

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ**

**СТАНОВИЩЕ**

**от проф. д-р инж. Весела Денева Кънчева  
от Институт по органична химия с Център по фитохимия - БАН**

на дисертационен труд за присъждане на научна степен **“доктор на науките”** в област на висше образование професионално направление 4.2. Химически науки научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

**Автор: проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка – Институт по органична химия с Център по фитохимия - БАН.**

**Тема: Структура и функция на медни гликопротеини, свързващи кислородни форми**

**1. Общо представяне на процедурата и дисертанта**

Със Заповед No РД-09-150/24.06.2019г. на Директора на ИОХЦФ-БАН въз основа на Решение на НС (протокол 17/20.06.2019г.) съм избрана за член на научното жури и за изготвяне на становище по конкурса.

Представеният от проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка комплект материали на електронен и хартиен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ - БАН и отговаря на критериите на ИОХЦФ-БАН за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Дисертационният труд представя обобщение на 50 научни публикации, като резултатите от научните изследвания са докладвани на 71 научни форума у нас и в чужбина. Получените резултати са от съвместни научни изследвания по линия на договори с колеги от Германия, Белгия, Италия, Украйна и Китай.

Проф. Павлинка Долашка е родена на 21.09.1954г. в с. Якимово, Михайловградска област. Завършва висше образование във ВХТИ „Проф. Асен Златаров“ в Бургас през 1980г. В ИОХЦФ-БАН работи от 1990г. Защитава дисертация за присъждане на научна и образователна степен „доктор“ през 1992г. с научен ръководител проф. д-р Николай Генев на тема: „Структурни изследвания върху протеиназа К и сродни ензими със спектрални и кинетични методи“. След това последователно работи като главен асистент (1994-2004), доцент (2004-2014) и професор от 2014г до момента. Представител е в IUPAC (международен съюз за чиста и приложна химия) и е член на Европейското дружество по пептиди. Не е представена справка за проведени специализации у нас и в чужбина.

**2. Актуалност на тематиката**

Олигозахаридите са жизнено важни вещества за организма, тъй като участват в редица биологични процеси. Най-важната им функция е като източник на енергия за клетките, участват в изграждането на клетъчните стени и са отговорни за стабилизиране структурата на протеините. Заедно с полипептидните вериги оформят т.нар. “гликопротеини“ – едни от най-разпространените протеини в природата. В дисертационния труд са изследвани два вида медни гликопротеини, **хемоцианини и супероксид дисмутази (СОД)**, които притежават сложни въглеводородни структури и участват в различни процеси с кислорода и производните му. Медните гликопротеини намират все по-голямо приложение за лечение на редица заболявания през последните години. Ензимът Cu/Zn-СОД се прилага за подобряване на антиоксидантната защита на пациенти със СПИН и ускоряване на възстановителния процес след мозъчни травми. Хемоцианините, като диагностични и антимикробни реагенти се прилагат и при лечение на инфекции или продуценти на антитела. Доказан е ефектът на редица СОД-зи и хемоцианини и при терапия на тумор на пикочния мехур, тумор на гърдата, хранопровода и др. Независимо от разработените методи за допълнително гликозилиране на СОД-зи, предимствата на природно гликозилираните СОД-ензими са неоспорими, защото не се налага допълнително гликозилиране и се избягват нежеланите странични продукти. Това доказва предимството за използване на природно гликозилирани СОД-зи при различни терапии.

### **3. Познание на проблема**

Дисертантката е използвала 441 литературни източника, за да обоснове актуалността на проблема. Оформянето на литературния обзор и анализа на публикуваните данни показват отлично познание на проблема. Разнообразието на гликопротеините в природата се свързва с различните биологични функции, които изпълняват като транспортни, имунологични, каталитични, защитни и др. Функционалните свойства на гликопротеините определят основните направления и областите на приложението им. Въпреки многобройните доказателства за терапевтичния ефект на СОД-ите и хемоцианините, приложението им е ограничено поради недостатъчно производство на подходящи препарати. Авторката правилно заключава, че предоставената информация за значението и областите на прилагане на хемоцианините и Cu/Zn-СОД-зи все още е неудовлетворителна по отношение на изискванията на пазара за по-широкото им включване в експерименталната и приложна медицина. Всичко това налага откриване и пречистване на нови Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини, както и задълбочен анализ на зависимостта между структурата и биологичното действие на новите гликопротеини. Дисертантката обръща внимание, че изясняването на ролята на олигозахаридните структури ще даде възможност да се допълни информацията за структурната организация на гликопротеините и да се установи влиянието им върху функцията. Последното има значение за разширяване на областите на приложение на медните гликопротеини Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини, свързващи различни кислородни форми.

