

РЕЦЕНЗИЯ

от дхн Георги Янков Папанов – професор, катедра Органична химия,
Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“, пенсионер,

на материалите представени от Катя Христова Николова-Маламова, редовен докторант към катедра „Биохимия и микробиология“ Биологически Факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“, за присъждане на образователната и научна степен (ОНС) 'доктор', на тема „Дитерпени от *Scutellaria galericulata* и биологичната им активност“, в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Биохимия, с научен ръководител доц. д-р Петко Иванов Бозов от Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“.

Със заповед № Р33-2140 от 30. 05. 2019 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури относно процедура за защита на настоящия дисертационен труд.

Представеният от Катя Христова Николова-Маламова комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ. Към приложенията са включени дисертационен труд, автореферат, 4 публикации, списък на забелязани цитирания на публикации свързани с дисертационния труд, 4 броя сертификати за участие в научни конференции с материали от дисертационния труд.

1. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем в научно и научно-приложно отношение

Фитохимичните изследвания са едно от научните направления в катедра Органична химия на ПУ. Основите на това научно направление са положени от проф. дхн Никола Моллов. Разработени са три дисертации за получаване на

ОНС 'доктор' и две за 'доктор на науките'. И сега продължават изследванията в катедрата и са защитени още дисертации за получаване на ОНС 'доктор'.

През 1991 г. започва фитохимичното изследване на видовете от род *Scutellaria*. Те по-нататък успешно са продължени от доц. д-р Петко Иванов Бозов, който се хабилитира в катедрата по Биохимия и микробиология на Биологическия факултет. Той продължава научното сътрудничество с Химическия факултет – катедра Аналитична химия.

Фитохимичното изучаване на растенията е важно както в научно, така и от научно-приложно отношение. Тези проучвания са от голямо значение за използването на богатата и разнообразна българска флора. В резултат на изследванията се изолират и идентифицират голям брой природни органични съединения, част от които са нови за науката вещества. С последните се провеждат прецизни спектрални, химични и биологични изследвания, в резултат на които се доказва структурата, стереохимията и биологичната активност на веществата. Фитохимичните резултати се публикуват в престижни български и международни списания.

В някои страни се извършва култивиране на видове от различни семейства с оглед лабораторно, полупромишлено и промишлено извличане на биологично активните съединения от тях. Почвено-климатичните условия у нас са много благоприятни за култивиране на охарактеризирани видове с доказана биологична активност. В това отношение научни колективи от двата факултета могат да допринесат много в такова направление.

2. Степен на познаване на състоянието на проблема и на литературните източници

Във въведението (2 стр.) е изтъкнато, че род *Scutellaria* принадлежи към семейство Lamiaceae, чиито видове са разпространени в целия свят, с изключение на южна Африка. Подчертано е, че растенията са намерили широко приложение в народната медицина още от дълбока древност. След 2000 г. с представители на *Scutellaria* са проведени фармакологични изследвания, ко-

ито потвърждават многообразната биологична активност на видовете от този род. Отбелязано, е че тази активност се дължи на съдържащите се в тях флавоноиди и *нео*-клероданови дитерпеноиди, последните от които са обект на настоящата дисертационна работа.

Литературният обзор представен на 28 стр. включва: състав, строеж и класификация на терпените, бицикличните дитерпеноиди и тяхното наименование, биосинтез на *нео*-клеродановия скелет, представители, структурни особености, както и разпространение на видовете в България и чужбина, и идентифицираните в тях *нео*-клеродани.

В обзора е включена една таблица, съдържаща 14 типа скелети на циклични дитерпеноиди, една схема от 5 структури на биосинтез на дитерпеноиди с лабданов, *нео*-клероданов и *нор*-клероданов скелет. В него има три подструктури на тетра- и хексахидро фуурофуранова системи и лактолов пръстен, както и 7 характерни фрагменти в C-11-C-16 подструктурата на клеродановия скелет. Обзорът съдържа и 3 структури, показващи обичайния начин на свързване между две молекули изопрен до ацикличен монотерпен (оцимен). В него е дадена една таблица с IC₅₀ стойности за 7 съединения, подобни на изследваните, срещу 5 туморни клетъчни линии.

