

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Марияна Димитрова Аргирова, дн
Катедра по химични науки, Фармацевтичен факултет на МУ - Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: 4.3. Биологически науки; Докторска програма: Ботаника

Автор: Доника Петрова Гюзелева

Тема: Биологично и фитохимично проучване на растения от българската флора с потенциал за биотехнологично приложение

Научни ръководители:

Проф. д-р Пламен Стефанов Стоянов, дб, Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“

Доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска, дб, Фармацевтичен факултет на МУ – Пловдив

1. Общо описание на процедурата и представените материали

Със заповед № РД-21-2058 от 15.11.2024 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема „Биологично и фитохимично проучване на растения от българската флора с потенциал за биотехнологично приложение“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Автор на дисертационния труд е Доника Петрова Гюзелева – докторантка в редовна форма на обучение към катедра „Ботаника и биологическо образование“. На първото заседание на научното жури, проведено на 19.11.2024 год. ми бе възложено да изготвя рецензия върху дисертационния труд. Всички материали, необходими за изготвяне на настоящата рецензия, получих в електронен формат. Те са в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включват следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- протокол от катедрения съвет, свързан с докладване на готовността за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

2. Кратки биографични данни

Докторантката Доника Гюзелева е възпитаник на ПУ „Паисий Хилендарски“, където през 2015 год. се дипломира като бакалавър със специалност „Медицинска биология“, а през 2016 год. получава магистърска степен по специалност „Микробиологичен контрол и безопасност на храни“. През последните две учебни години провежда практически упражнения със студенти по анатомия и морфология на растенията в катедра „Ботаника и биологическо образование“ на Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“. Зачислена е като редовен докторант по докторска програма „Ботаника“ на 01.08.2019 год. и е отчислена на 01.08.2022 год. с право на защита.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Дисертационният труд, представен от докторантката Доника Гюзелева, има за цел чрез биологично и фитохимично проучване на три вида от род *Marrubium* (*Marrubium friwaldskyanum* – Фривалдскиев пчелник, *Marrubium peregrinum* – сусерка, *Marrubium vulgare* – пчелник) и *Centaurea thracica* – тракийска метличина да установи възможността за тяхно приложение като лечебни средства. Основание за тази разработка са недостатъчните сведения за фитохимичния състав на растенията, срещани се в различни райони на България, едно от които (Фривалдскиевия пчелник) е ендемично за България, както и липсата на детайлни проучвания на отделните морфологични части (листа, цветове, плодове) по отношение на тяхната индивидуална фитохимична и биологична активност. Темата на дисертационния труд е в съзвучие с препоръките на Световната здравна организация, която окуражава използването на уникалните силни страни на природните източници за подобряване на здравето и благосъстоянието на хората, като същевременно насърчава по-детайлни научни изследвания, за да се разберат ползите и рисковете на традиционната медицина (WHO global report on traditional and complementary medicine 2019).

4. Познаване на проблема

Докторантката въвежда в настоящето познание за изследваните растения чрез литературен обзор върху морфологичните характеристики на растенията, тяхното приложение в традиционната медицина, и известните фитохимични характеристики. Разгледани са и някои известни биологични свойства на екстракти, получени от тези растения: антиоксидантни, антимикробни и противотуморни, както и вероятните механизми, свързани с тези ефекти. Би било добре литературният преглед да завършва със заключение, което да обоснове по-добре следващите цел и задачи на дисертационния труд.

5. Методика на изследването

Използваните методи от докторантката са адекватни на поставената цел и задачи. Изясняването на фитохимичния състав на такава сложна смес от химични компоненти, каквито са растителните екстракти, идентифицирането на отделни съединения и надеждното им количествено определяне е твърде трудна задача поради химическата сложност и динамичния концентрационен диапазон на метаболома и е немислимо без прилагането на съвременните хроматографски методи с мас детекция. Докторантката използва GC-MS за

анализ на слабополярни аналити след предварителна дериватизация и течна хроматография с тандемна мас детекция. Анотирането на метаболитите е направено чрез използване или на вътрешна база данни със стандартни съединения, или на достъпни библиотеки с бази данни. Данните от газовата и течната хроматография са подложени на мултивариационен анализ, за да се очертаят приликите и разликите във фитохимичния състав на отделните представители на род *Marrubium*.

