

РЕЦЕНЗИЯ

От От Доц. Ренета Славова Гевренова, дф, Катедра Фармакогнозия, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет-София

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен "доктор" в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.2. Химически науки, докторска програма „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”

Автор: Виктория Светлинова Иванова

Тема: **Фитохимично охарактеризиране на видове от род *Inula*, растящи в България**

Научен ръководител: Проф. Д-р Антоанета Трендафилова, ИОХЦФ, БАН

1. Общо описание на представените материали

Автор на дисертационния труд е Виктория Светлинова Иванова – докторантка на самостоятелна подготовка към Института по Органична Химия с Център по Фитохимия (ИОХЦФ), БАН с научен ръководител Проф. Д-р Антоанета Трендафилова.

Представеният от В. Иванова комплект материали е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ, и отговаря на критериите на ИОХЦФ-БАН за придобиване на научната и образователна степен „доктор“.

Докторантът е приложил 6 броя публикации, списъци за цитати и участия в конференции, и наукометрична справка съгласно изискванията на ИОХЦФ.

2. Актуалност на темата на дисертационния труд

Темата на дисертацията е несъмнено актуална поради търсенето на нови източници на фармацевтично значими биологичноактивни вещества (БАВ) от природен произход за превенция и терапия на невродегенеративни и злокачествените заболявания. Повечето от тези вещества са вторични растителни метаболити. Видовете от сем. Asteraceae (Сложноцветни), се характеризират с изключително разнообразие от сескитерпенови лактони (ейдесманолити, гуайанолиди, гермакранолити), тритерпеноиди, ацилхинни киселини (кафеил-, феруил-, кумарил-, кафеилферуилхинни киселини), метоксилирани флавоноидни агликони и гликозидите им. Етнофармакологичното приложение на

лечебните видове се подкрепя от съвременните фармакологични изследвания, насочени главно към антиоксидантна, ензим инхибиторна, антинеопластична и антибактериална активност. Известни са антихелминтна, агароцидна, инсектицидна и репелентна активност на сложноцветните видове. Сескитерпеновите лактони са широко проучвани за противовъзпалителна, цитотоксична (*in vitro*), антитуморна (*in vivo*), антимикробна и антималярийна активност. Кафеилхинните киселини и флавоноидите са известни с антиоксидантните, хипогликемични, хипохолестеролемични и антивирусни свойства. Доказан е цитотоксичният им ефект в туморни клетъчни линии чрез активиране на апоптоза; установена е инхибиторната им активност върху някои мембранно-свързани и цитозолни протеази. В контекста на посочените протективни ефекти на сложноцветните видове, изборът на таксоните от род *Inula* като източник на сескитерпеновите лактони, кафеилхинни киселини и флавоноиди, е целесъобразен. Определен интерес представляват резултатите за слабо проучения субендемит за Балканския полуостров *Inula aschersoniana* var. *aschersonian*. Сескитерпеновите лактони и флавоноидите са хемотаксономични маркери в сем. Asteraceae и всички установени съединения имат хемотаксономично значение за род *Inula*. В този смисъл, изборът на докторантката на групата растителни вторични метаболити е обоснован и резултатите биха имали както фундаментален характер, така и приносен характер към хемотаксономията на рода.

3. Анализ и обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд по своите цели и задачи е интердисциплинарно изследване, което предполага компетенции в областта на фитохимията, хроматографския анализ с класически и комбинирани методи, и спектроскопските методи. Състои се от 117 стр. и е онагледен с 37 фигури, 14 таблици, цитирани са 156 литературни източника. Дисертантката добре познава научната литература и умело я използва за да докаже научната си теза.

Целта на проучването е фитохимично охарактеризиране на три вида от род *Inula*, растящи в България: *Inula britannica* L. (британски оман), *Inula oculus-christi* L. (скален оман) и субендемичния вид *Inula aschersoniana* Janka var. *aschersoniana* (ашерсониев оман), насочено към изучаване на техния терпенов (сескитерпеноиди и тритерпеноиди) и

фенолен (флавоноиди и фенолни киселини) профил, както и оценка на антиоксидантния им потенциал.

Дисертацията се състои от 3 раздела: Литературен обзор (6 глави), Собствени изследвания (10 глави), и Експериментална част (11 глави), заедно с въведение, изводи, приноси, библиография и списък с публикации, цитати и участия в научни форуми.

В Литературния обзор дисертантката представя трите ключови елементи в изследванията си: 1) растителните видове *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* и данни за вторичните метаболити, 2) двете прицелни групи БАВ (сескитерпенови лактони и флавоноиди) и 3) методите, които използва за изолиране, идентифициране и установяване на антиоксидантен потенциал. В обзорната част на дисертацията добре са свързани съвременните данни за фитохимичния състав на изследваните видове и фармакологичните им ефекти.