Обзорът е на съвременно, критично и изчерпателно ниво. От него се вижда, че изследванията на видовете от този род се увеличава, което е естествено, тъй като се изолират нови биологичноактивни органични съединения, на които се определя структурата, стереохимията и биологичната им активност.

Изолирането на *нео*-клероданови дитерпеноиди от род *Scutellaria* започва през 1987 година с изследването на *Scutellaria rivularis*, растение използвано в Тайланд и Япония за третиране на тумори, хепатит и чернодробна цироза. През първите 15 г. за видовете от този род са отпечатани 49 научни съобщения, през следващите 15 г. те са над 100.

Би могло да се препоръча на докторанта да преработи този полезен обзор, в който да отпаднат някои подробности и неточности и в удобна форма да го публикува.

Въз основа на направения анализ е определена целта на дисертационния труд и четирите задачи за реализирането ѝ.

3. Научни резултати от разработката на дисертационния труд

Разделът „Резултати и обсъждане“ включва 45 стр., 32 фиг. и 7 таблици. В него са разгледани извличането на сместа от дитерпеноиди, наречена горчива фракция и нейното хроматографско разделяне. В резултат са отделени 5 фракции. От втората фракция чрез хроматографиране са отделени две подфракции, от които при допълнително хроматографиране и прекристализация са изолирани две вещества с различна R_f стойност. Те са прецизно анализирани с помощта на съвременни физични методи за анализ (мас-спектрометрия с висока разделителна способност, ИЧС, ^1H - и ^{13}C ЯМР, 2D ЯМР техники). В резултат е доказано, че едно от веществата е идентично с единия от изомерите на епимерната смес скуталтисин В + С (1 : 1), изолирана по-рано от Бозов и съавтори от *Scutellaria altissima*.

Въз основа на публикуваните данни за епимерите и тези получени за изолираното чисто вещество е доказано, че то е идентично със скуталтисин В. Имайки предвид, че компонентите на изолираната по-рано епимерна смес са в съотношение 1 : 1, е извършено щателно анализиране на изолирания скуталтисин В с помощта на двумерна спектроскопия на ЯМР, инверсна ^1H - ^{13}C корелация и такава през повече от една връзка, както и ^1H - ^1H COSY двумерен ефект на Оверхаузер. В резултат са корегирани стойностите за С-7, С-9 и С-12, с което са отнесени коректно всички сигнали във ^{13}C ЯМР спектрите и на двата епимера. В това изследване Николова-Маламова изолира за първи път скуталтисин В в чист вид. Той е и за първи път доказан в *Scutellaria galericulata*.

Второто изолирано вещество, което при ТСХ анализ, също се наблюдава като „чист“ продукт, е прецизно анализирано маспектрометрично, с ИЧС и ^1H - ^{13}C инверсна корелация през повече от една връзка, в резултат на което се установява, че това е неделима епимерна смес от два клеродана в съотношение 1 : 2. Двата дитерпена са означени като скутегалерин С и скутегалерин D. Доказано е, че те имат идентичен декалинов пръстен с два известни *нео*-клеродана – скуполин Н и I, идентифицирани от испански изследователи.

Установено е, че шест въглеродни атома от страничната верига (C-11 – C-16) участват в изграждането на лактолен пръстен, сключен между C-15 и C-16. Такъв пръстен е идентифициран от японски изследователи в четири дитерпеноида, изолирани от *S. repens*.

Доказано е, че скутегалерини С и D се различават един от друг по конфигурацията на C-16. Установена е разлика в химичното отместване (δ_{C}) на C-16 в 16R и в 16S епимера, които са в съгласие с публикуваните данни от японските изследователи за скутерепинозиди A₁ – A₄. Регистрираният дву-мерен ефект на Оверхаузер напълно потвърждава доказаната стереохимия на двата епимера.

След двукратно разделяне (ПТСХ) от IV фракция е изолирано чисто вещество, което е анализирано с помощта на споменатите съвременни методи. В резултат е установено, че това е нов дитерпеноид, наречен скутегалерин E. В протонния спектър е установено далечно спин-спиново взаимодействие през 4 връзки между H-3 α и H-1 α , което се обяснява с W образната структура в този фрагмент на молекулата. Изтъкнато е, че такова взаимодействие не би могло да се осъществи, ако ОН групата при C-3 е α ориентирана. Такова взаимодействие и строеж на този фрагмент е в съгласие и с представеният на фиг. 24 Драйдинг модел на скутегалерин E.

