

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Стефан Димитров Николов, д.ф.н.,
Ръководител на катедра по Фармакогнозия при
Фармацевтичен факултет, Медицински Университет-София

Относно: Процедура по защита на дисертационен труд на тема: „Химично изследване на стероидни сапонини и флавоноиди в *Tribulus terrestris* L.” на докторанта **Драгомир Николов Динчев** от Института по органична химия с център по фитохимия при БАН

Общи данни

Обявената процедура по защита на дисертационния труд е в област на висшето образование. 4. Природни науки, математика и информатика. Професионално направление: 4.2. „Химически науки”. Научна специалност: Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества, шифър 01.05.10. Дисертационният труд съдържа 180 страници текст, обособени са 4 основни раздела и е онагледен с 29 фигури и 13 таблици. Библиографската справка включва 378 източника, от които 10 на кирилица.

Професионално развитие

Докторантът е завършил Химическия факултет при Софийския Университет “Св. Климент Охридски”, специалност Органична и аналитична химия с образователна степен магистър по химия, през 1993 г. От октомври 1994 г. започва работа в Софарма АД – Pharmaceutical, производство на лекарствени продукти като аналитик химик в отдел Контрол на качеството. Занимава се с анализи на помощни вещества, активни вещества и фармацевтични продукти. От 2000 г. продължава работа в същата фирма, но в отдела по „Научноизследователска и развойна дейност”, където се занимава с подготовка и валидиране на аналитичните методи, и изготвяне на документация за регистрация в България и в чужбина на лекарствени продукти. Развитието му във в Софарма АД продължава и от 2008 г. работи като химик в друг отдел по „Управление на качеството”. От данните посочени в CV се вижда, че е зачислен като докторант към Института по органична химия с център по фитохимия при БАН през 1998 г. Участвал е в 2 научно-изследователски проекта през 2000 г. и 2003 г., свързани с темата на дисертационния труд и ръководени от научния ръководител на докторанта проф. дхн Иванка Костова. Специализирал е в Института по химия в Университета Hohenheim в Щутгарт, Германия в областта на ЯМР спектроскопия и полупрепаративна ВЕТХ, в Института по почвознание и растително култивиране, в Пулави, Полша и Специализация в програмата „Развитие на човешките ресурси”, спонсорирана от социален фонд на ЕС „Фармация за нефармацевти”, провеждана във Фармацевтичния факултет на МУ, София.

Актуалност на темата

Интересът към *Tribulus terrestris* L. и по-точно към съдържащите се стероидни сапонини започват още през 60-те и 70-те години на миналия век, когато излизат първите патенти и публикации от български автори за препарати стимулиращи сперматогенезата и повишаващи либидото - Тб-68 за ветеринарно приложение и Tribestan за хуманната медицина. От тогава интересът към оригиналния български фитопродукт Tribestan не намалява. Проучванията на фитопродукта продължават и сега, което се налага заради новите регистрации и пререгистрации. От друга страна от стотиците публикации, които излизат през последното десетилетие върху *Tribulus*

terrestris се установява голямо различие между изолираните сапонини от растението в Индия, Китай и тези в България. Това говори за съществуването на хемотипове на вида и е тясно свързано с появата на разлики във фармакологичните ефекти на вида, събиран от различни местообитания и използван като суровина за производство на фитопродукти. Посочените аргументи показват, че научните проучвания и най-вече фитохимичните съвсем не са приключили и темата *Tribulus terrestris* продължава да е интересна, което говори и за актуалността на рецензирания дисертационен труд.

Анализ на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран в 4 главни отдела: литературен обзор; резултати и обсъждане; експериментална част и литература. Отделни заглавия са въведение, цели и задачи, и обобщение на резултатите.

Целта и задачите на дисертационния труд са ясно формулирани. За изпълнение на целта са поставени 4 задачи за разрешаване. Целта и задачите са адекватни на проблема заложен в темата.

