



СТАНОВИЩЕ

на дисертационния труд на
Нели Атанасова Димитрова

Докторант по „Генетика“
към катедра , Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“
на Медицински Факултет, Тракийски университет

на тема:

**“ Влияние на тотален екстракт от *Haberlea Rhodopensis* върху
експресията на туморсупресорни гени и гени участващи в
репарацията на ДНК”**

представен за присъждане на научна степен “ДОКТОР”
по научна специалност „Генетика”, в област на висшето образование
4. „Природни науки, математика, и информатика”,
професионално направление 4.3. Биологически науки

изготвена от проф. д-р Татяна Иванова Влайкова, дб
Катедра Химия и Биохимия, Медицински факултет,
Тракийски Университет, Стара Загора,
тел: 0888 002438, e-mail: tatyana.vlaykova@trakia-uni.bg

1. Биографични данни за кандидата

Ас. Нели Атанасова Димитрова придобива през 2006 образователна степен „бакалавър“ по Молекулярна биология в СУ „Св. Климент Охридски“, през „магистър“ по Генетика, също в СУ и „магистър -инженер Биотехнолог“ по „Анализ и контрол на храните“ в Университет „ Проф. д-р Асен Златаров“, Бургас. От 01.03.2017 е докторант по „Генетика“ към катедра , Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ на Медицински Факултет, Тракийски университет- отчислена с право на защита.

От октомври 2011 Нели Димитрова е назначена за Биолог-специалист, секция Медицинска генетика, на катедра Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“, МФ, ТрУ, а от януари 2024 е избрана за Асистент по биология в секция Молекулярна биология на същата катедра.

Като докторант и специалист-биологи Нели е овладяла редица класически и съвременни методи на цитогенетиката и молекулярната и клетъчна биология (FACS, PCR- техники за анализ - RT qPCR, електрофореза, методи за растителна екстракция и анализ), а като асистент участва в подготовка и провеждането на упражнения по Биология на човека със студенти по медицина и други бакалавърски програми на МФ и участва в семестриални изпитни комисии. Изготвяне на доклади и постери за участие в научни конференции и участие в разработване и осъществяване на научни проекти. От 2024 е член на комисията за подготовка и проверки на кандидат-студентските изпит по биология на Тракийски университет.

Владее на високо ниво английски език и познава и работи със специализирани софтуерни пакети за анализ и обработка на данни.

Член е на Дружеството по Медицинска биология в България. Участва като член на научните екипи на научни проекти, финансирани от МОН и Тракийски университет.

2. АНАЛИЗ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

2.1. Актуалност на научния труд:

"Медицината е изкуство да се подражава на лечебната сила на природата" – това е мисъл, изказана от Хипократ и многократно доказана през вековете. Използването на растения и извлекци на растения за лечебни цели съпътства развитието на човешката цивилизация и продължава да бъде един широко застъпен подход в медицината за въздействие и терапия и в съвременните условия. Освен във фитотерапията като клон на нетрадиционната (алтернативна) медицина, фармакологично активни вещества от лечебни растения се прилагат в създаването на лекарства използвани и от конвенционалната медицина. Съвременните подходи при прилагането на природни продукти изискват задълбочено и детайлно проучване на съставните вещества и тяхното многостранно влияние както върху целия организъм при различни състояния, така и върху отделни системи, органи, клетъчни популации и биохимични и клетъчни процеси. Такива проучвания са изключително важни за предсказването както на лечебните, така и на странични токсични ефекти при прилагането им и за уточняване на полезните и терапевтични дози при различни заболявания и състояния.

Ето защо научният труд на Нели Димитрова, без колебание мога да твърдя, че е актуален, тъй като в него докторантът проучва с различна степен на детайлност състава и антимулагенния, антиканцерогенен и радиопротективен потенциал на тоталния етанолов екстракт на един от балканските реликтни ендемити, *Haberlea rhodopensis* (Родопски силивряк), за който има редица литературни данни, които сочат, че това медицинско (лечебно) растение е източник на биологично активни субстанции с антиоксидантен и цитопротективен ефект.

