

СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № I-41/01.04.2019 г. на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН

за получаване на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология)

Автор на дисертационния труд: **Людмила Людмила Димитрова**

Тема на дисертационния труд: **„БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ЕКСТРАКТИ И СЪЕДИНЕНИЯ, ИЗОЛИРАНИ ОТ *GEUM URBANUM* L“**

Изготвил становището: **проф. Мария Ангелова, д.б.н.**

Антимикробната резистентност (АМР) е един от ключовите проблеми на 21 век. Предполага се, че до 2050 година феноменът АМР може да се превърне в по-често срещана причина за смърт, отколкото редица тежки заболявания. Тази ситуация създава условия за възраждане на интереса към алтернативните стратегии за антимикробно лечение. Голяма част от усилията на учените се фокусират върху лечебните растения, които са известни като природни лаборатории за получаването на продукти, уникални по своята структура, по своето разнообразие и сложна природа. Забележителен факт е, че 60% от наличните в момента антимикробни и антитуморни лекарства са получени от растения, които често са по-евтини, по-безопасни за използване по отношение на страничните ефекти и по-лесно достъпни в сравнение със синтетичните им аналози. До сега не е наблюдавана резистентност към получените от тях активни съединения. Въпреки значителното нарастване на броя на публикации в тази област, търсенето на нови или недостатъчно проучени лечебни растения продължава с възходящ темп. Заедно с това нарастват и изискванията за безопасни и здравословни продукти, в резултат на което на преден план излизат насочените дирения, свързани с детайлното проучване на структурата и свойствата на предлаганите екстракти. Именно това е научната насоченост в дисертацията на Людмила Димитрова, което е указание за нейната актуалност и значимост. Освен това, тя се вписва много точно в основните приоритети на страната и Европа. Дисертационната теза е мултидисциплинарна, фокусирана върху задълбочаване на изследванията относно химичния състав и биологичната активност на екстракти от вида *Geum urbanum*. Новото тук е фитохимичното охарактеризиране на екстрактите и връзката с проявената от тях антиоксидантна, антимикробна и антинеопластична активност, което създава предпоставки за оригинални приноси. Искам да подчертая още, че докторантката и нейните научни

ръководители, чл. кор. Х. Найденски и чл. кор. В. Банкова са си поставили сериозна научна задача с несъмнено приложно звучене.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 180 стандартни компютърни страници, които включват 142 страници текст, 20 страници литература и 18 страници приложения. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и отчита всички аспекти на изследването. В него са отразени публикации, кореспондиращи с всяка една от поставените задачи. Обзорът представя състоянието на проблема по настоящем, като коректно отчита постигнатото до този момент при род *Geum* и вид *G. urbanum*, отбелязва нерешените въпроси и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза.

Въз основа на анализа в литературния обзор е изведена целта на настоящата дисертация, формулирани са конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи.

Раздел „Материали и методи” демонстрира много широк набор от конвенционални и съвременни методи от областта на микробиологията, химията и молекулярната биология, като напр. ЯМР спектрален анализ, сканираща и флуоресцентна микроскопия, различни тестове за антибактериална активност, клетъчна виталност, клоногенна способност, отключване на апоптоза, инхибиране на биофилмообразуването, цитотоксичен и антинеопластичен ефект, антиоксидантна активност, ниво на фрагментиране на ДНК и др. Те са адекватни на поставените задачи и дават възможност за коректни резултати. Според мен, някои от методите са представени ненужно подробно.

В раздел „Резултати и дискусия” е включен огромен експериментален материал, който е представен в логическа последователност и съответства на мултидисциплинарния характер на разработката. Докторантката е направила пълна фитохимична характеристика на екстракти от различни части на растението *G. urbanum*: определено е съдържанието на фенолни съединения в 12 екстракта и тяхната антиоксидантна активност; детайлно е проучен етилацетатния екстракт от корените, показал най-високо съдържание на феноли и най-добра биологична активност; изолирани са 9 индивидуални химични съединения, като някои от тях са доказани за първи път при род *Geum* или вида *G. urbanum*. Резултатите са получени на базата на съвременни методи и техники, включително и ^1H и ^{13}C ЯМР, което е гаранция за висока степен на достоверност. Особено внимание е отделено на доказване на биологичните ефекти на изолираните екстракти и съединения. Антибактериална активност и механизъм на действие са проучени чрез различни методи и подходи - електронна микроскопия, синергизъм с клинично прилагани антибиотици, инхибиране на кворум-сенсинг системата на бактериални фенотипове и подтискане образуването на биофилми. Получени са данни за антивирусния потенциал на богати на полифеноли екстракти по