Много добре са обосновани на тази база целите и задачите, които си поставя проф. Долашка при разработването на настоящия дисертационен труд.

#### **4. Методика на изследването**

Предложени са оригинални методи за пречистване на свързващи кислородни форми гликопротеини с един и два медни йони в активния център. Разработена е нова методика за идентифициране сложната въглехидратна структура на хемоцианините с неизвестна и частично известна структура. За много хемоцианини от вид молюска са доказани сложни четвъртични и третични структури. Поради огромните и сложни структури на тези гликопротеини, приложените утвърдени методи не дават точна информация за структурата на хемоцианините. Приложени са: многогъгло разсейване на светлина в комбинация с електроспрей йонизационна маспектрометрия, а грешката при тези измервания е по-малка от 1%, което ги прави подходящи за анализ на огромните хемоцианинови комплекси. Прилагането на подходящи термодинамични подходи дава възможност да се установи влиянието на въглехидратната структура върху стабилностните характеристики на интактната молекула и структурните субединици. Сравнителният анализ на филогенетичното дърво на хемоцианини от молюски определя осем отделни разклонения на сходни функционални единици, което показва както ранната им поява, така и произход от един прародител. Прилагането на комбиниран подход чрез капилярна електрофореза и маспектрометричен анализ го утвърждават като най-подходящ за интерпретиране на структурите на много ниски концентрации на гликани в сместа. В потвърждение на гликозилирания характер на Cu/Zn-СОД са представените данни за 3D модели на гликопротеина с програма MODELLER и публикуваната кристалографска структура. Като цяло проф. Долашка прилага различни комбинации от най-съвременни аналитични методи, което ѝ позволява да постигне поставената цел и да бъдат получени коректни отговори на поставените задачи в дисертационния труд.

#### **5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите**

През последните години клиничните изследвания доказват сериозно нарушение в оксидант/антиоксидантния баланс в процеса на онкогенезата. Това се свързва с понижено ниво на антиоксидантната защита при хора и животни с различни видове туморни образувания. Антиоксидантната защита обосновава една нова концепция в превенцията и лечението на туморни заболявания, в които важно участие имат антиоксидантите. В тази връзка темата на дисертационния труд е с голяма значимост за биохимичната и медицинска наука и практика.

Дисертационният труд представя информация за структурата и свойствата на нови свързващи кислородни форми гликопротеини, които включват един меден (n-СОД-зи) и два медни йона (хемоцианини) в активния център. Представен е задълбочен анализ на въглехидратните

структури и значението им за функцията и потенциалния терапевтичен ефект на пречистените гликопротеини от различни природни източници.

Дисертационният труд е структуриран много добре в 4 раздела, като в раздел резултати и дискусия са обособени следните глави:

- Изолиране и структурно характеризиране на Cu/Zn-СОД ензим
- Хемоцианини от вид атропода – изолиране и характеризиране
- Хемоцианини от вид молюска – изолиране и характеризиране
- Въглегидратни структури на гликопротеини
- Функция на олигозахаридните структури в кислород-свързващи медни гликопротеини
- Участие на гликаните в терапевтичния ефект на супероксиддисмитазите и хемоцианините

Научните приноси на дисертационния труд са в областта на биоорганичната химия и по-конкретно в областта на химия на протеини. Получени са нови данни за структурата и биологичната активност на важна група медни, реагиращи с кислорода гликопротеини.

Основните приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация са следните:

