

## РЕЦЕНЗИЯ

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

**Автор:** Людмила Людмилова Димитрова, асистент, департамент „Инфекциозна микробиология”, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”- БАН

**Тема:** „БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ЕКСТРАКТИ И СЪЕДИНЕНИЯ, ИЗОЛИРАНИ ОТ *GEUM URBANUM L.*”

**Рецензент:** доцент Веселин Кънчев Късовски, д-р, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”- БАН, (vkussovski@gmail.com, тел.: 02 979 3174)

### **Кратко представяне на докторантката:**

Людмила Димитрова е завършила през 2013 г. висше образование в СУ „Св.Климент Охридски”, Биологически факултет, като магистър по специалността „Екология и опазване на околната среда” с професионална квалификация „Магистър по екология”.

Същата година е зачислена със заповед № I-144/16.10.2013 г. за редовна докторантура, шифър 4.3., направление „Биологически науки” (специалност „Микробиология”, 01.16.12) със срок на обучение три години и научни ръководители чл.кор.проф. Христо Найденски, д-р и чл.кор.проф. Вася Банкова, д-р. Със заповед № I-96/26.10.2017 е отчислена с право на защита.

### **Актуалност на проблема**

Благодарение на географското си разположение, разнообразните климатични и почвени условия България се нарежда на първо място сред страните в Европа и на шесто място в света по износ на билки. Понастоящем 200 вида от тях се използват за получаването на над 270 фитотерапевтици, приложими в профилактиката, медицината, козметиката и хранителната промишленост. Фармакологичен интерес представляват видовете на род *Geum* (сем. *Rosaceae*), много от които са богати на биологично активни съединения. Сред тях е и лечебното растение *Geum urbanum L.* (Градско омайниче), широко разпространено на територията на страната и използвано от древни времена в народната медицина. Известна е употребата на отвари при лечение на стомашно-чревни заболявания, нарушения на функцията на черния дроб, жлъчните пътища, при лечение на дизентерия, подагра, и вирусни инфекции.

През последните 10 години се наблюдава висока противотуморна успеваемост на фитохимиотерапията, при която се прилагат фитоконплекси с антинеопластичен ефект, изолирани от растителни видове. Поради тази причина задълбоченото изследване на механизма на действие на лечебните растения, е от съществено значение.

От род *Geum* са изолирани много съединения (терпеноиди, флавоноиди, хидролизуеми танини, фенилпропаноиди и др.), но проучванията относно химичния състав на *G. urbanum* L., на вторичните му метаболити, тяхната биологична активност и възможностите им за приложение в медицинската практика са оскъдни.

Във връзка с казаното, представеното от докторантката изследване, което е насочено към получаване на екстракти и изолирането и идентифицирането на съединения от *Geum urbanum*, както и върху проучването на тяхната биологична активност (антибактериална, антимикотична, антинеопластичната, радикал-улавящата, антиоксидантна и антивирусна активности), е актуална разработка.

### **Структура на дисертационния труд**

Дисертационният труд е сериозно обмислено и извършено изследване, структуриран е по приетите правила и съдържа следните раздели: увод (2 стр.), литературен обзор (41 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (27 стр.), резултати (38 стр.), обсъждане (22 стр.), изводи (2 стр.), приноси (1 стр.), литература (20 стр.), приложения (11 стр.), информация за публикации, научни прояви и участие в проекти, получени награди (5 стр.). Обемът на труда е 180 страници. Съдържа 38 фигури (8 от фигурите са в обзора, като коректно е отразен техният източник). Таблиците са 5 в раздел „Обзор“, и 15 в „Резултати“. В края на работата има девет приложения със спектри на ядрено-магнитен резонанс на изолирани съединения. Илюстративният материал е изработен професионално и допринася за по-лесното и пълно възприемане на получените резултати. Стилът на изложението е научен и ясен.