Литературният обзор е представен в 4 основни глави. Първите две се отнасят до ботанически данни за семейство *Zygophyllaceae* и за род *Tribulus* L. и за разпространението на *Tribulus terrestris* L. Най-обширна е литературната справка направена в третата част „Изследвани класове съединения,” която заема почти целия обзор. Тази част е подразделена на две подчасти - „Стероидни сапонини и сапогенини” и „Флавоноиди”, което е напълно понятно и отговаря на заглавието на дисертацията. Близо $\frac{3}{4}$ от литературния обзор е посветен на стероидните сапонини и сапогенини в род *Tribulus*. За тази част от обзора давам много висока оценка на докторанта за работата по събиране и най-вече по систематизирането и класифицирането на многобройните литературни данни. Подразделът „Стероидни сапонини и сапогенини”, от своя страна е разделен на 11 подчасти. Групирането започва от двата основни типа стероидни сапогенини и сапонини – спироستانолов и фуростанолов. Следващите подчасти се отнасят главно до изолиране и пречистване, методи за структурни изследвания, методи за полуколичествено и количествено определяне на сапонини и сапогенини и биологична активност на стероидните сапонини в *Tribulus terrestris* L.

Най-обширна е представената информация в първите два подраздела, свързани с химичната структурата на сапогенините и сапонините от двата типа. Определено тук изпъкват отличните познания на докторанта по отношение на сложната структура на тези съединения. Обилната информация, която съществува за структурата на сапогенините на спироستانоловите сапонини е събрана и систематизирана в 6 групи. Признаците на това подразделяне са различни. Водещ признак е принадлежността на сапогенините към изомерните групи на холестанов тип (транс свързване на А и В пръстените $-5\alpha\text{H}$) и копростанов тип (цис свързване на А и В пръстените $-5\beta\text{H}$). Следващият признак е наситен или ненаситен въглероден скелет, следва подразделяне по вида, броя и мястото на функционалните групи в 6 пръстенната структура на спироستانоловите сапогенини. За да стигне до структурата на конкретен сапогенин е направено допълнително разделяне в зависимост от варирането на метиловата група при С-25, което разделя сапогенините на два типа: нео (25-S-ax Me) и изо (25-R-eq Me). Така се стига до структурата на важните за вида сапогенини като тигогенин, гитогенин, хекогенин и 25S /нео/ изомерите, диосгенин, рускогенин, сарсасапогенин и др. Спироستانоловите сапонини на тези сапогенини са подредени и номерирани в таблици, в които са посочени и литературните източници. От тях се вижда, че досега от *Tribulus terrestris* са изолирани и идентифицирани 64 спироستانолови сапонини. Същият подход е приложен при обработката и представянето на обилната информация и за фуростаноловите сапонини. Всички те са бисдесмозиди, с две захарни вериги при С₃ и

C₂₆ и са прекурсори на спиростаноловите сапонини. Интересно е да се отбележи, че в *Tribulus terrestris* е намерен фуростанолов сапонин свързан с диглюкозид на 26-то място, което рядко се среща, а също и отделената специфична група на фуростаноловите сапонини с двойна връзка при 20,22 позиция ($\Delta^{20,22}$), известни като псевдофуростанолов тип сапонини. От приложените таблици се вижда, че броят на изолираните и идентифицирани фуростанолови сапонини в *Tribulus terrestris* е 67. Впечатляващ е общият брой от 131 сапонини, описани от докторанта в тази част на обзора.