1. Получени са нови природно-гликолизирани протеини, които взаимодействат с кислорода – от една страна от гъбични щамове и от дрожди като са получени ензими с един меден йон като активен център на супероксиддисмутази и от друга – хемоцианини с два медни йона в активния център. Представена е информация за сложната им въглегидратна структура и за физико-химичните им свойства.
2. За идентифициране на сложната въглегидратна структура на хемоцианините с неизвестна или частично известна структура е разработена високоефективна методика. За първи път е определена пълната въглегидратна структура на хемоцианини от молуска, което представлява нов клас N-гликани за хемоцианините.
3. За първи път са представени нуклеотидните аминокиселинни последователности и потенциални центрове на гликолизирани на изоморфи на хемоцианините от тип молуска. За първи път се съобщава за участие на гликаните при сформирани на третична структура на хемоцианина.
4. Чрез прилагане на термодинамични подходи за оценка на стабилността на протеина е установено влиянието на въглегидратната структура върху стабилитетните характеристики на интактната молекула и структурните единици.
5. За първи път е представено участието на хемоцианини от вид Mollusca в защитната функция на организма, като осигуряват първоначална защита срещу инфекциозни патогени. Субединица  $\beta$ s-НаН е доказана, като много перспективна за включване във фармацевтични препарати срещу по-устойчиви инфекции *Staphylococcus*. 80
6. Получени са нови доказателства за по-силно изразен инхибиращ ефект на функционалните единици срещу репликацията на вируси, туморни клетъчни линии и бактерии, което вероятно е свързано с неговите специфични олигозахаридни структури.
7. За първи път е предоставена протеомна карта за цитостатичното действие на хемоцианина от *H. lisogit* върху човешката клетъчна линия CAL-29. Изказано е предположение за специфичната роля на олигозахаридните структури на протеините за тяхното биологично действие срещу рак на пикочния мехур.

Получени са и редица приноси с потвърдителен характер.

Приносите с приложен характер са следните:

Предложени са лабораторни технологии, както и пречистени Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини от различни източници, които могат да се използват в лечението на вирусни, бактериални и туморни заболявания.

Създадена е генна банка (ДНК и РНК) и база от структури на гликани, които може да послужат за бъдещи изследвания по тези тематика.

Приносите с методичен характер включват разработването на нови методи и подходи, споменати при използваната методика.

#### **6. Преценка на публикациите и личния принос на дисертанта**

В конкурса проф. Долашка участва общо с 50 работи, 20 от които са с ранг Q1, 18 - с ранг Q2, 8 с ранг Q3 и 2 с ранг Q4. Големият брой работи (38 общо), публикувани в реномирани списания с висок ранг Q1 и Q2 показват високо качество на нейната научна работа. Тъй като научните разработки са резултат от международно сътрудничество, повечето работи са с повече от 2ма автори (36), като проф. П. Долашка е първи автор в 22 от тях.

Основните научни и научно-приложни резултати от дисертационния труд са в резултат на ръководството на проф. Долашка на българския екип в общо 21 международни проекта, от които – 6 с НАТО, 3 със СЗО (Белгия), 3 с DFG и 1 с ДААД (Германия), и 2 с CNR (Италия), както и на 21 български проекта. Това я характеризира като учен, който работи в различни интердисциплинарни международни проекти с голям успех.

Забелязани са общо 527 цитата, което също е висок атестат за качеството на научните резултати на дисертантката, намиращи отражение в трудовете на други автори. С най-голям брой цитати са работите с номера 24 (37 цитата), 8 (32 цитата), 17 и 31 (с по 26 цитата).

Резултатите от научните изследвания на проф. Долашка успешно са внедрени в практиката. Представен е списък с патенти и полезни модели, който е впечатляващ и съдържа общо 4 патента и 2 полезни модела като във всички проф. Долашка е водещ учен.

Представен е списък с множество награди и отличия на колектива под ръководството на проф. Долашка, което е много висок атестат за нейната научна и научно-приложна дейност. Колективът под нейно ръководство има множество златни и сребърни отличия и две най-високи отличия- Наградата „Питагор“.

#### **7. Автореферат**

Авторефератът е представен отлично като отразява основните резултати, постигнати в дисертацията. Много добре са балансирани текст с илюстративен материал. Представен е цветен илюстративен материал, което значително улеснява читателя. Авторефератът е представен на български и на английски езици.

#### **8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати**

Познавам проф. Долашка от постъпването ѝ в ИОХЦФ-БАН и имам отлични впечатления от нея като учен и колега. Нейната упоритост и всеотдайност в работата се доказват с отличните резултати. В България не е лесно да се внедри полезен продукт и аз искрено се възхищавам на ентузиазма, упоритостта и работоспособността на проф. Долашка в осъществяването и реализирането на нейните резултати. Тя е ерудирен учен с голям опит и сама ще намери начин за реализация и на бъдещи резултати от научните изследвания. В това отношение проф. Долашка служи за пример на колегите как от един научен резултат може да се стигне до търговски продукт и то не само един.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд съдържа голям брой научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИОХЦФ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка чрез представения дисертационен труд демонстрира задълбочени теоретични познания и професионални умения за провеждане на научните изследвания с получаване на оригинални и значими научни приноси в професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“.