отношение на някои глобално срещани вируси. Много силно впечатление в разработката правят експериментите за определяне на цитотоксичния и антинеопластичен ефект върху няколко клетъчни линии. Използвани са различни съвременни подходи, като оценката за индекс на селективност и клоногенна способност, индукцията на апоптозата чрез активирането на каспаза-3, нивата на GSH и фрагментирането на ДНК. Много информативни в тази посока са данните от флуоресцентната и трансмисионната електронна микроскопия. Докторантката е разширила изследванията с антинеопластичния ефект върху избрана клетъчна линия Raji, свързана с лимфома на Бъркит и доказва положителния ефект на някои от екстрактите. Сериозен теоретичен и приложен интерес представляват проучванията относно ролята на оксидативния стрес при регулиране на клетъчния отговор в експерименти с екстракти от *G. urbanum*. Като маркери за ефективността на получените съединения са използвани данните за общия антиоксидантен капацитет, нивото на активните форми на кислорода и азота, както и радикал-обезвреждаща активност.

Дискусията е изнесена в отделно обособен раздел, в който докторантката представя анализ на получените резултати с творческо използване на литературните данни. Искам да обърна внимание на подходящия стил в този раздел – Димитрова обяснява защо провежда изследването, какво очаква от него и какъв е изводът. Този начин на обсъждане предоставя възможност на читателя да възприеме идеята и резултатите на дисертационна тема.

Изводите съответстват на получените резултати и подчертават съвременното звучене на изследванията и тяхната теоретична и приложна значимост. Те дават необходимата информация за стойността на разработката, но някои от тях звучат в стил „какво е направено“. Приемам и формулировката на приносите и искам да подчертая следните:

1. Постигната е целта на дисертационната теза – получена е нова информация за структурата и биологичната активност на екстракти и индивидуални съединения от лечебното растение *G. urbanum*.

2. Изолирани и идентифицирани са индивидуални съединения, доказани за първи път при род *Geum* и вид *G. urbanum*.

3. Получени са нови данни за ефекта на екстракти от *G. urbanum* по отношение на:

- антибактериалния потенциал, вкл. и към резистентни щамове бактерии;
- антивирусна активност срещу *Herpes simplex* тип 1 и човешкия аденовирус 5;
- проявата на цитотоксичен ефект при туморни клетъчни линии Т-24 и ВС-3С, свързан с индуциране на апоптозата;
- високата антинеопластична активност върху карцином на пикочен мехур.

4. Разработен е ефективен метод за изолиране и концентриране на биологично активни съединения от екстракти на *G. urbanum*.

Към достоинства на дисертацията на Л. Димитрова отнасям още отличното оформление, коректното отразяване на резултатите в 38 фигури, 20 таблици и 9 приложения, като и тяхното професионално представяне.

Получените резултати са включени в 2 журнални статии в списания с ИФ (Chemistry Central Journal с ИФ 2.442 и Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences с ИФ 0.27). Освен това, Л. Димитрова е представила части от разработката в 4 доклада и 13 постера на международни и национални научни форуми. В двете статии и в 15 от материалите тя е първи автор, една от статиите вече е цитиран. Това ми дава основание да считам, че резултатите в дисертацията основно са дело на докторантката и са получили международно признание.

Димитрова е спечелила 4 награди за постер и отлични научни постижения, което е отражение на нейната творческа активност и ентузиазъм. Тя е носител на наградата за най-добра работа на млад микробиолог през 2017 г. на Фондация „Акад. проф. д-р Стефан Ангелов“.

В заключение искам да подчертая, че докторантката е изпълнила изискванията на ЗРАСРБ, като и тези в Правилника на Институт по микробиология при БАН за придобиване на научната степен «Доктор». Освен това, материалът, който представя Людмила Димитрова е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. В процеса на обучение тя е усвоила широк набор от модерни методи, а така също умението да интерпретира данни, да търси и критично да оценява подобни изследвания в литературата и да формулира обяснения. Според мен, получените резултати са достоверни и са база за следващи научни и приложни разработки.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, **убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури**, сформирано със заповед № I-41/01.04.2019 г на Директора на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН да присъдят на Людмила Людмила Димитрова образователната и научна степен **“доктор”** по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология).

30. 05. 2019 г

София

Изготвил становището:.....

/проф. М. Ангелова, дбн/