Установено е, че ^1H - и ^{13}C ЯМР данните на новия дитерпеноид са почти идентични с тези на неоаюгапирин А, идентифициран по-рано в изследвания вид.

От същата фракция е изолирано и друго вещество, което на ТСХ се проявява като едно хомогенно петно. След щателно анализиране е установено в протонния спектър присъствието на дублиращи се, добре разграничени сигнали. Въз основа на ^1H - и ^{13}C ЯМР изследванията и тези на ^1H - ^{13}C инверсната корелация през повече от една връзка е доказано, че това е С-15 епимерна смес в съотношение 2 : 3, означена като скутегалерин F и скутегалерин G. В ^{13}C ЯМР спектъра е установено различие за С-16, а в протонния за Н-11. Тези различия са в съгласие с 15R и 5S епимерната смес скутекипрол А, изолирана и идентифицирана от Rosselly и съавтори. Конфигурацията на епимерния център се потвърждава и от двумерният ефект на Оверхаузер, който много добре и нагледно е означен на представените фигури на двата епимера.

В тази част са дадени физикохимичните показатели и спектралните данни на идентифицираните дитерпеноиди. Представени са и 21 различни спектри, въз основа на които са определени структурата и стереохимията на изолираните дитерпеноиди. В таблица 2 на стр. 137 е включен допълнителен доказателствен материал за изолираните и идентифицирани дитерпеноиди. Представени са и резултатите и дискусията върху тях от проведените биологични изпитания за антифидантна и цитотоксична активност. За антифидантна активност са тествани 11 *нео*-клеродана, а за цитотоксична 7. За тях са представени и съответните структури. Направените изводи след биологичните изпитания са коректни. На страница 178-183 са представени експерименталните резултати за цитотоксичната активност.

4. Други раздели, автореферат и обща характеристика на дисертационния труд

На 8 страници в е разгледана експерименталната част, която включва методи за изолиране, разделяне и идентифициране на биологично-активни дитерпеноиди.

В кратка и разбираема форма са описани извличането на горчивата фракция и нейното хроматографско разделяне, както и различните съвре-

менни методи и техники за доказване на структурата и стереохимията на природни органични съединения, част от които са дитерпеноидите. Дадени са методите за тестване на биологичната активност – антифидантна, антиту-морна и цитотоксична.

Подкрепям напълно изводите и приносите в дисертацията, които са в пълно съгласие с резултатите от изследванията, посочени са и научните форуми на които са представени получените резултати от научната работа.

Автореферата съдържа 35 стр., включително изводи, приноси, резюме на английски език от три страници, публикуваните 4 научни съобщения, изнесените доклади и участия с постери на международни и национални научни форуми. Отбелязано е, че до сега са забелязани 3 цитата за публикуваните научни съобщения.

Авторефератът отразява напълно резултатите от проведените научни изследвания, подробно описани в дисертационната работа.

Успешно е изпълнена и образователната част, тъй като докторантът се е запознал с методите за извличане, разделяне, пречистване и идентифициране на дитерпеноиди с помощта на съвременни методи за анализ на природни биологично-активни вещества, част от които са дитерпеноидите.

Дисертационният труд е написан на 183 стр., които включват и три приложения: приложение № 1, 19 страници (таблица 2 съдържаща 206 структури на дитерпеноиди, изолирани от различни видове на род *Scutellaria* с наименования и литература), приложение № 2, 47 страници (допълнителен доказателствен материал за идентифицираните нови дитерпеноиди) и приложение № 3, 6 страници (експериментални резултати от тестовете на цитотоксичната активност).

Четири научни съобщения, които са основата на дисертационния труд, са изцяло по темата. Три от статиите са отпечатани в списания с ИФ, а четвъртата е цитирана в списание с ИФ. Две от научните съобщения са в международни специализирани издания: *Phytochemistry Letters* с ИФ: 1.418 и *Chemistry of Natural Compounds* с ИФ: 0.450, а третата в *Bulgarian Chemical*

Communications с IF: 0.238. Четвъртата статия е публикувана в специализирано online издание на периодичното списание, на ПУ „Паисий Хилендарски“, *Journal of Bioscience and Biotechnology* и е цитирана в списание с импакт фактор - *Journal Pharmacia Science & Research* - ИФ: 0.34.

