

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема „**МИКРОРАЗМНОЖАВАНЕ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ В ЕКСТРАКТИ ОТ *LAMIUM ALBUM L.***”, представена за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по шифър 4.3., направление „Биологически науки”, (Физиология на растенията - *in vitro* култивиране на лечебни растения), от **Милена Ангелова Димитрова**– докторант към катедра „Физиология на растенията” при Биологичен факултет на Софийски Университет „Климент Охридски”.

от проф. д-р Страхил Христов Берков – Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, определен за рецензент със заповед РД – 566/03.11.2014 на Ректора на Софийски Университет „Климент Охридски”.

Актуалност на дисертационния труд

Хората използват растителни екстракти от хилядолетия за получаване на лекарствени, козметични и хранителни продукти. Тези екстракти биват ползвани поради тяхната биологична активност, зад която стоят определени биологично активни вещества. Съвременните аналитични техники ни дават възможност за все по-детайлен метаболитен анализ и за установяване на връзки между състава на екстрактите и тяхното биологично действие. От друга страна, комбинирането на съвременни аналитични и биотехнологични методи дава възможност за изследване на биосинтезата на биологично активни вещества, което стои в основата на оптимизирането по биотехнологичен път на получаването им от интактни растения. През последните години има засилен интерес към природните продукти като алтернатива на синтетичните, за лечение на определени заболявания, подобряване качеството на живот или за получаване на суровина за полусинтез на високоефективни лекарствени вещества. В тази връзка, от особено значение за практиката е бързото микроразмножение и запазване на биохимичните характеристики на растенията продуциращи биологично активни вещества. Комбинирането на биотехнологични, химични и биологични подходи за постигане на конкретни научни цели прави

предложения за рецензия дисертационен труд актуален и от интерес за широк кръг специалисти работещи с природни вещества.

Характеристика на проекта на дисертацията

Дисертационният труд е оформен по възприетия в България класически модел на 176 страници и включващ 30 фигури, 5 таблици и 444 цитирани литературни източника (два от които на кирилица). Структурата на дисертацията е балансирана, като отделните раздели дават възможност за задълбочено представяне на постигнатото в света до момента и за интерпретиране на получените резултати в изпълнение на формулираната цел.

Литературният обзор е логично структуриран и е с обем от 32 страници. Включва подробен преглед на биосинтезата на фенолни съединения, терпени и стероли. Продължава с критичен анализ на методите за извличане на екстракти богати на биологичноактивни вещества, биотехнологични аспекти на микроразмножаване на растения и завършва с биологична и подробна фитохимична характеристика на род *Lamium* и изследвания вид *Lamium album*. На базата на литературния обзор се формулират целта и задачите на дисертационния труд. Броят на цитираната литература е показателен за задълбочената работа на докторанта по отношение на литературната справка.

Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани така, че изпълнението им да осигури постигане на резултати с висока научна стойност.

Цел на дисертационния труд е разработване на моделна система за микроразмножаване на бяла мъртва коприва */Lamium album/* за изследване на биосинтетичния потенциал и биологична активност на листни екстракти от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* култивирани растения. Формулирани са осем задачи.

Разделът „Материали и методи“ е представен на 10 страници, на които докторанта описва необходимите за целта на дисертационния труд методи на изследване: въвеждане на растителен материал в *in vitro* култури, получаване на

екстракти с различен метаболитен състав, определяне на биологична активност, инструментален анализ и статистическа обработка на получените резултати. Условието за провеждане на експериментите и апаратурата са описани стегнато по начин, позволяващ тяхното повторение. Усвояването на разнообразните методи за химичен и биологичен анализ и различните подходи за биотехнологично култивиране на растенията е пример, потвърждаващ образователната стойност на докторантурата.

