



РЕЦЕНЗИЯ

От: Доц. Сена Карачанак-Янкова, дб; Катедра „Генетика“, Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ от Нели Димитрова Атанасова – редовен докторант с научен ръководител доц. д-р Борислав Николов Попов, д.м. по докторска програма „Генетика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“ към катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ на Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора с тема на дисертационния труд „Влияние на тотален екстракт от *Haberlea rhodopensis* върху експресията на туморсупресорни гени и гени участващи в репарацията на ДНК“

Основание за представяне на рецензията: участие в състава на научното жури по защита на дисертационния труд съгласно Заповед № 2077 от 22.05.2026 г. от Ректора на Тракийски университет- проф. д-р М. Карабалиев.

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение и Правилника за развитието на академичния състав в Тракийски университет.

Биографични данни на докторанта

Асистент Нели Димитрова е родена 1983 г. През 2006 г. завършва висше образование в СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, специалност „Молекулярна биология“. През 2008 г. придобива ОКС „магистър“ в СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет в магистърска програма „Генетика“, а през 2016 г. придобива втора ОКС „магистър“ в Университет „Проф. д-р Асен Златаров“, Бургас специалност Биотехнологии, специализация Анализ и контрол на храните. От октомври 2011 г. до декември 2023 г. работи като биолог-специалист към секция Медицинска генетика, МФ, ТрУ, Стара Загора. Зачислена е като редовен докторант по „Генетика“ към катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ на Медицински Факултет, Тракийски университет от 2017 г. и е отчислена с право на защита от април 2023 г. От януари 2024 г. Нели Димитрова е назначена на академична длъжност асистент към катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ на Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора.

Актуалност и значимост на дисертационния труд

Темата за биологичното действие на тотални растителни екстракти върху молекулярните механизми на клетъчния отговор при генотоксичен и оксидативен стрес е актуална поради нарастващия интерес към естествени биомодулатори с потенциално антиоксидантно, антимуtagenно, лечепротекторно и антиканцерогенно действие. Родопският силивряк - *Haberlea rhodopensis* е ендемичен, защитен вид с добре документирани антиоксидантни свойства, но молекулярните механизми на действието му върху туморсупресорни гени и гени участващи в ДНК репарацията все още не са напълно изяснени. Проследяването на влиянието на тотален екстракт от *Haberlea rhodopensis* с различни концентрации при третиране на туморна клетъчна линия HeLa,

както и при йонизираща радиация и при третиране с H_2O_2 е добре обоснован подход позволяващ установяване на ефекта на екстракта върху клетъчния отговор към йонизиращи лъчения и оксидативен стрес, което може да допринесе за разширяване на практическото приложение на екстракта в козметични, хранителни и фармацевтични продукти.

Структура и обем на дисертационния труд

Дисертационният труд е в обем от 185 страници и е структуриран по стандартния начин, състоящ се от разделите: списък на съкращенията (2 стр.), въведение (2 стр.), литературен обзор (55 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (16 стр.), резултати (40 стр.), обсъждане (28 стр.), заключение (1 стр.), изводи (2 стр.), приноси (2 стр.), библиография, (26 стр.) и списък на публикации, участия в научни форуми и научно-изследователски проекти във връзка с дисертационния труд (2 стр.). Дисертационният труд е онагледен с 39 фигури и 25 таблици Библиографията включва 338 източника, над 75% от които са от последните десет години.

Въведението е кратко и синтезирано и дава обосновка за изследването на влиянието на тотален екстракт от *H. rhodopensis* върху експресията на ключови гени участващи в ДНК репарацията, контрола на клетъчния цикъл и апоптозата в клетъчни култури, изложени на въздействие с физични и химични мутагени.