Биологичните тестове на общите екстракти или екстракти от отделни растителни части включват изследвания върху тяхната цитотоксичност и антитуморни свойства, антимикробен потенциал и имуномодулиращ ефект. Антитуморните свойства на извлекци от листа, цветове и стебла от ендемичния за България пчелник са изследвани спрямо три вида туморни клетки в монослой, а една от туморните линии и като клетъчни сфероиди, които са по-близък модел на солидни тумори. Виталността на клетките е проследявана чрез два стандартни метода – чрез тетразолиево багрило МТТ и тест с багрилото неутрално червено (NR). Антибактериалните свойства са изпитани върху два щамове бактерии – един Грам (+) и един Грам(-), като за всеки екстракт са определени минималната инхибираща концентрация и минималната бактерицидна концентрация.

За изясняване на химичния състав на семената и плодовете от тракийска метличина (*Centaurea thracica*) са използвани стандартизирани по БДС, ISO или други международни организации методи.

Приложени са подходящи статистически методи за обработка на получените резултати.

Описанието на някои от използваните методи е непълно, например условията на хроматографските анализи оригинални ли са или са използвани методи, разработени от други автори (цитиран е само метода за дериватизация). Не става ясно кои точно извлекци по отношение на използвания разтворител са използвани при биологичните тестове (статията в *Heliyon* препраща към статията в *International Journal of Molecular Sciences*, а там има няколко получени екстракта).

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд обхваща 128 страници с добър баланс между отделните части. Литературният обзор, написан на 15 страници, прави преглед на известните данни за ботаническата и морфологична характеристика на растенията, обект на изследване, данни за техния фитохимичен състав и терапевтични свойства. Главата „Материали и методи“ (23 страници) описва сравнително подробно използваните методи. Съвсем уместно докторантката обединява резултатите и тяхното обсъждане в една глава, тъй като по този начин многообразието от резултати логично се свързва с техния смисъл и значение.

В библиографията са включени 257 литературни източника, от които 7 на кирилица.

Експерименталните изследвания са проведени в научните лаборатории на катедрата по Ботаника и биологическо образование, катедрата по Биология на развитието към Биологически факултет, катедра Химична технология към Химически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“; катедрата по Медицинска биохимия към Фармацевтичен факултет при Медицински университет – Пловдив, и Център по растителна и системна биология и биотехнология – Пловдив. Това са утвърдени научни центрове, в които работят доказани в своята област специалисти, което не поставя под съмнение достоверността на получените резултати и тяхното обсъждане.

Дисертационният труд е една добра основа, върху която да продължат по-нататъшни изследвания, даващи възможност за практическо приложение на растенията или техни извлеци като хранителни добавки, фитотерапевтици и др.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Формулираната цел и задачи на дисертационния труд показват, че стремежът на докторантката е не само да се получат нови за научната литература данни за изследваните растения, но и да се очертаят възможни практически приложения на техни извлеци. В този смисъл дисертацията има не само научни, но и научно-приложни приноси. Бих очертала главните от тях:

