

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление: 4.3. Биологически науки (Физиология на растенията)

Автор на дисертационния труд: гл. ас. Милена Ангелова Димитрова, задочен докторант в катедра „Физиология на растенията”, Биологически Факултет на Софийския Университет „Св. Климент Охридски”

Тема на дисертационния труд: „Микроразмножаване и биологична активност в екстракти от *Lamium album* L.”

Рецензент: доц. д-р Ели Георгиева Зайова, секция „Приложна генетика и биотехнология на растенията”, Институт по Физиология на Растенията и Генетика, Българска Академия на Науките

Описание на представените материали: Със заповед № РД38-566 от 03.11.2014 г. на Ректора на Софийския Университет „Св. Климент Охридски” съм определена за член на научното жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема „Микроразмножаване и биологична активност в екстракти от *Lamium album* L.” за придобиване на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление: 4.3. Биологически науки (Физиология на растенията – ин витро култивиране на лечебни растения). Автор на дисертационния труд е Милена Ангелова Димитрова – докторант в задочна форма на обучение към катедра „Физиология на растенията”, Биологически Факултет на Софийския Университет „Св. Климент Охридски” с научен ръководител проф. д-р Венета Капчина Тотева. Представеният от Милена Ангелова Димитрова комплект материали на хартиен носител е прецизно подреден. Настоящата дисертация е насочена към проучване на възможностите за микроразмножаване на ценното лечебно растение *Lamium album* L., и сравнителен анализ на съдържащите се първични и вторични метаболити в *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растителни екстракти от този вид.

Обем и структура на дисертационния труд: Дисертацията е написана на 176 стандартни печатни страници в т.ч. и списък на ползваната литература. Дисертационният труд в посочения обем е логично изграден в следната структура: увод и литературен обзор (34 стр.); цел и задачи (1 стр.); материали и методи (11 стр.); резултати (33 стр.); дискусия (20 стр.); заключение, изводи и приноси (7 стр.); литература (34 стр.) и две приложения (23 стр.). Основните резултати са илюстрирани с

10 таблици и 30 фигури, включително и снимков материал. Използваният академичен стил показва, че авторът притежава добра специализирана подготовка и прави аргументирани изводи.

Актуалност на тематиката: Темата и конкретните задачи на предложения дисертационния труд са несъмнено актуални, като се има предвид научната значимост на изследвания проблем. Основният обект на изследване на дисертацията е бяла мъртва коприва (*Lamium album* L.), ценно лечебно растение, източник на широк спектър от биологично активни вещества (флавоноиди, иридоиди, фенолни киселини, полизахариди, тритерпени и етерични масла), определящи противовъзпалителна, антиоксидантна, антивирусна и други активности. В условията на постоянни климатични промени и непрекъсната нужда от суровина за фармацевтичната промишленост пред изследователите стоят редица въпроси за решаване, свързани с проучване на условията на култивиране на лечебните растения и промените в съдържанието на вторичните метаболити. В този аспект, настоящия дисертационен труд разглежда актуални научни проблеми.

Познаване на проблема: Литературният преглед е изчерпателен, онагледен с 10 фигури. Съвременното състояние на тематиката през последните години е отразено чрез използването на изключително голям брой литературни източници – 444, което показва много добро познаване на научната литература и осведоменост на докторанта по разработваните проблеми. Цитираната литература е актуална и свързана с темата, свободно се борави със специфична съвременна терминология. Представено е подробно описание на биосинтезата на вторичните метаболити: фенолни съединения (танини, фенилпропаноиди, флавоноиди), терпени и стероли. Разгледани са възможностите на *in vitro* методите за ускорено микроразмножаване на лечебни растения с висока фармакологична стойност. Подчертани са предимствата и недостатъците на микроразмножаването и соматоналното вариране. Основният акцент в литературният преглед е поставен върху съдържанието на БАВ: иридоиди и секоиридоиди, фенолни съединения, фитоекдистероиди, тритерпеноиди, азотсъдържащи съединения (бетаини, мелатонин) и етерични масла, както и върху биологичната активност на екстрактите от *L. album*. На основата на задълбочен анализ ясно са формулирани целта и основните експериментални задачи на дисертацията.

