ХАБИЛИТАЦИОННА СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

в трудовете на гл. ас. д-р Боряна Стойкова Трушева

представени за участие в конкурс за "Доцент" по професионално направление 4.2. Химически науки: научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“, обявен в ДВ, бр. 43 от 31.05.2019 г.

Авторската справка за научните приноси е направена върху 26 научни публикации (извън дисертационния труд) и едно авторско свидетелство за регистриран полезен модел [**публ. № 6, 7, 9, 11-32, 34, 35**] (приложен списък с всички публикации). Седем от научните трудове, публикувани в реферирани и индексирани списания, са приравнени на хабилитационен труд (група от показатели В) [**публ. № 9, 13-15, 23, 27, 31**]. Към момента на подаване на документите са забелязани общо 1229 цитата (778 от тях по *Scopus/WoS*), **h**-индекс **15** (*Scopus*, без автоцитирания).

Най общо научната работа, отразена в тези трудове, е в областта на химия на природните вещества. Целта на проведените изследвания е да се изясни химичния състав, свързаната с него биологичната активност и възможностите и начините за приложение в съвременната медицинска практика на природни обекти, използвани традиционно в народната медицина, или на съдържащи се в тях биологично активни компоненти. Само в две от публикациите [**6, 12**] обекти на изследване са съответно два вида **дървесни гъби**. В останалите трудове, като продължение на работата по дисертацията, обект на изследване е **прополис** (пчелен клей) от медоносни пчели (*Apis mellifera*), с изключение на **публ. 22**, където се изследва геопрополис от безжилни пчели (*Melipona fasciculata*).

I. Научни приноси

Те са свързани основно с **получаването на нови данни и потвърждаване на хипотези за структурното разнообразие на биологично активните природни съединения** и могат да се групират в две основни направления:

1. Приноси в изследванията върху прополис

2. Приноси в изследвания на дървесни гъби от клас Базидиомицети

1. Изследвания върху прополис

Прополисът (пчелен клей) е едни от най-ценните и загадъчни пчелни продукти с лечебни свойства. Той представлява смес от смолисти растителни секрети, които пчелите събират от повърхността на пъпките, младите листа или наранена кора на дърветата, и пчелен восък. Именно тези секрети са основната му съставка и

източник на биологичната му активност. Прополисът е средството на пчелите за борба с микроорганизмите, а хората го използват за профилактика и лечение на редица заболявания.

Непрекъснатите изследвания върху прополиса се налагат поради твърде различният му химичен състав, определящ се от растителното биоразнообразие в различните географски и климатични райони. Изучаването на химичния състав и растителния му произход води до формулиране на „типове" прополис, което е от значение при създаването на критерии за неговата стандартизация и качествен контрол, необходими при използването му в съвременната медицина.

Основната насока при изследване на химичния състав на прополиса е свързана с установяване на структурата на веществата, обуславящи неговата биологична активност. Като продукт с растителен произход, за целта се прилага фитохимичен подход: най-често се използва ГХ/МС метод (след дериватизиране) и/или изолиране на индивидуални компоненти. За изолиране на индивидуални компоненти са използвани комбинация от хроматографски техники, а структурата на вещества е определена с помощта на спектрални методи, като ЯМР, МС, УВ и ИЧ. За количествено определяне на различни групи фенолни съединения в състава на тополовия прополис са използвани валидирани спектрофотометрични методи, разработени в нашата лаборатория. Голяма част от изследванията се основават на изследване състава на 70% етанолен екстракт (балсам) от суровия прополис, формата под която най-често се използва в медицината и апитерапията, и съдържаща биологичноактивните растителни компоненти.

1.1. Изолиране на нови природни съединения и/или нови данни за химичен състав на прополис от различни географски райони, главно неизследвани до сега [публ. №14-17, 19, 20, 22, 23, 27,31]

- В търсене на нови биологично активни молекули **за първи път е изследван химичният състав и биологичната активност на ирански прополис** от провинция Исфахан. От 70% етанолен екстракт са изолирани пет индивидуални съединения: пренилираният кумарин суберозин, и четири терпенови естера: чимгин (борнил-р-хидроксибензоат), чимганин (борнил ванилат), ферутинин (ферутинол р-хидроксибензоат), и теферин (ферутинол ванилат). **Всички тези съединения се откриват за първи път в прополис**. И четирите терпенови естера проявяват антибактериална активност срещу *Staphylococcus aureus* [**публ. №14**][1].

