

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Албена Василева Мерджанова, д. х.

Ръководител катедра „Химия“, Факултет „Фармация“

Медицински Университет – Варна

определена за член на Научно жури със Заповед № Р-109-249/ 30.07.2024 г

от Ректора на Медицински Университет – Варна

и избрана да изготви рецензия (Протокол №1/02.08.2024 г.)

Относно: процедура за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ в област на висшето образование 4. *Природни науки, математика и информатика*, професионално направление 4.2. *Химически науки* и докторска програма *Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества*

Тема: *„Изследване на полициклични ароматни въглеводороди и токсични елементи в лечебни растения и оценка на безопасност“*

Автор: Ангелика Георгиева, редовен докторант, зачислена със Заповед № Р 109-466/29.12.2017 г. към катедра „Химия“, Факултет „Фармация“, Медицински Университет – Варна.

Научен ръководител: доц. Станислава Кателиева Георгиева, д. х.

Общи сведения за процедурата

Рецензията на материалите представени в конкурса е базирана на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение, както и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности и Качествени критерии за развитието на академичния състав на Медицински университет – Варна. Не са установени процедурни нарушения, конфликт на интереси и забележки по предоставените материали.

Биографични данни за кандидата

Ангелика Георгиева придобива през 1992 г магистърска степен по химия от Университет „Асен Златаров“ - Бургас, специалност „Технология на полимерите“. През 2008 г

специализира „Санитарна химия“ в Медицински университет – София. Работила е като старши експерт в Дирекция лабораторни изследвания към РЗИ – Варна. През 2011 г. постъпва на работа в Медицински университет – Варна като химик. От 2022 г. до сега, работи като асистент в катедра „Химия“.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 172 страници, от които: Въведение (2 страници), Литературен обзор (39 страници), Експериментална част (24 страници), Резултати и дискусия (58 страници), Изводи и приноси (3 страници), и Литература (14 страници). Дисертацията включва 36 фигури, 23 таблици и 26 страници приложения (5 броя). Цитирани са 225 литературни източника, от които 25 са на кирилица, 200 – на латиница. Експерименталната работа е извършена в катедрата по „Химия“ към Медицински университет – Варна.

Актуалност на темата

Темата на рецензията дисертационен труд е добре подбрана, в съответствие с интересите на дисертанта и натрупаната експертиза и опит на научния ръководител.

През последните тридесет години в световен мащаб се наблюдава нарастване на глобалния интерес към употребата на лечебните растения. България е на едно от първите места в Европа по производство и износ на билки и затова у нас има дългогодишни традиции при използването на лечебните растения в изсушено състояние за приготвяне на чайове, отвари и тинктури за перорално приложение и други. Билките намират широко приложение при производството на козметични средства, фармацевтични препарати и хранителни добавки. Освен наличието на ценни биологично активни вещества, в билките се откриват токсични вещества, каквито са полицикличните ароматни въглеводороди (РАНs) и редица токсични елементи (олово, кадмий, живак, арсен и др). РАНs са устойчиви органични замърсители, широко разпространени в околната среда и често попадащи в лечебните растения, което може да доведе до негативно въздействие върху човешкото здраве.

Световната здравна организация (СЗО) определя необходимостта от разработване на методология за наблюдение и осигуряване на безопасност и качество на лечебните растения и фармацевтичните продукти на тяхна основа. Определянето на нивата на РАНs и токсични елементи в лечебните растения има отношение не само за директна оценка на безопасността на лечебните растения като храна, но и за екологична оценка на района, от който са събрани

билките. За съжаление, въпреки доказаният неблагоприятен ефект на PAHs и токсичните елементи върху околната среда и човешкото здраве, в България все още не се извършва системен контрол на тези замърсители в лечебни растения, сушени билки и чай. Провеждани са само епизодични изследвания за определяне съдържанието на токсични елементи в билки от отделни райони в България, а проучвания за наличието на PAHs не са открити. Затова е необходимо да бъдат определяни нивата на тези замърсители в традиционно използвани лечебни растения, което ще позволи да се направи оценка на тяхната експозиция по отношение на определени замърсители. Тази информация би дала и възможност да бъде оценено каква част от съдържащите се в лечебните растения замърсители могат да попаднат в организма на човека при консумация на билков чай и прием на хранителни добавки. Считам, че темата на дисертационния труд е актуална и социално-значима.

Характеристика и структура на дисертационния труд

Структурата на дисертационния труд е балансирана и в съответствие със съвременните изисквания за съотношение на частите, но с подчертана насоченост към резултатите, тяхната статистическа обработка и интерпретация.