Методика на изследването: Методичната постановка се основава на използването на съвкупност от редица методични похвати и техники на работа. В изследователската дейност са приложени съвременни биотехнологични, молекулярни и фитохимични

методи. Използвана е флоуцитометрията като ефективен метод за анализ на плоидността на *L. album* растенията. Приложени са молекулярните маркери RAPD-PCR и ISSR-PCR, чрез които са характеризирани ДНК профилите на *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* адаптираните растения. Данните показват липса на ДНК полиморфизъм по време на различните условия на растителния растеж. Промените в първичния и вторичния метаболизъм на *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растителни екстракти от бяла мъртва коприва са изследвани с помощта на хроматографски методи (HPLC и GC/MS). Получени са екстракти с различни разтворители (хлороформ и метанол) по различни екстракционни методи (Сокслет и термостат). Химичният състав на етеричните масла е определен чрез газохроматографски анализ. При установяване количеството на тоталните феноли и антиоксидантния капацитет са използвани различни методи: DPPH, ABTS и тотална антиоксидантна активност (ТАА). Проучени са потенциалната антитуморна, антимикробна и антивирусна активности на метанолови и хлороформени екстракти от *in vivo* и *in vitro* растения. Приложени са подходящи съвременни методи за статистически анализ на данните. От методична гледна точка оценявам високо подготовката на докторанта.

Значимост и убедителност на резултатите: Резултатите в настоящия труд са представени ясно и прегледно, онагледени с 10 таблици и 20 фигури. На лице е сериозен по обхват емпиричен доказателствен материал от самостоятелни проучвания. Получените данни са интерпретирани правилно в хода на тяхното разглеждане.

Разработеният ефективен протокол за микроразмножаване на *L. album* осигурява оптимални нива на минералните вещества и факторите на околната среда като светлина, температура и влажност, което гарантира масово мултиплициране и вкореняване на жизнеспособни растения от проучвания вид. Микроразмножените растения успешно са адаптирани при *ex vitro* условия, а в последствие и при оранжерийни и полски условия, което показва завършеност на целият процес на размножаване. Проведеното сравнително изследване на първичните (аминокиселини, органични и мастни киселини, захари) и вторичните метаболити (фенолни съединения) в екстракти от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения обогатява научната информация за този лечебен вид. Резултатите показват, че въгледороди и мастни алкохоли (хексакозан, нонакозан, триаконтан и 1-монооктадеканол глицерол) са характерни за *in vitro* растенията. Установено е, че метаноловите екстракти, получени от растения, събрани от естествените популации и от *ex vitro* адаптираните растения са продуценти на фенолни съединения с висок антиоксидантен потенциал в сравнение с екстрактите от *in vitro*

размножените растения. Чрез газова хроматография е идентифициран съставът на етеричните масла при *in vivo*, *ex vitro* и *in vitro* растенията от бяла мъртва коприва. Доказано е, че основните компоненти в етерично-маслената фракция на *in vitro* и *ex vitro* култивираните растения са гермакрен D и β -кариофилен. Оценени са антитуморна, антимикробна и антивирусна активности на растения, събрани от естествените популации и на *in vitro* размножените растения.

Дискусията е аргументирана, представена в отделен раздел. Обсъждането на резултатите е подкрепено с цитирания на други автори, което показва задълбоченост на познанията, относно материята, свързана с поставената цел и задачи. Дисертацията завършва със заключение, което обобщава основните стъпки в разгръщането на проблематиката. В пълно съответствие с експерименталните данни са формулирани седем изводи. Дисертационният труд потенциално има много добри възможности получените резултати да бъдат използвани за практически цели, което дава широки перспективи за по-нататъшни изследвания.

Оценка на дисертационния труд:

1. Съдържанието на дисертационния труд и автореферата, убедително показват, че авторът има траен научен интерес към изследваните проблеми, способност задълбочено да работи върху конкретни тематични области и да постига значими резултати.
2. Оригиналните моменти в дисертацията не са самоцелни, а съобразени със съвременните изследвания. Прави впечатление, че е използван мултидисциплинарен подход на изследване, което показва добра методологическа подготовка.
3. Дисертационният труд е източник на научна информация, полезна както за специалистите, така и за една по-широка аудитория.
4. В дисертационния труд са налице достатъчно доказателства за научно-приложни приноси.