[1] Тестовете за антибактериална активност са проведени от колеги в Института по микробиология, БАН

- От биологично активен екстракт на слабо проучен индонезийски прополис от източната част на о. Ява са изолирани и идентифицирани 11 съединения: **четири алк(ен)илрезорциноли** (получени като неразделяема смес), **нови за прополис**, заедно с четири пренилфлаванони (прополин D, прополин C, прополин F и прополин G) и три тритерпена от циклоартанов тип (мангиферолова, изомангиферолова и 27-хидроксиизомангиферолова киселини). Всичките пренилфлаванони демонстрираха силна радикал-улавяща активност срещу дифенилпикрилхидразил радикали (DPPH). **За първи път като растителни източници на индонезийски прополис** са определени видовете *Macaranga tanarius* L. and *Mangifera indica* L. (манго), което го отличава от известния до тогава „тихоокеански" или *Macaranga* тип прополис (от Тайван и Окинава) [**публ. №15**].

- **За първи път е изследван прополис от Малта**, като е установено, че той е представител на дитерпеновия тип. Седемнадесет проби малтийски прополис са анализирани с ГХ/МС след силилиране и резултатите показват типичния средиземноморски химичен профил, богат на дитерпенови съединения. В 16 проби, са намерени и терпенилови естери на заместени бензоени киселини, **2 от които, нови за прополис компоненти**, са изолирани и идентифицирани като ацетилирани дауканови естери на p-метокси и p-хидроксибензоена киселини. Терпениловите естери са характерни за вида *Ferula communis* (Apiaceae), широко разпространен в Малта и определен като вторичен растителен източник. Отчетена е статистически значима корелация (Pearson test) между съдържанието на естерите и противогъбичната активност [**публ. №16**].

- Следваща стъпка е доказване на растителния вид, чийто смолисти секрети, богати на дитерпени, са основната активна съставка на средиземноморския прополис. Анализиран е химичният състав на смола от кипарис *Cupressus sempervirens* и бор *Pinus halepensis*, събрани от Малта, а полученият ГХ/МС профил е сравнен с този на прополис от Малта и Гърция. Според резултатите, **основният и/или единствен растителен източник на средиземноморския тип прополис е кипарисът *C. sempervirens*** (Mediterranean Cypress), и за първи път се доказва, като източник на прополис [**публ. №17**].

- В последните години, възникват сериозни проблеми с болестите по пчелите, водещи до измиране на цели пчелни колонии. В рамките на проект по 7 РП на ЕС и в сътрудничество с д-р Биликова от Словашката академия на науките са проведени изследвания върху активността на изолирани прополисови компоненти срещу пчелни патогени. От български прополис са изолирани 5 индивидуални съединения (пиноцембрин, пинобанксин-3-О-ацетат, бензил и пентенил ферулати и **9-оксо-10(E)-12(Z)-октадекадиенова киселина, нова за**

прополис), заедно със смес от естери на кафеената киселина (пентенил, изопентенил и фенетил кафеат), които са тествани ин витро срещу *Paenibacillus larvae*. Това е бактерия нар. американски гнилец водеща до заболяване по пчелите с летален изход. Като резултат, флавоноидите и сместа от кафеати показват значителна и най-висока активност. **Това е първото съобщение за активност на прополисови компоненти срещу *P. larvae*, което ги определя като потенциални антимикробни средства срещу пчелни патогени**. Използването на изолирани съединения от прополис, като средство за борба с болестите по пчелите, има предимство, тъй като тези вещества са природни и естествено присъстват в пчелните кошери [**публ. №19**].

