

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Антоанета Борисова Т

Институт по органична химия с център по фитохимия, БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор' по професионално направление „Биологически науки“, шифър 4.3, научна специалност „Микробиология“, шифър 01.06.12.

Автор: Людмила Людмилова Димитрова

Тема: Биологична активност на екстракти и съединения, изолирани от *Geum urbanum* L.

Научни ръководители: чл. кор. проф. двмн Христо Найденски и чл. кор. проф. дхн Вася Банкова

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № I-41 от 01.04.2019 г. на Директора на Институт по микробиология „Стеван Ангелов“- БАН съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Биологична активност на екстракти и съединения, изолирани от *Geum urbanum* L.“ за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност 01.06.12 „Микробиология“. Автор на дисертационния труд е асистент Людмила Людмилова Димитрова – редовен докторант с научни ръководители чл. кор. проф. двмн Христо Найденски и чл. кор. проф. дхн Вася Банкова. Представеният от ас. Людмила Людмилова Димитрова комплект материали на хартиен носител е съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на Институт по микробиология „Стеван Ангелов“, включва следните документи: автобиография в европейски формат; заповеди за зачисляване и отчисляване в докторантura; протоколи от успешно положени изпити по индивидуален план на обучение; дисертационен труд; автореферат; списък и копия на научните публикации по темата на дисертацията; списък на забелязани цитирания. Документите са добре оформени и подредени.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Людмила Димитрова е завършила висше образование в Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, София през 2013 г. Придобива магистърска степен по специалност „Екология и опазване на околната среда“. През следващите години

2013-2017 г. е редовен докторант по микробиология в Инст. „Ст. Ст. Ангелов“ - БАН, а от 18.11.2016 г. г. е назначена като асистент. Кандидатът мила Димитрова е съавтор на 5 научни публикации. Тя активно участва в 15 научни проекта към ФНИ, към СУ, Национални научни програми, по линия на ЕБР с Виетнамската Академия на Науките, с Русия, Антибиотик Разград ЕООД и др. Ръководител е на два младежки проекта с БАН по Програма за подпомагане на младите учени. Активно участва в национални и международни конференции, на които е представила резултати от научните изследвания с 19 постера и 10 устни доклада. Отличена е с награда за най-добър постер от 4-та национална конференция с международно участие и с младежка сесия по екологично инженерство и опазване на околната среда (2015), с награда за отлични научни изследвания на млад учен на 5-та международна конференция по екологично инженерство и опазване на околната среда (2017), както и с награда за най-добра работа на млад микробиолог през 2017 г. на Фондация „Акад. проф. д-р Стефан Ангелов“. През 2018 г. печели грант за участие в 14-ти Конгрес на микробиолозите в България с международно участие.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

От древността хората са използвали растения, за да се предпазват и лекуват от болести. След триумфа на синтетичните лекарствени препарати през 20 в. понастоящем се наблюдава трайна тенденция към нарастващо използване на традиционните билки или техни продукти като лечебни средства. Една от причините за това е нарастването на процента на антимикробна резистентност към клинично прилаганите антибиотици, което води до възпалителни процеси и по-серииозни заболявания, както и намаляването на ефективността и увеличаване на страничните ефекти при прилагане на конвенционалните химиотерапевтици за лечение на различни тумори. Българската е flora е богата на растения с лечебни свойства, сред които са и представителите на род *Geum* (сем. Rosaceae). Един от тях, *G. urbanum* L. (градско омайниче) се използва от древни времена в народната медицина за лечение на стомашно-чревни заболявания, нарушения на черния дроб, жълчните пътища и матката, срещу хемороиди, дизентерия, инфекции, треска и др. Липсата или осъкъдната информация за химичния състав и биологична активност на *G. urbanum* L. определят основната цел на дисертационния труд. Поставените за изпълнение шест задачи са свързани с използването на съвременни методологии, техники и анализи. Тематиката е актуална и разширяването на познанията за химичния състав, антиоксидантната, антимикробната и антинеопластичната активности на *G. urbanum* L. биха допринесли за пълноценното и рационално използване на растението като източник на лечебни екстракти и биологично активни вещества.

