**реЦЕНЗИЯ**

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „**доктор**“, професионално направление: 4.2. Химически науки (Аналитична химия)

**Автор на дисертационния труд:**Крум Венциславов Бърдаров

Редовен докторант към катедра „Аналитична химия“ при Факултет по химия и фармация, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, гр. София

**Тема на дисертационния труд** Изследване влиянието на антропогенно замърсяване върху съдържанието на кадмий, олово, мед и цинк, форми на свързване и метаболитни продукти в растението *Clinopodium vulgare* L.

**Рецензент:** Академик Атанас Иванов Атанасов, дсн

Крум Венциславов Бърдаров е роден 1987 г. в гр. София. Той е възпитаник на Факултета по Химия и Фармация, към СУ „Св. Климент Охридски“, където през 2010 год. завършва – бакалавър, а през 2011 год. магистърска степен по съвременни спектрални и хромотографски методи. От 2012 година е редовен докторант в Катедрата по Аналитична Химия. Научен ръководител на дисертационния труд на Крум Бърдаров е проф. Румяна Джингова, дхн.

Към днешна дата интересът към фитопродуктите расте неимоверно бързо. Съвременните аналитични техники дават възможност за получаване на една по-детайлна характеристика, що се отнася до анализирането на химичния им състав. Това от своя страна подсилва и прави значително по-ефективно и убедително използването на медицинските растения, предимно в превантивната медицина. Предвижда се след 2050 г. делът на фито-фармацевтичните продукти да достигне **до 40-50%** от общия дел на фармацевтичното производство. Това поставя този раздел от биоикономиката на света с особено социално икономическа значимост.

Сред огромното разнообразие на българската флора**, от 3500** растителни вида, около **500 са известни като лечебни**. В народната ни медицина има натрупана огромна, многовековна информация за полезните качества на много от билките и медицинските растения. Огромен недостатък при голяма част от тях остава липсата на подробни данни за съдържанието на биологично активните компоненти, за тяхната трайност и тяхната зависимост от сезона и почвено-климатичните условия на съответния регион.

Тези вариации, както в биологично активните компоненти, така и в елементния състав създават риск и правят уязвими практиките на традиционната медицина. Бързото развитие и усъвършенстването на аналитичните методики дава възможност за натрупване на знания по отношение на химичния състав на лекарствените растения, което повишава ефективността и безопасността при тяхното използване. Обект на изследване в настоящата дисертация е **сравнително слабо изученото лекарствено растение *Clinopodium vulgare* L.** Ето защо съчетаването на модерни, съвременни аналитични техники за изучаване на химичния състав на едно важно медицинско растение, придава изключителна актуалност и значимост на проблематиката, представена в дисертация.

**Литературният обзор** е написан на 38 страници, включващ 4 фигури. Той е достатъчно информативен и логично построен. Започва с представяне на изследваното в настоящата работа медицинско растение *Clinopodium vulgare* L, като се съобщават известните до момента данни за неговото действие. Дисертантът разглежда и биологичния отговор на растенията спрямо токсичен стрес, причинен от повишени концентрации на тежки метали в почвата. Не е известно този феномен да е проучван при този вид растение, което предизвиква неговия интерес и изключителна важност.

Следва последователно въвеждане в основните методи, използвани за специационен анализ, като се акцентира на **комбинираните техники**, посочвайки техните приложения при този вид анализ. Подробно са описани **методите за пробоподготовка**, което е изключително важна и критична стъпка при реализирането на всеки един експеримент. На определени места в частта за „методики за екстракция“ има прекалено големи методични детайли, което не е свойствено за литературен обзор.

 Задълбоченият анализ на литературната справка дава възможност да се обоснове позицията на докторанта за възможните изследвания, които биха били възможни при определяне съдържанието на кадмий, олово, мед и цинк, форми на свързване и метаболитни продукти в растението *Clinopodium vulgare* L.

Въз основа на това докторантът изгражда своята концепция и очертава конкретните направления в изследователската си работа, извеждайки целта на настоящата дисертация и произтичащите от нея конкретни експериментални задачи, които са ясно формулирани. **Целта е**: да се изследва и охарактеризира растението *Clinopodium Vulgare* L. по отношение на елементен състав, начин и степен на акумулация на някои токсични и есенциални елементи, както и влиянието на токсичния стрес върху синтеза на характерни за растението фитохелатини. С правилно планираните задачи, докторантът показва логично дейностите, които са свързани със събиране на проби от растителния вид, от промишлено незамърсени и замърсени райони в България и последващ анализ посредством ICP-MS и AAS. Паралелно с това са заложени задачи, свързани с провеждането на оранжериен експеримент, който цели да докаже с много по-висока степен на достоверност влиянието на степента на замърсяване на почвата върху концентрацията на елементите и отговора на растението към антропогенните фактори. Разработването и валидирането на метод за мониториране на фитохелатини в растението, както и провеждането на тестове за неговата биологична активност, правят изследването завършено и стойностно.