Дисертацията е изработена под ръководството на доц. д-р Борислав Николов Попов, д.м в катедрата по Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика, МФ, ТрУ в сътрудничеството с Катедра „Индустриална микробиология“, Лаборатория по приложни биотехнологии, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, Пловдив, с Лабораторията по Молекулярна генетика на дрожди, Институт по молекулярна биология, „Академик Румен Цанев“, БАН, гр. София и с Лабораторията „Свободно радикални процеси“ към Институт по Невробиология-БАН.

2.2. Описание на дисертацията:

Представеният ми за оценка дисертационен труд е с обем 185 страници, включва 25 таблици и 39 фигури и са цитирани 338 литературни източника, от които 5 са на кирилица, като голямата част от източниците са от последните 5 години. Дисертационният труд е структуриран по следния начин: 2 стр Въведение; 55 стр. Литературен обзир; 1 стр. Цел и Задачи; 15 стр. Материали и методи; 43 стр. Резултати, 30 стр. Обсъждане и Заключение, 2 стр. Изводи, 2 стр. Приноси, 26 стр. Библиография и 2 стр. Списък с публикации и участия в

проекти. В помощ на читателя, в началото на дисертационния труд, Нели Димитрова е включила 2 стр. с най-често използваните съкращения.

2.3. Познаване на проблема

Литературният обзор на дисертационния труд на Нели Димитрова представя задълбочените знания и информираност на докторанта относно видовете вторични растителни метаболити, имащи хранителна стойност и/или терапевтичен потенциал, като феноли (включително полифенолите), алкалоиди, и терпеноиди. Докторанът много добре е описала и изяснила разликите и ефектите на мутагенните, кластогенни и канцерогенни фактори, като задълбочено са разяснени ефектите и механизмите на действие на някои физични, химични и биологични мутагени. От литературния обзор става ясно, че Нели Димитрова е много добре запозната и има обширни и задълбочени знания за биохимичните и клетъчни процеси и ключовите гени и техните белтъчни продукти, участващи в защитата на човешките клетки и организма като цяло от оксидативен стрес, ДНК увреждания, канцерогенна трансформация и неконтролирана пролиферация, както и за молекулните механизми на основните типове клетъчна смърт, апоптоза, пироптоза, некроптоза и фероптоза.

Последната част на литературния обзор на дисертационния труд е отделен на обекта на изследванията, лечебното растение *Haberlea rhodopensis* (Родопски силивряк), като е събрана и представена обширна информация за неговото разпространение, морфологични, фенологични и репродуктивни характеристики, за фитохимичния състав и за радиопротективните, антиоксидантни, имуномодулаторни и антимутагенни ефекти на неговите водни и етанолни екстракти.

Литературният обзор е написан на добър литературен български език с лесен за четене и възприемане научен стил без излишно използване на чуждици. Илюстриран е с 6 фигури, които много успешно подпомагат възприемането на информацията в текста.

В края на литературния обзор Нели Димитрова, макар много кратко е дала много добра и убедителна обосновка за подбора на гените, изследвани в дисертационния труд, на основата на който са изведени целите и задачите на дисертацията: проучване на влиянието на тотален екстракт от *H. rhodopensis* върху експресията на 7 гени, участващи в процесите на ДНК репарация, контрол на клетъчния цикъл и апоптоза (TP53, BRCA1, ATM, RAD51, RAD50, CDKN1A и BBC3), в условия на ДНК увреждащ фактор (2 Gy йонизиращо лъчение) и оксидативен стрес (10 mM H₂O₂), като фактор предизвикващ апоптоза.

Целта на дисертационния труд е формулирана точно и ясно. За нейното изпълнение са поставени в логична последователност 5 задачи, които напълно отговарят на проведените изследвания и представените резултати.

2.4. Материали и методи

Разделът "Материали и методи" обхваща 15 стр. и е развит подробно и задълбочено с методологични детайли, които могат да служат като наръчник за този тип лабораторни изследвания.