Литературният обзор представя общата характеристика и класификация на полициклически ароматни въглеводороди (PAHs) и токсични метали. Подробно са описани молекулната структура и характеристика на 13 приоритетни за наблюдение PAHs, които са препоръчани за мониторинг от Научния комитет по храните на Европейския съюз (SCF), Европейският орган за безопасност на храните (EFSA) и Европейския съюз (EU). Докторантът е насочил изследванията си върху тези съединения съобразявайки се с мнението на международните органи по безопасност, които приемат тези съединения като потенциално генотоксични и канцерогенни за хората и представляват приоритетна група при оценката на риска от дългосрочни неблагоприятни последици за здравето при хранителен прием. Доста детайлно е разгледано въздействието на PAHs върху човешкия организъм. Описан е механизмът на токсичността им, свързан с взаимодействие с клетъчните мембрани и с ензимните системи. Поради факта, че тези съединения са с доказани канцерогенен и мутагенен ефект и са мощни имunosупресори, те са класифицирани в следните групи: група 2A - вероятен канцероген за хора, група 2B - възможен канцероген за хора или група 1 - канцероген за хора. Описани са източници на замърсяване (естествени и антропогенни) и разпространение на PAHs, механизмите им на

образуване в околната среда, и пътищата на проникването им в билките (непреработени и преработени). Коментирани са европейски научни изследвания за нивата на PAHs в непреработени лечебни растения и билкови чайове, както и в горещи и студени инфузии, като някои публикации представят високи нива на PAHs в чаени листа, в горещи и студени инфузии които надвишават регулаторните норми. EFSA обобщава данни от анализ на 16 приоритетни PAHs в проби от категорията „билки и подправки“, предоставени от 17 държави-членки и установява неблагоприятно завишени нива на изследваните замърсители, което води до въвеждането на нов регулаторен лимит за сумата от четирите PAHs. Дисертантът представя и научни изследвания за нивата на PAHs във водни и етанолови екстракти от лечебни растения, като обобщава, че се откриват до 50% преминаване на токсичните съединения при инфузии от листа, но този тип резултати са трудно сравними вероятно поради големи различия в методите за приготвяне на екстрактите (температура, съотношение в обема чай/вода, време за екстрахиране и др.). Като заключение, авторът коментира, че поради сравнително ниската степен на преминаване на високомолекулни PAH във водни екстракти от билки, рискът от замърсяване на хранителните добавки, приготвени от тях може да се счита за нисък. Този извод е потвърден и от Европейска агенция по лекарствата и за билкови тинктури, (2017).

Докторантът е разгледал много детайлно аналитичните методи за определяне на PAHs в лечебни растения, като е подчертан проблемът, че в България и Европейският съюз няма стандартизирани методи за анализ на PAHs в лечебни растения, изсушени билки или подправки. В научната литература са публикувани различни методи на пробоподготовка, екстракция, пречистване и хроматографско определяне на полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) в лечебни растения. Разработени са много методи за анализ на PAHs в храни и лечебни растения, като са прилагани различни техники за екстрахиране, пречистване и анализ, като най-често използваните аналитични методи са HPLC-FLD и GC-MS.

Сравнително по-кратко, дисертантът е представил информация за токсичните елементи и възможното им преминаване от околната среда в изследваните лечебни растения. Описана е класификацията и източниците на замърсяване с токсични елементи. Коментирани са изследвания на съдържанието на тези елементи в билки. В тази сфера на изследване има сравнително малко публикации за съдържанието на токсични елементи в лечебни растения

от България. Бял равнец от Рила и Пирин, считани за чисти региони са били изследвани за съдържание на токсични метали, като средните стойностите за олово са близки или надвишават граничната стойност, определена от СЗО. Тези резултати показват, че е важно да се провежда контрол на качеството на билковите растения, дори от чисти райони. В заключение, дисертантът аргументира актуалността и значимостта на темата за безопасността на лечебните растения в България, като пояснява, че липсват данни за проучвания на PAHs в лечебни растения, а информацията за нивата на токсичните елементи в лечебни растения е недостатъчна. Резултатите от изследването ще допринесат за повишаване на информираността на обществеността относно безопасността на билките и необходимостта от контролиране на концентрациите на тези замърсители в лечебните растения.

Целта на дисертационния труд е насочена към определяне на полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) и токсични елементи в пет вида лечебни растения от район Варна и оценка на тяхната безопасност. Поставените 6 задачи са ясно формулирани, в логическа последователност и съответстват на поставената цел.