4. Обща характеристика и оценка на дисертациоn

Дисертационният труд на ас. Людмила Димитрова съдържа 180 страници, 38 фигури и 20 таблици и 9 приложения. Библиографската справка включва 343 литературни източника, от които 180 са публикувани в периода 2009-2019 г. Дисертацията е добре подредена и структурирана, отговаря на изискванията на чл. 27. от ППЗРАСРБ и съдържа: Въведение, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати, Обсъждане на резултатите, Изводи, Приноси, Използвана литература. Приложения, Списък на публикации по темата, Забелязани цитати, Участие в научни форуми и награди.

Литературен обзор: Литературният обзор е написан на 40 страници. Подробно са описани ботаническата характеристика и разпространението на видовете от род *Geum*. Представена е подробна информация за химичния състав и биологичната активност на видовете от род *Geum*. Намерените досега флавоноиди, тритерпеноиди, танини, фенилпропаноиди и др. са дадени със съответните структури и литературни източници. Накратко са описани методите за изолиране и идентифициране на вторични метаболити от растителни източници. Съществено място е отделено на някои инфекциозни представители като *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus spp.*, *Listeria monocytogenes* и др., кворум сенсинга при бактерии и възможностите за тяхното инхибиране, както и на антиоксидантна и радикалувавяща активност (химия, биохимия, механизъм, канцерогенеза и апоптоза и др.). Литературният обзор показва подготвеността и компетентността на докторантката в областта на микробиологията и в частност на фитохимията. Анализираната литература е коректно цитирана.

Методи и материали: В тази част (25 стр.) са описани процедурите по екстракция на растителния материал и хроматографското разделяне и изолиране на индивидуалните съединения, методите за качествено и количествено определяне на основните класове вторични метаболити, за определяне на антиоксидантна и антимикробна активности, както и на цитотоксичен и антинеопластичен ефект. Прецизно описаните експерименти са подкрепени със схеми и биха позволили повторяемост и възпроизвежданост на резултатите. Използваните методични подходи са съвременни и са повишили чувствително квалификацията на докторантката.

Резултати: Резултатите (36 стр.) логично следват хода на решаването на поставените задачи. Извършени са голям брой експерименти, което прави получените данни достоверни.

Резултатите от проведените изследвания са представени тури, графики, таблици и снимков материал.

Обсъждане на резултатите: В тази част (22 стр.) докторантката е коментирала получените резултати като умело ги е сравнила с описаните в литературата данни. Обобщението на резултатите от проведените изследвания ас. Людмила Димитрова е формулирала кратко и ясно в 8 извода.

5. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Основните приноси в дисертационния труд могат да се формулират като научни и научно-приложни. Фундаменталният за мен принос на дисертацията е изолирането и идентифицирането на 9 индивидуални съединения от корените на *G. urbanum* L, от които 2 се откриват за първи път в род *Geum*, а други три съединения за първи път в изследвания вид. Другите по-важни приноси, които имат както научен, така и научно-приложен характер могат да бъдат групирани, както следва:

- Установено е, че EtOAc и n-BuOH екстракти от корени и надземни части на *G. urbanum* L. инхибират RhI системата на *P. aeruginosa* PA01, а също така модулират редукционния капацитет, потискат "онкогенния" супероксид и индуцират апоптоза в лимфомни клетки.

- Доказано е, EtOAc екстракт от надземни части проявява инхибиращ ефект срещу Agr системата на щамове от вид *S. aureus* и показва по-ниска *in vitro* цитотоксичност срещу нетуморогенни клетъчни линии и по-висока антинеопластична активност върху карцином на пикочен мехур.

- Установено е, че EtOAc и n-BuOH са най-подходящи органични разтворители за концентриране на биологично активни съединения, действащи в синергизъм, от MeOH екстракти на *G. urbanum* L

6. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от дисертацията са публикувани в две научни публикации в списания с импакт фактор Chemistry Central Journal (с импакт фактор 2.442) и Доклади на БАН (с импакт фактор 0.27). Докторантката е на първо място и в двете работи, което потвърждава нейното съществено участие в изработването на експерименталната работа и обработването на резултатите по дисертацията. Открит е и един цитат.