Логически следва, да се проследи пътят от първата индикация за наличие на фуру и спиро стероидни сапонини в растителни екстракти или фракции и се премине през използваните методи за тяхното изолиране, пречистване структурни изследвания и прилаганите методи за полу- и количествено определяне, което докторантът прави в следващите части на обзора. Напълно споделям казаното от докторанта, че „изолирането на индивидуални компоненти от сапониновата смес е трудна задача изискваща комбинирано прилагане на хроматографски техники, тъй като това са съединения с относително сложни структури, близка полярност и малки разлики в молекулата”. Същото се отнася и до следващата стъпка, тяхното структурно определяне. В последователен ред докторантът описва класическите и стига до съвременните методи за директно определяне на структурата на сапониновите гликозиди с помощта на 1D и 2D ЯМР и мас спектрални техники при мека йонизация, както и висока резолюция. В подраздели на тази част от обзора, докторантът описва прилаганите методи за идентифициране на сапонини в *Tribulus terrestris* в смес с помощта на многостадийна МС и ВЕТХ-МС, която се прилага и за полуколичественото им определяне. Възможно е полуколичествено и количествено определяне на сапонини в *Tribulus terrestris* да се извърши и само чрез ВЕТХ методи за анализ. Последната 11 подчаст на обширния подраздел „Стероидни сапонини и сапогенини”, се отнася до биологична активност на стероидните сапонини в *Tribulus terrestris*. Тази подчаст е разделена на две: биологична активност на сапонинови екстракти от *Tribulus terrestris* и биологична активност на сапонини, изолирани от *Tribulus terrestris*. Направен е подробен литературен преглед на фармакологичните и клиничните изследвания, свързани преди всичко с най-известното действие на *T. terrestris* като афродизиак за лечение на импотентност при мъжете и на разработените препарати от сапониновата фракция, получена от алкохолен екстракт на надземните части на растението като Tribestan, Vitanone, Tribusaponin и др. Прави впечатление, че от проведените фармакологични изследвания за други активности на сапонинови водни или аклохолни екстракти от *Tribulus terrestris*, се оказва че видът действа като панацея с доказани ефекти върху почти всички системи в човешкия организъм и средство за лечение на над 20 заболявания. По-целенасочени са проучванията върху чистите сапонини, за които се доказва определена противотуморна и фунгицидна активност.

По същия начин са структурирани известните литературни данни и за втората група биологичноактивни вещества – флавоноидите. От тях в род *Tribulus* се срещат само флавоноли производни на кверцетина, кемпферола и изорамнетина и един единствен представител като агликон от групата на флавоноидите – хризин. Данните за генините и флавоноловите гликозиди и тук са представени таблично и номерирани, от където се вижда, че общият брой на изолираните флавоноиди е 24. Описани са още използваните методи за изолиране и пречистване на флавоноиди, за структурното им определяне, за качествен и количествен анализ и публикуваните данни за биологичната активност на флавоноиди от *Tribulus terrestris*.

Последната четвърта глава на обзора е посветена на хемотипните разлики при *Tribulus terrestris*. Разделена е на две части - основни понятия и „Преглед на

дискутирани хемотипни разлики при *Tribulus terrestris*, публикувани преди излизането на нашите резултати". Считам за уместно въвеждането на тази глава в обзора, тъй като съществуват достатъчно данни за наличието на различни хемотипа *Tribulus terrestris* и то по отношение на сапогениновия състав, респ. на количественият и качествен състав на фураностаноловите сапонини. Цитирани са редица публикации, в които се описват големите разлики в количествения и компонентен състав на сапоинови екстракти от растението с произход от България спрямо тези от Индия, Китай и Югоизточна Азия. Оценявам високо обзора на дисертационния труд като основание за това са научната му стойност и полезност, която има и ще има за настоящите и бъдещи изследователи в тази област. Прави впечатление и големият брой прегледана и цитирана научна литература, което показва добрата осведоменост на докторанта.

