

РЕЦЕНЗИЯ

за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност 7.3

Фармация (Фармацевтична химия)

Автор на дисертационния труд: инж. Ивайла Недялкова Динчева

Тема на дисертационния труд: **“АНАЛИЗ НА ФЕНОЛНИЯ СЪСТАВ И БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ ПРИ ДИВИ ЯГОДОПЛОДНИ ВИДОВЕ ОТ РОД *VACCINIUM* L.**

Рецензент: доц. д-р Анелия Ценова Маврова,
катедра „Органичен синтез и горива“, при ХТМУ-София

Представеният за защита дисертационен труд е изработен от инж. Ивайла Недялкова Динчева, зачислена като докторант на свободна подготовка в катедра „Органичен синтез и горива“ при ХТМУ-София по научната специалност 7.3. Фармация (Фармацевтична химия), считано от 30 май 2013 година. Ивайла Динчева завършва през 1995 година петгодишен курс по специалността „Органичен синтез и горива“, специализация „Синтетични лекарствени средства“, с квалификация инженер-химик. В периода 1996–2002 година работи като химик в Институт по органична химия с център по фитохимия на БАН, провеждайки фитохимични и структурни изследвания. В периода 2002–2005 като научен сътрудник III степен в същия институт работи върху проучване на нови растителни видове и изясняване структурата на компонентите им с цел изследване на биологичната им активност. От 2005 до 2007 г. е химик в Софарма АД, София (България, Отдел „Контрол на качеството“) и се занимава с анализ на ексципиенти, активни вещества, фармацевтични продукти като таблетни форми, капсули, супозитории, инжекционни разтвори. През 2008 г. преминава в Дирекция научноизследователска и развойна дейност, където предмет на дейността ѝ е валидиране на аналитични методи; От 2009–31/01/2014 работи като химик в АгроБиоИнститут - София в областта на анализа на биологично активни съединения чрез LC-MS / MS и GC-MS / MS, валидиране на аналитичните методи и процедури в съответствие с изискванията на Международната конференция по хармонизация (ICH) и изготвяне на мас-спектрални библиотеки и метаболитен профил. От 01.02.2014 г. до сега е асистент в същия институт, участвайки в проект по програма BG 09, EEA Grants, Norway Grants "Генетично и

фитохимично разнообразие на черна (*Vaccinium myrtillus* L.) и червена боровинка (*Vaccinium vitis-idaea* L.) с произход от България и Норвегия и тяхната биологична активност във връзка с човешкото здраве"

Участва в два проекта по 7 ЕП. SUPROGAL (SUstantiable PROduction of GALanthamine by both in vitro culture and agricultural crops of highly galanthamine-containing plants): molecular (DNA) analysis (RAPD, ISSR, AFLP, molecular cloning and sequencing); QRF (QualiRedFruits): plant pathogen propagation, molecular diagnostic of *Phytophthora* sp. and metabolite analysis; и два проекта към ФНИ: Диви ягодоплодни видове в България - ценен ресурс за човешкото здраве; Изследване на видовото разнообразие на представители от семейство *Quercus* в България и възможностите за устойчивото им приложение;

Дисертационния труд на Ивайла Динчева е построен по характерния за този вид научни трудове начин и е с общ обем 207 страници, съдържа 38 фигури, 36 таблици и 78 приложения. Цитирани са 366 източника. Съставен е от Въведение (4 стр.); Литературен преглед (27 стр.); Цели и задачи 1 стр. Методи и материали (35 стр), Резултати и обсъждане (46 стр); Изводи и приноси (3 стр), Литература 28 стр; Приложения - 78; Списък на публикациите и цитатите – 1 стр

Заглавието на дисертацията отразява точно и пълно проблематиката по темата.

Съдържанието отразява пълно и коректно структурата на преставения дисертационен труд.

Въведението очертава тематиката и рамките на проблемите, свързани с необходимостта от количествена и качествена оценка на полифенолния състав и антиоксидантен капацитет на екстрактите от плодове на рода *VACCINIUM* L, както и изясняване на физиологичното им въздействие с цел бъдещето разширяване на използването им и приложението им като естествени съставки в лекарствени препарати с очакван здравословен ефект.

Актуалността на темата е добре очертана и обоснована във Въведението на дисертацията и Литературния преглед.

