

РЕЦЕНЗИЯ

от

д-рн Георги Янков Папанов, професор, катедра „Органична химия”, Химически факултет, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски”, пенсионер,

на дисертационен труд за присъждане на научната степен “доктор на науките“

в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление: 4.2. Химически науки
Научна специалност: Органична химия

Автор: доц. д-р Петко Иванов Бозов от катедра „Биохимия и микробиология” към Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски”.

Тема: „Клероданови дитерпеноиди от видове на семейство Lamiaceae“.

I. ПРЕДМЕТ НА РЕЦЕНЗИРАНЕ

Със заповед № Р33-902 от 11. 03. 2021 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски” (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Клероданови дитерпеноиди от видове на семейство Lamiaceae“ за придобиване на научната степен ‘доктор на науките’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия). Автор на дисертационния труд е доц. д-р Петко Иванов Бозов - катедра „Биохимия и микробиология” към Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски”.

Представеният от доц. д-р Петко Иванов Бозов комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл.45 (4) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- копие от диплома за образователната и научна степен „доктор”;

- протоколи от катедрени съвети, свързани с откриване на процедурата и с предварителното обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за изпълнение на минималните национални изисквания;

I.1. ОБЩО ПРЕДСТАВЯНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ МАТЕРИАЛИ И ДОКУМЕНТИ НА ДОЦ. Д-Р ПЕТКО ИВАНОВ БОЗОВ

Представените от кандидата документи и материали са добре оформени и подредени. Дисертантът е приложил 28 броя научни трудове по темата на дисертационния труд не участвали в процедурата за придобиване на ОНС „доктор“. Осемнадесет от научните публикации са в научни издания, реферирани и индексирани в световно-известни бази данни с научна информация. Една статия е цитирана в научно издание, реферирано и индексирано в световно-известни бази данни с научна информация. Девет от публикациите са в реферирани издания, а една е в пълен текст в сборник от конференция. Седемнадесет научни публикации са извън представените в процедури за придобиване на ОНС „доктор“ и за заемане на академичната длъжност „доцент“. От тях, 11 публикации са в научни издания, реферирани и индексирани в световно-известни бази данни с научна информация. Всички статии са изключително добре оформени и представени.

I.2. КРАТКО ПРЕДСТАВЯНЕ НА КАНДИДАТА ЗА НАУЧНАТА СТЕПЕН „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“

Доц. д-р Бозов завършва ПУ „П. Хилендарски“ през 1986г. с квалификация „химик, учител по химия“ с втора специалност „физика“. Работи като химик, контролиращ качеството на етеричните масла в НИРЕЛК „Българска роза“ град Казанлък, а от 1989г. е редовен докторант в ПУ, катедра Органична химия под ръководството на мен и доц. д-р

Петър Малаков. През 1994 г. успешно защитава ОНС „доктор“ на тема „Ди- и тритерпеноиди в представители от семейство Lamiaceae и биологичната им активност” в специализирания научен съвет по „Органична химия и органични технологии” на ВАК. След това работи в ОУ „Гео Милев“ и ВГ „Хр. Смирненски” като учител по химия и английски език и хоноруван преподавател по Обща и органична химия при Медицинския университет – Пловдив. От 2010 г. до момента е на трудов договор в ПУ, Биологически факултет.

Завършил е курс „Работа в мултиетническа среда”, както и „Базови и специфични компютърни умения на учителя” към Националния педагогически център на Министерството на образованието и науката (МОН). Член е на съюза на учените в България и на Регионалния съюз на химиците към НТС – Пловдив, както и на Читалищно настоятелство при читалище „Христо Ботев”, гр. Пловдив.

Познавам доц. Бозов още като студент, след това като дипломант и докторант. Той е изключително работлив, находчив и амбициозен научен работник и преподавател, прецизен в работата си изследовател, който непрекъснато изучава и усвоява съвременните методи за извличане, разделяне, химично и спектрално охарактеризиране и идентифициране на структурата и стереохимията на сложни органични химични съединения. Доц. д-р Бозов успя не само да пренесе фитохимичните изследвания в областта на дитерпеноидите от Химически факултет в Биологическия факултет на Пловдивския университет, но и да ги развие на едно по-високо равнище, от което се роди настоящият трети по ред дисертационен труд за придобиване на научната степен “доктор на науките”.