Резултатите от изследванията са обобщени в 32 страници. Експерименталната работа се разделя условно на две части, *in vitro* микроразмножаване и *ex vitro* адаптиране на ***Lamium album***, от една страна и **изследване на** генетичната стабилност на получените растения, както и биологични и метаболитни анализи на екстракти от тях, от друга страна. Използвани са съвременни аналитична техника (ГХ-МС и ВЕТХ) за метаболитен анализ и методи за определяне на биологична активност (антиоксидантна, антимикробиална, противотуморна и противовирусна активности) на екстракти получени от интактни, *in vitro* и *ex vitro* растения. Експерименталната част започва с въвеждане на растенията *in vitro* и адаптиране при *ex vitro* условия. Прави се проверка на тяхната генетична стабилност чрез цитометрични и ДНК-анализи. Пробите се обработват по различен начин (в термостат, апарати на Клевенджер, Соклет и др), при което се получават екстракти с различен метаболитен състав. Тези проби се анализират с ГХ-МС или ВЕТХ в зависимост от природата на веществата. Идентифицирани са различни първични и вторични метаболити, като въглеводороди, мастни киселини, захариди, терпеноиди и фитостероли, както и фенолни вещества. Съществено внимание се отделя на количеството и състава на фенолните съединения и терпените в анализираниите проби като основни носители на биологична активност. Антиоксидантната активност на екстрактите се корелира с тяхното тоталното фенолно съдържание. Изследва се и влиянието на фитохормони върху тоталното фенолно съдържание и антиоксидантната активност. Експерименталната част завършва с тестване на екстрактите за противотуморна, антимикробиална и противовирусна активности. Тестван е ефектът на екстракти от *L. album* с различни концентрации върху растежа и развитието на белодробна ракова клетъчна линия A549, при което се определя цитотоксичността, жизнения цикъл, клетъчната морфология и пропускателната способност на клетъчните мембраните. При определяне на

антимикробна активност са ползвани различни патогенни микроорганизми. Антивирусната активност е тествана с *Herpes simplex* тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2) патогени.

Дискусията на получените резултати показва задълбочено познаване на проблематиката и литературата. Дискутират се получени оригинални резултати за влиянието на състава на хранителната среда и условията на култивиране върху съдържанието на метаболити в изследваното растение, както и потенциала на намерените метаболити в *Lamium album* като фармакологични агенти. Трябва да се отбележи, че досега, в наличната литература, не са открити данни за влиянието на екстракти от *L. album*, както и от род *Lamium* върху прикрепителната способност на клетките от клетъчна линия А 109, както и върху репликацията на *Herpes simplex* в MDBK клетки. Тези екстракти показват значителна активност, което заслужава бъдещо по-задълбочено проучване водещо до изолиране на отделни биологично активни вещества и проучване на молекулните механизми на действие. От друга страна, тези резултати имат и приложен характер с потенциал за разработване на фитопрепарати.

Получените резултати от работата са обобщени в 7 извода. Посочени са и 5 приноса, които недвусмислено показват научната стойност на дисертационния труд.

Публикациите във връзка с дисертацията са 2 в списания с импакт фактор - Acta Horticulturae и Journal of Pharmacy Research, като докторантът има и 17 участия с материали от дисертацията в конференции с международно участие. Трябва да се отбележи, че публикациите имат 3 цитата в реномирани международни списания (Journal of Functional Foods, Food research international, Natural Product Communications) с висок импакт фактор.

Забележки

Дисертационен труд е добре оформен и илюстриран, позволяващо да се придобие адекватна преценка за обема и същността на извършената работа и получени резултати. Докторантът е взел в предвид направените забележки в процеса на оформяне на дисертацията, поради което нямам критични бележки по същество.

Заклучение: рецензираният труд отговаря по качество и обем изискванията за дисертация за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” съгласно закона за развитие на академичния състав в Република България, както и на препоръките за критерии за придобиване на научни степени и академични длъжности в СУ в направление „Биологически науки”.

Публикуваните материали във връзка с дисертацията отговарят на наукометричните изисквания. Основните резултати са публикувани в престижни международни издания и докладвани на международни научни форуми в страната и чужбина. Докторант Милена Ангелова Димитрова се очертава като задълбочен, самостоятелен и переспективен млад учен.

Въз основа на анализа направен до тук, с убеденост препоръчвам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор” на **Милена Ангелова Димитрова**– докторант към катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет - Софийски Университет „Климент Охридски”.

София

Ноември, 2014

проф. д-р Страхил Берков