Оценка на приносите на дисертационния труд: Справката за приносите, съответства на дисертационния труд и отразява обективно реалните постижения на докторанта. Те могат да се оценят по значимост както следва:

1. Проблемът за *in vitro* култивирането и размножаването на бяла мъртва коприва не е бил предмет на задълбочено изследване досега в България. Разработеният за първи път протокол за микроразмножаване на вида има приносен характер;
2. Особено ценна е потвърдената стабилност на генома при *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* култивирани растения от бяла мъртва коприва;

3. За пръв път са анализирани и сравнени по съдържание на антиоксиданти и антиоксидантна активност, както и на етеричните масла на *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения от този вид. В това отношение работата може да се оцени като новаторска;
4. За първи път е установено наличие на флавоноида кверцитин в *in vitro* размножените растения;
5. Предлаганият дисертационен труд е значима стъпка в изследването на антитуморния, антимикробния и антивирусния капацитет на екстракти от бяла мъртва коприва.

Приносителите в дисертационния труд са значими както за практика, така и за науката като цяло. Считаю, че те са достатъчни за този вид изследване и могат да допринесат за разширяване на знанията в изследваната сфера.

Оценка на личния принос на докторанта в разработването на дисертацията и преценка на автореферата и публикациите по дисертационния труд:

Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Практическото изпълнение на експериментите и обсъждането на получените резултати са лично дело на докторанта. Това може да се каже и по отношение на публикуваните статии, въпреки, че не може да се отрече високото качество на научното ръководство. Докторантът подхожда с необходимата отговорност и задълбоченост към всеки проучван научен проблем. Дисертацията впечатлява с подчертано авторско присъствие и компетентни анализи, обобщения и заключения. Убедително направените сравнения и аргументираните изводи доказват, че авторът е изграден изследовател.

Авторефератът е подготвен в обем от 36 страници текст и напълно отговаря на изискванията, които могат да се предявят към него. Включени са всички раздели от дисертацията. Авторефератът отразява обективно получените резултати и научните приноси на дисертационния труд.

Публикации по дисертационния труд: Във връзка с дисертационния труд, докторантът представя две публикации в научни списания: първата в *Acta Horticulturae* с IF 0.223, където е първи автор, а втората в *Journal of Pharmacy Research* с IF 1.09, където е втори автор. Приемам публикациите като част от дисертационния труд. Забелязани са три цитирания. Впечатляващи са участията на докторанта (17) в престижни международни и национални научни форуми, с доклади и научни съобщения по темата на дисертацията. Това показва, че гл. ас. М. Димитрова е добър популяризатор на актуалните проблеми на растителната физиология и фитохимия.

Критични забележки и препоръки: Нямам съществени забележки към дисертационния труд на М. Димитрова. Имам две второстепенни забележки. Първата е свързана с изложението в раздел „Резултати”, V.2.1., което има повече методичен характер и в недостатъчна степен присъства аналитичното изследване. Втората забележка е относно проучваните показатели, характерни за микроразмножаването, които са отразени в раздел „Материали и методи”, но отсъстват в раздел „Резултати”. Посочените критични бележки не намаляват научната стойност на представения труд. Препоръчвам на докторанта да продължи да работи в тази научна проблематика.

Заключение: Дисертационният труд на докторант Милена Димитрова е задълбочено изследване, базирано на разнообразни съвременни методи, със задълбочени анализи и точни изводи от научно и научноприложно значение за растителната биотехнология, физиология и фитохимия т.е. представлява определен принос за биологичната наука. Оценявам положително научно-изследователската работа по дисертацията и публикационната дейност на автора. Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото прилагане. Анализът на резултатите от дисертацията, формулираните изводи и демонстрираните научни приноси, както и личните качества на докторанта като самостоятелен изследовател, ми дават основание убедено да препоръчам на уважаемите членове на научното жури да присъдят образователната и научна степен „доктор” на Милена Ангелова Димитрова по научно направление 4.3. Биологически науки (Физиология на растенията – ин витро култивиране на лечебни растения).

07.11.2014 г

гр. София

Рецензент:

Доц. д-р Ели Зайова