I.3. СТРУКТУРА И СЪДЪРЖАНИЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Дисертационният труд съдържа 289 страници, които включват:

- | | |
|--|---------------|
| - съдържание и използвани съкращения | - 4 страници |
| - въведение | - 3 страници |
| - литературен обзор (първа глава) | - 32 страници |
| - цел и задачи на дисертационния труд | - 1 страница |
| - материали и методи на изследване (втора глава) | - 12 страници |

- резултати и обсъждане (трета глава) - 111 страници
- изводи и приноси - 6 страници
- цитирана литература - 16 страници
- приложения (1-23) - 91 страници
- научни трудове по темата на дисертационния труд, не участвали в процедурата за придобиване на ОНС „доктор“ - 12 страници

Литературният обзор включва 376 източника, от които само четири са на кирилица. Той е на съвременно, критично и изчерпателно ниво, като 28 % от публикациите са от последните 15 години. Демонстрирано е задълбочено познаване на литературата и много коректно цитиране на българските автори. Като следствие от него правилно са формулирани целта и задачите на дисертационния труд.

Надземните части от растителния материал от пет рода от сем. Lamiaceae е лично събиран от него и е нямало разминаване при определянето на вида от катедрите по Ботаника в ПУ и Аграрния университет, както и от института по Ботаника при БАН, което показва, че той много добре се е запознал с ботаническите характеристики на подбраните от него видове и тяхното вероятно нахождение.

По отношение на извличането на природните органични съединения, пречистване и разделяне до индивидуални вещества, както и тяхното физико-химично и спектрално охарактеризиране, доц. Бозов има голям практически опит и не е представлявало непреодолим проблем. Още като дипломант проявяваше голям интерес при разчитането на различните спектри, а като докторант смело боравеше с тяхното тълкуване. Той обогати много познанията си при съвместното разчитане, тълкуване и използване на различните техники при ЯМР спектроскопията и за това изказва своята благодарност на проф. дхн Пламен Пенчев и в дисертационния труд. Доц. Бозов винаги е проявявал интерес и към приложението на природните органични съединения, което се наблюдава и при тези научни изследвания.

В текста на дисертацията се съдържат 33 таблици и 137 фигури. Основната, най обемиста част на дисертацията „Резултати и обсъждане“ е структурирана в пет раздела, посветени съответно на:

- 1) Дитерпеноидите на видовете от род *Scutellaria*

От тях са изолирани общо 35 *нео*-клероданови съединения, от които 15 са нови дитерпеноиди. Те са химично и спектрално охарактеризирани, чиито структури са представени в таблица № 15. Освен дитерпеноидите в изследваните видове са идентифицирани 2 стерола, 2 иридоида и 2 клероиндицина, които са познати органични съединения.

2) Дитерпеноиди от род *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* L. и *Teucrium scordium* subsp. *scordioides* (Schreb.) Maire et Petitmengin

От горчивата фракция на *Teucrium polium* чрез колонна хроматография са елуирани четири фракции. От първата чрез ТСХ е изолирано съединение, чиито спектрални характеристики (ИЧС, ^1H , ^{13}C и DEPT ЯМР спектри, молекулен йон-пик в HR-ESIMS и изчислената обща формула) е охарактеризиран дитерпеноид с тривиално наименование поливинцин А. След анализ на снетите 2D ЯМР спектри (HSQC, COSY, HMBC и NOESY) еднозначно е определена неговата структура и стереохимия. Оказва се, че данните от протонния спектър са много близки до тези публикувани от Малаков и съавтори за ацетилираният дитерпеноид с тривиално наименование монтанин D, изолиран от *Teucrium montanum*, за който няма публикувани ^{13}C ЯМР спектрални данни. Протонните спектри за него са снети при 80, 100 и 220 MHz, а на поливинцин А при 600.13 MHz. Тези и другите спектрални данни допълват спектралната характеристика на продукта получен след ацетилиране на монтанин D.

От втората фракция чрез аналогични изследвания е доказана структурата и стереохимията на втори нов дитерпеноид поливинцин В. Неговите спектрални характеристики са много близки до тези на теополин XII, изолиран от *Teucrium polium* L. от Fiorentino и съавтори през 2011 г. Наблюдават се разлики в протонния спектър, освен това са дадени и някои допълнителни данни от ^{13}C ЯМР спектрите.

От третата фракция е изолиран и идентифициран трети нов *нео*-клеродан наречен поливинцин С. Неговата структура и стереохимия е идентифицирана чрез споменатите спектрални изследвания. И за трите нови *нео*-клеродана, освен спектралните данни от приложените спектрални изследвания, са определени и физико-химичните им показатели.