Литературният обзор е изчерпателен и добре структуриран, с аналитичен и задълбочен поглед на научната литература. Започва с описанието на вторичните метаболити при лечебните растения; последвано от преглед на различните класове мутагени, кластогени и канцерогени; както и антиоксидантите и антиоксидантната защитна система. След това са разгледани различните механизми на отговор на клетките при увреждане на ДНК, връзката на ДНК репарацията с програмираната клетъчна смърт и ролята на туморсупресорните гени и гените участващи в ДНК репарацията (*TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51*, *CDKN1A* и *BBC3*). Разделът приключва с описание на обекта на изследване - балканския реликтов ендемит *H. rhodopensis* (HRE) и неговите радиопротективни, антиоксидантни, имуномодулаторни и антимутагенни ефекти.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана: изследване на влиянието на тотален екстракт от *H. rhodopensis* върху експресията на гени участващи в процесите на ДНК репарация, контрол на клетъчния цикъл и апоптоза (*TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51*, *CDKN1A* и *BBC3*) при HeLa клетки, подложени на йонизираща радиация и оксидативен стрес. За осъществяването на целта са поставени пет конкретни задачи, които следват ясна експериментална логика: от получаване на стандартизиран тотален екстракт и определяне на подходящи за анализ концентрации след облъчване с гама - радиация и третиране с H_2O_2 , до анализ на нивото на генна експресия на *TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD51*, *RAD50*, *CDKN1A* и *BBC3* при съответните експериментални постановки.

В раздел „*Материали и методи*“ подробно и възпроизводимо са описани методите за получаване на стандартизиран тотален екстракт чрез перкуляция, анализ на екстракта от *H. rhodopensis* чрез високоефективна течна хроматография (HPLC), както и клетъчното култивиране на HeLa клетъчна линия. Клетъчната линия HeLa без HRE и с различни концентрации на тотален HRE (10, 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$) самостоятелно и в комбинация с 2 Gy γ -облъчване или 10 mM H_2O_2 е изследвана чрез тест с трипаново синьо за клетъчната преживяемост и чрез флоуцитометричен анализ на клетъчна морфология и клетъчен цикъл. По същия начин са сравнени и нивата на РНК експресия на избраните гени установени чрез количествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция в реално време спрямо референтния ген *GAPDH*, по метода 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ в три

повторения. С цел да бъдат разширени проучванията на антиоксидантните свойства на тотален HRE е определена активността на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза, както и концентрацията на глутатион и на малондиалдехид като индикатор за липопероксидация в третирани и контролни клетки. Статистическите анализи на получените експериментални данни са извършени със Student t-test при степен на значимост $p < 0.05$.

Резултатите са представени последователно и логично, като започват с данните от HPLC анализа за идентифициране и количествено определяне на една от основните активни съставки в тоталния екстракт от *H. rhodopensis* – миконазид. При анализа на клетъчната преживяемост е установено, че различните концентрации HRE приложени за 3 часа нямат цитотоксичен ефект върху клетъчна линия HeLa. След това са представени резултатите от анализа на клетъчна морфология и разпределение на фазите на клетъчния цикъл на туморна клетъчна линия HeLa третирана с различни концентрации тотален HRE, контролна нетретирана група, както и след облъчването на третирани клетки с 2 Gy γ -радиация и след добавяне на 10 mM H_2O_2 . Въпреки получените статистически значимите разлики, количествените промени са сравнително малки и се приема, че за периода на действие на екстракта, значителни промени в клетъчната морфология са малко вероятни. Краткосрочният ефект на HRE показва липса на значителни вариации в клетъчната морфология и разпределението на клетъчните популации в различните фази на клетъчния цикъл, като основната група клетки остават във фаза G0/G1.

Оценката на нивото на експресия е извършена за гени кодиращи сензори на увреждане на ДНК: *ATM* и *TP53*; гени за ДНК репарация: *RAD50*, *RAD51* и *BRCA1*; гени за ефектори на клетъчната съдба (арест на клетъчния цикъл/апоптоза): *CDKN1A* и *BBC3*.