В дисертационната работа са използвани разнообразие от класически и съвременни високо-технологични химични и молекулярно-биологични методи, които са напълно адекватни за решаване на поставените задачи и гарантират достоверността на резултатите. Освен класическите методи на получаване на

растителни екстракти, клетъчно култивиране, изолиране и обратна транскрипция на тотална РНК, спектрофотометрични методи за определяне на продукти на оксидативния стрес и антиоксидантни ензими, са използвани високоефективна течна хроматография (HPLC), флуоцитометричен анализ, чрез флуоресцентно активирано клетъчно сортиране (fluorescence-activated cell sorting-FACS) и количествен PCR в реално време (qRT-PCR). Въпреки, че използваните статистически анализи не са много и разнообразни, те са напълно достатъчни и подходящи за адекватно анализиране на резултатите от провежданите изследвания.

2.5. Резултати и дискусия

Най-съществената и обемна част от дисертацията са разделите „Резултати“ и „Обсъждане“. Тук най-силно проличава големият обем работа извършен при разработването на дисертацията и се очертават важните с научна значимост резултати.

С високоефективната течна хроматография (HPLC) е определено количеството на една от основните активни съставки на растението, миконазида, в тоталния екстракт от *H. Rhodopensis* - 140 ± 2.3 мг/г сухо тегло. Анализите на преживяемостта на използваната в дисертацията човешка туморна клетъчна линия HeLa, доказват, че приложените концентрации не предизвикват цитотоксичен ефект през изследвания период от време. FACS анализите доказват минимален, но статистически значим дозо-зависим ефект на тоталния екстракт (HRE) върху клетъчната морфология, отразяваща наличието на некроза и апоптоза самостоятелно и при наличие на генотоксичен фактор и окислителен стрес.

Най-значими, водещи до приноси с оригинален характер, са резултатите от генната експресия на иРНК ниво на подобрените гени (TP53, BRCA1, ATM, RAD51, RAD50, CDKN1A и BBC3) при самостоятелно приложение на HRE и при претретиране на клетъчната линия с HRE и последващо третиране с 2 Gy йонизиращо лъчение или оксидативен стрес (10 mM H₂O₂). Резултатите доказват, че екстрактът от *H. rhodopensis* осъществява дозо-зависима модулация на ДНК репаративните механизми, апоптозата, и окислителния стрес, както самостоятелно, така и при наличие на генотоксични фактори.

Резултатите представени в дисертацията са обсъдени компетентно в светлината на съвременната научна литература, като дискусии на получените разнообразни, понякога привидно противоречиви резултати, които Нели Димитрова прави се отличават със задълбоченост и показат изградената у докторанта способност критично да анализира и обобщава данните и да прави изводи.

2.6. Изводи и приноси

Приемам изцяло направените изводи и изведените приноси, които имат основно научно-теоретичен характер и много удачно са категоризирани като оригинални и потвърдителни.

3. ПУБЛИКАЦИОННА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списъкът на публикациите на Нели Димитрова, свързани с дисертационния труд включва 3 статии с квартили (1xQ1, 1xQ2 и 1xQ4), като едната има и импакт фактор (ИФ=4.9). Нели представя и списък от 4 научни

съобщения: 3 на национални и международни форуми в България и един в чужбина. В две от статиите Нели Димитрова е първи автор и втори в третата и е представящ автор на всички научни съобщения, което безспорно доказва нейния личен принос в изработване на експериментите, провеждане на анализите, и подготовката на статиите и научните съобщения.

4. КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ

Фактически нямам съществени критични бележки по дисертацията, освен някои незначителни неточности, основно в литературния обзор: „външна орбита“ на атом или молекула вместо „външна орбитала“; „...тяхната (на антиоксидантните ензими) активност не е достатъчна за пълното предодвратяване на заболявания, свързани с оксидативния стрес“ (ензимите не предотвратчват заболявания) и малък брой други неясни или неточни изречения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд на Ас. Нели Атанасова Димитрова е актуален, оригинален, интердисциплинарен, със съвременни методи и апаратура. Получени са резултати, водещи до оригинални и потвърдителни научно-теоретични приноси. Дисертационният труд очертава Нели Димитрова като млад и амбициозен изследовател, с теоретичен и практически опит, с широки познания в областта на молекулярната и клетъчна биология.

