Справка за научните и научно-приложните приноси

на д-р Страхил Христов Берков

представени за участие в конкурса за академичната длъжност ПРОФЕСОР по научна специалност Ботаника (01.06.03), за нуждите на ИГ "Фитохимичен анализ, биотичен и абиотичен стрес" обявен в бр. 29 на Държавен вестник от 22.03.2013 (с. 79).

Забележка: *трудовете, в които са направени съответните приноси, са цитирани в квадратни скоби.*

Основната дейност на кандидата е свързана с прилагане на методи за разделяне, като газова (GC), тънкослойна (TLC), течна (LC) и колонна (CC) хроматография и спекрални методи за идентифициране, като мас (MS), ултравиолетова (UV), кръгов дихроизъм (CD) и ядрено-магнитна (NMR) спектроскопия за идентифициране на растителни метаболити и биологично активни вещества като тропанови и амарилисови алкалоиди. Провеждани са изследвания в области като фитохимия, хемотаксономия и растителна биотехнология, чиито приноси могат да се класифицират както следва:

1. Създаване на нови методи

- Разработени са бързи TLC методи за количествен анализ на хиосциамин и скополамин в интактни растения и коренови култури от сем. Solanaceae [17] и флавоноидни агликони в растителни ексудати [5 и 14].
- Разработен е бърз метод за скрининг на ацетилхолинестеразни (AChE) инхибитори в растителни екстракти, базиран на биоавтографско TLC детектиране и MS идентифициране [28].
- Чрез метаболомен подход е валидиран метод (по правилата на ICH, http://www.ich.org) за окачествяване на растителни суровини съдържащи галантамин. Методът позволява едновременно количествено определяне на галантамин, оценка на съпътстващите алкалоиди и произход на суровината. В сравнение с останалите, предложения метод се отличава с висока чувствителност, прецизвост, възпроизводимост, информативност, простота на изпълнение и нисък разход на консумативи и време [52].
- Разработен е GC-MS метод за разделяне и анализ на алкалоиди от галантаминов тип [29].
- Разработен е HPLC метод количествен анализ на галантамин в растителен материал [40].

2. Приноси – новости за науката

2.1 Нови природни съединения

При наличие на богати на мас спектри библиотеки и/или литература, GC-MS позволява в редица случаи идентифициране на нови съединения в смеси на базата на закономерности на мас спектралната фрагментацията на познати съединения със сходна структура.

- В процеса на изследване на алкалоидни профили от представители на род *Datura* (Solanaceae) са установени структурите на 11 нови тропанови алкалоиди чрез GC-MS. Това са 3-(3’-ацетокситропоилокси)тропан, 3-(2’-хидрокситропоилокси)-тропан [3], 3-(3’-формилокситропоилокси)тропан [6], 3-тиглоилокси-6-пропионилокси-7-хидрокситропан [7], 3-фенилацетокси-6,7-епоксинортропан, 7-хидроксиапоатропин [18], 3-хидрокси-6-ацетокситропан, 3-пропионилокси-6-хидрокситропан, 3-хидрокси-6-тиглоилокситропан, 3-тиглоилокси-6-ацетокситропан и 3-тиглоилокси-7-изобутирилокситропан [20].

Създадена е библиотека от GC-MS спектри със стандартни алкалоиди, изолирани от сем. Amaryllidaceae и идентифицирани с NMR, CD, UV и HRMS (мас спектрометрия с висока резолюция). Понастоящем, тази библиотека наброява над 200 съединения и е изключително ефективна при търсене на нови алкалоиди. Предварителния GC-MS скрининг на проби (няколко милиграма екстракт) позволява елиминиране на тези с познати вещества и насочване на усилията върху произходи, проби или фракции, съдържащи вещества с непознати мас-спектри.