- Транскрипционните нива на *ATM* в клетъчна линия HeLa не показват значими промени при нито една от приложените концентрации на екстракта, което показва, че растителният екстракт не повлиява краткосрочната *ATM* експресия. При прилагане на 2 Gy радиация в групите с 25 и 50 $\mu\text{g/ml}$ HRE е отчетено понижаване на нивото на *ATM* експресията спрямо облъчената, нетретирана с HRE контролна група; а при предварителното третиране с 10 $\mu\text{g/ml}$ HRE и последващо третиране с H_2O_2 експресията на *ATM* се понижава с 30 %.
- По отношение на експресията на гена *p53* трите различни концентрации HRE не водят до значими изменения в относителната концентрация на мРНК транскрипта; прилагането на йонизираща радиация води до повишена експресия на *p53*, като с увеличаване на концентрацията на екстракта експресията на *p53* намалява; а при третиране с H_2O_2 се отчита концентрационно зависимо нарастване на експресията на гена.
- Анализът на промените в генната експресия на *RAD50* показва статистически значимо повишаване в групата третирана с 10 $\mu\text{g/ml}$ и понижаване в групата третирана с 50 $\mu\text{g/ml}$ екстракт в сравнение с нетретираната контрола; както и понижена генна експресия в групата третирана с 10 $\mu\text{g/ml}$ тотален HRE при облъчването с 2 Gy. Оксидативният стрес вследствие H_2O_2 също води до повишена експресия на гена *RAD50*.
- Третирането на HeLa клетъчна линия с нарастващи концентрации на тотален HRE не води до значими промени в експресията на *BRCA1*, но след прилагане на 2Gy γ -радиация е установено статистически значимо повишение на експресията на *BRCA1* спрямо контролната необлъчвана група. При третиране с тотален HRE,

експресията на *BRCA1* е значимо повишена спрямо контролата преди облъчване при концентрация 10 µg/ml на екстракта и значимо понижена при концентрация 25 µg/ml на екстракта. След третиране с 10 mM H₂O₂ в групата третирана с най-високата концентрация от 50 µg/ml екстракт повишаването на транскрипционните нива на *BRCA1* показва статистически значима разлика спрямо групата третирана само с 10 mM H₂O₂ без добавен екстракт.

- Нарастващите концентрации на тотален HRE не водят до значимо изменение на експресията на *RAD51* спрямо контролната група без растителен екстракт. При облъчване с 2Gy γ-радиация експресията на *RAD51* се повишава, но без статистическа разлика с необлъчената контрола; а при предварителното третиране с тотален HRE експресията значимо се увеличава спрямо облъчената контролна група при концентрация 10 µg/ml.
- В проведените анализи на промените на генната експресия на *CDKN1A*, концентрациите от 10, 25 и 50 µg/ml тотален HRE не повлияват значимо експресията; ефектът на 2 Gy γ-радиация в групата третирана с 50 µg/ml от екстракта се отразява със статистически значимо понижаване на експресията, а прилагането на H₂O₂ води до статистически значимо понижаване на експресията в сравнение с контролната група, като при групата с предварително добавен 50 µg/ml екстракт е отчетена ниво на експресия на *CDKN1A* съответстващо на стойностите отчетени преди третирането с H₂O₂, което се потвърждава и статистически.
- Получените резултати показват, че генната експресия на *BBC3* гена значимо намалява при прилагане на 10 и 25 µg/ml от екстракта. Прилагането на 2Gy гама радиация значимо повишава експресията на *BBC3* гена в сравнение с облъчената контролна група при 50 µg/ml концентрация на екстракта. При изследване на влиянието на 10 mM H₂O₂ върху експресията на *BBC3* гена в групи без и със добавен HRE, в групата с 10 µg/ml и 25 µg/ml тотален екстракт е установена статистически значима разлика в сравнение със съответната им проба преди третиране с 10 mM H₂O₂.

Разделът завършва с представянето на резултатите от оценката на ензимната антиоксидантна активност.

Обсъждането е обстойно и добре аргументирано, като всеки резултат е поставен в контекста на съществуващата литература и е съпоставен с публикувани данни от други изследователски групи, работили с *H. rhodopensis* върху различни клетъчни линии (MDA-MB-231, HL-60, MCF7, HaCaT, HT-29, HepG2, Lep3).