Считам, че настоящият дисертационен труд напълно отговаря на изискванията за съответната научна степен, формулирани от ЗРАСРБ и Правилника за прилагането му в Тракийски университете по докторски програми в Професионално направление 4.3 «Биологически науки». **Давам положителна оценка** и предлагам на почитаемото научно жури да присъди на **ас. Нели Атанасова Димитрова ОНС „Доктор“** по Научна специалност „Генетика“, Професионално направление 4.3. „Биологически науки“, Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика.

27.08.2026

Член на научно жури.....
/проф. Татяна Влайкова, дб/



STATEMENT

about the PhD thesis
of **Neli Atanasova Dimitrova**

PhD student in "Genetics"
at the Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics"
Medical Faculty, Trakia University – Stara Zagora

with title:

“Effect of total extract of *Haberlea Rhodopensis* on the expression of tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair”

presented for obtaining PhD
Field of higher education 4. Natural Sciences, Mathematics and Informatics,
Professional field 4.3. Biological Sciences
Scientific specialty "Genetics"

prepared by Prof. Tatyana Ivanova Vlaykova, PhD
Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical Faculty, Trakia
University – Stara Zagora,
Tel: 0888 002438, e-mail: tatyana.vlaykova@trakia-uni.bg

1. Biographical data about the candidate

Ass. Prof. Neli Atanasova Dimitrova obtained a Bachelor's degree in Molecular Biology at Sofia University "St. Kliment Ohridski" in 2006, a Master's degree in Genetics, also at Sofia University, and a Master's degree in Biotechnology in "Food Analysis and Control" at the University "Prof. Dr. Asen Zlatarov", Burgas. Since 01.03.2017 she has been a doctoral student in "Genetics" at the Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics" of Medical Faculty, Trakia University – Stara Zagora.

Since October 2011, Neli Dimitrova has been working as a Biologist-Specialist, in Section of Medical Genetics, at the Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, MF, Trakia University, and in January 2024 she was elected as an Assistant Professor in Biology in the Section of Molecular Biology of the same department.

As a PhD student and specialist-biologist, Neli has mastered a number of classical and modern methods of cytogenetics and molecular and cell biology (FACS, PCR-analysis techniques – RT-qPCR, electrophoresis, plant extraction and analysis methods), and as an assistant she participates in the preparation and conduct of practical classes in Human Biology with students of medicine and other bachelor's programs of the Medical Faculty and participates in semester examination committees, preparation of reports and posters for participation in scientific events and participation in the development and implementation of scientific projects. Since 2024 she has been a member of the committee for the preparation and assessment of the candidate student exam in biology of Trakia University.

Neli is fluent in English and knows and works with specialized software packages for data analysis and processing.

She is a member of the Society of Medical Biology in Bulgaria. She participates as a member of the scientific teams of scientific projects funded by the Ministry of Education and Science and Trakia University.

2. Analysis of the PhD thesis

2.1. Relevance of scientific work:

"Medicine is the art of imitating the healing power of nature" - this is a thought expressed by Hippocrates and repeatedly proven over the centuries. The use of plants and plant extracts for medicinal purposes accompanies the development of human civilization and continues to be a widely used approach in medicine for impact and therapy in modern conditions. In addition to phytotherapy as a branch of alternative medicine, pharmacologically active substances from medicinal plants are used in the creation of drugs used in conventional medicine. Modern approaches to the application of natural products require a thorough and detailed study of the constituent substances and their multifaceted influence both on the whole organism in different conditions, and on individual systems, organs, cell populations and biochemical and cellular processes. Such studies are extremely important for predicting both therapeutic and toxic side effects of their application and for specifying beneficial and therapeutic doses for various diseases and conditions.