- **За първи път е анализиран съставът на прополис от област Перм, европейска Русия**, а резултатите доведоха до формулирането на нов смесен тип прополис. Пет проби от различни райони са анализирани чрез ГХ/МС. Установено е, че всички проби принадлежат към специфичен, **нов тип прополис с троен растителен произход: трепетлика-бреза-топола (*Populus tremula-Betula pendula-Populus nigra***). Отчетено е количественото съдържание на основните групи биологично активни компоненти, като е определено, че проби с по-високо съдържание на общи флавоноиди проявяват по-висока антибактериална активност [**публ. №20**].

- Съвместно с колеги от Държавния университет в Сао Пауло, Бразилия е **изследван химичният състав и фармакологичното действие на слабопроучен геопрополис от безжилни пчели *Melipona fasciculata***, събран от кошери в щата Мараняо, Североизточната част на Бразилия. Освен растителни смоли и пчелен восък геопрополисът съдържа и малки количества почва, от където произхожда името му. Химичният състав на геопрополиса беше изследван чрез ГХ/МС анализ на 70% етанолен екстракт и е **установено, че основните компоненти са захари и техни производни, тритерпени, анакардиеви киселини, алкилрезорциноли и захарни алкохоли**. Установи се, че геопрополисът в комбинация с хлорамфеникол проявява синергистичен ефект срещу *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Изследваният геопрополис показа също така противотуморна и имуномодулираща активност, като **е изказана хипотезата, че фармакологичното му действие се дължи най вече на наличието на тритерпени в пробата** [**публ. №22**].

- **За първи път е изследван прополис от о. Фиджи и е определен неговият химичен състав.** От етанолния екстракт са **изолирани два нови пренилирани стилбена с неправилна сескитерпенова странична верига**- соломонин B и соломонин C, и четири познати съединения (глиасперин A,

куматакенин, макарангин и мангиферолова киселина). **Глиасперин А е нов за прополис компонент**. Паралелно с това е проведен ГХ/МС анализ (след силилиране) на етанолния екстракт и е установено, че **основните компоненти са пренилирани флавоноиди и стилбени, алкилрезорциноли, анакардиеви киселини и циклоартанови тритерпени. Установено е, че пробата е с двоен растителен произход.** Докато алк(ен)илрезорцинолите, анакардиевите киселини и циклоартановите тритерпени са характерни за смолистия секрет на вида *Mangifera indica* (манго), то източникът на пренилираните флавоноиди и стилбени е друг и това най вероятно е вид *Macaranga*, но различен от вида, източник на индонезийския и „тихоокеанския" тип прополис [**публ. №23**].

- Като продължение на работата ни върху прополис от неизследвани райони, съвместно с колеги от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН и Институт по микробиология-БАН, **изследвахме за първи път прополис от о. Питкерн**. От дихлорметановия екстракт на изследваната проба **са изолирани четири нови циклоартанови тритерпена:** 3-оксо-циклоарт-24E-ен-21,26-диол-21,26-диацетат, 3-оксо-циклоарт-24E-ен-21,26-диол, 3-оксо-циклоарт-24E-ен-21,26-диол-21-ацетат и 3-оксо-циклоарт-24E-ен-21,26-диол-26-ацетат, заедно със 17 познати съединения (ди- и тритерпени). Установено е, че екстрактът проявява потенциално противотуморно действие срещу MDA-MB-231 клетки от човешки карцином на гърдата, както и антимикробна активност срещу *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Изследвана е и антимикробната активност на новооткритите природни съединения като се установи, че три от тях са силно активни срещу *Escherichia coli*, а 3-оксо-циклоарт-24E-ен-21,26-диол-21,26-diacetate проявява и силна противогъбична активност срещу *Candida albicans* [**публ. №31**].

- Чрез хидродестилация в апарат на Ликенс-Никерсон са изолирани етерични масла от два различни типа суров прополис: бразилски червен (раст. източник *Dalbergia ecastaphyllum*) и тайвански зелен прополис (раст. източник *Macaranga tanarius*). Получените летливи фракции са анализирани с ГХ/МС и е установено, че **основните летливи компоненти в бразилски червен прополис, които са слабо проучени** са фенилпропаноидите: елемицин, метил евгенол, трансметил изоевгенол, изоелемицин и транс-анетол, които могат да се използват и като негови маркери. Докато **основните компоненти в етерично масло от тайвански зелен прополис, което не е изследвано до сега**, са: β-еудесмол, 6-метил-3,5-хептадиен-2-он, γ-еудесмол, гераниал и 6-метил-5-хептен-2-он [**публ. №27**].