7. Оценка на автореферата

Авторефератът съдържа 57 страници, направен и споменава новните резултати, постигнати в дисертацията.

8. Критични забележки и препоръки

Като специалист в областта на фитохимията, моите бележки са свързани главно с тази част от дисертационния труд:

- В литературния обзор химичните съединения биха могли да бъдат обобщени по-добре, тъй като в „част I.2.5. Други изолирани съединения“ имат такива, които принадлежат към класовете съединения описани в предходните части като например: съединения 134 и 135 могат да бъдат добавени към групата на тритерпеноидите, салидрозид (141) – към групата на фенилпропаноидите, даидзеин (165) и епикатехин (166) – към групата на flavonoидите. Не е малък броят на фенолните киселини, намерени във видове *Geum*, които също биха могли да се обобщят.

- Някои термини като „сесквитерпени“ и „петрол етерен“ екстракт са неточни. Вместо това трябва да се използват сескитерпени и петролево-етерен екстракт. На няколко места в текста е изписано „наземна“ вместо „надземна“, което вероятно е техническа грешка.

- Глава II.3. „Общо съдържание на фенолни съединения в екстракти“ е озаглавена неточно. Написана по този начин тя изключва терпеноидите, които не са фенолни съединения.

- В автореферата на фиг. 5 има една неточност относно структурата на съединение 4 (нига-ичигозид F1). Заместителят R₄ е глюкопиранозил (Glc), а като Glc е даден ферулов остатък вместо глюкопиранозен. Подобна неточност има и на стр. 20 в дисертационния труд: липсва символа за ферулов остатък, а в същото време е изписано равенство между Glc, глюкопиранозен и ферулов заместители.

- На стр. 119 (Обсъждане на резултатите) докторантката описва предимствата и недостатъците на класическата екстракция и на тази с ултразвук. Изказано е предположение, че ултразвуковата екстракция води до по-добра селективност и по-високи добиви на полифенолни съединения. Докторантката е посочила, че в дисертационния труд са използвани тези два метода за екстракция, но не са дискутиирани получените резултати. Има ли различия по отношение на добива, на химическия състав и т.н.? По-скоро не е проведен паралелен експеримент на екстракция с метанол, 20% етанол и вода по двата метода, за да има реално сравнение.

- Впечатлена съм от сложната схема на разработване на етилацетатния екстракт и успеха да бъдат изолирани 8 индивидуални съединения. С едно изречение е написано как е доказана тяхната структура, приложени са техните ЯМР спектри, но липсва типичната за една фитохимична работа част, а именно не са описани спектралните данни на индивидуалните съединения. Изненадана съм от резултатите, получени при разработването на петролево-етерния екстракт. От 1.9 грама екстракт са изолирани само 5.5 мг β-ситостерол и липсва обяснение какви други съединения може да се съдържат в този екстракт.

Предполагам, че посочените неточности и технически грешки се дължат най-вече на невнимание и бих искала да отбележа, че те не повлияват като цяло отличното ми впечатление от качеството на работата на докторантката и научното ниво на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на Институт по микробиология „Стеван Ангелов“- БАН. Дисертационният труд показва, че докторантката Людмила Димитрова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения в областта на микробиологията, които умело съчетава с фитохимичните методи за изолиране и идентифициране на биологично активни съединения от растителен произход. Убедена съм, че докторантката има безспорен принос в извършените изследвания и получените резултати.

Въз основа на анализа направен до тук, с убеденост давам положителна оценка за научната и изследователска работа на асистент Людмила Димитрова и съм съгласна да ѝ бъде присъдена образователната и научна степен „доктор“ по професионално направление професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност 01.06.12 „Микробиология“.

05.06.2019 г.

Рецензент:

(доц. д-р Антоанета Трендафилова)