- Чрез GC-MS скрининг на проби бяха идентифицирани 16 нови амарилисови алкалоиди, както следва:

  От български представители на род *Galanthus* са изолирани и идентифицирани (NMR, CD, UV и HRMS) 8 нови природни съединения. Това са 11-*O*-(3'-хидроксибутаноил)хамайн, 3,11-*O*-(3',3''-дихидроксибутаноил)хамайн, 3-*O*-(2''-бутаноил)-11-*O*-(3'-хидроксибутаноил)хамайн, 3,11,3''-*O*-(3',3'',3'''-трихидрокси-бутаноил)хамайн, 2-*O*-(3'-ацетоксибутаноил)хамайн, 3,3’-*O*-(3',3''-дихидрокси-бутаноил)хамайн, 11,3'-*O*-(3',3''-дихидроксибутаноил) хамайн и 2-*O*-(3'-хидроксибутаноил)ликорин [24 и 33].

  От *Leucojum aestivum* (блатно кокиче), с произход България, е изолиран и идентифициран (NMR, CD, UV и HRMS) 1 нов алкалоид – *N*-метилалилноргалантамин [27].

  От *Hippeastrum papilio* и *Hippeastrum morelianum*, с произход Бразилия, са детектирани, а в последствие изолирани и идентифицирани (NMR, CD, UV и HRMS) 2 нови алкалоида, 1*β*-хидроксигалантамин и 2*α*,7-диметоксиномоликорин [47 и 48].

От *Narcissus serotinus,* с произход Испания, са изолирани и идентифицирани (NMR, CD, UV и HRMS) 1-*O*-(3´-ацетоксибутаноил) ликорин и нарсеронин [41].

От *Phaedranassa dubia,* с произход Колумбия, е изолиран и идентифициран с NMR, CD, UV и HRMS федранамин [43].

При анализ на алкалоидни фракции от *Pancratium canariense* (от Канарските острови), е установена структурата на нов алкалоид, 3-*O*-ацетилхабрантин, чрез GC-MS и LC-ESI-TOF/MS [44].

При анализ на алкалоидни фракции от *Leucojum aestivum* ssp *pulchelum,* с произход Палма де Майорка, с GC-HRMS и GC-MS/MS (тандем MS), е доказана структурата на нов алкалоид от галантаминов тип, 3-O-(2´-бутеноил)сангвинин [58].

2.2 Нови факти

2.2.1 Химични

- Установено е, че GC-MS спектрите на C-11 заместени съединения от кринанов тип, като 11-хидроксивитатин, хамайн и хемантидин, се различават от тези, съобщени в литературата и анализирани с директно подаване на пробата (DIP-MS). До този момент, този факт е бил известен само за хемантамин [35].
- Установяват се закономерностите на фрагментиране и фрагментационните пътища на алкалоидите от галантаминов тип с GC-HRMS и GC-MS/MS, с което се улеснява идентифициране на непознати вещества от този тип [58].
- NMR спектрите на хлидантин и инкартин са ревизирани и детерминирани с 2-D хомо- и хетеронуклеарни експерименти [22, 45].
- Изяснена е мас-спектралната фрагментация на динитрогенните амарилисови алкалоиди обликин, пликамин и секопликамин с LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS [60].

2.2.2 Фитохимични

- За първи път е изследван алкалоидния състав на *Sternbergia colchiciflora*, *Pancratium canariense*, *Zephyrantes concolor Hippeastrum papilio, Hippeastrum morelianum, Galanthus* x*valentinei* nothosubsp. s*ubplicatus* и *Galanthus rizehensis* [35, 44, 45, 47 и 48, 63, 67].
- За първи път е изследван метаболитния профил на микроводораслото *Coccineis scutellum* [39].
- За първи път се изследват амарилисови растения от Аржентина [56].
- Обогатени са познанията за алкалоидните профили на вече изследвани видове от род *Datura* (Solanaceae). За пръв път се съобщават редица нови за *Datura stramonium* [3,18], *Datura innoxia* [15] и *Datura ceratocaula* [6] тропанови алкалоиди.