В **Експерименталната част** са представени обектите на изследване - 5 вида лечебни растения, широко разпространени в североизточна България и традиционно използвани от населението – черен бъз, бял равнец, лайка, дива мащерка и сребролиста липа. Описани са районите за вземане на проби - в близост до транспортни източници на замърсяване (главни пътни артерии на гр. Варна); в близост до промишлени източници на замърсяване (Девня цемент, ТЕЦ Девня, Асфалтова база, Екарисаж) и екологично чист район (местност Фичоза). Освен диворастващи растения, са взети проби от търговската мрежа от същите видове под формата на изсушени билки в насипно състояние и пакетирани билкови чайове (тип филтър), следвайки насоките в Регламент (ЕО) № 333/2007 на ЕС (Регламент (ЕО) № 333/2007).

Подробно е представена разработена аналитична процедура за анализ на PAHs, базирана на аналитичен метод, публикуван от Kowalski et al., (2015) за определяне на полициклични ароматни въглеводороди (PAHs) в изсушени билкови чайове. Изследването на PAHs, в пробите е осъществено чрез приложена аналитична процедура, разработена в катедра „Химия“ на МУ– Варна. В табличен вид са представени инструменталните оптимизирани параметри на газовохроматографската система на режим MSn на масспектрометъра за

качествено идентифициране и количествено определяне на PAHs. Детайлно е описана процедурата по валидиране на аналитичния метод чрез определяне на основни аналитични параметри.

Представена е и аналитичната процедура за определяне на токсични и есенциални елементи (Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al и Co) в лечебни растения, като е описана процедурата по валидиране на аналитичния метод чрез определяне на основни аналитични параметри.

За контрол на качеството са използвани класически методи гарантиращи достоверността на процедурата. Подбрани са адекватни методи за статистическа обработка на получените резултати.

В главата *Резултати и дискусия* дисертантът подробно описва получените експериментални резултати, но едновременно с това дискутира наблюдаваните промени, което показва системния подход при реализирането на изследванията. Представени са данни за съдържанието на нивата на тринадесет сродни съединения PAHs - аценафтилен, флуорен, фенантрен, антрацен, пирен, бенз[а]антрацен, хризен, бензо[б]флуорантен, бензо[к]флуорантен, бензо[а]пирен, индено[1,2,3-сd]пирен, дибенз[а, h]антрацен, бензо[ghi]перилен в проби от диворастящи лечебни растения, сухи билкови чайове, водни и етанолови екстракти на сухи билкови чайове.

Задълбочено е разгледано и дискутирано съдържанието на нивата на PAHs с акцент на четирите индикаторни PAHs в избраните лечебни растения от различни райони на област Варна. Доминиращ замърсител от групата на PAHs е фенантренът, който се среща във всички изследвани проби лечебни растения, докато в нито една проба не се откриват бензо[а]пирен и бензо[б]флуорантен. Определените суми от четирите приоритетни PAHs са под допустимите стойности ($<50 \mu\text{g/kg}$ за сухи билки) определени в Регламент 2015/1933 на ЕС. Резултатите от направеното проучване са обобщени по видове билки, по райони на пробовзимане и по години. Наблюдавана е статистически значима разлика между нивата на PAHs в изследваните пет вида лечебни растения, като най-високо съдържане на сумата от 13 PAHs е определено в липа (от район с интензивен трафик), а най-ниска - в лайка (екологично чист район). При видовете лечебни растения събрани от екологично чист район са установени по-високи нива на 13 PAHs в мащерка, което вероятно се дължи на по-голяма склонност на този вид да биоакумулира тези замърсители.

Представените резултати за съдържание на PAHs в изсушени билкови чайове, водни и етанолови екстракти показват най-висока средна стойност на сумата от 4PAHs в изсушени билкови чайове, техни водни и етанолови екстракти *за липа*, но сумата за 4PAHs в изсушените лечебни растения е по-ниска от максимално допустимата концентрация, определена от Европейската комисия. Като положителен резултат се приема фактът, че бензо[a]пиренът, който има най-висока токсичност от изследваните PAHs не се открива в изсушените билкови чайове, както и в техните водни и етанолови екстракти.

Детайлно и с разбиране дисертантът е представил оценка на безопасността свързана със замърсяването на лечебните растения с PAHs чрез изчисляване на дневен прием и сравнение на получените данни с регулаторните норми. Изчислени са коефициенти на опасност, (HQ) на индивидуални неканцерогенни PAHs както при консумация на билков чай, така и чрез прием на хранителни добавки, съдържащи лечебни растения. Направена е оценка на потенциалната експозиция на карциногенни и генотоксични съединения чрез изчисляване на Граница на експозиция по предложение на Научния комитет на Европейски орган по безопасност на храните (EFSA).