Статията „Minor diterpenoids from *Scutellaria galericulata*“ публикувана в списанието „*Phytochemistry letters*“ е цитирана два пъти през 2017 г: във „*Phytochemistry letters*“ с ИФ 1.575 и в *Natural Product Reports* с ИФ 11.406.

Резултатите от изследванията са докладвани на:

Международни научни форуми:

1. Katia Nikolova, Petko Bozov, Thematic area 2: „Food Chemistry, Microbiology, Biotechnology and Safety“ entitled: „Isolation and identification of *Scutellaria* diterpenoids and testing on vegetable culture against Colorado larvae /*Leptinotarsa decemlineata* (Say)“ (доклад), 65th Anniversary Scientific Conference with International Participation, „Food Sciences, Equipment and Technology - 2018“, University of food Technologies (UFT) - Plovdiv: 11nt – 13th October, 2018, Plovdiv, Bulgaria;

2. Katia H. Nikolova, I. T. Stoykov and P. I. Bozov., „Responsible structural features for cytotoxic and other kinds activity of neo-clerodane diterpenes from genus *Scutellaria*“ (постер), First International Conference on Bio-antioxidants (ICBA 2017): „Natural Bio-antioxidants - as a base for new synthetic drugs and food additives/supplements“: 25 - 29 June, 2017, Sofia, Bulgaria;

3. Katia Nikolova, I. T. Stoykov and Petko Bozov, „Two new *neo*-clerodane diterpenes isolated from *Scutellaria galericulata* and cytotoxic activities of diterpenes from different *Scutellaria* genus“ (постер), 4-th Balkan Scientific Conference on Biology: 1st - 3rd November, 2017, Plovdiv, Bulgaria.

Национални научни форуми:

К. Николова и П. Бозов, „Дитерпени от *Scutellaria galericulata* и биологичната им активност“ (доклад), XVI Национална конференция по химия за

студенти и докторанти 2017, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, 17 – 19 май, гр. София, България.

8. Бележки, препоръки и въпроси

В проекта за автореферат бяха направени някои препоръки, които са приети. В експерименталната част (стр. 39, 1.1.) вместо получаване е по-добре да се напише извличане; в „резултати и обсъждане“ т. 2, изолиране вместо получаване; стр. 59 първи абзац вместо пример доказателство. На доста места се изписва въглеродните атоми и следва кои са те, например С-14, С-15 и т. н. – не е необходимо да се изписва „въглеродните атоми“. На някои места, например стр. 64 последен абзац, не е необходимо да се пише протон, след като е означен Н-16 α , вместо двата Н-12 атома, двата Н-12 протона. На стр. 73 първи абзац вместо отразен представен. На стр. 78, 3.1. да се добави „физико-химични“, тъй като има такива данни. На стр. 3 и 85 не е отбелязано в кой институт на БАН. Страница 92, ред 4 (от долу) вместо реакции на разлагане настъпили промени. Страница 93, т.5 последен ред да се прибави антифидантна. Страница 94, т.5 последен ред след *Scutellaria coleifolia* в скоби да се напише от коя страна е растението.

Въпроси към докторанта:

1. В изложението използвате понятията терпени и терпеноиди. Моля, обяснете разликата между тях.
2. Каква е ролята на дитерпеноидите за растенията, в които се синтезират.
3. Какво представлява J константата и може ли нейните стойности да се използват при идентифициране на изомери и епимери?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В дисертацията се съдържат научни и научно-приложни резултати, коректно отразени в изводите и приносите на дисертационния труд и автореферата. Цялостно са охарактеризирани нови биологично-активни вещества, които са оригинален научен принос в химията на природните органични съ-

единения. Рецензията на дисертационен труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за приложението му, както и на съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“ и специфичните наукометрични изисквания на Биологически Факултет за получаване на образователната и научна степен „доктор“.

След запознаване и анализ на представената дисертационна работа, автореферата, четирите научни съобщения, докладваните научни резултати на международни и национални форуми, намирам за основателно да дам своята положителна оценка на разработения труд и да препоръчам на почитаемото научно жури да присъди на Катя Христова Николова-Маламова образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Биохимия.

18.06.2019 г.

Изготвил рецензията:.....

/проф. дхн Георги Папанов/