

РЕЦЕНЗИЯ

върху научните трудове по конкурса за доцент по професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества” за нуждите на лаборатория „Химия на природните вещества” към Институт по органична химия с Център по фитохимия към БАН-София, обявен в Държавен вестник, бр. 16, стр. 194 от 27.02.2015 г.

Рецензент:

Доц. д-р Атанас Кирилов Сиджимов,

Катедра Органична химия и фармакогнозия, Факултет по Химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски”, София 1164, бул. Джеймс Баучър №1, тел. 02-8161-226, ел. поща: asidjimov@chem.uni-sofia.bg

Кандидат в конкурса:

Д-р Калина Иванова Алипиева,

Гл. асистент в Института по органична химия с Център по фитохимия към БАН.

1. Биографични сведения

Д-р Калина Алипиева е родена на 25.06.1971 г. в гр. София. Средното си образование завършва през 1990 г. в Техникум по химическа промишленост и биотехнологии „Проф. д-р Асен Златаров”, а висшето, със специалност магистър по органична химия с успех от следването и държавните изпити съответно мн. добър и отличен, през 1996 г. През 1997 г. постъпва като редовен докторант в ИОХ с ЦФ – БАН, където през 2004 г., под ръководството на ст.н.с. дхн С. Попов и ст.н.с. д-р Н. Ханджиева, успешно защитава дисертация за получаване на образователната и научна степен „доктор” в областта на фитохимични изследвания на фенилетаноидни и иридоидни гликозиди. През 2005 г. след конкурс, д-р Алипиева е избрана за научен сътрудник II степен, а от 2008 г. до настоящия момент е главен асистент в лабораторията по „Химия на природните вещества” към ИОХ с ЦФ – БАН. Провела е две краткосрочни специализации (2009 и 2013 г.) в Природо-математическия факултет на Университет „Св. св. Кирил и Методий”, Скопие и една 4 месечна специализация (2004 г.) в Института по органична химия към Датския технически университет, Копенхаген.

2. Представени научни трудове

Д-р Алипиева е представила списък от 33 публикации извън дисертационния труд и отделен списък с 6 публикации от дисертацията си. В списъка на публикации по

дисертационния труд тя съвсем коректно е включила и две работи под № 5 и 6, които са били публикувани след защитата, но са на основата на резултати, част от дисертационния труд. Тъй като дисертацията е получила оценка по-рано, свързаните с нея публикации (статии с номера от 1 до 6) тук отпадат от рецензиране. В представения списък от 33 публикации извън дисертационния труд, 32 са публикации в специализирани научни списания и една (№13) е глава от поредица. Тъй като България е част от Европа, считам направеното разделяне на списанията на български и чуждестранни за остаряло. Приемам, че съвременното деление е на списания с импакт фактор и на такива без импакт фактор, което съответства и на препоръчителните изисквания на ИОХ с ЦФ за поне 15 публикации в списания с импакт фактор за получаване на научното звание доцент. От представените публикации, 26 са в списания с импакт фактор, като към означените от д-р Алипиева 25 публикации, след проверка съм добавил и публикацията под № 10.

3. Дисертация за образователната и научна степен доктор

Изследван е химичния състав на девет растителни вида от родовете *Phlomis* L., *Lamium* L. и *Lamiastrum* Heist ex Fabr. Изолирани и идентифицирани са голям брой индивидуални съединения, предимно иридоидни и фенилетаноидни гликозиди, от които 3 нови съединения. Установено е, че иридоидите са надеждни хемотаксономични маркери за родовете *Lamium* и *Lamiastrum* и са направени хемотаксономични заключения. И докато през 2004 г. дисертацията е защитена с 2 забелязани цитата, понастоящем е приложен списък от 73 цитирания, което говори за високо ниво и актуалност на проведените изследвания и получените резултати.

4. Научни приноси извън дисертационния труд

Значителна част от научната продукция на д-р Алипиева обхваща изследвания на химичния състав на видове от родове *Micromeria*, *Sideritis* и *Lamium*, семейство Lamiaceae. Видовете *Micromeria* са използвани в народната медицина за лечение на различни инфекциозни заболявания и възпаления. Проведен е ГХ/МС анализ на етерични масла получени от *Micromeria dalmatica* от български произход, *M. cristata* от две находища в България и едно в Македония и *M. juliana*. За *M. dalmatica* е установено високо съдържание на етерично масло, където преобладават кислородсъдържащи монотерпени с ментанов скелет. Получените резултати за *M. dalmatica* и тези за *M. juliana*, сравнени с тези публикувани от други автори, показват относителна стабилност в качествения състав. Съставът на етеричните масла, получени от две находища на *M. cristata* се различава съществено – в единия преобладават монотерпенови алкохоли, а в другия

сесквитерпеноиди. Получените резултати водят до заключението, че освен генетичния фактор, съществено влияние оказват и екологичните условия (публ. 8).