Въз основа на изложеното по-горе, както и на отличните ми лични впечатления от дисертантката, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен ‘доктор на науките** на проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка в професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“.

01.08. 2019 г.

София

**Изготвил становището:** .....

/Проф. д-р инж. Весела Кънчева/

BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES  
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY WITH THE CENTER OF PHYTOCHEMISTRY  
**OPINION**

**by Prof. Vessela Deneva Kancheva, PhD**

**from the Institute of Organic Chemistry with the Center of Phytochemistry - BAS**

*of the dissertation for awarding the degree of Doctor of Science in higher education area 4.2. Chemical Sciences, professional field "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances"*

**Author: Prof. Dr. Pavlinka Alexandrova Dolashka - Institute of Organic Chemistry with the Center for Phytochemistry - BAS.**

**Topic: Structure and function of copper glycoproteins, binding oxygen forms**

**1. General presentation of the procedure and dissertation**

*By Order No. RD-09-150/24.06.2019 of the Director of IOCCP-BAS on the basis of a Decision of the National Assembly (Protocol 17 / 20.06.2019) I was elected a member of the scientific jury and for preparing an opinion on the competition.*

*The set of electronic and paper materials presented by Prof. Pavlinka Alexandrova Dolashka is in accordance with the Rules of development of the academic staff of IOCCP - BAS and meets the criteria of IOCCP - BAS for obtaining the degree of Doctor of Science. The dissertation presents a summary of 50 scientific publications, and the results were reported at 71 scientific forums in Bulgaria and abroad. The results are from joint research contracts with colleagues from Germany, Belgium, Italy, Ukraine and China.*

*Prof. Pavlinka Dolashka was born on 21.09.1954. in Yakimovo village, Mikhailovgrad district. Graduated from the High Institute of Chemical Technology "Prof. Assen Zlatarov" in Bourgas in 1980. She has been working at IOCCP-BAS since 1990. She defended his dissertation for the PhD degree in 1992 with supervisor Prof. DSc Nikolay Genov on the topic: "Structural studies on proteinase K and related enzymes by spectral and kinetic methods". Prof. Dolashka has subsequently worked at IOCCP-BAS as Assistant Professor (1994-2004), Associated Professor (2004-2014) and Full Professor from 2014 until now. She is a representative at IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry) and a member of the European Society for Peptides. There is no information about the specializations conducted in Bulgaria and abroad.*

**2. Relevance of the topic**

*Oligosaccharides are vital substances for the body as they participate in a number of biological processes. Their most important function is as a source of energy for the cells, they are involved in the construction of the cell walls and are responsible for stabilizing the structure of proteins. Together with the polypeptide chains, they form the so-called. "glycoproteins" - some of the most abundant proteins in nature. Two types of copper*

glycoproteins, hemocyanins and superoxide dismutases (SOD), which have complex carbohydrate structures and are involved in different processes with oxygen and its derivatives, have been investigated in the dissertation. Copper glycoproteins have been increasingly used to treat a number of diseases in recent years. The Cu/Zn-SOD enzyme is used to improve the antioxidant protection of AIDS patients and accelerate the recovery process after brain injury. Hemocyanins, such as diagnostic and antimicrobial reagents, are also used in the treatment of infections or antibody producers. The effect of a number of SODs and hemocyanins on the treatment of bladder tumor, breast tumor, esophagus and others has been proven. Regardless of the methods for additional glycosylation of SODs developed, the advantages of naturally occurring glycosylated SOD-enzymes are indisputable, since no additional glycosylation is required and side by-products are avoided. This proves the advantage of using naturally glycosylated SODs in various therapies.

### **3. Knowledge of the problem**

Prof. Dolashka used 441 literature sources to justify the relevance of the problem. The design of the literature review and the analysis of published data show excellent knowledge of the problem. The diversity of glycoproteins in nature is associated with the various biological functions that they perform as transport, immunological, catalytic, protective, etc. The functional properties of glycoproteins determine the main directions and areas of their application. Despite the abundant evidence for the therapeutic effect of SODs and hemocyanins, their use is limited due to insufficient production of appropriate preparations. The author correctly concludes that the information provided on the importance and fields of application of hemocyanins and Cu/Zn-SOD is still unsatisfactory with respect to market requirements for their broader inclusion in experimental and applied medicine. All this requires the discovery and purification of new Cu/Zn-SODs and hemocyanins, as well as a thorough analysis of the relationship between the structure and biological action of the new glycoproteins. The dissertation notes that clarifying the role of oligosaccharide structures will allow to supplement information on the structural organization of glycoproteins and to determine their influence on function. The latter is important for expanding the areas of application of copper glycoproteins Cu/Zn-SOD and hemocyanins linking different oxygen forms.