Следващият /втори/ раздел на дисертацията е „Резултати и обсъждане”. Той е разделен на пет части: подходи и методи; изследване на суровия сапоинов екстракт - ССЕ (бутанолна фракция) на *Tribulus terrestris*; сравнителен ВЕТХ – МС анализ на сапоиновия състав на *Tribulus terrestris* от различни географски региони; сравнителен ВЕТХ анализ на флавоноидния гликозиден състав на ССЕ от *Tribulus terrestris* от различни географски региони и изследване на антиоксидантния потенциал на български *Tribulus terrestris* и антирадикаловата активност на негови флавоноидни компоненти. Първата част включва общата схема за разработване на изследвания растителен материал и се посочват методите за изолиране и пречистване на индивидуални съединения, за идентифициране и структурното им охарактеризиране и за аналитични цели при количественото определяне на сапонини и рутин. Втората част е подразделена в 2 подчасти: изолиране и идентифициране на сапонини и изолиране и идентифициране на флавоноиди. В третата и четвъртата част са описани резултатите от сравнителния ВЕТХ - МС анализ на сапоиновия състав и на сравнителния ВЕТХ анализ на флавоноидния гликозиден състав на ССЕ на *Tribulus terrestris* от различни географски региони. В три подчасти е структурирана петата част, в която първо се описва охарактеризирането на ССЕ, използван за изследване на антиоксидантния потенциал на български *Tribulus terrestris*, а в следващите две подчасти, изследванията и получените резултати на антиоксидантния потенциал на български *Tribulus terrestris* и антирадикаловата активност на негови флавоноидни компоненти.

Третият раздел на дисертацията е „Експериментална част”, в която по-детайлно са описани материалите и методите, използвани при разработването на дисертационния труд, схемите на хроматографското разработване на отделните фракции, физичните и спектралните данни на изолираните индивидуални компоненти, химическите и ензимни реакции използвани в дисертацията и извършените пробоподготовки за сравнителните анализи. Преди четвъртата глава „Литература” в отделно заглавие са обобщени резултатите.

Резултати и научни приноси

Най-съществени са резултатите от фитохимичното проучване, свързани с изолиране на индивидуални съединения от надземната част на *Tribulus terrestris* L. и тяхното идентифициране и структурно охарактеризиране. Трудната задача по изолирането на индивидуални съединения е представена прегледно на фиг. 2, която отразява схемата на работа и използваните техники и методи до получаването на чисти вещества. Така изолираните съединения са структурно охарактеризирани, чрез използването на спектралните методи УВ, ИЧ, МС и ЯМР. Тежест на дисертационния труд, убеденост и достоверност в постигнатите резултати, придават използваните и добре овладяни от докторанта съвременни техники на МС и ЯМР техники. От МС методи са използвани EI-MS (70 eV) FAB-MS и ЕСЙ. От ЯМР освен "класическите"

техники (^1H и ^{13}C , DEPT, COSY, NOE) са приложени 1D и 2D техники като DQF-COSY, NH-LR-COSY, TOCSY, GHSQC-TOCSY, 1D-TOQSY, HSQC, HMBC ROESY и NOESY, както и допълнително направените химични трансформации, които водят до превръщането на близките по структура сапонини един в друг. По този начин еднозначно е определена структурата на общо 20 съединения: 8 стероидни сапонина и 12 флавоноида. От тях 3 са нови стероидни сапонина, един фуростанолов сапонин е нов за род *Tribulus L.*, а един флавон - трицин е нов за *Tribulus terrestris L.* Характерно за структурата на 2 от новите сапонини прототрибестин и метилпрототрибестин, е че са сулфатирани фуростанолови сапонини, а третият нов сапонин - трибол е стероиден сапонин без захарна част при C-26, но с отворен пръстен F и OH група при C-16 вместо при C-22. Новият за род *Tribulus L.* фуростанолов сапонин е псевдопротодиосцинът.