1. 2. Обобщени и сравнителни данни за прополис [**публ. № 7,11, 18, 21, 25, 26, 32**]

Обобщени и сравнителни данни за прополис са представени в обзорни работи, публикувани в научни списания и книги (по покана). Те са насочени, съответно към:

- **Растителни източници на прополис от различни географски и климатични райони**, данни публикувани в периода 2000 - 2006 г. Специално внимание е обърнато на растителните източници определени на базата на сравнение състава на прополис и растителен материал, както и на директното наблюдение върху поведението на пчелите [**публ. №7**].

- **Химичен състав, биологична активност и растителни източници на прополис**. Специално внимание е обърнато на новооткритите природни и прополисови компоненти [**публ. №11, 26**].

- **Различни типове прополис, въз основа на растителните източници и съответните им химични профили**, данни публикувани след 2000 година. Обсъдена е връзката състав-активност за различните типове прополис, като подробно са описани конкретни съединения, отговорни за дадената биологична активност [**публ. № 18**].

- **За първи път са събрани и обобщени данните за съдържанието на летливи съединения в прополис** от различни географски райони. Противно на твърдението (базирано на данни в литературата преди 1948 г.), че пчелният клей съдържа до 10% етерични масла, се стигна до извода, че независимо от географския произход, прополисът обикновено съдържа не повече от 1% етерично масло, в редки случаи до 2-3%. За различните проби прополис са посочени основните компоненти на етерично-маслените фракции. Отчетен е приносът на летливите фракции към биологичната активност на прополиса [**публ. №21**].

- **За първи път се обобщават данни за нововъзникнали през последните години приложения на прополиса,** извън тези, свързани с подобряване и защита на човешкото здраве [**публ. № 25**].

- **Растителни източници на прополис, предпочитания на пчелите към определени растителни видове, приложение на метаболомните подходи и хемометрията за изследване на прополис и проблеми относно неговата стандартизация**, данни публикувани в периода 2007-2017 г. [**публ. № 32**].

2. Изследвания върху дървесни гъби (клас Базидиомицети) [**публ. № 6, 12**]
Тези изследвания са проведени в рамките на проект финансиран от Фонд Научни изследвания. Интересът към тези обекти е породен от оскъдните данни или от пълната липса на такива в научната литература и в същото време от наличието на достатъчно доказателства за мощните лечебни качества на други близкородствени видове дървесни гъби.

- Установена е потенциална цитотоксичност (срещу ларви на *Artemia salina*) на макромицета *Hygrophorus agathosmus*, като чрез ГХ/МС е изследван и химичният състав на активната хлороформена фракция. Идентифицирани са няколко въглеводорода, сред които парафини, пристан, фитан и сквален. **За първи път е изследван стеролният състав на тази гъба.** Чрез ГХ/МС е установено, че основен компонент е типичният за гъбите стерол ергостерол (82%), заедно с други две ергостанови производни: (22E)-ергоста-5,7,9(11),22-тетраен-3β-ол (11.5%) и ергоста-7-ен-3β-ol (6.5%). За първи път от *H. agathosmus* е изолиран 5α, 8α-Епидиокси-24(ξ)-метилхолеста-6,22-диен-3β-ол, но наличието му вероятно е артефакт, получен чрез окисление на съответния $\Delta^{5,7}$ стерол [**публ. №6**].

- **За първи път е анализиран вторичният метаболитен състав на дървесната гъба *Fomitopsis rosea*.** Тя е защитен вид, включен в Червената книга на много страни, вкл. на България. Изолирани и охарактеризирани са **2 новооткрити природни тритерпени- ланостанови киселини**, заедно с три познати ланостанови тритерпени и епидиокси стерол. Изолираните съединения проявяват активност срещу *Staphylococcus aureus*. Всички тритерпени се отличават с наличие на допълнителен въглероден атом при С-24, което е характерно за дървесната гъба *Daedalea quercina* и потвърждава близката родствена връзка между *Fomitopsis* и *Daedalea* [**публ. №12**].