On this basis, the goals and tasks set by Professor Dolashka in developing this dissertation are very well grounded.

### **4. Research methodology**

Original methods for purifying oxygen-binding glycoproteins with one and two copper ions in the active center are proposed. A new methodology has been developed to identify the complex carbohydrate structure of hemocyanins with an unknown and partially known structure. Many Mollusca hemocyanins have proven complex with quaternary and tertiary structures. Due to the enormous and complex structures of these glycoproteins, the established methods employed do not provide accurate information on the structure of hemocyanins. Polygonal light scattering in combination with electrospray ionization mass spectrometry were applied, and the error in these measurements was less than 1%, making them suitable for the analysis of huge hemocyanins complexes. Applying appropriate thermodynamic approaches makes it possible to determine the influence of the carbohydrate structure on the stability characteristics of the intact molecule and structural subunits. The comparative analysis of the phylogenetic tree of Mollusca hemocyanins identifies eight distinct branches of similar functional units, showing both their early appearance and origin from one ancestor. The use of a combined approach by capillary electrophoresis and mass

spectrometric analysis confirmed it as the most suitable for interpreting the structures of very low concentrations of glycans in the mixture. In support of the glycosylated nature of Cu/Zn-SOD, data on 3D models of the glycoprotein with MODELLER program and the published crystallographic structure are presented. In general, Professor Dolashka applied different combinations of the most modern analytical methods, which allows her to achieve the set goal and to receive correct answers to the set tasks in the dissertation.

## **5. Characterization and evaluation of dissertation work and contributions**

In recent years, clinical studies have demonstrated a serious disturbance in the oxidant / antioxidant balance in the process of oncogenesis. This is associated with reduced levels of antioxidant protection in humans and animals with various types of tumor formation. Antioxidant protection justifies a new concept in the prevention and treatment of tumor diseases, in which antioxidants play an important role. In this regard, the topic of dissertation work is of great importance for biochemical and medical science and practice.

The dissertation presents information on the structure and properties of novel oxygen-binding glycoproteins, which include one copper (n-SODs) and two copper ions (hemocyanins) in the active center. An in-depth analysis of carbohydrate structures and their significance for the function and potential therapeutic effect of purified glycoproteins from various natural sources is presented.

The dissertation is structured very well in 4 sections, with the following chapters in the results and discussion section:

- Isolation and structural characterization of the Cu / Zn-SOD enzyme
- Athropod-type hemocyanins - isolation and characterization
- Shellfish hemocyanins - isolation and characterization
- Carbohydrate structures of glycoproteins
- Function of oligosaccharide structures in oxygen-binding copper glycoproteins
- Participation of glycans in the therapeutic effect of superoxide dismutase and hemocyanins

The scientific contributions of the dissertation are in the field of bioorganic chemistry and in particular in the field of protein chemistry. New data on the structure and biological activity of an important group of oxygen-reacting glycoproteins have been obtained.

The main contributions containing new and original information for science are the following:

1. New naturally-glycosylated proteins are produced that interact with oxygen - on the one hand, by fungal strains and yeast, producing enzymes with one copper ion as the active center of superoxide dismutase and on the other - hemocyanins with two copper ions in the active center. Information is given about their complex carbohydrate structure and their physicochemical properties.

2. A highly efficient technique has been developed to identify the complex carbohydrate structure of hemocyanins with unknown or partially known structure. For the first time, the complete carbohydrate structure of Mollusca hemocyanins has been determined, representing a new class of N-glycans for hemocyanins.



3. The nucleotide amino acid sequences and potential centers of glycosylation of isomorphs of Mollusca type hemocyanins are presented for the first time. New data about the involvement of glycans in the formation of the tertiary structure of hemocyanins has been reported.

4. The influence of the carbohydrate structure on the stability characteristics of the intact molecule and the structural units has been established by applying thermodynamic approaches for evaluating the stability of the protein.

5. New results about the involvement of Mollusca hemocyanins in the protective function of the body are presented, providing initial protection against infectious pathogens. The  $\beta$ c-HaH subunit has been proven to be very promising for incorporation into pharmaceuticals against more resistant *Staphylococcus* infections.

