

До Председателя на Научното жури за  
оценка на дисертационния труд и  
присъждане на ОНС „доктор“ на  
Людмила Людмилова Димитрова

## СТ А Н О В И Щ Е

относно дисертационния труд за получаване на образователната и научна степен „доктор“ на тема „Биологична активност на екстракти и съединения, изолирани от *Geum urbanum* L.“

*Разработена от магистър по екология и опазване на околната среда Людмила Людмилова Димитрова*

**Член на научното жури:** проф. д-р Спиро М. Константинов, дм кат. „Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология“ при МУ – София

По заповед на директора на И-т по Микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН № I-41/1.4.2019г. и съобразно решение на НС на И-та по Микробиология, протокол 5 от 28.3.2019г.

### **Кратки биографични данни за автора на дисертационния труд:**

Людмила Димитрова получава магистърска степен през 2013г. в СУ „Св. Климент Охридски“ по екология и опазване на околната среда (шифър 02.22.00; среден успех много добър 5.33 и защитена дипломна работа с успех отличен 6.00). Преди това през 2011г. успешно завършва бакалавърския курс на същия университет по същата специалност. През 2013г. започва редовна докторантура по микробиология с шифър 01.06.12 към И-та по Микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН. От 18.11.2016г. досега е асистент в департамента по Инфекциозна Микробиология в същия институт. Активно участва в изпълнението на изследователски проекти с провеждане и отчитане на

експериментални резултати. Владее английски език на ниво B2, а ползва немски и руски език.

Людмила Димитрова е завършила успешно и редица курсове за придобиване на специфични умения: „Статистически анализ“ през 2014г.; „Култивиране на животински клетки“ през 2017г.; „Съвременни електронномикроскопски техники при биомедицинските изследвания“ през 2017г. и „Next Generation Scientists workshop, Library preparation, Sequencing and Bioinformatics“ през 2019г. Авторката има натрупан опит в определянето на антибиотичната чувствителност на вещества с различен произход, включително по метода на микротитруване и агар-дифузионни методи. Притежава специфични познания и умения за изследване на кворум сенсинг в бактериални съобщества като подход за проучване на антибактериален механизъм на действие. Запозната е и използва *in vitro* тестове за отчитане на цитотоксичния и антинеопластичен ефект, както и с определяне на токсичност *in vivo*. Има умения да подготвя и интерпретира данните от сканираща и трансмисионна микроскопия, а също и от флуоресцентна микроскопия. Людмила Димитрова е усвоила и молекулярно-биологични техники като например изолиране на ДНК от бактерии, вертикална електрофореза в агарозен гел, полимеразна верижна реакция (PCR и qPCR, респективно RT-PCR и qRT-PCR). Запозната е и с успех прилага фитохимични методи за изолиране, пречистване и идентифициране на биологично активни вещества с помощта на хроматографски и спектрални методи. Людмила Димитрова има дигитални умения, свързани с използването на прогармите от Microsoft Office, ползва EndNote, PhotoShop и GraphPad Prism.

Людмила Димитрова има 5 публикации в пълен текст. Първата е на български език в сп. „Екологично инженерство и опазване на околната среда“ от 2015г. Втората е в реномираното международно списание с IF=2.28 Chemistry Central Journal от 2017г., а третата е в сп. „Доклади на БАН“ – също с IF=0.27. В тези три публикации Людмила Димитрова е първи автор. Последните две от общия списък на публикациите са също в списания с IF като Int J Bioautomation и Biotechnology&Biotechnology Equipment. Към дисертацията за придобиване на ОНС „доктор“ са представени две публикации, а именно:

1. Dimitrova et al. (2017), Chemistry Central Journal 11(1), 113 (IF=2.284)
2. Dimitrova et al. (2017), Comptes rendus de l'Academie bulgare des sciences 72(3), 341-349 (IF= 0.27)

Людмила Димитрова е активен участник в 17 финансирани научни проекти и една текуща национална научна програма. В резултат на големия обем получени експериментални резултати са представени 19 постери в 14 конференции. Има изнесени 10 орални презентации в 8 конференции.