### **Литературна осведоменост**

Литературният обзор включва 343 източника, 337 на латиница и 6 на кирилица. Отражава съвременните световни изследвания по проблема. Литературните данни са актуални - от представените източници, 180 са от последните 10 години, а 103 са от последните 5 години. Обзорът съдържа подробни данни относно ботаническата характеристика и разпространението на род *Geum*, както и дава сведения за

изолираните от растенията основни химични съединения (флавоноиди, хидролизуеми танини, фенилпропаноиди, терпеноиди и други). Отделено е място на съответната информация за биологичната активност на изолираните съединения. Описани са по-важните микробни видове, свързани с разработваната тематика, кворум сенсинг системите при Грам (+) и Грам (-) бактерии и инхибиторите на тази система.

Описани са ключовите механизми при канцерогенезата, балансът между клетъчната пролиферация и клетъчна смърт, процесът на апоптоза. Съществена е и информацията за антиоксидантните защитни механизми и наличието на антиоксиданти в растенията.

Онагледяването с таблици и фигури допринася за по-лесното възприемане на богатия информационен материал. Това позволява на докторантката аргументирано да определи целта на настоящата разработка, а по-късно творчески и критично да интерпретира получените от нея собствени резултати.

#### **Цел, задачи и методични подходи**

Поставената цел за проучване на химичния състав и биологичните ефекти на екстрактите, получени от лечебното растение *G. urbanum* L. е ясно формулирана. За изпълнението на тази цел са поставени 6 конкретни задачи, чиято реализация води до получаването на екстракти от *G. urbanum* и изолирането и идентифицирането на важни за фитотерапията съединения. Впоследствие е проучена биологичната активност на изолираните екстракти и съединения и по-точно тяхната антимикуробна, радикалулаваща, антиоксидантна и антинеопластичната активност, както и техния инхибиторен потенциал срещу бактериални фенотипове – кворум сенсинг.

За реализиране на поставената цел и задачи докторантката е подбрала и усвоила необходимия набор от класически и съвременни методи на експериментални изследвания. Описани са методите за екстрахиране, изолиране и идентификация на индивидуалните съединения чрез колонна и препаративна тънкослойна хроматография и ядрено-магнитен резонанс, микробиологичните методи за определяне на антимикуробна активност, използването на флуоресцентна и трансмисионна и сканираща електронна микроскопия. Съществено място е отделено на методите за оценка на цитотоксичния и антинеопластичен ефект (оценка на клетъчна виталност с МТТ колориметричен тест и теста с трипаново синьо, тестовете за клетъчна клоногенност, тестовете за апоптоза с Caspase-3 DEVD-R110 (Biotium) и Cell Death

Detection ELISA (Roche) за определяне на нивата на фрагментирана ДНК в цитозола, теста с FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (BioVision). Описани са методите за радикал-улавяща активност (метод на DPPH· и SOD) и редокс-модулиращ ефект (нивата на вътреклетъчен глутатион, нива на общ антиоксидантен капацитет, нивата на АКФ/ААФ и на вътреклетъчния супероксиден анион) на екстрактите.

### **Получени резултати и обсъждане**

Изследванията са проведени прецизно и в необходимия обем, което е предпоставка за достоверност и възпроизводимост на получените резултати. Експерименталната работа е онагледена с професионално изработени фигури, таблици и флуоресцентни и електронномикроскопски снимки. В хода на разработката са получени дванадесет екстракта от корените и надземните части на *Geum urbanum* (метанолни, петролетерни, етилацетатни, бутанолни, водни и водно-етанолни) чрез два метода на екстракция и всички те са фитохимично охарактеризирани. От етил-ацетатния екстракт на корени, показал най-високо съдържание на полифенолни съединения и най-висока радикал-улавяща активност са изолирани и идентифицирани осем съединения. От тях два ацетилрамнопиранозида на метилелаговата киселина са изолирани и идентифицирани за първи път от род *Geum*, а три съединения (торментикова киселина, нига-ичигозид F1 и 3,3'-ди-*O*-метилелагова киселина-4-*O*- $\beta$ -D-глюкопиранозид) са изолирани и идентифицирани за първи път при вида *Geum urbanum*. Установена е съществена антимикробната активност на EtOAc екстракти срещу *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus cereus*, на катехина – срещу *S. aureus* и *P. aeruginosa*, и на торментиковата киселина – срещу *S. aureus* и *C. albicans*. *N*-BuOH екстракти проявяват силен антивирусен ефект срещу *Herpes simplex* тип 1. EtOAc екстракти са били активни срещу човешкия аденовирус 5. EtOAc и *n*-BuOH фракции инхибират синтеза на пиоцианин и подвижността на *P. aeruginosa* PA01 в суб-МИК концентрации, докато EtOAc екстракт от надземни части потиска образуването на стафилококови биофилми в същите концентрации. Установен е силен цитотоксичен ефект на EtOAc екстракт от надземни части върху туморните клетъчни линии T-24 и BC-3C в сравнение с нормалните клетки на линии HEK-293 и CCL-1, като отключва ранната и напредналата фаза на апоптоза в тях. *N*-BuOH екстракти от корени и надземни части на *G. urbanum* проявяват по-силен антилимфомен ефект върху клетъчната линия Raji, в сравнение с EtOAc екстракти, като и четирите екстракта