6. New evidence has been obtained of a more pronounced inhibitory effect of functional units against the replication of viruses, tumor cell lines and bacteria, possibly related to its specific oligosaccharide structures.

7. A proteomic map for the cytostatic action of *H. lucorum* hemocyanins on human CAL-29 cell line was first provided. The specific role of oligosaccharide structures of proteins for their biological action against bladder cancer has been suggested.

A number of confirmatory contributions were also received.

Contributions for the practice are as follows:

Laboratory technologies are proposed as well as purified Cu/Zn-SODs and hemocyanins from various sources that can be used in the treatment of viral, bacterial and tumor diseases.

A gene bank (DNA and RNA) and a base of glycan structures have been created that can serve as future research on these topics.

Methodological contributions include the development of new methods and approaches mentioned in the methodology used.

## **6. Evaluation of publications and personal contribution of the dissertation**

Prof. Dolashka competes in total with 50 scientific papers, 20 of which are ranked Q1, 18 - ranked Q2, 8 ranked Q3 and 2 ranked Q4. The large number of papers (38 in total) published in high-ranking scientific journals Q1 and Q2 show the high quality of her scientific work. Since they are the results of international cooperation, most of the works are with more than 2 authors (36), with prof. P. Dolashka being the first author in 22 of them.

The main scientific and applied results of the dissertation work are the result of the leadership of Prof. Dolashka of the Bulgarian team in a total of 21 international projects, of which 6 with NATO, 3 with WHO (Belgium), 3 with DFG and 1 with DAAD ( Germany), and 2 with CNR (Italy), as well as 21 Bulgarian projects. This characterizes her as a scientist who has worked in various interdisciplinary international projects with great success.

A total of 527 citations were noted, which is also a high certificate for the quality of the dissertation's scientific results, which are reflected in the works of other authors. The largest number of quotes are scientific papers with numbers 24 (37 quotes), 8 (32 quotes), 17 and 31 (with 26 quotes each).

*The results of Prof. Dolashka's research have been successfully applied to the practice. A list of patents and utility models is presented, which is impressive and contains a total of 4 patents and 2 utility models, as in all Prof. Dolashka is a leading scientist.*

*A list of numerous awards and distinctions of the team under the leadership of Prof. Dolashka is presented, which is a very high certificate for her scientific and applied scientific activity. The team under her leadership has many gold and silver honors and two highest honors - the Pythagor Awards.*

## **7. Abstract**

*The abstract is well presented, reflecting the main results achieved in the dissertation with very well balanced text with illustrative material. Color illustrative material is presented, which greatly facilitates the reader. The abstract is presented in Bulgarian and English.*

## **8. Recommendations for future use of dissertation contributions and results**

*I have known Prof. Dolashka since her admission to IOCCP-BAS, and I have excellent impressions of her as a scientist and colleague. Her perseverance and dedication to work is proven by her excellent results. It is not easy to implement a useful product in Bulgaria and I sincerely admire the enthusiasm, persistence and efficiency of Prof. Dolashka in the implementation and realization of the scientific results. She is an erudite scientist with extensive experience and will find her own way of realizing future research results as well. In this regard, Professor Dolashka serves as an example to colleagues of how a scientific product can lead to a commercial product, and not just one.*

## **CONCLUSION**

*The dissertation contains a large number of scientific and applied results, which make an original contribution to science and meet all the requirements of the Law for the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria of BAS. The submitted materials and the dissertation results fully comply with the specific requirements of the IOCCP-BAS Regulations.*

*Prof. Pavlinka Alexandrova Dolashka, PhD, through her dissertation presented, demonstrates in-depth theoretical knowledge and professional skills for conducting scientific research with obtaining original and significant scientific contributions in a professional field 4.2. Chemical Sciences, scientific specialty "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances".*

*Based on the above, as well as my excellent personal impressions of Prof. Dolashka, I am convinced of my positive assessment of the research presented by the dissertation reviewed above, abstract, results achieved and contributions, and propose to the venerable scientific jury scientific degree "Doctor of Sciences" in Prof. Dr. Pavlinka Alexandrova Dolashka in a professional field 4.2. Chemical Sciences, scientific specialty "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances".*

01.08. 2019

Sofia

*Drafted the opinion:  
/ Prof. Vessela Kancheva, PhD /*