Характера на тези научни приноси определям като новост за науката, тъй като структурите на новите сапонини са неописани досега в литературата. Съществен е и изводът, че основните фуростанолови сапонини в растението от български произход и Трибестан субстанция са протодиосцин и прототрибестин, а не протодиосцин и протограцилин, както се посочваше в предишните изследвания на български автори. Към тази група научни приноси може да се отнесе и твърдението на автора за доказването на хемотипове в *Tribulus terrestris*, определянето на принадлежността на растението от български произход, към хемотип общ за Югоизточна Европа и Западна Азия и предлагането на сулфатирани сапонини прототрибестин и трибестин като маркери на този хемотип. За целта са проведени многобройни сравнителни ВЕТХ-МС анализи на сапониновия състав по отношение на 5 сапонина, характерни за растението от български произход, /протодиосцин, прототрибестин, диосцин, трибестин и псевдопротодиосцин/ и на основния флавоноид рутин в проби на *Tribulus terrestris* от различни географски региони. Разработени са проби от девет страни в различни географско-климатични зони на Балканския полуостров (Сърбия, Македония, България, Гърция), на Мала Азия (азиатската част на Турция), от Грузия, Иран, Северна и Южна Индия, и от Виетнам. В резултат на тези изследвания са установени много различия в химичния състав, в зависимост от географското местоположение на събирания материал. Вижда се, че българският *Tribulus terrestris*, се отличава с високо съдържание на протодиосцин и други стероидни сапонини от диосгенинов тип, което е свързано с характерните фармакологични ефекти на растителната субстанция от български произход. Тук трябва да се добавят и намерените значителни различия в количествен и качествен аспект, при сравняване на флавоноидния профил на растителни материали от различни географски райони спрямо 8 флавонолови гликозида, предварително изолирани от български *Tribulus terrestris*.

Приносите, свързани с изолирането и идентифицирането на останалите стероидни сапонини, флавоноиди, както и на β -ситостерол-3-О-глюкозид, определям като приноси с потвърдителен характер. С такъв характер определям резултатите, получени от изследванията за антирадикаловата активност на 11 флавоноида на метилпрототрибестин и на суровия сапонинов екстракт, за които се установява, че с най-висока антирадикалова активност е кверцетинът и неговите 3-OH заместени производни.

В дисертационния труд се откриват и приноси с научно-приложен характер. Особено практическо значение имат направените изводи за съдържанието на изследваните сапонини в различните морфологични части на растението. Установено е, че е най-високо в листата, следвано от стеблата и най-ниско е в плодчетата. Важни са също и изводите, свързани с фенофазната динамика на натрупване на сапонините и флавоноидите. Съдържанието на сапонините нараства от стадия преди цъфтежа към

този на цъфтеж, след което слабо намалява и достига минимум при стадий на цъфтеж-плодообразуване, и леко нараства отново в периода на плодообразуване. Разработеният ВЕТХ-МС метод, който е използван за описаните по-горе сравнителни количествени анализи на проби от *Tribulus terrestris* L., събрани от различни географски райони по света, е приложим и за анализ на търговски продукти, съдържащи сапонинов екстракт от растението, което е също принос с определен научно-приложен характер, както и новото регистрационното досие на препарата Трибестан, произвеждан от Софарма АД, съдържащо данни от дисертационния труд.

Направеният анализ и оценените дотук резултати и приноси, считам за достатъчни като обем за дисертационен труд, претендиращ за исканата научно-образователна степен. Поставената цел и определените за изпълнение задачи са изпълнени. Научните приноси в зависимост от техния характер са с фундаментален и с научно-приложен характер. Най-общо определям характера на научните приноси като новост за науката и обогатяване на съществуващи знания. В тях личи водещата роля на докторанта Динчев.

Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд

Получените резултати и постигнатите научните приноси, свързани с дисертационния труд са отразени в шест научни публикации, четири от които са в списания с импакт фактор. От тази публикация са забелязани досега общо 260 цитата, от които повече от чуждестранни автори. Участвал е в 3 научни форума с 2 постерни презентации и с 1 доклад.

Критични бележки и препоръки

След критичното преглеждане на дисертационния труд, могат да се дадат някои препоръки, отправят въпроси и да се направят забележки. Препоръчвам на докторанта допълнителна работа по изясняване на важния въпрос за метоксиформите на сапонините. Имат ли те природен произход или са артефакти? При дискутирането на този въпрос на стр. 64 и 65 употребата на изрази като „се счита”, „дава вероятност”, „непубликувани резултати”, „...проведеното ТСХ изследване е неточно.....”, както и наличието само на едно „потвърждение на нашите резултати дойде от италиански изследователи” будят съмнения за направения извод – цитирам „Тези данни доказват, че 22-ОМе производните на протодиосцина (101) и прототрибестина (160) са артефакт”.

