

## СТАНОВИЩЕ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен  
"доктор"  
област на висше образование 4. „Природни науки, математика, и информатика”,  
професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност "Биохимия "

Автор на дисертационния труд: **Миглена Николаева Тодорова**

Тема на дисертационния труд:

**“ПОЛУЧАВАНЕ НА БОГАТ НА АНТОЦИАНИНИ ЕКСТРАКТ  
ОТ ПЛОДОВЕ НА БЪЗАК (*SAMBUCUS EBULUS*) И  
ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНАТА МУ  
АКТИВНОСТ С ОГЛЕД ИЗПОЛЗВАНЕТО МУ КАТО  
СУРОВИНА ПРИ ПРОИЗВОДСТВОТО НА ХРАНИ И  
ЛЕЧЕБНИ СРЕДСТВА“**

Научен ръководител:

**доц. Йоана Киселова-Кънева, дб**

Изговил становище:

**проф. Бистра Цанева Калчева, дф**

Катедра по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика  
Медицински университет "Проф. д-р Параскев Стоянов" –  
Варна

ул. "Марин Дринов" 55, 9002 Варна

тел: 677050 вътр.2883; e-mail: [bistra.galunska@gmail.com](mailto:bistra.galunska@gmail.com)

Със заповед No P-109-216/10.07.2019 на Ректора на МУ-Варна съм определена да представя становище, относно дисертационния труд на ас. Миглена Николаева Тодорова за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Биохимия“.

### **1. Актуалност на разработения в дисертационния труд проблем**

Настоящият дисертационен труд е логично продължение на едно от тематичните направления, разработвани в катедрата по Биохимия, Молекулна Медицина и Нутригеномика, а именно изучаване на молекулните механизми на действие на биологично активни компоненти и фитохимични комплекси, изолирани от български лечебни растения в моделни системи и върху хора.

Актуалността на представения ми за становище дисертационен труд се определя от няколко фактора:

1. Обекта на изследване – традиционна за България билка, бъзак, като е избрана една от неговите разновидности *Sambucus Ebulus*, типична за нашия регион. В последните години нарастна интересът към българските лечебни растения като потенциално терапевтично средство. Голям брой проучвания са насочени към изследване на различни аспекти на биологичната активност както на техни извлеци, така и на отделни фитохимични съставки. Бъзакът е едно от широкоизползваните медицински растения в българската народна медицина. Извлеци от медицински растения и биологичноактивни вещества, изолирани от тях, се използват все по-широко във фармацевтичната и козметична индустрии и се явяват отлична алтернатива на синтетичните химични продукти.
2. Методология – използвани са разнообразни съвременни аналитични и молекулярно биологични методи, гаранция за надеждност на резултатите.

3. Изследвани са различни аспекти на биологичната активност, като цитотоксичност, антиоксидантна активност, антипролиферативно, противовъзпалително и фагоцитарно действие, не само на общ екстракт от бъзак, но и на негови фракции.

Към момента в България няма систематични проучвания върху фитохимичния състав и биологичните ефекти на екстракти от плодове на *Sambucus Ebulus*. В световната литература проучванията са насочени главно към биологичните действия на *Sambucus Nigra*, а изследванията върху *Sambucus Ebulus* са изключително оскъдни.

Настоящият дисертационен труд е посветен на именно на такова изследване, поради което считам темата за актуална и значима и с конкретното си практическо приложение.

## **2. Технически данни за дисертационния труд**

Дисертационният труд на ас. Миглена Тодорова е изложен на 240 страници, добре структуриран и включва следните раздели: въведение – 1 страница, литературен обзор – 33 страници, цел и задачи - 1 стр., материал и методи – 16 страници, резултати и обсъждане – 124 страници, изводи – 2 страници и приноси – 1 страници. Дисертацията съдържа общо 63 таблици, и 53 фигури. Книгописът съдържа 366 броя литературни източника, от които от които 3 на кирилица и 363 на латиница. От тях 136 броя (37%) са от последните 10 години. В литературата не са включени публикации на докторанта. Приложен е списък на публикации и участия в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд.