**Материал и методи**. За провеждане на плануваните анализи, в хода на изработването на настоящата дисертация е анализиран растителен материал и почва, събирани от общо 15 области на територията на България, в периода 2012-2013 г. Систематизирано е представено описание на партидите растения и почви, годината в която са събрани и района, откъдето са събирани. Освен почви от естествените хабитати на растенията, такива са вземани и от промишлено замърсени райони в страната. За изследване зависимостта на елементния състав на растението от съдържанието на Cu, Zn, Pb и Cd в почвата върху която то се отглежда е проведен вегетационен експеримент, като растението се отглежда върху изкуствено замърсени с посочените елементи почви, в оранжерийни условия. Подробно е описан начинът на пробовземането, както на почви, така и на растителен материал. Значителна част от този раздел е посветена на детайлното описание на използваните методи. Основните използвани методи за елементен анализ на растителен материал и почви са **ICP/MS** и **AAS**. За всеки използван метод последователно е представена информация за пробоподготовката и конкретните условия на инструменталния анализ. **Описан е метод за специационен анализ на химичните форми на елементите Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Na, K, Ca, Cd и Pb** в екстракти от растението и оценка на тяхната биоусвоимост. Подробно са описани методите за биологична активност, включващи DPPH-тест за антиоксидантна активност, MTT-теста за определяне на цитотоксичност и тест за ДНК-защитна активност. В описанието на последния тест има допусната грешка – текстът *„pBR322-ДНК, изолирана от водорасли*“ е неверен, pBR322 е бактериален плазмид. Описани са методите за определяне тотално съдържание на сапонини, флавоноиди, фенолни съединения, както и GC/MS и UHPLC/HR-MS и H-ESI метода. Разделът Материали и Методи завършва с описанието на разработването и валидирането на метод за определяне и мониториране съдържанието на фитохелатини в органите на растението. В тази част присъства информация за фитохелатините, която е по-правилно да бъде част от Литературния обзор. Също така тук са представени и много резултати, засягащи оптимизацията на процесите по хроматографско разделяне и детекция на фитохелатините, които е редно да бъдат представени в раздела Резултати.

Използваните материали и методи са детайлно описани, което дава възможност при необходимост експериментите да бъдат повторени без необходимост от допълнителна методична литература, което придава на дисертацията характер на изключително полезно методично пособие.

**Резултати и Обсъждане** е основният раздел от дисертацията. Той обхваща около 50 страници. Получените резултати са визуализирани с 19 фигури и 14 таблици. Първоначално са представени резултатите, свързани с изпитването на биологичната активност на тестваното растение. Тестът за антиканцерогенната активност показва 50% съкращаване на **преживяемостта на HT-29 ракови клетки**, което е в потвърждение на вече публикувани данни за това растение.

Проведеният тест за антиоксидантна активност показва, че IC50 за различните екстракти (от наземна част, органи и т.н) се постига при различни концентрации. Най ниската концентрация на екстракт , с който се постига IC50  е тази, получена от воден екстракт от листа. Това е изключително важен и насочващ резултат. Използвайки воден екстракт от наземната част на растението е доказан и ДНК-защитен ефект. Може би е добре, трите теста за биологична активност да са били направени паралелно, използвайки различните видове екстракти (както е направено при антиоксидантния тест).

След резултатите, потвърждаващи биологичната активност на екстракти от изследваното растение, логично са представени резултатите, целящи установяване присъствието на биологично активни вещества в тях, прилагайки различни аналитични техники. След проведената GC-MS хроматография се установява само кафеена киселина, която само по себе си не би била причина за всички наблюдавани биологични ефекти. С резултатите, получени от GC-MS, докторантът заключава, че най-вероятно в анализирания екстракт присъстват и други по-високо молекулни или нелетливи и термонестабилни вещества, които не би било възможно да бъдат детектирани посредством този метод. Бих отличил анализите, свързани с определяне **съдържанието на сапонини**, които показват значително високи нива, за които има сведения, че са свързани с анти-туморния ефект на растителни екстракти.

Проведеният GC-MS на липофилни биологично активни вещества показа присъствието на компоненти с известен здравен ефект, като**: Фитол, α-токоферол, α- и β-амирин, Лупеол, Витамин К1 и др**. С техниката на UHPLC/HRMS, докторантът установява и други известни по-високомолекулни биологично активни вещества във воден екстракт от надземната част на растението. Или в крайна сметка в резултат на използваните от него техники, докторантът установява 31 индивидуални компоненти с биологична активност, както и сапонини, феноли и флавоноли. Тези резултати потвърждават литературните данни за здравословния ефект на екстракти от това растение и значително подсилват перспективата за използването му като медицинско растение.

