

## РЕЦЕНЗИЯ

за дисертационния труд на **Драгомир Николов Динчев** на тема “**Химично изследване на стероидни сапонини и флавоноиди *Tribulus terrestris* L.**”, представен за присъждане на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност “Химия на природните и физиологичноактивни вещества”

**Рецензент:** проф. дхн Вася Стефанова Банкова, Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН

Дисертационният труд на г-н Динчев е посветен на химични изследвания на основните биологично активни вещества в лечебното растение *Tribulus terrestris* L. (бабини зъби, трабузан), добило популярност през последните години. Това растение е широко използвано в традиционната индийска и китайска медицина, както и по нашите земи, за лечение на различни заболявания. На негова основа са създадени няколко сполучливи фитопрепарата и растителни добавки, произвеждани от български фирми, включително бестселъра на Софарма «Трибестан». Ето защо стопанското му значение е съществено. Това прави темата на настоящия дисертационен труд важна и актуална и в научно, и в практическо отношение.

Материалът в дисертацията е подреден по класическата схема. Литературният обзор обхваща 53 страници, като в него са цитирани над 350 литературни източника, почти половината от които са публикувани в последните 10 години. В обзора са представени систематизирани и подредени в табличен вид всички намерени в бабините зъби стероидни сапонини, чийто брой е удивително голям – 133. Разгледани са методите за тяхното изолиране, структурно охарактеризиране и качествен и количествен анализ в растителен материал, както и тяхната биологична активност. Аналогични литературни данни са представени и за значително по-малобройните флавоноиди във вида. Обзорът разкрива отлично и детайлно познаване на литературата, но в него до известна степен липсва критичната оценка на публикуваните данни като

отправна точка за изследванията в дисертационния труд. Това е донякъде разбираемо, тъй като експерименталната работа по тази дисертация е приключила преди 7-8 години, и междуременно са се натрупали нови знания за обекта, включително и породени от резултатите, постигнати и публикувани от дисертанта.

Частта «Резултати и обсъждане» започва – малко неочаквано - с глава «Подходи и методи». Тук не би трябвало да се разглеждат методите, а по-скоро да се обясни и мотивира изборът именно на конкретните използвани методи, ако и доколкото те с нещо се различават от стандартните подходи на фитохимичен анализ.

Собствените изследвания включват както изолиране и структурно охарактеризиране на индивидуални компоненти на суровия сапонинов екстракт, така и разработването на процедури за химично профилиране на екстракти и прилагането им за анализ на многобройни проби с различен географски произход.

При изолирането на индивидуалните стероидни сапонини са използвани подходящо подбрани комбинации от съвременни хроматографски техники. Разкриването на структурите е проведено със задълбочено познаване на модерните спектрални методи за структурен анализ на сложни природни съединения и особено на богатия арсенал от едно- и двудименсионални ЯМР техники. Дисертантът се е справил успешно, разбира се със съответната менторска помощ от научния си ръководител, със сериозно предизвикателство – идентифицирането на първият сулфатиран сапонин в род *Tribulus*, който е и новооткрито природно съединение. Сложните структури на този тип съединения с молекулни маси около и над 900 D представляват немалко изпитание за знанията и уменията на фитохимика да превръща спектралната информация в структурна, което дисертантът е преодолял блестящо. Това е един от съществените научни приноси на работата, при това със сериозно практическо значение – прототрибестинът се оказва един от основните сапонинови компоненти в българския *T. terrestris* и съответно в препарата Трибестан. Благодарение на това ново знание се поправя грешка, допусната преди години

при разработването на препаратите, като новите данни са включени в регистрационното му досие. Интересен принос е и откриването на трибол, съединение с ненамираната досега в природни стероидни сапонини структура с отворен пръстен F и хидроксилна група на 16 място. Много добро впечатление прави задълбоченото проучване на въпроса за произхода на 22-О-метилните производни на прототрибестина и протодиосцина и доказването, че те са артефакти.

Изолирането на основните стероидни сапонини в *T. terrestris* дава и възможност те да бъдат използвани като стандарти при разработването на високоефективен течнохроматографски – маспектрален метод с електроспрей йонизация за анализ на сапонините (заедно с флавоноида рутин) в растителен материал и екстракти от бабини зъби. Задълбоченото проучване на литературните данни е насочило дисертанта към хипотезата за съществуването на различни хемотипове *T. terrestris*. За да се потвърди или отхвърли тази хипотеза, е разработен въпросният аналитичен метод, позволяващ химично профилиране на екстрактите. Резултатите, получени при анализа на многобройни проби с различен географски произход, потвърждават наличието на хемотипове. Оказва се, че българският *T. terrestris* принадлежи към хемотип, разпространен на изток до Иран включително и богат на ценните биологично активни протодиосцин и сулфатирани сапонини. Именно сулфатираните прототрибестин и трибестин са и таксономичните маркери на този хемотип, който е ценна суровина за получаването на полово стимулиращи препарати. Методът е особено подходящ и за следене на съдържанието на активни вещества в растителна суровина, в екстракти и препарати, съдържащи екстракти от *T. terrestris*.