В **Литературният преглед** докторантката накратко е представила ботаническа характеристика на двата вида боровинки червена-*Vaccinium vitis* и черна-*Vaccinium myrtillus*, представляващи изходния растителен материал. Наред с това е направена класифиция на голямата група фенолни съединения, съдържащи се в този вид растения. В тази класификация накратко са представени простите феноли, производни на хидрокси-бензоените и канелени киселини, както и на стилбените. В групата на флавоноидите инж. Динчева подробно се е спряла на отделните подгрупи като антоцианиди, флаваноли, флаванони, флавони и флавоноли. Охарактеризирани са и

полимерните фенолни съединения на база галова и елагова киселина, наричани още хидролизуеми и кондензирани танини, известни като проантоцианидини. Прави впечатление детайлното разглеждане на методите за изолиране и пречистване на фенолните съединения от растителен материал, различните екстракционни техники. Особено внимание е отделено на методите за идентифицирането и структурното изследване на екстракти при използването на хроматографски техники и различните видове спектроскопски анализи. И не на последно място, следва да се отбележи доброто познаване на биологичната активност на флавоноидите и в частност на тези, съдържащи се в екстрактите от червена и черна боровинка. В резюме: **Литературният преглед** е построен върху солидни литературни източници и разкрива познанията на докторантката по разработваната тема. От този обзор личи, че докторантката се е запознала много добре с литературните сведения по темата и свободно борава с тях. Въз основа на направените от литературния преглед изводи е определена целта на дисертацията и са формулирани задачите, които трябва да бъдат изпълнени за постигане на тази цел.

Разделът „**Материали и методи**“ представлява изчерпателно и конкретно описание на използваните методи и техники, което позволява възпроизвеждане на процедурите. В съответствие с поставените задачи, изследванията са насочени в няколко направления,

Първото направление включва: 1). Приготвяне на базови екстракти от плодове на червена и черна боровинка; Спектрофото-метрични анализи на базовите екстракти включващи: Определяне на TPC; Определяне на TMA; Определяне на TAC; 2). Фракциониране на базовите екстракти и на екстракти с цел определяне на свободни и свързани фенолни киселини; определяне съдържанието на флавоноли, флавони и флаванони; съдържанието на антоцианидини; екстракти за биологичен скрийнинг;

Втората насока, в която са проведени изследванията е: 1). Определяне на свободни и свързани фенолни киселини чрез GC-MS; Валидиране на метода; Установяване на Селективност; Прецизност; Повторимост; Линеиност; Правилност; Граница на откриване и количествено определяне (LOD и LOQ); 2). Определяне съдържанието на антоцианидини в екстракти чрез HPLC-UV и съответно валидиране на метода; 3) Определяне на флавоноли, флавони и флаванони и съответно валидиране на метода; 4). установяване на атоциани чрез LC-PDA-ESI-MS; течен хроматограф-фотодиоден детектор- електройонизационна MC; 5) Определяне на проатоцианидини в екстракти чрез LC-ESI-MS

Третото направление е фармакологичният скрининг за: 1) Антивирусна активност и цитотоксичност; 2) антибактериална и противогъбична активност; 3) статистически анализ

Същността на дисертационния труд е изложена в раздела *Резултати и обсъждане*. Резултатите са представени и обсъдени по реда на поставените задачи, което показва умението на докторантката да оформя и представя резултатите логично и последователно. Те са онагледени с 23 таблици и 17 фигури. В съответствие с поставените задачи, изследванията са насочени в няколко направления, в които са и основните приноси на работата. Всички изследвания, проведени от докторантката обхващат интервала 2009 – 2015 година, като се отнасят поотделно до получените екстракти от двата вида плодове от съответните пет местообитания. Интерпретираните резултати, показват че са определени TPC, TMA и TAC. Установено е, че както съдържанието на полифеноли и антоцианидини, така и антиоксидантната активност на екстрактите зависят от вида на растителния материал, от който те са изолирани. С използваните два теста за определяне на антиоксидантния капацитет DPPH и FRAP са отчетени радикалоулавящата способност на растителните екстракти и съответно общото съдържание на редокси-активни съединения. Високите стойности на корелационния коефициент между металоредуциращата и радикалоулавящата способност показват надеждността на използваните *in vitro* тестове за оценяване на антиоксидантната активност.

Определено е съдържанието на свободни и свързани хидрокси-бензоени киселини, при използването на HPLC-UV това на антоцианидини и на три основни класа флавоноиди: флавоноли, флавони и флаваноли. В екстрактите от плодовете на *Vaccinium vitis* от различните местообитания е установено наличието на 3 гликозида на цианидини. Като статистически подход е използван анализа по основния компонент, който показва превес на генетичния фактор, а като техника за многовариационно сравняване класификационния анализ, резултатите от който показват, че образците могат да се разграничат по местонахождение. Чрез използване на LC-ESI-MS количествено са установени 15 гликозидни производни на антоциани и са идентифицирани общо 40 фенолни вещества в обогатените В-фракции. Отличната подготовка на докторантката в областта на мас-спектроскопията проличава при интерпретирането на структурата на идентифицираните съединения.