- Направено е сравнително анатомично и морфологично описание на трите представителя на род *Marrubium* с акцент върху характеристиките на ендемичния за България Фривалдскиев пчелник, които могат да бъдат полезни за бъдещи таксономични проучвания в рамките на род *Marrubium*;
- Въз основа на данните от газ-хроматографски анализ е проведен йерархичен клъстерен анализ на първичните метаболити (главно аминокиселини), съдържащи се в екстракти от *Marrubium peregrinum* L. и *Marrubium friwaldskyanum*, което дава възможност да се определят основните съединения, жизнено необходими за развитието на растенията;
- Метаболитното профилиране, направено чрез данните от течно-хроматографски анализ и избора на 20 целеви съединения с най-висока концентрация, е показало значителни различия във вида и количеството на вторичните метаболити, синтезирани от *M. friwaldskyanum* и *M. Peregrinum*, което говори за значими видови разлики в биохимичните мрежи, водещи до синтез на вторични метаболити. Това е най-добре подчертано при фитохимичния състав на цветовете, чиято биологична роля е различна от тази на останалите растителни части;
- Идентифицирани са две съединения – дипептидът фенилаланилметионин и спрегната киселина на таурина с дезоксихоловата киселина, които се срещат само в ендемичния пчелник;
- За първи път е демонстрирана способността на екстрактите от различни части на Фривалдскиев пчелник (*M. Friwaldskyanum*) селективно да инхибират растежа, активността и жизнеността на различни видове туморни клетки, докато подобен цитотоксичен ефект не е установен при нормални фибробластни клетки. На базата на резултатите от двата теста за цитотоксичност е изказана хипотеза за механизма на възможното въздействие на тестваните екстракти върху туморните клетки;
- Направен е детайлен химичен анализ на неузрели и узрели семена от тракийска метличина (*Centaurea thracica*), като е сравнена динамиката в синтеза на основни съединения: протеини, въглехидрати, липиди и съдържанието на неразтворими влакнини и минерали в процеса на зреене. Специално внимание е отделено на липидния състав на плодовете и семената. Изчислените стойности на индексите на атерогенност и тромбогенност показват добри антиатерогенни и антитромбогенни свойства на изследваните масла, а стойностите на съотношението полиненаситени/наситени мастни киселини потвърждават високата хранителна

стойност на маслото, което го прави перспективно за влагане в хранителни добавки и фармацевтични продукти за профилактика на някои хронични заболявания.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Дисертационният труд е основан върху съдържанието на 4 научни статии, всички те са публикувани в международни списания, реферирани в международни бази данни за научна литература WoS и/или Scopus. Докторантката е първи автор на три от тях. Трябва да се отбележи интересът на други български и чуждестранни изследователи към тях, за което свидетелства факта, че статиите, макар и публикувани през последните 2 години, вече са цитирани 9 пъти (към дата на изготвяне на рецензията).

По отношение на точките, посочени в Правилника за приложение на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), докторантката напълно покрива изискваните от него 30 точки от публикации, като публикуваните статии върху дисертационния труд събират общо 85 точки:

Статия	Impact-factor WoS	Scopus Journal Rank	Точки	Цитирания
Gyuzeleva, D. , Batsalova, T., Dzhambazov, B., Teneva, I., Mladenova, T., Mladenov, R., ... & Bivolarska, A. (2024). Assessment of the biological activity of <i>Marrubium friwaldskyanum</i> Boiss.(Lamiaceae). Heliyon.	3.4, Q1	0.62, Q1	25	-
Gyuzeleva, D. P. , Stoyanov, P. S., Bivolarska, A. V., Mladenov, R. D., Mladenova, T. R., Petkov, V. H., & Todorov, K. T. (2022). Anatomical Investigation of <i>Marrubium friwaldskyanum</i> Boiss. and <i>Marrubium peregrinum</i> L.(Lamiaceae) from Bulgaria. Ecologia Balkanica, 14(1).	-	0.202, Q4	10	6
Gyuzeleva, D. , Benina, M., Ivanova, V., Vatov, E., Alseekh, S., Mladenova, T., ... & Stoyanov, P. (2023). Metabolome Profiling of <i>Marrubium peregrinum</i> L. and <i>Marrubium friwaldskyanum</i> Boiss Reveals Their Potential as Sources of Plant-Based Pharmaceuticals. International journal of molecular sciences, 24(23), 17035.	4.9, Q1	1.18, Q1	25	2
Teneva, O., Petkova, Z., Antova, G., Angelova-Romova, M., Stoyanov, P., Todorov, K., ... & Gyuzeleva, D. (2024). Chemical Composition and Lipid Bioactive Components of <i>Centaurea thracica</i> Dwelling in Bulgaria. Molecules, 29(14), 3282.	4.2, Q2	0.74, Q1	25	1

Резултатите, включени в дисертационния труд, са получили публичност пред научната общност не само чрез публикуване в международни списания, но и чрез представяне пред 3 научни форума.