Представени са подробни данни за състава на сескитерпеновите лактони от проучваните видове *Inula* отнасящи се към групите на ейдесманOLIDите, гуайанOLIDите, гермакранOLIDите и димерните лактони. Детайлно са представени флавонолите и флавонолите, включително голям брой метоксилирани производни. Направен е преглед на двата класа вторични метаболити - сескитерпенови лактони и флавоноиди, които са обект на изследване в дисертационния труд. Сескитерпенови лактони имат цитотоксичната (*in vitro*) и противотуморната (*in vivo*) активност, докато антиоксидантната активност по механизма на улавяне на свободните радикали и редуцираща способност, диуретичния и антихипертензивен ефект се дължат на флавоноидите.

Акцентирано е върху литературните данни свързани със спектроскопията на ядрено-магнитния резонанс – основен метод в структурното охарактеризиране на сескитерпеновите лактони. Дисертантката дава подробни данни за антиоксидантната активност по механизма на улавяне на свободни радикали (DPPH и ABTS). Литературният обзор убедително обосновава изследователския интерес към видовете от род *Inula* и проучваните вторични метаболити. Дисертантката аналитично коментира литературните данни и прави необходимите за целите на работата си изводи.

Собствените изследвания на дисертантката са в три направления: 1) изолиране и идентифициране вторични метаболити от класовете сескитерпенови лактони, флавоноиди, тритерпеноиди, стероли и фенолни киселини от изследваните таксони и обсъждане

хемотаксономичното им значение; 2) сравнителен качествен и количествен анализ на хлороформени и метанолни екстракти от *I. britannica* от различни находища в България по отношение съответно на основни сескитерпенови лактони и кафеилхинни киселини и 3) количествено определяне на фенолни съединения във видовете *Inula* и *I. britannica* от различни находища и оценка на антиоксидантния им потенциал. За краткото и ясно представяне на многобройните резултати са използвани схеми и фигури.

В работата по първото направление прави впечатление, че докторантката владее и успешно прилага спектроскопските методи (ЯМР, УВ, ИЧ) и мас спектрометрия, както и хроматографските методи високо-ефективна течна хроматография и газова хроматография – мас спектрометрия, за идентифициране на 52 съединения. Важни научни резултати са представени в глава II.3. От хлороформените екстракти на изследваните видове са изолирани и идентифицирани 13 сескитерпенови лактона и 4 сескитерпеноида, които се отнасят към групите гуайанолиди, псевдогуайанолиди, ейдесманолиди, гермакранолиди и 4,5-секо-гуайанолиди. Важен приносен характер имат резултатите от изследването на *I. oculus-christi*, в което са изолирани 4 нови сескитерпенови лактона (номера 167-170). Тъй като 9 β ,10 β -Епоксигайлардин (167) и 9 α ,10 α -Епокси-2-*enu*-гайлардин (168) са изобари, идентифицирането им е истинско предизвикателство. Изследването на *I. aschersoniana* има съществен приносен характер във връзка с изолирането на 4 нови псевдогуайанови сескитерпеноиди – два естера на дамсиновата киселина (171 и 172) и ашерсониянон А (173) и ашерсониянон В (174). Този вид е източник на познатия гермакранолид партенолид, изолиран от видове от род *Tanacetum*.

Структурният тип на установените сескитерпенови лактони са основа за важни хемотаксономични изводи. Българската популация на *I. britannica* се определя като нов хемотип и се отличава с наличие на бицикличните сескитерпенови лактони (гуайанолиди, псевдогуайанолиди и ейдесманолиди). Резултатите подкрепят таксономичната принадлежност на *I. britannica* и *I. oculus-christi* към една подгрупа в клада, въз основа на установените в последния вид гуайанолиди и ейдесманолиди. Отделянето на *I. aschersoniana* в друга подгрупа се основава на установените във вида гермакранолиди (партенолид и диепоксикостунолид) и секо-гуайанолиди.

Проучването на тритерпеноидите в изследваните видове (глава II.4) е съществен принос към охарактеризирането на *I. aschersoniana*, която е субендемичен вид за

Балканския полуостров, защото доказаните съединения от β - и α -амиринов, таракастеролов и ψ -таракастеролов тип са нови за вида. За първи път от *I. britannica* са изолирани палмитинови естери на 16β -хидроксилупеол, фарадиол и 16β -хидрокси- β -амирин; същите са потвърдени и в *I. oculus-christi*.

От метанолните екстракти от *I. aschersoniana* и *I. britannica* са изолирани флаволи и флавоноли, докато *I. oculus-christi* съдържа само флаволи (глава II.5). В съответствие с известните данни за триб Inuleae са установени С-6 метоксилирани производни (яцеозидин, хиспидулин, хиспидулин 7-глюкозид, патулитин, патулитрин, патулетин-7-*O*-(6"-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид. Яцеозидин се съобщава за първи път в род *Inula*; патулетин-7-*O*-(6"-*O*-ацетил)-глюкопиранозид е новооткрито природно съединение.