Представителите на род *Sideritis* (планински чай) са широко използвани в народната медицина под формата на запарки за лечение на простудни и стомашни заболявания. От петте разпространени на Балканския полуостров вида, най-широко използван е *Sideritis scardica* Griseb. Това е довело до включването му в Червената книга като един от най-застрашените видове в българската флора. Един от начините да се отговори от една страна на изискванията на пазара и традициите на народната медицина и от друга да се запазят тези ценни растителни видове от изчезване е тяхното култивиране и създаване на полесни за култивиране хибриди. Проведено е сравнително ГХ/МС изследване на хексанови екстракти на растителен материал от *S. scardica* от две естествени популации и такива от три хибридни култивирани популации *S. scardica* x *S. syriaca* отглеждани в различни райони на страната. Резултатите показват близък състав на основните компоненти (дистерпени и висши въглеводороди) в двете естествени популации и в два от култивираните хибриди. Проведените тестове показват и близка антибактериална активност на екстрактите от естествените и двете култивирани популации. Резултатите са обещаващи и показват, че при правилно подбрани култивационни условия е възможно да се получи растителен материал надвишаващ биологичната активност дори на естествените популации (публ. 9).

Проведените ГХ/МС изследвания на химичния състав на етерични масла от диворастящи популации на *S. scardica* от български и македонски произход показват качествени и количествени разлики – основни компоненти в маслата от български произход са дистерпените, а в македонската – моно и сесквитерпени. Извода е, че химичния състав на този род зависи предимно от екологичните условия на географския район и склонността към хибридизация (публ. 5).

Разработен е съвременен ефективен метод за екстракция на фенолни съединения от *Sideritis* чрез ултразвуково подпомагана екстракция с метанол при нагряване и спектрофотометричен метод за анализ на тотални феноли и флавоноиди. Установено е, че при традиционния способ за приготвяне на чай чрез запарка, количеството на екстрахираните феноли и флавоноиди е най-голямо (публ. 12). Разработените методи са приложени и за определяне на тоталното фенолно и флавоноидно съдържание на култивирани растения от *S. scardica* в пет флористични райони на страната. Най-високо съдържание е установено в планински райони, близки до естествените находища на *S. scardica*, а най-ниско – в райони с ниска надморска височина. Резултатите са от важно

значение за насочване към подходящи райони за отглеждане на култивирани проби (публ. 26).

Много успешно е участието на д-р Алипиева в мащабно изследване на фенолното съдържание на видове *Sideritis* в рамките на Балканския полуостров със съвместното участие на изследователи от България, Македония, Сърбия, Албания. Изследвани са видовете *S. scardica*, *S. raeseri*, *S. syriaca*, *S. taurica*, *S. perfoliata*. Разработен е HPLC-UV-MS метод за качествен и количествен анализ на фенолни и флавоноидни гликозиди, изолирани и идентифицирани са десетки съединения от групите на фенилетаноидните гликозиди, флавоноидните гликозиди, флавоноидните ацетилгликозиди, хидроксиканелени киселини, дитерпените сидерол и сидеридиол, установени са антиоксидантните им свойства. Получените резултати показват, че видовете от рода, диворастящи и култивирани са богат източник на биологично активни полифенолни и дитерпенови съединения (публ. 6, 22, 33).

Като част от комплексното изследване на съдържащите се в растенията от род *Sideritis* вторични метаболити от надземните части на *S. lanata* са изолирани и чрез спектроскопски методи, двумерен ЯМР и МС са доказани структурите на две нови за природата съединения – иридоиден дигликозид и флавонов гликозид (публ. 11).

Друга значителна част от научната продукция на д-р Алипиева обхваща фитохимични изследвания върху родовете *Veronica* (Великденче) и *Verbascum* (Лопен), проведени в рамките на проект за изучаване на иридоидните биомаркери в двата рода. От метанолов екстракт на ендемичния за района на Странджа вид *Veronica turrilliana* са изолирани два нови фенилетаноидни гликозида турилиозид А и турилиозид Б, един нов спироستانолов сапонин – турилианозид, шест познати иридоиди и фенолните гликозиди арбутин и кафеоиларбутин. Установен е висок потенциал на фенилетаноидите като уловители на свободните радикали, надвишаващ този на кверцетина (публ. 4).