- За първи път се съобщават данниии за химични профили на тетраплоидни трансгенни коренови култури (от *Datura stramonium*) [7].
- Обогатени са познанията за алкалоидните профили на вече изследвани видове от сем. Amaryllidaceae. За първи път се съобщават редица нови алкалоиди за *Habranthus jamesoniip* [56], *Galanthus nivalis* [30, 54], *Galanthus elwesii* [30, 54], *Crinum zeylanicum*[49], *Leucojum aestivum* [23], *Pancratium maritimum* [16], *Hippeastrum vittatum* [51].
- Съобщават се нови метаболити, включително фенолни киселини, за възкръсващото растение *Haberlea rhodopensis* [53].
- Установено е категорично, че растенията биосинтезират претазетин, а тазетинът, който се детектира или изолира, е артефакт от екстракционния процес [60].

2.2.3 Хемотаксономични

- Получени са фитохимични данни, подкрепящи разделянето на род *Brugmansia* от род *Datura* на триба *Datureae* [20].
- Установено е, че броя и типа на алкалоидите в алкалоидните спектри на *Datura stramonium* е в зависимост от етапите на развитие на растенията [18].
- Установено е, че алкалоидните профили могат да послужат за диференциране на *Galanthus elwesii* и *Galanthus nivalis* [30].
- Установено е значително химично разнообразие при *Leucojum aestivum, Galanthus elwesii* и *Galanthus nivalis* [10, 13, 54 и 65].

2.2.4 Биотехнологични

- За първи път се индуцират тетраплоидни трансгенни коренови култури [7].
- За първи път се прилага GC-MS за анализ на алкалоиди в *in vitro* култури от амарилисови растения [7].
- Установена е сомаклонална изменчивост и влияние на светлината върху алкалоидните спектри и количеството на галантамин в *in vitro* култури от *Leucojum aestivum* [37].
- Установени са метаболитните промени (при липиди и алкалоиди) по време на диференциране на тъканни култури от *Pancratium maritimum.* Биосинтезата на алкалоиди е в пряка връзка със степента на тъканна диференциация [42].

Разработените аналитични методи са прилагани при различни биотехнологични експерименти за оптимизиране на условията на култивиране целящи по-високи добиви от тропанови и амарилисови алкалоиди [25, 34, 36, 38, 46, 50, 55, 59, 61, 64 и 68].

3. Други факти

- Установено е, че алкалоидните профили при различни вариатети на *Datura stramonium* и *Datura innoxia* се повлияват от фактори на околната среда [15, 20, 21].
- Установени са морфологични параметри (съотношение на дължина към ширина на листата, размер на поленовите зърна, размер на устицата на епидермиса и др.) за коствено определяне на плоидното ниво при *Datura stramonium* и *Hyoscyamus niger* [1 и 4].
- При сравнително изследване на химичния състав на лайка с различен произход и плоидно ниво, е установено, че тетраплоидната форма от български произход показва най-високо съдържание на етерично масло, богато на хамазулен [2].
- Установени са нови перспективни източници на галантамин, алкалоид ползван в медицинската практика за лечение на болестта на Алцхаймер и други нервно-дегенеративни заболявания [66].
- Установени са 2 перспективни алкалоида от галантаминов тип, които показват 10 пъти по-силни AChE инхибиторна активност от одобрения в медицинската практика галантамин [27].
- Установена е връзката структура-действие на алкалоиди от крининов тип при антитуморна активност. Хидрогенирането на двойната връзка при C1 – C2 води до загуба на активност, а замествания при C6, C8 и C11 водят до промяна в активността в зависимост от заместителя.
- Чрез био-насочено фракциониране е установено, че ейкозапентаеноената киселина е отговорна за мощно антитуморно действие на микроводораслото *Coccineis scutellum* при клетъчни линии от BT 20 (рак на гърдата) [62].