## **3. Литературен обзор на дисертационния труд**

В дисертационния труд е направен подробен обзор и критична оценка на съвременното състояние на проблема, предмет на дисертацията. Литературният обзор е разделен на шест части, от които първите три са посветени на изолиране и фракциониране на фенолни компоненти от растителен материал и методи за количествено определяне на фитохимичния състав на получените извлеци и фракции и антиоксидантната им активност, а следващите две се отнасят до биологичната активност и метаболизма на антоцианините. Последната част от обзора представя ботанически и фитотерапевтични данни за обекта на изследване плодове от *Sambucus ebulus*. Много добро впечатление правят изводите от обзора на литературата, изнесени в отделна част и обосноваващи целта и задачите на дисертацията.

## **4. Формулиране на целите и задачите на дисертационния труд**

От направения анализ в литературния обзор логично е изведена основната **цел** на дисертацията “ *Да бъде получена и пречистена антоцианинова фракция от плодовете на Бъзак (*Sambucus ebulus*) и да се изследва *in vitro* биологичната активност на получената фракция.*”. Целта и произтичащите от нея задачи са ясно и конкретно дефинирани и са в логична последователност.

Задачите са разделени в две групи: задачи, свързани с получаване, фракциониране и охарактеризиране на екстракт от плодове на Бъзак (*Sambucus ebulus*); задачи касаещи изследване на *in vitro* биологичната активност на получения общ екстракт и антоцианиновата фракция от плодове на Бъзак в модел на третиране на клетъчна култура с бактериални LPS.

В съответствие с така формулираните цел и задачи в логична последователност са представени останалите раздели на дисертационния труд.

## **5. Експериментална част и методология**

Подробно са описани методите за екстракция на фенолните съединения от растителния материал и получаването на богата на антоцианини фракция. Описани са методите за количествено определяне на общо фенолно съдържание, общи флавоноиди, общи мономерни антоцианини, както и хроматографския метод за количествено и селективно определяне на

фитохимичния състав, специално разработен за нуждите на експеримента. Всички методи са валидирани според официално приетите критерии.

Антиоксидантната активност на получените екстракти и фракции е оценена по два метода – чрез пренос на електрон и чрез пренос на водород върху радикала.

Подробно са описани използваната клетъчна линия и нейното субкултивиране, експерименталните модели и методите за оценка на биологичната активност на получените екстракти и фракции.

Посочени са основните статистически методи, използвани при анализа на резултатите.

## 6. Резултати и обсъждане

Резултатите в дисертационния труд са представени в осем части: а) оптимизиране на екстракционната процедура; б) разработване, оптимизиране и валидиране на методи за фитохимичен анализ в) оценка на антиоксидантната активност на получените екстракти; г) определяне влиянието на екстрактите върху жизнеността на стимулирана с LPS и нестимулирана макрофажна клетъчна линия; д) изследване ефекта на екстрактите върху експресията на гени от антиоксидантната защита върху нестимулирана и стимулирана макрофажна клетъчна линия. Изследвани са гени за гама-глутамилцистеин лигаза, глутатион синтаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза и СОД-2; е) изследване влиянието на тотален екстракт и антоцианинова фракция от плодове на бъзак върху експресията на гени, свързани с възпалителния отговор при нестимулирана макрофажна клетъчна линия и стимулирана с LPS. Изследвани са гени за TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RN, MCP-1, COX-2, CRP, iNOS, TLR-4; ж) изследване влиянието на тотален екстракт и антоцианинова фракция от плодове на бъзак върху експресията на гени, свързани с фагоцитоза. Изследвана е експресията на гени за НАДФН оксидаза и миелопероксидаза.

Накратко основните резултати включват:

1. Тоталния екстракт и антоцианиновата фракция проявяват ясно изразен цитопротективен ефект, подобрявайки клетъчната жизненост на макрофагите в условия на LPS индуцирана цитотоксичност.

2. По отношение ефекта на тоталния екстракт и антоцианиновата фракция върху антиоксидантната защита:

Усилва се експресията на GCL и GPx-1 и се намалява тази на GS, GR и SOD в нестимулирани макрофаги. В условия на LPS третиране, за което е доказано, че индуцира оксидативен стрес и възпалителен отговор, изследваните екстракти проявяват протективно действие, като намаляват ефекта на LPS върху експресията на GCL, GPx-1, GS и GR, и повишават експресионните нива на SOD.