II. Научно-приложни приноси [**публ. № 9, 13, 24, 28-30, 35**]

- В рамките на проект, финансиран от Фонд Научни изследвания **за първи път е проведено изследване върху възможността за приложение на съвременни методи за екстракция на биологично активни вещества от прополис и е оценена тяхната ефективност.** За екстракция на български (тополов тип) прополис със 70% етанол са приложени следните методи: използваната до този момент класическа екстракция чрез накисване, ултразвукова и микровълнова екстракция, при вариране на условията (екстракционно време, съотношение суров прополис/разтворител). Спектрофотометрично са определени количествата на извлечените феноли и

флавоноиди, въз основа на които **е определена ефективността на методите**. Установено е, че в сравнение с класическата екстракция, микровълновата и ултразвуковата екстракция осигуряват висок екстракционен добив, изисквайки много по-кратко време и по-малко усилия. Показано е, че по отношение на добив, екстракционно време и селективност ултразвуковата екстракция е най-ефективна [**публ. №9**].

- В рамките на проект по 7 РП на ЕС и в сътрудничество с колеги от ХТМУ и Университет Ровира и Виргили, Испания, **за първи път успешно е приложено *dead-end* нанофилтруване като метод за концентриране на биологично активни вещества извлечени от тополов прополис**. За целта са използвани две мембрани: Starmem^{TM} 122 (полиимид) и Duramem^{TM} 200 (модифициран полиимид), устойчиви на органични разтворители и с размер на порите съответно 220 Da и 200 Da. Като изходен разтвор е използван химически добре охарактеризиран водно-алкохолен екстракт на тополов прополис, съдържащ флавоноиди, фенолни киселини и техните естери. За оценката на ефективността на нанофилтруването спектрофотометрично са определени количествата на съдържащите се в изходния разтвор и пермеата тотални флавони и флавоноли, тотални флаванони и дихидрофлавоноли и тотални феноли. **Задържане от над 95% на всичките анализирани вещества и концентриране на прополисовия екстракт, повече от три пъти**, е постигнато с мембраната Duramem^{TM} 200. Установените условия за концентриране на екстракта могат да улеснят последващи експерименти с използване на нанофилтруване с кръстосан поток с цел разработване на технология за производство на лекарства или хранителни добавки на основата на тополов прополис [**публ. №13**].

- Съвместно с колеги от Институт по полимери- БАН **е разработена нова водоразтворима форма на тополов прополис** на базата на биосъвместим поли(етилен оксид)-*блок*-поли(пропилен оксид)-*блок*-поли(етилен оксид) блок съполимер ($PEO_{26}PPO_{40}PEO_{26}$), като **съставът на тази водоразтворима форма е регистриран като полезен модел**. Бързото и лесно получаване на колоидния воден разтвор, неговата стабилност във времето при сравнително ниско тегловно съотношение полимер/прополис, и съдържанието на всички биологично активни съставки на прополиса при отсъствие на алкохол, разкрива възможност за приложението му в медицината, фармацията, хранително-вкусовата промишленост, козметиката и др. Водоразтворимата форма на прополиса показа висока ин витро цитотоксичност[2] при относително ниски концентрации, което в комбинация с наноразмерността на частиците й и устойчивото освобождаване на

[2] Тестовете за цитотоксичността са извършени от колеги във Фармацевтичен факултет към МУ-София

прополисовите молекули я превръща в **обещаващ кандидат за приложение в терапията на рака** [**публ. №24, 35**].