Изводите коректно отразяват получените резултати и подчертават доза-зависимия характер на тоталния екстракт от *Haberlea rhodopensis* върху транскрипционната активност на гени участващи в процесите на ДНК репарация, контрол на клетъчния цикъл и апоптоза, а именно цитопротективен и антиоксидантен ефект при ниски концентрации и про-апоптичен и про-оксидантен при високи концентрации на екстракта.

Формулирани са три *приноси* с оригинален характер свързани с доза-зависимия ефект на тотален екстракт от *H. rhodopensis* върху HeLa клетки установен въз основа на промяната в нивата на експресия на туморсупресорни гени и гени участващи в репарацията на ДНК. Приносите с потвърдителен характер обобщават научните резултати от анализите на промените в генната експресия и ензимната антиоксидантна активност под влияние на тотален екстракт от *Haberlea rhodopensis*.

Автореферат

Авторефератът е с обем 70 страници и отразява напълно отделните раздели за въведението, целта и задачите на дисертационния труд, приложените материали и методи, получените резултати и тяхното обсъждане и направените изводи и приноси, както и приложение на английски език.

Научни публикации и научни прояви във връзка с дисертационния труд

Асистент Нели Димитрова е представила три публикации във връзка с дисертационния труд: в списание *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* с квантил Q4 и в *International Journal of Science and Research*, в които докторантката е първи автор; и в *International Journal of Molecular Sciences* с квантил Q1. Приложен е и списък с 4 участия в научни форуми и един научно-изследователски проект.

Критични бележки и въпроси

Нямам забележки по същество на дисертационния труд, с изключение на единични правописни грешки.

Към авторът на дисертационния труд имам следните въпроси:

- Кои други гени освен изследваните са туморсупресорни и/или участват в репарацията на ДНК?
- Необходими ли са допълнителни изследвания за да се докаже функционалния ефект на промените в нивата на експресия на анализирания гени?

Заклучение

Дисертационният труд на Нели Атанасова Димитрова е задълбочено и завършено научно изследване на цитопротективното и анти-оксидантно влияние на различни концентрации от тотален екстракт от *Haberlea rhodopensis* през призмата на нивата на експресия на туморсупресорни гени и гени участващи в репарацията на ДНК. При разработването на дисертационния труд са приложени съвременни методи и са получени резултати с голям потенциален принос в медицината и хранителната индустрия.

Дисертационният труд на Нели Атанасова Димитрова напълно отговаря на изискванията за придобиване на ОНС „Доктор“ според Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника за развитието на академичния състав в Тракийски университет – Стара Загора за присъждане на образователно-научна степен „Доктор“ по научно направление 4.3. „Биологически науки“ (Генетика).

Въз основа на изложеното давам ПОЛОЖИТЕЛНА ОЦЕНКА и убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури да присъди на Нели Атанасова Димитрова образователната и научна степен „доктор“ по докторска програма „Генетика“, професионално направление 4.3. „Биологически науки“, област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика.

22.08.2026 г.

гр. София

Подпис:

/доц. Сена Карачанак-Янкова, дб/



REVIEW

From: Assoc. Prof. Sena Karachanak-Yankova, PhD; Department of Genetics, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski"

Subject: PhD thesis for the award of the educational and scientific degree "Doctor" to **Neli Atanasova Dimitrova**— full-time PhD student under the scientific supervision of Assoc. Prof. Borislav Nikolov Popov, MD, PhD in the doctoral programme "Genetics", professional field 4.3 "Biological Sciences," at the Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics," Faculty of Medicine, Trakia University – Stara Zagora, with dissertation title "**Influence of a total extract from *Haberlea rhodopensis* on the expression of tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair**"

Grounds for presenting the review: membership in the Scientific Jury for the defense of the dissertation thesis, in accordance with Order No. 2077 of 22.05.2026 issued by the Rector of Trakia University, Prof. M. Karabaliev.

This review has been prepared in accordance with the requirements of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations on the Implementation of the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria, and the Regulations on the Development of the Academic Staff at Trakia University.