От авторката напълно заслужено са получени и следните отличия и награди:

- За най-добър постер на млад учен през 2015г.
- За отлични научни изследвания на млад учен през 2017г.
- За най-добра работа на млад микробиолог.
- Грант за участие в конференция в Хисаря.

### **Актуалност на дисертационния труд**

Дисертационният труд се отнася до особено актуален фармакотерапевтичен проблем, какъвто е антибиотичната резистентност и на възможностите за нейното повлияване. Антибактериалната резистентност е водещ медицински проблем в целия свят и е пряка причина за смъртта на 700 000 души годишно. При неблагоприятно развитие на проблема това число може да достигне до 10 000 000 смъртни случаи през 2050г. Според Европейския Център за Превенция и Контрол на Болестите през 2015г. в ЕС са установени 671 689 инфекции, причинени от антибиотично резистентни бактерии, довели до смъртта на 31 110 човека в Европа. Причините за бактериалната резистентност се разделят на две групи – свързани с неправилната употреба на антимикробни лекарства и с недобро качество на медикаментите (лекарствата с ниско съдържание на активно вещество могат да доведат до множествена антибиотична резистентност). Спорд СЗО антибиотичната резистентност може да засегне всеки, на всяка възраст и във всяка страна. Това налага устойчивото

инвестиране в програми за намиране на нови източници и нови вещества с антибактериална активност или такива, които могат да потиснат механизмите на развитие на антибиотичната резистентност, включително анти-кворум ефекти на различни вещества.

Българската флора съдържа над 4100 вида висши растения, от които 750 са лечебни. От тях само 250 се използват в официалната и традиционна медицина на принципа „За всяка болка има билка!“.

Дисертационният труд е посветен на изолирането, фитохимичното и фармакологичното охарактеризиране на вещества и екстракти от широко разпространената в света билка – градско омайниче или *Geum urbanum* L. от семейство Rosaceae. Ефектите на тази билка са отдавна известни и имат сериозен етнофармакологичен корен, който ясно личи и от чуждоезиковите названия на тази билка – Nelkenwurz (немски), Herbe de Saint Benoit (френски) и Herb Bennet (английски).

Дисертационната разработка се отнася до разкриване на антимикробната активност и детайлните механизми на повлияване на антибиотичната резистентност и налчието на потенциална противотуморна активност на 12 екстракта и 8 нови съединения от градското омайниче.

Поради гореизложеното оценявам като много актуална и перспективна тематиката на дисертационния труд. Разработването ѝ води до намирането на нови съединения с желана фармакологична активност и до селектиране на предпочитан екстракционен способ.

### **Структура на дисертационния труд**

Дисертацията на Людмила Димитрова следва утвърдената в страната обща схема на структуриране:

1. Въведение – 2 стр.
2. Литературен обзор – 41 стр.
3. Цели и задачи – 1 стр.

4. Методи и материали – 27 стр.
5. Резултати – 38 стр.
6. Обсъждане на резултатите – 22 стр.
7. Изводи – 2 стр.
8. Приноси – 1 стр.
9. Използвана литература – 20 стр.
10. Приложения – 11 стр.

Дисертацията е богато и сполучливо илюстрирана с общо 38 фигури и 20 таблици. От тях 27 фигури и 15 таблици съдържат обобщение на получените собствени резултати.

Литературният обзор и обсъждането обхващат 308 литературни източници като 97 са от последните 5 години.

### **Предимства на дисертационния труд**

Експерименталната разработка на Людмила Димитрова е описание на едно добре структурирано и прецизно изпълнено интердисциплинано изследване, което протича в три основни направления:

1. Фитохимично извличане и идентифициране на вещества и екстракти от надземни и подземни части на *Geum urbanum*.
2. Задълбочено микробиологично изследване на получените екстракти и вещества върху 13 утвърдени като модели бактериални щамове и един микотичен такъв; изследвани са детайлни механизми за развитие на резистентност към антибактериални средства, включително наличие на анти-кворум ефект. Направена е оценка на противовирусната активност върху модели на коксаки-, адено-, Herpes simplex- и RS-инфекцията.
3. Широкомасщабно проучване на потенциална антинеопластична активност върху панел от малигнено трансформирани човешки клетъчни линии с произход от цервикален карцином (HEp-2, дериват на HeLa), карцином на

пикочния мехур (T-24 и BC-3C); хепатоцелуларен карцином (HEP-G2), левкемизирал лимфом на Burkitt (Raji), а в сравнителен аспект са използвани и две нетуморигенни клетъчни линии – HEK-293 и CCL-1.