- Като продължение на работата ни три амфифилни поли(етилен оксид)-*блок*-поли(n-бутил акрилат) (PEO-b-PnBA, n=53, 99, 157 мономерни единици) диблок съполимери **за първи път са приложени успешно за получаването на сферични, прополис-натоварени полимерни мицели във водна среда**. PEO-b-PnBA съполимерните мицели са подбрани заради малките им размери, ниска цитотоксичност и отлична устойчивост при голямо разреждане. **И за трите изследвани съполимерни композиции са получени стабилни, леко опалесциращи колоидни разтвори** при тегловно съотношение съполимер/прополисов екстракт ≥2. Много близките стойности на хидродинамичния диаметър на празните и натоварените с прополис мицели и отсъствието на каквато и да е утайка в разтворите показват, че е **постигнато пълно зареждане на всички биологично активни липофилни съставки на прополиса в мицелните сърцевини**. При това мицелите, натоварени с прополис, показват висока структурна стабилност при определено разреждане и запазват морфологията си дори при концентрация от 0.01 g/L. Въз основа на получените резултати и благодарение на многобройните благоприятни характеристики като наноразмери, добра колоидна стабилност, висока товароносимост и устойчивост на бърза дисоциация при много ниски концентрации, **PEO-b-PnBA мицелите имат сериозен потенциал за приложение като дълго циркулиращи носители на прополис, подходящи за парентерално приложение в биомедицината** [**публ. №29**].

- В търсенето на нови лекарство-доставящи системи на прополис, които да преодолеят пречките свързани с неговата ниска разтворимост **за първи път е демонстрирано че модифицирани със сребро MCM-41 и SBA-15 мезопорести материали са подходящи носители на тополов прополис**. Изследването е проведено съвместно с колеги от Унгарската академия на науките и Институт по микробиология- БАН. Установено е, че мезопорестите канали на силикатния носител са подходящи за съхранението на относително високи количества, 15-17 тегловни процента, прополисов екстракт. **Натоварването на екстракта, разтворен в етанол, върху съдържащите сребро силикатни носители води до значително подобряване на разтворимостта му във вода, както и на засилване на противомикробното му действие срещу някои често срещани човешки патогени** в резултат на синергизъм със среброто. Резултатите от това изследване показват, че **модифицираните със сребро MCM-41 и SBA-15 мезопорести материали са обещаващи носители на тополов прополис**, които

могат да се използват за приготвянето на препарати на основата на тополов прополис, предназначени за локално приложение върху кожата [**публ. №30**].

- **За първи път са изследвани количествените характеристики на български прополис**, който се причислява към тополовия тип, тъй като растителият му източник е смолата на черната топола (*Populus nigra*). Компонентите, отговорни за биологичната му активност, са флавоноидни агликони (флавони, флавоноли, флаванони и дихидрофлавоноли), заместени канелени киселини и техни естери. Изследвани са 22 проби български прополис, събрани от различни региони на страната. Във всяка от пробите е определено количествено съдържанието на балсам и на трите основни групи биологично активни вещества (тотални феноли, тотални флавони/флавоноли и тотални флаванони/дихидрофлавоноли). Въз основа на получените резултати **са предложени минимални стойности за съдържание на биологично активни вещества в суров тополов прополис, както следва: 46% балсам, 24% тотални феноли, 7% тотални флавони/флавоноли и 5.4% тотални флаванони/дихидрофлавоноли**. Тези стойности могат да послужат като основа за стандартизация и качествен контрол на български прополис [**публ. №28**].

III. Методически приноси в изследванията на прополис [**публ. №34**]

- **За първи път са обобщени данните за съществуващите методи за анализ и изследване на прополис в различни аспекти** (включително на базата и на нашия опит): прополис в пчелната колония; химичен състав и растителни източници на прополис; биологична активност на прополиса по отношение на пчелите и хората; и подходи за стандартизация и качествен контрол с цел промишлено приложение. Налага се схващането, че разбирането за химичното разнообразие на прополиса е много важно при неговото изследване [**публ. №34**].

Насоки за бъдеща научно-изследователска работа:

През следващите няколко години предвиждам:

1. Продължаване на изследванията върху прополис и в частност прополис от безжилни пчели.

2. Изследвания свързани с приложение на природни дълбокоевтектични разтворители като „зелени" разтворители за екстракция на биологично активни съединения от природни суровини, включително прополис. Това ще се осъществява в рамките на вече спечелен проект за изследвания в областта на зелената химия, финансиран от Фонд Научни изследвания.

3. Продължаване на изследванията върху синтез на фенетилов естер на кафеената киселина, много важен биологично активен компонент на тополовия прополис.