That is why, without hesitation I can claim that Neli Dimitrova's scientific work is relevant, since in it the PhD student studies with varying degrees of detail the composition and antimutagenic, anticarcinogenic and radioprotective potential of the total ethanol extract of one of the Balkan relict endemics, *Haberlea rhodopensis* (Rhodope silivryak), for which there is a number of literary data indicating that this medicinal (medicinal) plant is a source of biologically active substances with antioxidant and cytoprotective effects.

The PhD thesis was prepared under the supervision of Assoc. Prof. Dr. Borislav Nikolov Popov, D.M. at the Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, MF, Trakia University in collaboration with the Department of Industrial Microbiology, Laboratory of Applied Biotechnologies, Institute of Microbiology "Stefan Angelov", BAS, Plovdiv, with the Laboratory of Molecular Genetics of Yeast, Institute of Molecular Biology, "Academician Rumen Tsanev", BAS, Sofia and with the Laboratory of Free Radical Processes at the Institute of Neurobiology-BAS.

2.2. Description of the PhD thesis:

The PhD thesis submitted for evaluation is in volume of 185 pages, includes 25 tables and 39 figures, and 338 literary sources are cited, of which 5 are in Cyrillic, as the majority of the sources being from the last 5 years. The PhD thesis is structured as follows: 2 pages Introduction; 55 pages Literature review; 1 page Aim and Objectives; 15 pages Materials and Methods; 43 pages Results, 30 pages Discussion and Conclusion, 2 pages Conclusions, 2 pages Contributions, 26 pages Bibliography and 2 pages List of publications and participation in projects. To help the reader, at the beginning of the dissertation, Neli Dimitrova has included 2 pages with the most frequently used abbreviations.

2.3. Knowledge of the problem - evaluation of the literature review

The review of the literature of Neli Dimitrova's PhD thesis presents the in-depth knowledge and awareness of Neli about the types of secondary plant metabolites with nutritional value and/or therapeutic potential, such as phenols (including polyphenols), alkaloids, and terpenoids. The PhD student has very well described and clarified the differences and effects of mutagenic, clastogenic, and carcinogenic factors, and the effects and mechanisms of action of some physical, chemical, and biological mutagens are thoroughly explained.

It is clear from the review of the literature that Neli Dimitrova is very well versed and has extensive and in-depth knowledge of the biochemical and cellular processes and the key genes and their protein products involved in the protection of human cells and the organism as a whole from oxidative stress, DNA damage, carcinogenic transformation and uncontrolled proliferation, as well as the molecular mechanisms of the main types of cell death, apoptosis, pyroptosis, necroptosis and ferroptosis.

The last part of the review of the literature of the dissertation work is devoted to the object of research, the medicinal plant *Haberlea rhodopensis* (Rhodope silvriak), and extensive information on its distribution, morphological, phenological and reproductive characteristics, on the phytochemical composition and on the radioprotective, antioxidant, immunomodulatory and antimutagenic effects of its water and ethanol extracts has been collected and presented.

The review of the literature is written in good literary Bulgarian with an easy-to-read and understandable scientific style without unnecessary use of foreign words. It is illustrated with 6 figures, which very successfully support the perception of the information in the text.

At the end of the literature review, Neli Dimitrova, although very briefly, gave a very good and convincing motivation for the selection of the genes studied in the dissertation, on the basis of which the goals and objectives of the dissertation were derived: study of the influence of a total extract of *H. rhodopensis* on the expression of 7 genes involved in the processes of DNA repair, cell cycle control and apoptosis (TP53, BRCA1, ATM, RAD51, RAD50, CDKN1A and BBC3), under conditions of a DNA damaging factor (2 Gy ionizing radiation) and oxidative stress (10 mM H₂O₂), as a factor inducing apoptosis.

The aim of the dissertation is precisely and clearly formulated. For its implementation, 5 tasks are set in a logical sequence, which fully correspond to the conducted research and presented results.

2.4. Materials and methods

The "Materials and Methods" section covers 15 pages and is developed in detail and in-depth with methodological details that can serve as a manual for this type of laboratory research.