Използваните за постигане на целите и изпълнение на задачите методи включват съвременни техники като TEM, SEM, изследване на антимикробната активност, включително на влиянието върху кворум сенсинг при *Ps. aeruginosa* и *S. violaceum*, МТТ-тест за оценка на клетъчната виталност, тестове за антиоксидантна активност, cell death ELISA за количествено определяне на олигонуклеозомалната апоптотична ДНК-фрагментация, FITC-Annexin V Apo Detection поточно-цитометричен тест, определяне на вътреклетъчен редуциран глутатион, тотален антиоксидантен капацитет, вътреклетъчен супероксиден анион, тест за колоногенна активност в полутвърда среда и др.

Фитохимичната работа е извършена прецизно и е отлично документирана.

Описанието на резултатите е последователно и подробно. Обсъждането е написано компетентно и с правилна интерпретация на данните. С това авторката доказва способността си не само да генерира експериментални данни, но и да прави вярна и обективна оценка и сравнение на получените резултати.

### **Забелязани неточности и грешки**

В редица случаи има неправилна употреба на пълен член – стр. 30, 35, 37, 106 и др. Наблюдава се неправилно изписване на названията на ензимите на български език – те би трябвали да се пишат слято или свързани с тире, а не като в англоезичната литература, където се възприемат като определения към дадено съществително-ензим. Такива грешки се окриват на стр. 31, 38, 40 и 49. На стр. 32 се говори за „хемолитичен уремичен синдром“, а не за хемолитично-уремичен синдром, което е правилния медицински термин. На същата страница е използвано понятието „циститна фиброза“ вместо правилното – кистична фиброза. На няколко места неправилно се изписват спрегаемите форми на глагола „поддържам“ с едно „д“ в смисъла на поддържам растеж, култура, клетки, а не „да поддържа“ този или онзи предмет в ръка. Понятието „петрол етер“ на български е по-добре да се изписва като петролев етер или петролен

етер. На стр. 46 е използван неправилният термин „карциногенен процес“ вместо правилното название – канцерогенен процес или канцерогенеза. В „ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ“ се среща „противоракови“ лекарства, вместо правилното – противотуморни или антинеопластични. Същото се отнася и за „ракови клетки“, вместо правилното – малигнени или малигнено-трансформирани. По принцип терминът „рак“ и съответното прилагателно „раков“ се отнасят само до злокачествени тумори от епителен произход и поради това употребата не трябва да припокрива англоезичното “cancer”. Легендата и текстът към фигура 35 не указват използвания метод на изследване на процента апоптотични клетки като се посочва само, че става въпрос за интензитет на флуоресценция. Поради това поставям на дисертантката въпроса каква е методиката (Annexin V или Nicoletti), използвана за получаване на данните от фигура 35?

Заглавието „Приноси към темата на дисертацията“ е неудачно. Приносите трябва да бъдат разделени на „Оригинални приноси“ – 1 до 3 и „С научно-приложен характер (методични)“ – принос 4.

Посочените грешки и неточности не омаловажават стойността на дисертационния труд.

#### **Въпроси към дисертантката:**

- 1. Какъв вид изследвания са представени на фигура 35?**
- 2. Кое е най-перспективното от гледна точка на антибактериалната и антинеопластична активност ново вещество от *Geum urbanum*?**
- 3. Можем ли да причислим градското омайниче като осми член към седемте най-добри антимикуробни средства от природен произход като чесън, пчелен мед, джинджифил, ехинацея, хидрастис, карамфил и риган?**

## **В заключение**

Считам, че дисертационният труд и наличието на две публикации в списания с импакт-фактор към него надхвърля изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор” и има висока научна стойност като показва авторката като изграден и задълбочен изследовател в областта на съвременната микробиология, фитохмия и фармакология на антинеопластичните средства от растителен произход. Убеддено ще гласувам „за” присъждането на степента „доктор”.

Дата

Подпис:

9.6.2019г.

/Проф.д-р С. Константинов, дм/