3. По отношение ефекта на тоталния екстракт и антоцианиновата фракция върху възпалението и фагоцитозата:

В нестимулирани макрофаги ниските концентрации стимулират експресията на IL-6, CRP, iNOS и TLR-4 и намаляват експресията на TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RN, MCP-1 и COX-2, докато високите концентрации стимулират експресията не само на CRP, iNOS, TLR-4, но и на COX-2, MPO и NOX. Изследваните екстракти намляват стимулиращото действие на LPS, като понижават експресионните нива на всички изследвани гени, свързани с възпаление и фагоцитоза.

## 7. Изводи

Изводите съответстват на поставените цел и задачи. Те са добре формулирани и логично изведени от получените резултати.

## 8. Основни приноси на дисертационния труд

Дисертационният труд на ас. Миглена Тодорова заслужава висока оценка. Той определено има конкретен научен и потенциален практически принос. Ще цитирам някои от по-важните оригинални и научно-приложни приноси на дисертационния труд:

1. За пръв път е разработен и валидиран хроматографски метод с тандемна UV и маселективна детекция за едновременна идентификация и количествено определяне на полифенолни съединения в растителни екстракти.
2. С разработения хроматографски метод за пръв път е установено съдържание на свободен кемпферол в ацетонов екстракт от плодове на *Sambucus ebulus*.
3. За пръв път е установено цитопротективно действие на тотален ацетонов екстракт и обогатена на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в модел на LPS-индуцирана цитотоксичност.
4. За пръв път е установено модулиращо действие на тотален ацетонов екстракт и обогатена на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в модел на LPS-стимулиране върху гени, свързани с антиоксидантната защита.
5. За пръв път е установено имуномодулиращо действие на тотален ацетонов екстракт и обогатена на антоцианини фракция от плодове на *Sambucus ebulus* в модел на LPS-стимулиране върху гени, свързани с имунната защита – ензими и фактори на възпалението, фагоцитарни ензими.

#### **9. Оценка на приносите на дисертанта при разработване на дисертационния труд**

Дисертационният труд и от направените публикации по него, показват, че той е изпълнен от докторанта, подпомаган от научния си ръководител.

#### **10. Оценка на публикациите по дисертационния труд**

От представените научни публикации и участия в научни форуми личи, че резултатите от дисертационния труд са добре популяризирани сред научната общност. Във връзка с дисертационния труд са представени 3 публикации в пълен текст в научни медицински списания, две от които, под номер 2 и 3 от списъка с публикации, са с импакт фактор 0,978 и 0,242, съответно. В две от публикациите ас. Миглена Тодорова е първи автор. Резултатите са докладвани на 5 международни научни форума, 1 от които в чужбина. В 4 научни съобщения дисертантът е първи автор, което недвусмислено показва неговият основен принос при разработване на дисертацията.

#### **11. Оценка на автореферата**

Представеният автореферат отразява актуалността на проблема, поставената цел и задачи, получените резултати, направените изводи и очерцащите се приноси на дисертационния труд.

#### **12. Заключение**

Дисертационният труд на ас. Миглена Николаева Тодорова "ПОЛУЧАВАНЕ НА БОГАТ НА АНТОЦИАНИНИ ЕКСТРАКТ ОТ ПЛОДОВЕ НА БЪЗАК (*SAMBUCUS EBULUS*) И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНАТА МУ АКТИВНОСТ С ОГЛЕД ИЗПОЛЗВАНЕТО МУ КАТО СУРОВИНА ПРИ ПРОИЗВОДСТВОТО НА ХРАНИ И ЛЕЧЕБНИ СРЕДСТВА" е посветен на един изключително актуален проблем. Полученият експериментален материал е достатъчен, за да бъдат получени нови за науката резултати. Използвани са съвременни аналитични, молекулярно биологични и генетични методи за анализ. Считаю, че е постигната поставената цел и свързаните с нея задачи. Приносите на дисертационния труд са с определена теоретична и практическа важност.

Казаното дотук показва, че представения ми за становище дисертационен труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България,

ППЗРАСРБ и Правилника за развитието на академичния състав в Медицински университет - Варна за получаване на образователната и научна степен "доктор". Убедено гласувам с „ДА“ и предлагам на членовете на Почитаемото Научното Жури да гласуват положително за присъждане на ОНС "доктор" на ас. Миглена Николаева Тодорова.

Варна, 18 08. 2019 г.

Изготвила становище:  
проф. Б. Галунска, дф