Много пестеливо докторантът обобщава резултатите от проведените задълбочени проучвания, свързани със съществуването на хемотипове в *Tribulus terrestris*. Оценявам високо изводите направени на стр. 75 и защо те, макар и в съкратен вид не са намерили място в „Обобщение на резултатите”. Според тези изводи убедено може да се говори за китайски, индийски и защо не и за български хемотип, след като „Сулфатирани сапонини са изолирани единствено от *T. terrestris* от български произход”. Същото се отнася и до изводите за съдържанието на изследваните сапонини в различните морфологични части на растението, за фенофазната динамика на натрупване на сапонините и флавоноидите, както и установената връзка между морфологията на плодчетата, според което видът се разделя на 2 подвида и сапониновия състав.

Една от задачите на рецензента е да установи съответствие между текста на дисертационния труд и автореферата. За съжаление открих сериозно разминаване в данните, отнасящи се до важния наукометричен показател „забелязани цитати”. Според автореферата тяхния брой е общо 158 цитата, от 5 публикации, а според дисертацията те са 260 от 6^{те} публикации.

Забелязват се някои неточности и печатни грешки, особено в изписване имената на съединенията. Например хризинът е флавоон, а не флавонон / стр. 45, 47/, написаната формула на сапонина на стр. 25 се отнася до триол, а не до тетраол, корекция търпи и изписването на структурата на прототрибестина /съединението **160**/ в частта му „26-диол-?“, недоумение буди и написаното, че третият нов сапонин трибол е с нетипична за стероидните сапонини структура. Кое е нетипичното, след като е с отворен пръстен F, но без захарна част при С-26 и разменени ОН групи? Липсата на съществени критични бележки се обяснява, че дисертационният труд се базира на научни трудове публикувани в реномирани научни списания с импакт фактор, след прецизни рецензии от водещи специалисти, както и след задълбоченото обсъждане на дисертационния труд пред Научния колоквиум на ИОХЦФ.

Заклучение

В заключението ще изкажа и мои лични впечатления от темите, свързани със стероидни сапонини, *Tribulus terrestris* и фитопродукта Трибестан. Научното дирене по тези теми е поставено преди повече от 50 години от моите преподаватели, научни ръководители, рецензенти на трудовете ми, доц. д-р Диана Панова от Фармацевтичния факултет в София и доц. д-р Маргарита Томова от тогавашния НИХФИ /Научно изследователски химико-фармацевтичен институт/. Те са първите изследователи на стероидните сапонини в *Tribulus terrestris* и едни от съавторите на непреходния от над половин век български фитопродукт Трибестан. Те поставиха началото и след тях се появяват поредица от публикации на български автори свързани с изолиране и охарактеризиране на сапогенини, сапонини и флавоноиди и в научната литература се заговори за *Tribulus terrestris* от български произход, а препаратът Трибестан отдавна се наложи на международния пазар. В тази връзка настоящият дисертационен труд е продължение на тези изследвания и още едно доказателство за характерните фитохимични и фармакологични особености на българския *Tribulus terrestris*. Тук е мястото да се отдаде заслуженото и на научния ръководител на докторанта, който през последните години е ръководител и на научноизследователски екип, работещ по тези теми.

От изложеното в рецензията се вижда, че образователни и научни цели, които се поставят пред кандидата за получаването на образователната и научната степен „Доктор“, са реализирани. В резултат на многогодишна работа, упоритост в усвояването на класически и съвременни методи, са постигнати значителни научни и научно-приложни приноси и резултати, отразени по-горе в рецензията. Кандидатът напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за развитие на академичния състав. Затова **убедено препоръчвам на членовете на Научното жури да присъди на маг. хим. Драгомир Николов Динчев образователната и научната степен „Доктор“.**

София
22. 04. 2015 г.

Рецензент:
(проф. Стефан Николов, д.ф.н.)