A variety of classical and modern high-tech chemical and molecular-biological methods are used in the dissertation work, which are fully adequate for solving the tasks and guarantee the reliability of the results. In addition to the classical methods of obtaining plant extracts, cell culture, isolation and reverse transcription of total RNA, spectrophotometric methods for determining oxidative stress products and antioxidant enzymes, high-performance liquid chromatography (HPLC), flow cytometric analysis, fluorescence-activated cell sorting (FACS) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were used. Although the statistical analyses used are not many

and diverse, they are completely sufficient and suitable for adequately analyzing the results of the conducted studies.

2.5. Evaluation of results and discussion

The most significant and voluminous part of the dissertation are the sections "Results" and "Discussion". This is where the large amount of work done in developing the dissertation is most evident and the important results of scientific significance are outlined.

High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the amount of one of the main active ingredients of the plant, miconazole, in the total extract of *H. Rhodopensis* - 140 ± 2.3 mg/g dry weight. Survival analyses of the human tumor cell line HeLa used in the dissertation proved that the applied concentrations did not cause a cytotoxic effect during the studied period of time. FACS analyses proved a minimal but statistically significant dose-dependent effect of the total extract (HRE) on cell morphology, reflecting the presence of necrosis and apoptosis alone and in the presence of a genotoxic factor and oxidative stress.

The most significant, leading to original contributions, are the results of gene expression at the mRNA level of the selected genes (TP53, BRCA1, ATM, RAD51, RAD50, CDKN1A and BBC3) upon application of HRE alone and upon pretreatment of the cell line with HRE and subsequent treatment with 2 Gy ionizing radiation or oxidative stress (10 mM H₂O₂). The results demonstrate that the extract of *H. rhodopensis* exerts a dose-dependent modulation of DNA repair mechanisms, apoptosis, and oxidative stress, both alone and in the presence of genotoxic factors.

The results presented in the dissertation are discussed competently in the light of contemporary scientific literature, and the discussions of the various, sometimes seemingly contradictory results that Neli Dimitrova makes, are characterized by their thoroughness and demonstrate the doctoral student's ability to critically analyze and summarize data and draw conclusions.

2.6. Evaluation of the conclusions and contributions

I fully accept the conclusions drawn and the contributions made, which are mainly of a scientific-theoretical nature and are very properly categorized as original and confirmatory.

3. Evaluation of publishing activity

The list of publications of Neli Dimitrova related to the dissertation work includes 3 articles with quartiles (1xQ1, 1xQ2 and 1xQ4), one of which has an impact factor (IF=4.9). Neli also presents a list of 4 scientific communications: 3 at national and international forums in Bulgaria and one abroad. In two of the articles Neli Dimitrova is the first author and the second in the third and is the presenting author of all scientific communications, which undoubtedly proves her personal contribution in designing the experiments, conducting the analyses, and preparing the articles and scientific communications.

5. Critical remarks

In fact, I have no significant critical remarks on the dissertation, except for some minor inaccuracies, mainly in the literature review: "outer orbit" of an atom or molecule instead of "outer orbital"; "...their (antioxidant enzymes) activity is not sufficient for the complete prevention of diseases related to oxidative stress"

(enzymes do not prevent diseases) and a small number of other unclear or inaccurate sentences.

CONCLUSION

The presented dissertation work of Ass. Prof. Neli Atanasova Dimitrova is up-to-date, original, interdisciplinary, with modern methods and equipment. Results have been obtained, leading to original and confirmatory scientific and theoretical contributions. The dissertation work outlines Neli Dimitrova as a young and ambitious researcher, with theoretical and practical experience, with extensive knowledge in the field of molecular and cellular biology.

I believe that the present dissertation fully meets the requirements for the relevant scientific degree, formulated by the Law for Academic development and the Regulations for its implementation in Trakia Universities for doctoral programs in Professional field 4.3 "Biological Sciences". I give a positive assessment and propose to the esteemed scientific jury to award Ass. Prof. Neli Atanasova Dimitrova PhD degree in the Scientific specialty "Genetics", Professional field 4.3. "Biological Sciences", Field of higher education 4. "Natural sciences, mathematics and informatics."

27.08.2026

Member of the scientific jury.....

/Prof. Tatyana Vlaykova, PhD/