Оценявам като полезен представеният разработен теоретичен подход за оценка на безопасност и риск за здравето на хората при прием на хранителни добавки, съдържащи изсушени билки и/или екстракти от лечебни растения. Считаю, че този подход е част от бъдещо по-задълбочено разработване на стратегия за управление на риска насочена към безопасността на хранителните добавки, което да гарантира, че те не са опасни за здравето на потребителите.

В значително по-съкратен обем докторантът представя резултати за съдържанието на 10 елемента (Cd, Ni, Cr, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Al и Co) в пет вида диворастящи билки, събрани от района на Варна. Сравнението на резултатите по райони на пробовзимане показва категорично, че нивата на токсични елементи (Cd, Cr и Pb) във всички видове лечебни растения от замърсени райони са по-високи отколкото в пробите от приетия за екологично чист район, което вероятно се дължи на влиянието на автомобилния трафик. В екологично чистите райони тези нива са значително по-ниски. Желязото и алуминият са по-високи във всички проби, вероятно поради съдържанието им в почвите.

Добре структурираните обобщения за съдържанието на изследваните групи замърсители след всеки раздел показва, че дисертантът е овладял използваните аналитични и

статистически методи на анализ. Във всяко обобщение се акцентира върху ключови резултати и тенденции, което показва, че докторантът умее да интерпретира добре сложни данни и да ги представя по разбираем начин.

Изводите (13 на брой) отразяват сравнително коректно и логично експерименталните резултати. Изводите значително надвишават поставените задачи. Считам, че независимо от представеният голям обем от данни, те са твърде много и биха могли да се да се съкратят и обединят.

Публикационна активност

По темата на дисертационният труд са публикувани 3 пълнотекстови публикации. Две от публикации са в реферирани и индексирани в Scopus и Web of Science издания (1-Q2, 1-Q4). Една от публикациите е в университетското издание на МУ – Варна, *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. Ас. Георгиева е първи автор в две от посочените публикации. Представени са 9 участия в научни форуми, от които седем в национални форуми, две международни участия.

Научната активност на дисертанта е в съответствие със Закона за развитие на академичния състав на РБ и правилника за приложението му в МУ-Варна.

Личен принос на докторанта

Дисертационният труд завършва с 2 приноса от оригинален характер и 2 приноса с научно-приложен характер. Научното изследване има практическа насоченост свързана с модифициране и валидиране на високоефективен газ-хроматографски метод с масдетекция за определяне на 13 полициклични ароматни въглеводороди в лечебни растения, който може да бъде приложен при анализ на тези замърсители в други растителни проби като подправки, водорасли и др.

Считам, че като принос с научно-приложен характер може да се посочи и разработения теоретичен подход за оценка на безопасност и риск за здравето на хората при прием на хранителни добавки, съдържащи изсушени билки и/или екстракти от лечебни растения.

Автореферат

Авторефератът е съобразен с изискванията на МУ-Варна и възпроизвежда в достатъчна степен съдържанието на дисертационния труд. Представен е на 67 страници, които коректно отразяват структурата на дисертацията.

Критични бележки и препоръки

Имам няколко критични забележки, които не намаляват качеството на представения труд. Бих препоръчала, всички представени хроматограми (фигури 6-10), както и значителна част от таблично представените данни в глава *Резултати и дискусия* да бъдат преместени в приложенията. Считам, че графиките достатъчно добре онагледяват резултатите. Препоръчвам на ас. Ангелика Георгиева да продължи да публикува получените резултати, защото представените статии са от 2021 г. Независимо, че авторът твърди, че проведените изследвания по тематиката са съвсем нови за България, те са преди всичко с регионално значение, което предполага тяхно продължение в други по обстойни изследвания.

Заклучение

Дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на Правилника за развитие на академичния състав и минималните наукометрични показатели на МУ-Варна, както и на изискванията на докторската програм по *Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества*. Поставените цели и задачи са изпълнени, а описаният експеримент е достатъчно обширен, което позволява да се направят сравнително точни изводи. Докторантът демонстрира, усвояване и прилагане на високоефективни хроматографски методи, и добро познаване на оптично-емисионния спектрометър с индуктивно-свързана плазма (ICP-OES), като представя добър аналитичен подход и подходящ статистически анализ при презентирането на резултатите.

Предвид гореизложеното, давам своята *положителна оценка* за представения дисертационен труд и *предлагам на научното жури да присъди образователна и научна степен „доктор“* на ас. Ангелика Георгиева, в област на висшето образование 4. *Природни науки, математика и информатика*, професионално направление 4.2. *Химически науки* и научна специалност: *Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества*.

26.09.2024 г.

гр. Варна

Рецензент

Заличено на основание чл. 5,
§1, б. „В“ от Регламент (ЕС)
2016/679

(проф. Албена Мерджанова, д.х.)