От метанолните екстракти на *I. oculus-christi* и *I. britannica* са изолирани една моно кафеилхинната киселина (хлорогенова) и две дикафеилхинни киселини (1,5- и 3,5- дикафеилхинна киселина). Чрез високо-ефективна тънкослойна хроматография (ВЕТСХ) и сравнение с референтни стандарти са идентифицирани още две дикафеилхинни киселини – 3,4- и 4,5- дикафеилхинна киселина. Въпреки, че ацилхинните киселини са основни съединения в сем. Asteraceae, доказването им в това изследване допълва по подходящ начин метаболитните профили.

Оценявам високо изследванията на българските популации от *I. britannica* за качествено и количествено определяне на сескитерпеновите лактони гайлардин и британин, и кафеилхинни киселини чрез ВЕТСХ и съответно ГХ и ВЕТХ с последващо използване на йерархично клъстериране. Резултатите показват, че българските популации от районите на Берковица и Славянка са с високо съдържание на кафеилхинни киселини, а в тази от с. Ъглен гайлардин и британин са в най-голямо количество.

В сравнителен анализ на общи феноли и флавоноиди в хлороформени и метанолни екстракти от изследваните видове е установено, че цветовете от *I. aschersoniana* са с най-високо съдържание на общи феноли и флавоноиди. В добра корелация с тези резултати е и антиоксидантната активност изследвана по механизма на улавяне на свободни радикали (DPPH и ABTS). В такъв тип експерименти е доказана най-висока антиоксидантна активност на популациите от *I. britannica* от районите на Берковица и Славянка, резултат, който е в съответствие с високото съдържание на общи феноли и флавоноиди регистрирани в екстрактите.

Дисертационният труд на Г-жа Иванова прави впечатление с владенето и целесъобразното приложение на редица спектроскопски и хроматографски методи. Резултатите са статистически достоверни и са направени хипотези за евентуално практическо приложение.

4. Характеристика на научните приноси

Приносите на дисертационния труд са в областта на фитохимията и хемотаксономията, както и в едно съвременно направление в изследването на растителни екстракти – приоритизиране на екстрактите на ранен етап от проучванията на базата на интегриране на метаболитното профилиране с тестове за биологичен потенциал. Несъмнено, принос с фундаментален характер е изолирането на 9 нови природни съединения - 4 сескитерпенови лактона, 4 псевдогуайанови сескитерпеноида и 1 флавоноиден ацилглюкозид.

Хемосистематиката на род *Inula* получава ново попълнение с доказаните общо 52 природни съединения – сескитерпеноиди, тритерпеноиди и стероли, флавоноиди и фенолни киселини. Установен е нов хемотип на *I. britannica*, продуциращ бициклични сескитерпенови лактони.

С оригинален приложен характер са приносите свързани от една страна с излъчването на перспективни български популации съответно за съдържание на сескитерпеновите лактони британин и гайлардин, и кафеилхинните киселини хлорогенова, 3,5-, 1,5-, 4,5- и 3,4- дикафеилхинни киселини сред 11 проучени популации. От друга страна е установен антиоксидантният потенциал по механизма на улавяне на свободни радикали на екстракти от листа и цветове на *I. britannica*, *I. oculus-christi* и *I. aschersoniana* var. *aschersoniana*, както и на екстракти от *I. britannica* от 11 български находища. Намерена е много добра корелация между тяхното тотално фенолно и флавоноидно съдържание и способността им да улавят свободните радикали.

5. Публикации

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 6 публикации, една от които една с Q1 и три - с Q2 и са представени на 7 научни форума. Много добро впечатление прави факта, че 4 от публикациите имат 16 цитата.

Изследванията са финансирани в 3 проекта: 1) PhytoBalk на Българо-Швейцарската изследователска програма и МОН (водец изследовател доц. д-р К. Данова),

2) проект ДН09/11 (водещ изследовател проф. д-р А. Трендафилова) финансиран от Фонд за научни изследвания, Министерство на образованието и науката (МОН) и 3) Националната изследователска програма „Млади учени и докторанти“ (ДСМ 577/17/08/2018) на МОН.

6. Критични бележки

Нямам критични бележки по хипотезата и дизайна на проведените изследвания и самия дисертационен труд. Препоръчвам да се продължи и разшири проучването с други видове от род *Inula* и сложноцветни видове.

Оценявам високо работата на г-жа Иванова в областта на фитохимията и хемотаксономията и смятам, че резултатите в дисертационния ѝ труд имат оригинален научно-приложен характер.

Заклучение

Представеният дисертационен труд има оригинални научни приноси в областта на фитохимията и хемотаксономията. Г-жа В. Иванова владее съвременни спектроскопски и хроматографски методи, и е постигнала резултати с фундаментален и приложен характер. Представената дисертация отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за развитие на академичния състав. Препоръчвам на научното жури да присъди на Г-жа Виктория Светлинова Иванова образователната и научна степен „Доктор“.

14.06.2022 г.

Рецензент:

(Доц. Д-р Ренета Гевренова)