За провеждането на анализите, касаещи определяне на елементния състав на растението, докторантът планува мащабно изследване, свързано със събиране на **растителен материал от 15 региона в страната**. При измерването на деветнайсет елемента, резултатите показват вариабилност на токсичните елементи Cd, Pb, Cr, което се свързва с влиянието на екологичните фактори върху елементния състав. Този резултат насочва докторанта към по-детайлно изследване на токсичните елементи във връзка с риска от поемане на токсични дози при консумиране. С особено значение са резултатите за съдържанието на токсичните елементи Cd, Pb и Cr в растенията от различните региони, които варират в граници до 150**%. При това се доказва, че кадмият се характеризира със значителна по-висока екстрахируемост, което го прави рисков елемент за потребителите на растението.** В тази връзка кандидатът допълнително доказва, че съществена част от него се намира в нискомолекулна, катионна форма, която се приема за биодостъпна . На база на получените резултати за елементния състав, докторантът правилно поставя въпроса за формата на свързване на елементите във водните екстракти за консумация от гледна точка на възможностите за биорезорбция на есенциалните и токсични елементи, които в наднормени концентрации биха могли да причинят патологични ефекти при човека.

Тези резултати изострят вниманието в посока на налагане на контрол на такива растения, предвидени за лечение.

Докторантът залага и изпълнява задача, свързана с изследване на био акумулационната способност на растението спрямо Cd, Pb, Cu и Zn. За целта се провежда вегетационен експеримент в оранжерийни условия. На база на получените резултати от този мащабен експеримент, се дава възможност да се изчислят и предложат максимално допустими нива на замърсеност на почвата върху която без риск може да се отглежда медицинското растение.

Докторантът си поставя и задачата да изследва динамиката на синтез на глутатион и фитохелатини в растението като реакция на стреса с повишени нива на Cd, Pb, Cu и Zn в почвата, като в същото време разработва и оптимизира подходящ метод за тази цел.. Полученият резултат показва повишаване на концентрациите на фитохелатини 2 и 3 във всички органи на растението, а при още по-високи съдържания на елементите в почвата, се наблюдава повишаване на концентрациите и на по-висшите фитохелатин 4 и 5. На база на тези резултати биха могли да се подберат маркери за оценка на стреса.

Оригинален елемент в Резултати и Обсъждане е частта, в която докторантът критично разглежда и прави опит за изчисляване на неопределеността на биологичния отговор, като под формата на диаграма се опитва да включи **и засегне различните приноси (биологични, аналитични и неизвестни) към него.**

Значим резултат е установената корелация в повишените нива на фитохелатини 2, 3 и 4 в листата и нивата на Cd в почвата и растението, както е налице и корелация между съдържанието на глутатион в листата на стресираните с кадмий растения и съдържанието на кадмий в растението и в почвата.

В резултат на проведената оранжерийна работа, докторантът е натрупал опит и информация, която да служи за оптимизиране на условията за производство на разсад и времевата схема за отглеждане на растението. Също така тези данни биха били изключително полезни за бъдещо култивиране на растението при нужда от масово производство на препарати от него и запазването му в природата.

Въз основа на получените резултати е представен и последният раздел **Основни Резултати и Изводи.** Изводите на базата на оригиналните резултати отразени по-горе са достоверни, обаче биха могли да бъдат представени и формулирани много по-ясно и точно.

Резултатите от дисертацията са представени в 3 публикации, в списания с импакт фактор.

Докторантът е взел основно участие във всички етапи от реализирането на настоящия дисертационен труд: събиране на растителния материал, организиране и реализиране на оранжерийния експеримент и провеждането на последващите химични анализи, използвайки различни аналитични техники. Заслужава да се отбележи, че извършената експериментална работа е огромна по обем. При този комплексен набор от натрупани данни, докторантът съумява да ги представи в систематизиран и добре оформен вид, който да улесни възприемането им от читателя. Дисертационният труд е написан е на правилен граматичен и научен език и логично представя получените резултати и тяхната интерпретация.

**С това считам, че той прави важна и значителна крачка и съществен принос във все още не добре изследваната област на влиянието на антропогенните фактори върху използването на фито фармацевтичните продукти.**

Запознат съм с автореферата и смятам, че той отразява адекватно съдържанието, резултатите и приноса на дисертацията.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Въз основа на научените и приложените от докторанта различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения на резултатите, считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните критерии на СУ за образователната и научна степен „ДОКТОР“, което ми дава пълно основание да го оценя ПОЛОЖИТЕЛНО.**

**Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да одобри дисертационния труд на кандидата и да присъди на Крум Бърдаров образователната и научна степен „доктор“.**

Дата: РЕЦЕНЗЕНТ: …………………………

Гр. София /Акад. Атанас Атанасов/