на екстракт от *R. carthamoides* и 20-XE при SGBS клетки и положително влияние на *R. carthamoides* върху стареенето и продължителността на живота при *C. elegans* са доказателства за потенциалната употреба на адаптогенните растения и техни вторични метаболити за контрол на телесното тегло и намаляване проявите в белезите на старее.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Във връзка с темата на дисертационния труд маг.-фарм. Тодорова е представила 3 публикации в международни научни списания, с импакт фактор – общ ИФ 14.306, като две от тях разположени в първи квантил за съответната научна област (Q1) и едно в Q3, като и трите са публикувани със свободен достъп, което е в съгласие с принципите за отворена наука. Във всички публикации Велислава Тодорова е първи автор, което е доказателство за водещата ѝ роля в проведените изследвания. Научните публикации по темата на дисертационния труд на Велислава Тодорова имат 58 цитирания (с изключени автоцитирания в Scopus). Отделни фрагменти от дисертационния труд на Велислава Тодорова са представени на 3 международни научни конференции, 1 като доклад и 3 като постери, като тя е водещ автор в 3 от участията си. Впечатление прави и участието на маг.-фарм. Тодорова като водещ изследовател в проект с номер ДПДП 06/2022г.: Фармакоаналитичен контрол на адаптогени от растителен произход - охарактеризиране на екстракт от *Rhaponticum carthamoides*, свързан с тематиката на дисертационния труд, което е показателно за нейното личностно развитие като самостоятелен учен. Впечатляващо е и участието на учения от няколко колектива извън МУ-Пловдив – един от страната и един в чужбина в публикациите включени по дисертационния труд, което показва умения за работа в мултидисциплинарен екип.

От предоставената документация е видно личното участие на Велислава Тодорова в проведеното дисертационно изследване. Получените резултати и формулираните приноси са нейна лична заслуга.

Към проведеното изследване и представените материали нямам критични забележки. Препоръчвам на Велислава Тодорова да продължи задълбоченото си изследване на фармакоаналитичните подходи в същата посока като допълни още повече познанията и опита си в метаболомика на растителни екстракти, например чрез добавяне на ядреномагнитно-резонансна спектроскопия.

7. Автореферат

Авторефератът към дисертационния труд на Велислава Тодорова е представен в 53 страници и отразява основните резултати, постигнати в дисертационния труд и отговаря на всички общоприети изисквания в правилника за прилагане на ЗРАСРБ за изготвянето му.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, считам, че дисертационният труд на Велислава Димитрова Тодорова е напълно завършен, съвременен, задълбочен, добре структуриран и оформен, с ясни и точно формулирани и изпълнени задачи, с определени изводи и солидни научно-фундаментални и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката в една интересна област – фармакоаналитичните подходи за фитохимично охарактеризиране на растителни екстракти.

Дисертационният труд отговаря на всички изисквания 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 и дори надвишават специфичните изисквания на Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет - Пловдив.

Дисертационният труд показва, че докторантката маг.-фарм. Велислава Димитрова Тодорова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Фармацевтична химия, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на членовете на уважаемото научно жури да присъдят образователната и научна степен 'доктор' на ас. Велислава Димитрова Тодорова в област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт 7.3. Фармация в докторска програма по фармацевтична химия.

Заличено на основание
Чл.5 §1, б. "В" Регламент (ЕС)2016/679

15.01.2025 г.

Изготвил становището:.....

/доц. Лилия В. Михайлова, маг-фарм. д.м./