Biographical data of the PhD candidate

Assistant Professor Neli Dimitrova was born in 1983. In 2006 she graduated from Sofia University "St. Kliment Ohridski," Faculty of Biology, with a degree in Molecular Biology. In 2008 she obtained a Master's degree from Sofia University "St. Kliment Ohridski," Faculty of Biology, in the Master's programme "Genetics," and in 2016 she obtained a second Master's degree from "Prof. D-r Assen Zlatarov" University, Burgas, in Biotechnology, specialization Food Analysis and Control. From October 2011 to December 2023 she worked as a biologist-specialist in the Medical Genetics section, Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora. She was enrolled as a full-time PhD student in "Genetics" at the Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics," Faculty of Medicine, Trakia University, in 2017, and was released with the right to defend her thesis in April 2023. Since January 2024, Neli Dimitrova has held the academic position of Assistant Professor at the Department of "Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics," Faculty of Medicine, Trakia University – Stara Zagora.

Relevance and significance of the dissertation thesis

The analysis of the biological action of total plant extracts on the molecular mechanisms of the cellular response to genotoxic and oxidative stress is modern topic, in particularly taking into account the growing interest in natural biomodulators with potential antioxidant, antimutagenic, radioprotective, and anticarcinogenic activity. The Rhodope Silivryak – *Haberlea rhodopensis* – is an endemic, protected species with well-documented antioxidant properties, but the molecular mechanisms of its effect on tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair are not yet fully elucidated. The analysis of the influence of the total extract from *Haberlea rhodopensis* at

various concentrations on HeLa tumor cell line, as well as under ionizing radiation and treatment with H₂O₂, is a well-established approach for testing the effect of the plant extract on the cellular response to ionizing radiation and oxidative stress, the results of which may contribute to expanding the practical application of the extract in cosmetic, food, and pharmaceutical products.

Structure and volume of the dissertation thesis

The PhD thesis comprises 185 pages and is structured in the standard manner, consisting of the following sections: list of abbreviations (2 pp.), introduction (2 pp.), literature review (55 pp.), aim and objectives (1 p.), materials and methods (16 pp.), results (40 pp.), discussion (28 pp.), conclusion (1 p.), findings (2 pp.), contributions (2 pp.), bibliography (26 pp.), and a list of publications, participation in scientific forums, and research projects related to the dissertation thesis (2 pp.). The dissertation thesis is illustrated with 39 figures and 25 tables. The bibliography includes 338 sources, over 75% of which are from the last ten years.

The *Introduction* is brief and concise, providing a rationale for studying the influence of a total extract from *H. rhodopensis* on the expression of key genes involved in DNA repair, cell-cycle control, and apoptosis in cell cultures exposed to physical and chemical mutagens.

The *Literature review* is comprehensive and well structured, offering an analytical and in-depth overview of the scientific literature. It begins with a description of secondary metabolites in medicinal plants, followed by a review of the various classes of mutagens, clastogens, and carcinogens, as well as antioxidants and the antioxidant defense system. The various mechanisms of the cellular response to DNA damage are then examined, along with the relationship between DNA repair and programmed cell death and the role of tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair (*TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51*, *CDKN1A*, and *BBC3*). The section concludes with a description of the object of study – the Balkan relict endemic *H. rhodopensis* (HRE) – and its radioprotective, antioxidant, immunomodulatory, and antimutagenic effects.

The *aim of the dissertation thesis* is clearly formulated: to study the influence of a total extract from *H. rhodopensis* on the expression of genes involved in the processes of DNA repair, cell-cycle control, and apoptosis (*TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51*, *CDKN1A*, and *BBC3*) in HeLa cells subjected to ionizing radiation and oxidative stress. To accomplish this aim, five specific objectives are set, which follow a clear experimental logic: from obtaining a standardized total extract and determining suitable concentrations for analysis after irradiation with gamma radiation and treatment with H₂O₂, to analyzing the level of gene expression of *TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *RAD51*, *RAD50*, *CDKN1A*, and *BBC3* under the respective experimental conditions.