Фитохимичните изследвания на ендемичния за България и неизследван вид *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. по разработената от д-р Алипиева схема довежда до получаване от метанолов екстракт на иридоидна и фенилетаноидна фракции, а оттам и на индивидуални съединения като иридоидните гликозиди аукубин, нигрозид III, нигрозид VI, аюгол, харпагозид, фенилетаноидните гликозиди вербаскозид, форситозид Б и левкосептозид Б. Съществена част от тези изследвания е върху биологичната активност на екстракт, фракции и индивидуални съединения. Установена е значителна антивъзпалителна и антиокислителна активност, както и силен инхибиращ ефект върху ацетил- и бутирилхолинестеразата, като тези активности се дължат преди всичко на

фенилетаноидите (публ. 17, 23, 24, 28). Получените обещаващи резултати за биологичната активност на вторичните метаболити в *Verbascum xanthophoeniceum* довежда до създаване на *in vitro* трансформирани коренови култури от този вид, с интензивно нарастваща биомаса и 6 пъти по-високо съдържание на фенилетаноидния гликозид вербаскозид от това в изходното растение. Резултатите дават възможност за практическо приложение на кореновите култури като източник за по-мощното му получаване (публ. 19).

Чрез прилагане на едномерна и двумерна ЯМР спектроскопия, за първи път в род *Verbascum* е проведен метаболомен анализ на 5 растителни вида (*V. xanthophoeniceum*, *V. nigrum*, *V. phoeniceum*, *V. densiflorum*, *V. phlomides*). Идентифицирани са 22 индивидуални съединения, което е позволило разделяне на видовете на две групи, едната от които с високо съдържание на биологично активните иридоидни и фенилетаноидни гликозиди (публ. 18).

Друга група научни публикации (публ. 14, 15, 16, 20 и 25) обхваща изследвания върху химичния състав и биологичните активности на метаболити изолирани от клетъчни и коренови култури от африканското растение *Harpagophytum procumbens* (дяволски нокът). *Harpagophytum procumbens* е лечебно растение, станало много популярно през последните години в Европа при лечение на дегенеративни ревматоидни артрити, остеоартрити, тендонити и бъбречни възпаления. Годишно се използват повече от 800 тона суха растителна маса от този вид и това налага търсене на алтернативни източници за нуждите на фармацевтиката и медицината. Направения анализ на химичния състав на клетъчните и коренови култури показва променен състав в сравнение с този на растението, но с високо съдържание на фенилетаноидната фракция. Въпреки, че в екстрактите не са намерени характерните за цялото растение иридоидни гликозиди харпагозид и харпагид, за метаноловите екстракти от *in vitro* културите е доказана антивъзпалителна, антиоксидантна и холинестераза инхибираща активност. Съществува реална възможност клетъчните и кореновите култури да се превърнат в удобен метод за изолиране на метаболити с ценни за медицината и козметиката свойства.

Едни от последните изследвания проведени от д-р Алипиева и публикувани през 2015 г. (публ. 31 и 32) са върху химичния състав на *Sambucus ebulus* L. (тревист бъз). От метаноловия екстракт са идентифицирани 5 флавоноидни гликозида, два от които нови за рода. Напълно охарактеризирана е и липофилната фракция. Доказана е висока антиоксидантна активност на тоталния екстракт и флавоноидната фракция, установена е противовирусна активност срещу *Herpes simplex*. Проведен е ЯМР метаболомен анализ в рамките на изследвания вид, като е установено, че метаболитния профил на зелените

плодове е близък до този на листата, за разлика от зрелите плодове. Не е идентифициран токсичния цианогенен глюкозид самбунигрин, докладван по-рано от други автори.

Натрупаният опит и постигнатите резултати от д-р Алипиева в разгледаните по-горе комплексни изследвания са довели и до написване на няколко обзорни статии по покана в реномирани списания, посветени на иридоидните и фенилетаноидни гликозиди; на аналитични и препаративни HPLC методи за анализ; на химичния състав и биологична активност на видовете от род *Verbascum* (публ. 13, 27, 29, 30). Към научната продукция на д-р Алипиева със забележим принос могат да бъдат отнесени и няколко изследвания, отразени в единични публикации, като например изследването върху алкалоидния състав на *Lobelia laxiflora* L., растение от Коста Рика, довело до изолиране на три нови пиперидинови алкалоиди (публ. 1) или изследване върху химичния състав на *Carthamus lanatus* L. с изолиране на четири нови бисаболанови фукопиранозида (публ. 2).

Приемам изготвената от д-р Алипиева справка за приносите.