Данните от сравнителния ВЕТХ анализ на флавоноидните гликозиди в суровия сапонинов екстракт от пробите от различен географски произход потвърждават съществуването на поне два хемотипа *T. terrestris*. Опитът да се свържат химичните различия с някои морфологични особености на растението остават нееднозначни.

Последната част от раздела “Резултати и обсъждане” е посветена на антиоксидантния потенциал и антирадикаловата активност на суровия сапонинов екстракт и на някои от неговите флавоноидни компоненти. Присъствието на антиоксидантно действащи компоненти във фитопрепарати на основата на *T. terrestris* допринася да тяхното превантивно действие по отношение на сърдечно-съдови увреждания, ракови и други социално-значими заболявания. Установено е, че суровият сапонинов екстракт проявява сравнително слаба антирадикалова активност, дължаща се основно на присъствието на флавоноидния гликозид рутин.

Като цяло работата е написана ясно и логично. Имам някои дребни забележки и въпроси:

- В списъците с известните сапонини всъщност не е показано ясно дали те са били намерени само в *T. terrestris* или в рода *Tribulus*.

- данните за биологичната активност на сапонините, изолирани и идентифицирани от дисертанта, не би трябвало да са в литературния обзор

- областта на инфрачервения спектър под  $1500\text{ cm}^{-1}$  на български е прието да се нарича “област на пръстовия отпечатък”, а не fingerprint

- на няколко места в работата флавоноидите са наречен “флвонОни”

- анализът на литературните данни за съдържанието на сапонини в *T. terrestris* от различен произход би трябвало да се направи в литературния обзор, а не в Резултати и обсъждане. Литературните източници 53 и 54, съобщаващи такива данни, въобще не са цитирани в обзора.

- на стр. 77 концентрацията в дрогата е обозначена като мг/мл, вероятно е мг/г

- на стр. 88 в Резултати и обсъждане са дадени излишни експериментални подробности за получаването на калибрационните криви. Мястото им е Материали и методи.

- На фиг. 19 и 20 са показани хроматограми. Има ли някакви данни за структурния тип на неидентифицираните съединения?

Направените бележки са предимно от технически характер и не намаляват стойността на настоящия дисертационен труд.

Докторантът е представил общо шест научни публикации, в които са съобщени резултатите от дисертационния труд. Четири от тях са в чуждестранни издания, включително реномирани такива като *Fitoterapia*, *Phytochemistry*, *Phytochemistry Reviews*. С това изискванията на ИОХЦФ за получаване на образователната и научна степен „доктор” по отношение на публикациите несъмнено са преизпълнени. Трябва да се отбележи и фактът, че на пет от публикациите (излезли между 2002 и 2008 г.) вече има повече от 150 цитата. Този факт показва високата оценка на резултатите, изложени в дисертационния труд, от международната научна общност. Част от резултатите са представени на три научни форума, един от които международен, а другите – български с международно участие.

В хода на работата по дисертацията си докторантът е усвоил разнообразни съвременни методи за изолиране и структурен анализ на сложни природни съединения, химично профилиране на растителни екстракти, оценка на антирадикалова активност. Усвоил е и уменията за критична оценка на получените данни и тяхното компетентно интерпретиране. Напълно ясно е, че образователните задачи на докторантурата са успешно изпълнени.

Трябва да се отбележи, че изработването на дисертационния труд на г-н Динчев е станало до голяма степен в хода на изпълнението на договор с фирма Софарма АД, свързан с изготвянето на регистрационното досие на препарата Трибестан, както и с анализа и контрола на този препарат.

Познавам лично г-н Драгомир Динчев от времето, когато работеше по дисертацията си в лаборатория “Химия на природните вещества” на ИОХЦФ и имам много добри впечатления от него като усърден и опитен експериментатор, отнасящ се с внимание към детайла, отлично запознат с литературата по въпросите, по които работи. Убедена съм, че приносите в работата са основно лично негови, разбира се с необходимото съдействие и напътствия от неговия научен ръководител. Наученото по време на докторантурата му беше изключително полезно при преминаването му на работа в Софарма, което обаче за съжаление доведе до закъснението в защитата на настоящата дисертация.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като се вземе предвид всичко казано по-горе, може да се заключи, че дисертационният труд на г-н Динчев е научно изследване на съвременно ниво, със съществени научни и научно-приложни приноси в областта на изучаването на българските лечебни растения и възможностите за тяхното устойчиво използване. Дисертацията напълно отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ и правилниците за неговото приложение, както и на специфичните изисквания на ИОХЦФ за исканата научна и образователна степен. В хода на изследването дисертантът е придобил разностранни знания и умения, които успешно прилага в практиката си в лабораториите на Софарма. Това ми дава основание с дълбоко убеждение да гласувам положително за присъждането на г-н Драгомир Динчев на образователната и научна степен „доктор” по професионално направление 4.2 Химически науки, и да препоръчам на почитаемото Научно жури да направи същото.

22.03.2015 г., София

Рецензент:

Вася Банкова