отключват апоптоза в клетките на 48<sup>ия</sup> h в концентрация 750 µg/ml. EtOAc екстракт от корени повишава до 5 пъти повече нивата на тоталния антиоксидантен капацитет спрямо нетретирани клетки.

Всяка основна група резултати завършва с кратко обобщение, в което се съдържа и обосновка на последващите експерименти. Поставените задачи са изпълнени в пълен обем. На базата на статистическата обработка на данните може да се твърди за достоверността и възпроизводимостта на получените резултати. Познавайки отлично научната литература по разработената тематика, дисертантката прави задълбочен анализ на своите резултати в дискусия от 22 страници. Отчитайки постигнатото в настоящата разработка, дисертантката вижда и възможност за по-задълбочени бъдещи изследвания, свързани с допълнителни *in vivo* проучвания.

Дисертантката се проявява като умел специалист, способен да планира, извършва и аргументирано да анализира експерименталните данни. Научните заключения са синтезирани в 8 извода, които точно отразяват постигнатото.

Формулираните 4 приноса са оригинални, с научен характер.

#### **Критични бележки**

Дисертантката се е съобщила с направените от мен, като предварителен рецензент за апробацията на работата, критични бележки и препоръки и е направила съответните корекции.

#### **Публикационна дейност и личен принос**

Резултатите от дисертациата са оформени в две публикации, от които една в списание *Chemistry Central Journal*, с импакт фактор 2.442 и една в българско списание с международна редакционна колегия - *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* (Доклади на БАН) и импакт фактор 0.27. И в двете работи Людмила Димитрова е първи автор.

С резултати от разработката дисертантката е участвала като първи автор с 4 доклада на 4 конференции в България. Участвала е и с 13 постера в 12 конференции, от които две в чужбина. В 11 от постерите е била първи автор. Получила е награда за най-добра работа на млад микробиолог през 2017 г. на Фондация „Акад. проф. д-р Стефан Ангелов“ за „Антимикробен и антиоксидантен потенциал на различни разтворими екстракти от медицинското растение *Geum urbanum* L.“

Позиционирането на първо място в публикациите и научните участия на дисертантката недвусмислено подсказват, че получените резултати и приноси в разработения труд са лично нейно дело.

Докторантката е положила всички задължителни изпити и като цяло е събрала 390 точки по кредитната система за докторанти на БАН, при изискуеми 250 точки.

#### **Автореферат**

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и отговаря на представените в дисертацията резултати, изводи и приноси.

#### **Заключение**

Представеният ми за рецензиране материал представлява извършено на високо методично ниво изследване с категорични резултати, адекватни изводи и оригинални приноси, отговарящ на изискванията за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”.

Въз основа на направения анализ и на личните ми впечатления от работата на докторантката, давам положителна оценка на дисертационния труд и убедено предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед № I-41/01.04.2019 на Директора на ИМикБ, БАН да присъдят на Людмила Людмилова Димитрова образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология).

12.06.2019

София

Рецензент:

/ доцент В. Късовски, д-р/