Приносите бих охарактеризирал като разработване на ефективни методи за екстракция, разделяне и изолиране на индивидуални съединения и доказване на техните структури; сравнителен качествен и количествен анализ на диворастящи и култивирани растителни видове с различен географски произход; качествен и количествен анализ на *in vitro* клетъчни и коренови култури; въвеждане на метаболомен ЯМР анализ; изследване на биологичната активност на екстракти, фракции и индивидуални съединения.

5. Характер на публикациите и цитирания

Научната продукция на д-р Алипиева е публикувана в реномирани научни списания, някои от които с висок IF, като *Biotechnology Advances* (IF 8.9), три публикации в *Phytochemistry* (IF над 3), три в *Food Chemistry* (IF над 3.6), две в *J. of Ethnopharmacology* (IF около 2.8) и т.н. Общият импакт фактор на научните публикации е 61, което е добро постижение. Броят на цитиранията е впечатляващ – общо 197 за публикациите извън дисертационния труд.

6. Лично участие

Прочитането на трудовете ясно показва участието на д-р Алипиева в разработването и реализирането на методите за екстракция, хроматографски разделяния до обогатени фракции и индивидуални съединения и доказване на тяхната структура, както и за оформяне на експерименталния материал в публикации. Личи отличното владене на хроматографските методи – HPLC, газ-хроматография, LPLC, ТСХ, както и на физичните методи за структурно-химичен анализ – MS, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, едномерни и двумерни ЯМР техники. Във всеки от трудовете на д-р Алипиева се забелязват ясно дефинирани

цели към практическа реализация на получените резултати – запазване на застрашени видове, чрез въвеждане на култивирани такива или хибриди, продуциращи биологично-активните метаболити, сравнителни анализи с цел намиране на подходящите географски условия за култивиране, сравнителни анализи на растителен материал и клетъчни и коренови култури, осигуряване на обогатени фракции или индивидуални съединения за изпитване на определени биологични активности. Именно тази мултидисциплинарност на изследванията в области освен фитохимията, като ботаника, биотехнология, имунология, микробиология, фармация, често пъти и с участие на изследователи от Германия, Холандия, Италия, Балканския полуостров е причина за не особено големия брой работи в които д-р Алипиева е първи и втори автор – съответно 6 и 9. Но във всеки от публикуваните 33 научни труда нейното участие като фитохимик е безспорно и необходимо.

7. Проекти

Кандидатът д-р Алипиева е представила за периода 2004-2015 г. списък от проекти, в които е участвала - седем проекта финансирани от ФНИ, МОМН, два международни проекта финансирани по 7 РП на ЕС и чрез Българската комисия към ЮНЕСКО и един извънпланов договор с възложител Аграрен университет – Пловдив.

8. Участие в научни конференции и симпозиуми

За периода 2006-2015 г. д-р Алипиева е представила списък на участия в 11 международни конференции и симпозиуми и в една национална конференция.

9. Преподавателска дейност

Представени са протоколи и заповед за назначаване на д-р Калина Алипиева за научен консултант на две докторантури от 2007 и 2012 г. съответно към ИБЕИ-БАН и ИОХЦФ-БАН, както и за ръководител на един студентски преддипломен стаж.

10. Рецензентска дейност

Представен е списък и документация показващи, че д-р Алипиева за периода 2007-2015 г. е рецензирала 13 научни труда в авторитетни научни списания като например две рецензии за *J. of Chromatography*, две за *Phytochemistry Letters*, една за *Nat. Prod. Commun.* и др., както и шест рецензии на дипломни работи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на научно-изследователската дейност на кандидата показва, че тя е в областта на обявения конкурс, като приносите имат предимно фундаментален характер, но с ясно

дефинирана практическа насоченост. Представена е убедителна научна продукция, със статии публикувани в авторитетни научни списания, върху които са забелязани многобройни цитирания. Наукометричните показатели значително надвишават изискванията на закона и препоръчителните критерии за присъждане на академичното звание „доцент” съгласно приетия „Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИОХ с ЦФ-БАН”. Всичко това, заедно с големия обем изследователска работа по проекти, преподавателска работа като консултант и рецензент показват, че гл. ас. д-р Калина Алипиева е един изграден, компетентен изследовател в областта на химията на природните съединения.

Препоръчвам на почитаемите членове на Научното жури по конкурса и на Научния съвет към ИОХ с ЦФ – БАН да присъди на гл. ас. д-р Калина Иванова Алипиева академичната длъжност доцент.

София, 24 юни 2015 г.

Рецензент:

(доц. д-р Атанас Сиджимов)