In the “*Materials and Methods*” section, the methods for obtaining a standardized total extract by percolation, analysis of the *H. rhodopensis* extract by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the cell culturing of the HeLa cell line are described in detail and reproducibly. The HeLa cell line without HRE and with various concentrations of total HRE (10, 25, and 50 µg/ml), alone and in combination with 2 Gy γ-irradiation or 10 mM H₂O₂, was examined by trypan blue assay for cell viability and by flow-cytometric analysis of cell morphology and cell cycle. Analogically, RNA expression levels of the selected genes were examined by quantitative real-time polymerase chain reaction following reverse transcription, relative to the reference gene *GAPDH*, using the 2^{-ΔΔCt} method, in triplicate. To further extend the study of the antioxidant properties of total HRE, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase was determined, as well as the concentration of glutathione and of

malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in treated and control cells. Statistical analyses of the experimental data obtained were performed using Student's t-test at a significance level of $p < 0.05$.

The *Results* are presented sequentially and logically, beginning with the analysis of HPLC data for identifying and quantifying one of the main active constituents of the total extract from *H. rhodopensis* – myconoside. Analysis of cell viability established that the various HRE concentrations applied for 3 hours had no cytotoxic effect on the HeLa cell line. This is followed by the results of the analysis of cell morphology and cell-cycle phase distribution of the HeLa tumor cell line treated with various concentrations of total HRE, an untreated control group, as well as after irradiation of the treated cells with 2 Gy γ -radiation and after the addition of 10 mM H_2O_2 . Despite the statistically significant differences obtained, the quantitative changes are relatively small, and it is concluded that, over the period of action of the extract, substantial changes in cell morphology are unlikely. The short-term effect of HRE showed a lack of significant variation in cell morphology and in the distribution of cell populations across the different cell-cycle phases, with the main group of cells remaining in the G0/G1 phase.

The expression levels of the genes encoding DNA-damage sensors: *ATM* and *TP53*; DNA-repair genes: *RAD50*, *RAD51*, and *BRCA1*; and genes encoding effectors of cell fate (cell-cycle arrest/apoptosis): *CDKN1A* and *BBC3* were assessed.

- The transcriptional levels of *ATM* in the HeLa cell line show no significant changes at any of the extract concentrations applied, indicating that the plant extract does not affect short-term *ATM* expression. Upon application of 2 Gy radiation, in the groups treated with 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ HRE, a decrease in *ATM* expression level was recorded relative to the irradiated control group not treated with HRE; while with pre-treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ HRE followed by treatment with H_2O_2 , *ATM* expression decreased by 30%.
- Regarding the expression of the *p53* gene, the three different HRE concentrations do not lead to significant changes in the relative concentration of the mRNA transcript; the application of ionizing radiation leads to increased *p53* expression, which decreases as the extract concentration increases; while treatment with H_2O_2 shows a concentration-dependent increase in gene expression.
- Analysis of changes in *RAD50* gene expression shows a statistically significant increase in the group treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ and a decrease in the group treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of extract, compared to the untreated control; as well as decreased gene expression in the group treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ total HRE upon irradiation with 2 Gy. Oxidative stress resulting from H_2O_2 also leads to increased expression of the *RAD50* gene.
- Treatment of the HeLa cell line with increasing concentrations of total HRE does not lead to significant changes in *BRCA1* expression, but after application of 2 Gy γ -radiation, a statistically significant increase in *BRCA1* expression was established relative to the non-irradiated control group. Upon treatment by total HRE, *BRCA1* expression is significantly increased relative to the control before irradiation at an extract concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, and significantly decreased at an extract concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$. After treatment with 10 mM H_2O_2 , in the group treated with the highest concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ extract, the

increase in *BRCA1* transcriptional levels shows a statistically significant difference relative to the group treated with 10 mM H₂O₂ alone, without added extract.