От горчивата фракция на *Teucrium scordium* при хроматографско разделяне са елуирани три съединения, които след щателни спектрални изследвания са идентифицирани като фуру клероданови дилактони с тривиални наименования б-ацетил-

теукрин F, теукрин E и 3 α -ацетокси-теуквин. Първите две съединения са получени по-рано полусинтетично от Малаков и съавтори при ацелиране на съответните хидроксилни производни, изолирани от *Teucrium hamaedris*. В изследваният нов растителен материал от друго местонахождение те са изолирани като природни дитерпеноиди, както и третото 3 α -ацетилно производно на дитерпеноида теуквин, изолиран и идентифициран от Е. Fujita (Япония). И трите дитерпеноида са идентифицирани чрез споменатите прецизни спектрални изследвания, които са представени в дисертационния труд.

3) Дитерпеноиди от род *Salvia*

От горчивата фракция на *Salvia splendens* Ker.-Gawl. При хроматографиране на колона със силикагел са елуирани четири вещества, а от надземните части на *Salvia nemorosa* L. едно вещество. В условия на кристализация от четирите елуирани вещества са получени кристални продукти, които са охарактеризирани спектрално и са определени техните физико-химични показатели. Те са идентифицирани като фуру *нео*-клерода дилактонови дитерпеноиди, които се оказват познати съединения. Прахообразното вещество изолирано от *S. nemorosa* L. след спектрално охарактеризиране е идентифицирано като склареол (лабданов тип дитерпеноид), който също е описан в литературата. Установено е, че в *S. amplexicaulis* LAM. не се съдържат дитерпеноиди.

4) Биологична активност на екстракти и на клероданови дитерпеноиди

4.1. Тестване на антифидантната активност на екстракти от видове на род *Scutellaria* и на клероданови дитерпеноиди срещу ларви на *Leptinotarsa decemlineata* Say.

Тествани са 8 екстракта от различни видове и получените резултати са представени в таблица 25. В таблица 26 са представени резултатите от тестването на 9 *нео*-клеродана. Единадесет *нео*-клероданови дитерпеноида, изолирани от *Scutellaria galericulata*, са тествани за инсект-антифидантна активност срещу ларви на *Leptinotarsa decemlineata* Say., при опити с хранене по избор. Резултатите са представени в таблица 27. Тествана е инсект-антифидантната активност на 14 *нео*-клероданови дитерпеноида изолирани от *Scutellaria altissima*. Получените резултати са дадени в таблица 28. При тези изследвания е установена разлика в активността на епимерни двойки с R и S конфигурация при C-11 и вида на заместителите при C-15 или C-19.

Тествана е антифидантната активност на 10 дитерпеноида от род *Teucrium*, Изолирани от *T. polium* и *T. scordium*. Резултатите са представени в таблица 29.

Напълно подкрепям коментара и изводите от проведените изследвания по 4.1.

4. 2. Тестване на антимикробната активност на клероданови дитерпеноиди срещу патогенни и хигиенно-индикаторни микроорганизми

Изследвана е антимикробната активност на 22 клероданови дитерпеноида (фиг. 135), изолирани от видове на род *Scutellaria*, *Salvia* и *Teucrium* от сем. Lamiaceae, срещу 19 щама, принадлежащи към 11 различни вида патогенни бактерии в хранителни продукти, както и срещу два щама дрожди, принадлежащи към видове на *Candida albicans*. Всички тествани съединения са с клероданов скелет, които условно са разделени на няколко групи в зависимост от подструктурите (А-С) в С-1 – С-10 клеродановото ядро и подструктурите (Ia, Ib, IIa, IIb, IIIb) в С-11 – С-16 страничната верига. Отбелязано е какво означават символите А, В и С, както и Ia, Ib, IIa, IIb, IIIb. В таблица 30 са дадени резултатите от антимикробната активност. Също напълно споделям коментара и изводите от проведените изследвания.

4.3. Тестване на цитотоксичната активност на *нео*-клероданови дитерпеноиди спрямо карциногенни клетки от тумори по белите дробове (H1299) и нормални клетки от пъпна връв (HUVEC)

Изследвани са 12 *нео*-клероданови дитерпеноида, чиито наименования и цифрови означения също са дадени, както и от кои видове на род *Scutellaria* са изолирани и тествани за тази активност. Съединенията са разделени в зависимост от заместители в декалиновото ядро на А и В групи, а въз основа на С-11 – С-16 подструктурите на четири групи (I - IV). В таблица 31 е представена цитотоксичната активност на 7 *нео*-клеродана срещу H1299 и HUVEC клетъчни линии. Graphpad Prism експерименталните резултати за цитотоксичната активност са дадени в приложение 22. Напълно споделям извода, който е направен.

5) Изолиране и охарактеризиране на други органични съединения

5.1. Определяне на химическия състав на етеричните масла на *Ajuga laxmanii* Benth, *Salvia amplexicaulis* Lam. и *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. Fil от сем Lamiaceae

Анализът е извършен с използване на GC и GC/MS. Изследвано е етеричното масло от двата вида (*Salvia* и *Ajuga*), за които е определен добив и влажност, качествен и

количествен състав (таблица 32). Установено е, че ацетоновият екстракт от вида от *Salvia* и *Ajuga* не съдържат ди- и тритерпеноиди.