В съответствие с поставените в дисертационната работа задачи за генериране на комплексна оценка на екстрактите от *Vaccinium V* и *M* с цел приложението им като естествени съставки в лекарствени препарати, докторантката детайлно е представила и коментирала резултатите от фармакологичния скрининг за цитопатичност, антивирусна, анимикотична и анимикотична активност на фракциите В и С. Най-добра антивирусна активност срещу CV-B1

притежават базовите екстракти, докато фракциите В не притежават този ефект, а фракция С е активна срещу грипен вирус А.

Коректно са дискутирани резултатите от изследванията по отношение на антибактериалната активност на базовите екстракти и на обогатените фракции В и С. Добрата антимикотична активност, сравнена с тази на нистатин, използван като референтно съединение, е предпоставка за бъдещи разширени проучвания. Висока е активността на тези фракции срещу Грам-отрицателните и Грам-положителните бактерии в сравнение с тази на използвания като стандарт антибиотик тобрамицин.

Направените **изводи** пълно и точно отразяват получените резултати.

Изведените **приноси** са обективни и коректно формулирани.

Докторантката е представила заглавията **на две научни статии**, свързани с резултатите, докладвани в дисертацията и публикувани в известни международни списания .

Част от резултатите при разработване на дисертационния труд са представени в 4 доклада на една международна и 3 национални конференции с международно участие и с 6 постера на международни научни форуми. Към датата на подаване на документите научната статия, отнасяща се до антивирусната активност на екстрактите е цитирана 4 пъти. С тези научни трудове докторантката покрива напълно препоръчителните критерии за получаване на образователната и научна степен „доктор”.

Авторефератът е изготвен по модела на дисертацията, напълно отговаря на изискванията; отразява вярно съдържанието на дисертационния труд и представя вярно получените резултати и изведените приноси

Към докторантката имам следните забележки и препоръки:

1. Коректно би било освен тривиалните наименования на съединенията да бъдат посочени наименованията по UIRAC.

2. В работата за съжаление се забелязват и някои печатни грешки, дълги и не винаги ясни изречения, напр на стр .47, („...възпрепятстват окислението на липопротеините с ниска плътност, с което чувствително се понижава риска от увреждане на сърдечно - съдовата система (Saito et al., 1998; Yamakoshi et al., 2002) посредством разрушаване глюкопротеиновите власинки на вирусите (Fukumoto & Mazza, 2000; Harborne, 2000; Stampfer et al., 2000; Amarowicz et al., 2004). В резултат на това те губят способността си да се прикрепват и развиват върху слизестите обвивки на уретера и да предизвикат възпаление (Weidenborner et al., 1990; Middleton et al., 2000; Wang et al., 2005; Davidson et al., 2014),...Неточност в заглавието на Фиг. 37b; неточен, неясен израз в

автореферата стр 20 и стр. 87 от дисертацията, цифрите в текста се разминават с тези в таблицата макар и в десетичния знак; на стр 86 вместо ТМА е използвано съкращението ТМС; някои абривиатури не са дадени в списъка на съкращенията, например при анализа по основния компонент и др.

3. Добре би било всички приложения да бъдат съпроводени със съответните структурни формули.

4. Добре би било в понататъшните изследвания да бъде сравнен антиоксидантния капацитет на екстрактите с този на кверцетина.

Заклучение

Дисертационният труд показва, че докторантката Ивайла Динчева притежава задълбочени знания по специалността и способности за самостоятелни изследвания.

Считам, че едно от най-големите постижения на докторската работа са изследванията върху създаването и валидирането на методите, използвани в дисертационния труд при изпълнението на поставените задачи. Създаден е селективен GC-MS метод за определяне на свободни и свързани фенолни киселини и са разработени надеждни HPLC-UV методи за определяне на антоцианидини, флавоноли, флавонони и флавани в екстракти от *Vaccinium V* и *M*

Оценявам високо включеният в дисертационния труд скрийнинг за антиоксидантните, антивирусните и антибактериалните свойства на изследваните екстракти.

Представените изследвания и получените резултати могат да се отнесат към категориите научно-приложни приноси в науката и обогатяване на съществуващите знания. Въз основа на горе изложеното считам, че представеният труд напълно отговаря на изискванията за докторска дисертация и препоръчвам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ на инж. Ивайла Недялкова Динчева.

15. 09. 2016г.

София

Рецензент:


/доц. д-р Анелия Маврова/