- Increasing concentrations of total HRE do not lead to a significant change in *RAD51* expression relative to the control group without plant extract. Upon irradiation with 2 Gy γ -radiation, *RAD51* expression increases, but without a statistically significant difference from the non-irradiated control; while with pre-treatment with total HRE, expression increases significantly relative to the irradiated control group at a concentration of 10 μ g/ml.
- In the analyses of the changes in *CDKN1A* gene expression, concentrations of 10, 25, and 50 μ g/ml total HRE do not significantly affect expression; the effect of 2 Gy γ -radiation in the group treated with 50 μ g/ml of the extract is reflected in a statistically significant decrease in expression, and the application of H₂O₂ leads to a statistically significant decrease in expression compared to the control group, while in the group with 50 μ g/ml extract added beforehand, the *CDKN1A* expression level recorded corresponds to the values recorded before treatment with H₂O₂, which is also confirmed statistically.
- The obtained results show that *BBC3* gene expression significantly decreases upon application of 10 and 25 μ g/ml of the extract. The application of 2 Gy gamma radiation significantly increases *BBC3* gene expression compared to the irradiated control group at a 50 μ g/ml extract concentration. When examining the influence of 10 mM H₂O₂ on *BBC3* gene expression in groups without and with added HRE, in the group with 10 μ g/ml and 25 μ g/ml total extract, a statistically significant difference was established compared to the respective sample before treatment with 10 mM H₂O₂.

The section concludes with the presentation of the results of the assessment of enzymatic antioxidant activity.

The *Discussion* is thorough and well argued, with each result placed in the context of the existing literature and compared with published data from other research groups that have worked with *H. rhodopensis* on various cell lines (MDA-MB-231, HL-60, MCF7, HaCaT, HT-29, HepG2, Lep3).

The *Conclusion* correctly reflect the results obtained and highlight the dose-dependent character of the total extract from *Haberlea rhodopensis* on the transcriptional activity of genes involved in the processes of DNA repair, cell-cycle control, and apoptosis, namely a cytoprotective and antioxidant effect at low concentrations, and a pro-apoptotic and pro-oxidant effect at high concentrations of the extract.

Three *Original contributions* are formulated, related to the dose-dependent effect of the total extract from *H. rhodopensis* on HeLa cells, established on the basis of the change in expression levels of tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair. The *Confirmatory contributions* summarize the scientific results of the analyses of changes in gene expression and enzymatic antioxidant activity under the influence of total extract from *Haberlea rhodopensis*.

Extended Abstract

The extended abstract of the PhD thesis is 70 pages long and fully reflects the separate sections on the introduction, the aim and objectives of the PhD thesis, the materials and methods applied, the results obtained and their discussion, and the established conclusions and contributions.

Scientific publications and research activities related to the PhD thesis

Assistant Professor Neli Dimitrova has presented three publications related to the dissertation thesis: in the *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* (Q4) and in the *International Journal of Science and Research*, in which the PhD candidate is first author; and in the *International Journal of Molecular Sciences* (Q1). A list of 4 participations in scientific forums and one research project is also included.

Critical remarks and questions

I have no substantive remarks on the dissertation thesis, apart from a small number of typographical errors.

I have the following questions for the author of the dissertation thesis:

- Which other genes, besides those studied, are tumor suppressors and/or are involved in DNA repair?
- Are additional studies necessary to demonstrate the functional effect of the changes in the expression levels of the genes analyzed?

Conclusion

The PhD thesis of Neli Atanasova Dimitrova is an in-depth and complete scientific study of the cytoprotective and antioxidant influence of various concentrations of total extract from *Haberlea rhodopensis*, viewed through the lens of the expression levels of tumor suppressor genes and genes involved in DNA repair. The PhD thesis is elaborated by applying modern methods, and the obtained results can have significant contribution to medicine and the food industry.

The PhD thesis fully meets the criteria for acquiring the educational and scientific degree "Doctor" according to the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations on the Implementation of the Development of Academic Staff in the Republic of Bulgaria, and the Regulations on the Development of the Academic Staff at Trakia University for awarding the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific field 4.3. "Biological Sciences" (Genetics).

Based on the above, I give a POSITIVE ASSESSMENT and confidently recommend to the esteemed Scientific Jury that they award Neli Atanasova Dimitrova the educational and scientific degree "Doctor" in the doctoral program "Genetics," professional field 4.3. "Biological Sciences," higher education area 4. Natural Sciences, Mathematics and Informatics.

22.08.2026

Sofia

Signature: ..

/Assoc. Prof. Sena Karachanak-Yankova, PhD/