Анализиран е химичния състав на етеричното масло от ендемичния вид *Stachys cretica* subsp. *bulgarica* Rech. Fil. При GC / MS анализа са идентифицирани количествено 20 компонента (89.20%) представени в таблица 33. В него също не са установени ди- и тритерпеноиди.

5.2. Количествено определяне на полифенолни съединения в *Scutellaria altissima*

Анализът е извършен с помощта на високоефективна течна хроматография.

Определен е качествения и количествен на 8 полифенолни съединения, структурата на които са представени на фигура 136. Установено е, че те са познати съединения.

5.3.Изолиране и охарактеризиране на стероли, клероиндицини и глюкозидно свързани иридоиди

В *Scutellaria albida* е идентифициран, с помощта на ^1H ЯМР спектър, глюкозидно свързан иридоид, който се оказва познатия иридоид каталпол.

В *Scutellaria altissima* са идентифицирани познатите β -сито и стигмастерол, както и глюкозидно свързаният иридоид – глобуларин. Веществата са охарактеризирани спектрално и данните за тях са представени в приложения 3 и 4, а структурите им на фигура 137.

От *Scutellaria hastifolia* L. са изолирани и охарактеризирани клероиндицин В и клероиндицин F, чиито спектрални данни и структури са представени в приложение 23. Клероиндицини В и F са нови съединения както за вида *Scutellaria hastifolia* L., така и за рода и за семейство Lamiaceae.

Напълно подкрепям изводите и приносите и приносите на дисертационния труд, тъй като те са в пълно съответствие с проведените фитохимични изследвания на 15 вида принадлежащи към пет рода от сем. Lamiaceae.

Авторефератът съдържа 66 страници, които са в пълно съответствие с проведените изследвания, описани и дискутирани в дисертационния труд и публикуваните 28 научни труда, в 16 от които доц. Бозов е първи автор, в 17 е кореспондиращ автор, а в три статии е самостоятелен автор. Голяма част от научните съобщения са отпечатани в специализирани научни списания с IF. Изчисленият общ IF на дисертационния труд е 14.921. На международни научни форуми по темата на дисертационния труд има 5 участия, а на национални – 7.

До сега научните трудове свързани с дисертационния труд, в които участва доц. д-р Бозов са цитирани 141 пъти от други автори, от които 76 не са използвани в други процедури.

БЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ

На страница 107 в дисертацията е написано таблица 18, вместо таблица 15, на страница 144 е цитирано таблица 27, вместо таблица 24, а на страница 139 е написано страница 19, вместо страница 24.

1. Известно е, че в различните родове от сем. *Lamiaceae* има голям брой видове. В кой от родовете може да се предположи, че се съдържат нови, не описани органични съединения?

2. Ще продължите ли научните изследвания на видовете от род *Teucrium* и род *Scutellaria*? Имате ли някакви планове относно култивирането на български или чужди видове, в които има природни органични съединения (дитерпеноиди, полифеноли) с доказана биологична активност, с оглед на приложението им с лечебни цели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рецензирания дисертационен труд има неоспорим научен принос, тъй като се съдържат пълни научни данни за 22 нови дитерпеноида: два с 19-*нор*-клероданов скелет и 20 с *нео*-клероданов скелет. Определени са техните физико-химични показатели, а структурата и стереохимията е доказана със спектрални изследвания (ИЧ, ^1H - и ^{13}C ЯМР, DEPT 135, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC, NOE, NOESY) и Мас-спектрометрия, данните за които са представени в дисертацията и публикуваните научни трудове.

Тези изследвания имат голям научен принос в областта на дитерпеноидите, които са ценни природни биологично-активни органични съединения.

Проведените изследвания, свързани с биологичната активност на поредица екстракти и индивидуални вещества (тестване на цитотоксичност, антифидантна и антимикробна активност) имат практическа насоченост и стойност.

Рецензираният дисертационен труд по обем и качество отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в България, Правилника за

приложението му, както и на съответния правилник на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и на специфичните изисквания на Биологическия факултет за придобиване на научната степен „доктор на науките“.

Намирам за основателно да дам положителната си оценка на дисертационния труд и да препоръчам на Почитаемото научно жури да присъди на доц. д-р Петко Иванов Бозов научната степен „доктор на науките“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия).

09. IV. 2021 г.
гр. Пловдив

изготвил рецензията:.....
/проф. дхн Георги Папанов/