9. Лично участие на докторантката

Не бих могла да дам оценка за личното участие на докторантката в проведеното дисертационно изследване, и в каква степен формулираните приноси и получените резултати, са нейна лична заслуга, тъй като повечето от изследванията са направени от големи научни мултидисциплинарни колективи. Показателно е, че тя е първи автор на 3 от публикациите. Както вече подчертах, експериментите са проведени в утвърдени научни

центрове и участието на докторантката в експерименталната работа и обсъждането на резултатите е несъмнено допринесло за нейното професионално обогатяване и израстване.

Смятам, че дисертацията е авторски труд на докторантката и не са плагиатствани данни и текстове от публикации на други автори.

10. Автореферат

Авторефератът е с обем 47 страници и включва в кондензиран, но изчерпателен вид съдържанието на дисертационния труд. Включени са голяма част от фигурите, които подкрепят изводите и основните приноси на разработката. Приложена е и библиографска справка за публикациите върху дисертационния труд.

11. Критични бележки и препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Дисертационният труд е написан на много добър научен език, следва логичната последователност на експериментите и тяхната интерпретация и това го прави много убедителен. Той впечатлява с множеството използвани методи и значително количество данни, графично представени в 39 фигури и 12 таблици. На места има малки терминологични неточности, например UV лъчението не е светлина; на стр. 62, 74 и фигури се говори за хидроксигалова киселина, но вероятно става въпрос за хидрокси производни (гликозиди) на галовата киселина, тъй като самата тя е трихидроксибензоена киселина; „сток разтвор“ вместо „складов разтвор“ и др.

Моите бележки върху съдържанието на дисертационния труд не се отразяват върху цялостната ми положителна оценка, но мисля, че биха били полезни в по-нататъшната изследователска и публикационна дейност на докторантката.

- За мен заглавието на дисертацията звучи малко странно. Наистина, в широк смисъл „биотехнология“ е използването на биологията да се правят полезни продукти, но в по-тесен смисъл изследванията на докторантката са не толкова върху биотехнологични производства, колкото върху потенциални медико-биологични или фармацевтични приложения; още повече, че този смисъл са и дискусиите на получените резултати;
- Списъкът с използваните съкращения е доста непълен;
- Литературният обзор отделя значително внимание на антиоксидантните свойства на растителни извлеци и по-специално на групата на полифенолите. В дисертацията липсват подобни данни. Биха могли да се приложат някои от стандартните антиоксидантни методи и да се види как те корелират с фитохимичния състав.
- В глава „Материали и методи“ е посочено, че калибрационните прави за ICP-MS са правени в интервалите 0.01 до 30 ppm, докато много от данните в таблица 4 надвишават 1000 ppm. Как е преодоляна тази разлика? Струва си да се коментира високото съдържание на K, което е близо 4 порядъка по-високо от това на Na като се има предвид важността на съотношението K^+/Na^+ за жизнените функции на клетките, за регулиране на кръвно налягане и намаляване рисковете от сърдечно-съдови заболявания;
- Някои от съжденията са общоприети и не се нуждаят от цитати (стр. 6 и 15). На стр. 59 предпоследен параграф обаче се нуждае от цитат;

- Част от така формулираните в дисертацията изводи звучат повече като приноси и обратно – част от приносите по същество са изводи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Съгласно ЗРАСРБ „Доктор” е образователна и научна степен. Съдържанието на дисертационният труд убедително показва, че докторантката Доника Гюзелева не само е надградила знания, получени в магистърската степен и е покрила образователната компонента на степента „Доктор”, но и е овладяла редица инструментални и биологични методи, умее да обсъжда критично получените резултати и да ги представя в писмен вид. Представеният за рецензиране дисертационен труд по своята научна стойност отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Въз основа на направения анализ на значимостта на проведените изследвания, разработения дисертационен труд и представените публикации давам уверено своята положителна оценка и препоръчвам на уважаемите членове на научното жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор“ на **Доника Петрова Гюзелева** в научна област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки по докторска програма Ботаника.

8 януари 2025 г.
гр. Пловдив

Рецензент: