ХАБИЛИТАЦИОННА РАЗШИРЕНА СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

на доц. д-р Антоанета Б. Трендафилова-Савкова

В настоящата справка са представени най-съществените научни приноси от изследвания, извършени след придобиване на академичната длъжност „доцент“

Общ брой публикации - 80; извън конкурси по придобиване на научната и образователна степен „доктор“ и академичната длъжност „доцент“ – 51; по показател В – 13 (Q1 - 3, Q2 - 8, Q3 - 2); по показател Г – 20 (Q1 - 5, Q2 - 4, Q3 - 7, Q4- 4)[1].

Фитохимичните изследвания са били и продължават да са важни, тъй като 80% от населението на планетата използва лечебни растения за лечение и профилактика. Повече от 200 години съществува тясна връзка между традиционната медицина и фитохимията, но напоследък новите технологии за ботаническо определяне, съвременните методи за фитохимичен анализ и оценка на биологичната активност се използват за разработване на нови стратегии за подобряване на контрола на качеството на лечебните растения. Като свързващо звено на ботаниката и биологичната оценка, фитохимията играе важна роля в много аспекти на осигуряването на безопасни и ефективни традиционни лекарства за повечето от хората по света. Всичко това, както и значението на природните вещества за органичната химия обуславят интензивното развитие на химията на природните вещества в целия свят.

България разполага със забележително видово разнообразие от лечебни растения и е един от най-големите износители на билки в Европа. Фитохимичните изследвания на билки са традиционни за страната ни и за ИОХЦФ-БАН. Лабораторията, в която работя е единствената в България, провеждаща научни изследвания в областта на сескитерпен-лактонната химия (*справка в Scopus*) и водеща в изследванията на вторични метаболити в растителни обекти.

Представените в конкурса научни приноси са резултат от **интердисциплинарни** изследвания, които могат да бъдат обобщени в следните направления:

- фитохимични изследвания на растителни видове известни като лечебни растения и/или неизследвани досега таксони, целящи получаване на нови данни за структурното разнообразие на биологично активните компоненти, хемосистематика, биологична активност и механизъм на действие върху различни биологични обекти.
- получаване на етерични масла от ароматични и лечебни растения, газ-хроматографски и мас-спектрален анализ на етерични масла с оглед идентифициране на основните компоненти, съдържащи се в тях и търсене на хемотаксономични и други зависимости
- използване съвременни техники за екстракция на биологично активни вещества от лечебни растения
- количествено определяне на биологично активни вещества в лечебни растения.

1. Фитохимични изследвания на растителни видове известни като лечебни растения и/или неизследвани досега таксони.

Тези изследвания са свързани главно с изолиране и структурно определяне на сески-, ди- и тритерпеноиди, флавоноиди, кумарини, фуранокумарини и фенолни киселини в растения от сем. Asterarceae (Сложноцветни**)**, Rosaceae (Розоцветни), Apiaceae (Сенникоцветни) и Araceae (Змиярникови). Чрез използване на съвременни хроматографски техники са изолирани над **140** индивидуални съединения, от които **24** са

[1] В **червено** са отразени публикациите, участващи в конкурса по показател В, а в **синьо** - по показател Г

новооткрити природни съединения, идентифицирани с помощта на спектрални методи (^{1}H и ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H -^{13}C HSQC, ^{1}H -^{13}C HMBC, NOESY, UV, IR и MS).

1.1. Вторични метаболити в представители на сем. Asteraceae:

Много представители на сем. Asteraceae са известни лечебни растения –лайка, пелин, вратига, бял равнец, бял оман и др. Установено е, че много видове от това семейство продуцират главно сескитерпенови лактони. Редица проучвания показват, че именно тези съединения са отговорни за лечебните свойства на растенията (противовъзпалителни, противоракови, цитотоксични, антималариини и др.), а от друга страна успешно се използват и за изясняване на хемотаксономични проблеми. Сескитерпеновите лактони са голямо научно предизвикателство, тъй като многообразието в техните структури не позволява използването на общи методи за тяхното количествено определяне. Те нямат специфична мас-фрагментация или хромофор, което налага в повечето случаи тяхното изолиране в чист вид и структурно охарактеризиране (главно с ЯМР), за да бъдат използвани след това за количествени измервания. Други характерни компоненти за представителите на това семейство са флавоноидите и естерите на хиновата киселина, съединения отговорни за антиоксидантните свойства на билките. Растенията от сем. Asteraceae са били и продължават да бъдат основен обект на научните ми изследвания.

Представителите на род Artemisia са обект на многобройни изследвания в световен мащаб, но слабо проучени в България. Продължавайки изследванията върху видовете от този род, растящи у нас [7, 8, 9 и 13] *бе проучен химичния състав на още един представител на рода.* ***Artemisia alba Turra*** *е растение широко разпространено в южните части на Европа. Отварата от надземните му части се използва в народната медицина като подобряващо храносмилането и тонизиращо средство. A. alba се разглежда като пример за проблематичен таксон поради значителната му морфологична вариабилност. Литературната справка за химическия състав на този вид също показва голямо разнообразие сред популациите на растението.*

При разработването на хлороформения екстракт, получен от надземните части на ***A. alba*** са изолирани 13 индивидуални съединения – 11 сескитерпеноида и 2 флавоноида. Три от тях се откриват за първи път в изследвания вид, а другите **десет** са новооткрити природни съединения. Последните са биогенетично свързани сескитерпеноиди с германкранов, ейдесманов, гуайанов и оплопанов въглероден скелет и висока степен на окисление (OH, OOH, OAc и епокси групи), които могат да се разглеждат като производни на германкрен А и германкрен Д. Идентифицираните сескитерпеноиди отличават тази проба от изследваните досега, които продуцират главно ациклични сескитерпеноиди. Резултатите от изследването потвърдиха, че *A. alba* не продуцира характерните за много видове от род *Artemisia* сескитерпенови лактони, както и вътревидовата изменчивост на този вид [**57**].

От метанолния екстракт на ***A. alba*** са изолирани и идентифицирани 18 съединения – 3 естера на хиновата киселина, 2 кумарина и 13 флавоноида. Проведеният качествен UHPLC-PDA-MS анализ на метанолни екстракти от листа и цветове на *A. alba* потвърди присъствието на тези вещества, както и на 13 други съединения, условно идентифицирани чрез сравняване на техните хроматографски отнасяния, УВ и мас-спектрални данни с тези публикувани в литературата. Пет от изолираните съединения се съобщават за първи път в изследвания вид. Направеното сравнение на флавоноидния профил на *A. alba*, изследвана от нас с данните публикувани за вида от различен произход, показа че растенията от находища на Балканския полуостров продуцират флавони и флавоноли, за разлика от пробите от Средиземноморския регион, които съдържат само флавоноли. Това заключение е важно от хемотаксономична гледна точка и бъдещи изследвания на други популации на вида биха допринесли за изясняване на вътревидовата изменчивост на този проблематичен таксон [**74**].

Род ***Inula*** *наброява около 100 вида разпространени в Азия, Африка и Европа (Средиземноморски регион). Някои представители на този род се използват в народната медицина и най-вече в традиционната китайска медицина като експекторанти, противокашлично, бактерицидно, противодиабетно, противотуберколозно и др. средства. Прави впечатление, че много малка част от видовете* Inula*, главно с азиатски произход са били обект на детайлни фитохимични и/или биологични изследвания. Въпреки малкия брой изследвани видове* Inula *повече от 400 вторични метаболити са изолирани досега, за някои от които е установена добра биологична активност. В литературата липсват данни за изследване на видовете от род Inula (11 вида и 3 вариетета), разпространени в България. До момента в нашата лаборатория са изследвани 4 вида от род Inula.*

За първи път е изследвано субендемичното растение ***I. aschersoniana var. aschersoniana***. От надземните части са изолирани 8 съединения: 3 сескитерпенови лактона, 1 флавоноид, както и **4 новооткрити природни вещества** с псевдогуайанов скелет. Новите природни съединения съдържат в молекулата си циклопропенонов пръстен. Такъв тип съединения се срещат рядко в природни източници. Досега са познати само 2 киселини изолирани от гъби и 4 сескитерпенови съединения - от *T. speciosa* и *I. lineariifolia* [**56**].

От корени на бял оман (***I. helenium*** **L.**) са изолирани 2 сескитерпенови лактона алантолактон и изоалантолактон, за които е известно, че притежават разнообразни фармакологични активности като хепатопротективна, противовъзпалителна, антитуморна, антибактериална, противогъбична и др. Тези съединения са използвани като стандарти за оценка на различни методи за извличането им от билката [**30**].

От надземните части на ***I. britannica*** са изолирани и структурно охарактеризирани – 5 сескитерпенови лактона с гуайанов, псевдогуайанов и ейдесманов скелет, 3 тритерпеноида, 3 флавоноида и 1,5-дикафеоилхинова киселина. Установена е значителна разлика в скелетния тип сескитерпенови лактони натрупвани в европейските и азиатските произходи на вида, т. е. наличие на вътревидова изменчивост. Ейдесманолидите и гуайанолидите доминират в европейските популации (българска и руска), докато азиатските – продуцират главно техните секо-производни [**64**].

От хлороформения екстракт получен от надземните части на ***I. oculus-christi*** **L.** са изолирани и структурно охарактеризирани познатите лактони гайлардин, пулшелин Е и С, 3-О-палмитати на тритерпеновите алкохоли 16β-хидроксилупеол, 16β-хидрокси-β-амирин и фарадиол, както и **6 новооткрити сескитерпенови лактона** (1 ейдесманолид и 5 гуайанолида). Намерено е, че гуайанолидите са доминиращия клас вещества, а гайлардин е основен компонент в всички изследвани досега популации на *I. oculus-christi.* От друга страна, пулшелин Е е намиран в проба от Черна гора, а пулшелин С – в проба от Иран. Получените от нас резултати са в съгласие с тези, публикувани досега и обогатяват познанията върху сескитерпеновия лактонен профил на *I. oculus-christi* и могат да бъдат от хемотаксономичен интерес [**69** и **73**].

От метанолния екстракт, получен от цветове на ***I. oculus-christi*** **L.** са изолирани 6 флавона, 2 флавонови глюкозида, хлорогенова и 3,5-дикафеоилхинова киселини. С изключение на хиспидулин, всички идентифицирани съединения се откриват за първи път в изследваното растение [**66**].

Предварителни изследвания за цитотоксичност на екстракти и фракции, обогатени на сескитерпенови лактони, флавоноиди и фенолни киселини от *I. oculus-christi* показват по-силно антипролиферативно действие на екстрактите върху раковите в сравнение с нераковите клетки. Фракциите обогатени на сескитерпенови лактони са с по-висока цитотоксичност спрямо раковите клетки, докато фракциите, обогатени на фенолни съединения и флавоноиди – само при високи концентрации и по-дълго третиране без значителна разлика между раковите и нераковите клетки. Тези резултати са още едно

допълнително потвърждение за противотуморното действие сескитерпенови лактони и екстракти от *I. oculus-christi* [63 и 77].

За първи път е изследван балканския ендемит ***Jurinea tzar-ferdinandii* Davidov**, от който са изолирани и идентифицирани **22** компонента: 12 тритерпеноида (алкохоли и техните 3-*O*-ацетати и 3-*O*-палмитати), 6 сескитерпенови лактона и 4 флавона. Сескитерпеновите лактони са с гермакранов, ейдесманов и елеманов скелет. Всички те съдържат 4-хидроксиметакрилоилна естерна група при С-8 и 12,6-*trans*-α-метилен-γ-лактонен пръстен. Те се изолират за първи път от вид от род *Jurinea* и отсъствието на функционална група при С-14 разграничава този вид от останалите в рода, които съдържат О-функция при този въглероден атом. Направената литературна справка показа, че такъв тип съединения са намирани в представители на родовете *Onopordon* и *Centaurea*. Изолираните флавоноиди са 5,7-дихидрокси-6-метоксифлавони, различаващи се по заместителите в пръстен Б: 4'-моно- и 3',4'-дизаместени с ОН и/или ОМе групи. Тези флавоноиди се съобщават за първи път във вид от род *Jurinea*, но има данни за тяхното наличие във видове от родовете *Centaurea* и *Onopordon*. Родовете *Onopordon, Centaurea* и *Jurinea* принадлежат към един същи триб Cardueae (Asteraceae). Така базирайки се на структурния тип на изолираните лактони може да се предположи, че *J. tzar-ferdinandii* заема някаква междинна позиция и подкрепя биогенетичната връзка на рода с другите два рода. Описаните флавоноиди също подкрепят тази хипотеза, но са необходими по-задълбочени изследвания за да се разбере тяхната хемотаксономична роля [**75**].

Проучен е и инхибиторния потенциал на тотален екстракт, фракции, обогатени на тритерпени, флавоноиди и лактони, както и на индивидуални съединения спрямо липаза от *Candida rugosa* (CRL) и липаза от свински панкреас (PPL). Минималните инхибиращи концентрации (IC_{50}) за двата ензима варират в граници 28-150 μg/mL. Най-висока инхибираща активност е намерена за хлороформения екстракт и за сескитерпеновия лактон онопордопикрин [**75**].

За първи път е направен фитохимичен анализ на ендемичния вид ***Centaurea davidovii*,** от който е изолиран и идентифициран 8α-(5'-хидроксиангелоил)-салонитенолид [**59**].

За първи път е изследван ендемичния вид ***Anthemis rumelica*** и от цветовете му са изолирани и структурно охарактеризирани 2 флавоноида и 4 сескитерпенови лактона, **два** от които са новооткрити природни съединения с гуайанов въглероден скелет. Съдържанието на гермакранолиди и гуайанолиди в този ендемичен вид е в съответствие с това на видовете от секция Hiorthia, към която принадлежи и потвърждава хемотаксономичната схема в този род [**35**].

За първи път е изследван фитохимично ***Asterothamnus centrali-asiaticus*** Novopokr. събран от пустинята Гоби (Монголия). От надземните части на растението е изолиран и структурно охарактеризиран **1 новооткрит** дитерпенов гликозид с цембранов скелет, което е и първия С-15 аналог на (-)-нефтенол изолиран досега от висше растение [**53**].

1.2. Вторични метаболити в представители на род *Alchemilla* (сем. Rosaceae)

"Herba Alchemillae" (Lady's mantle, цариче) е агрегат от видове Alchemilla, който притежава астригентни, диуретични и антиспазмолитични свойства и се използва в народната медицина лечение на обилна менструация, гинекологични заболявания и за заздравяване на рани. Различни изследвания са показали, че фенолните съединения (танини и флавоноиди), съдържащи се в растението са отговорни за фармакологичната активност на билката. Изследвани са 3 вида от род Alchemilla за които липсват данни за химичния им състав: ***A. mollis*** *(критично застрашен вид в България съгласно IUCN критерии) и българските ендемити –* ***A. achtarowii*** *(застрашен) и* ***A. jumrukczalica*** *(критично застрашен).*

При разработването на етилацетатната фракция, получена от тоталните метанолни екстракти от надземните части на трите вида *Alchemilla* са изолирани общо **24** съединения,

едно от които е новооткрито природно съединение [**36**, **40** и **65**]. Изолираните съединения са флавоноидни гликозиди главно от кемпферолов и кверцетинов тип. Направената подробна литературна справка за съдържание на флавоноиди във видове *Alchemilla* показа, че броят на изследваните видове е много малък (<10) в сравнение огромния брой видове в този род (повече от 300). Част от намерените от нас съединения са откривани и в други видове като *A. speciosa, A. vulgaris* и *A. xanthochlora,* но наличните данни не са достатъчни за хемотаксономични изводи.

Изучен е също и антиоксидантният капацитет на метанолен екстракт, фракции и индивидуални съединения от ***A. mollis*** и ***A. jumrukczalica*** чрез способността им да улавят DPPH радикали. Установено е, че етилацетатните фракции получени при течно-течна екстракция на тоталните екстракти са най-силни уловители на DPPH радикали. Новооткритото съединение, госипетин-3-*O*-β-D-галактопиранозил-7-*O*-α-L-рамнопиранозид показа сравнително добра антирадикалова активност [**36**]. Потвърдено е, че кверцетиновите гликозиди са по-добри радикал-уловители от кемпферол-3-галактозида и катехин [**65**].

1.3. Вторични метаболити във видове Heracleum (сем. *Apiaceae*):

Представителите на род ***Heracleum*** *(девесил), използвани като подправки и билки са богати на вторични метаболити с разнообразна биологична активност, но липсват задълбочени изследвания на видовете, разпространени в България.*

За първи път е изследвано съдържанието на фуранокумарини, антиоксидантния потенциал, ацетилхолинестеразната и α-амилазната инхибиторна активност на хексановите екстракти от 4 вида от род *Heracleum* – балканския енедмит ***H. verticillatum***, българския ендемит ***H. angustisectum***, ***H. sibiricum*** и ***H. ternatum***. Проведеният качествен ЯМР спектроскопски анализ позволи идентифицирането 9 фуранокумарина в хексановите екстракти от листа, корени и плодове. Най-висока DPPH радикал-улавяща активност и TEAC проявяват екстрактите от листа и плодове на *H. angustisectum.* Намерено е, че екстрактите от корени на *H. verticillatum* и *H.angustisectum* са най-ефективни при инхибиране на ацетилхолинестераза. Всички анализирани екстракти са слаби инхибитори на α-амилаза [**79**].

1.4. Вторични метаболити от *Arum palaestinum* (сем. Araceae)

От бутанолната фракция на водно-метанолен екстракт от лечебното растение ***Arum palaestinum*** с произход Йордания са изолирани 5 флавоноидни гликозида, 2 от които се съобщават за първи път в изследвания вид. Бутанолната фракция проявява значителна активност спрямо MCF7 и HepG2 клетъчни линии, а водно-метанолният екстракт – значителна противовирусна активност спрямо H5N1вирус [**68**].

2. Изследване на химичния състав на етерични масла от ароматични и лечебни растения и *ин витро* отгледани растения.

Изследван е съставът на 9 вида от семействата Asteraceae (*A. alba* [**44** и **52**], *Inula britannica* [**67**], *Inula aschersoniana* [71], *Inula oculus-christi* [**76**]), Lamiaceae (*Sideritis scardica* [41, **48** и **50**], *Panzeria lanata* [**49**] и *Thymus longedetatus* [**80**]) и Apiaceae (*Seseli rhodopeum* [**42**], *Seseli rigidum* [**51**]). С помощта на газова хроматография (GC) и газова хроматография–мас-спектрометрия (GC-MS) са регистрирани повече от 200 компонента. Съединенията са идентифицирани въз основа на техните мас-спектрални характеристики и време на задържане. Обогатени са познанията за етерично-маслените профили на изследваните видове, търсени са хемотаксономични зависимости и корелации между химичен състав и екологични условия, както и оценка влиянието на растежни регулатори върху натрупването на определени компоненти в *in vitro* отгледани растения. Някои по-съществени приноси са представени по-долу:

Изследван е етерично-маслениият състав на ***Sideritis scardica*** от 6 естествени находища в планините Пирин, Славянка и Родопите. Идентифицирани са 37 компонента, сред които α- и β-пинен, 1-октен-3-ол, фенилацеталдехид, β-бизаболен, бензилбензоат и m-камфорен са регистрирани като основни компоненти. Всички проби се характеризират с ниско съдържание на О-съдържащи моно- и сескитерпени (≤1.6 и 2.3%, съотв.). За изследване на вариациите в етеричномаслениия състав между различните популации е използван анализът на основните компоненти (PCA) и клъстерен анализ (CA). Установена е значителна вариабилност в химичния състав и зависимост между етерично-маслениия профил и екологичните условия на естествените хабитати [48].

Изследвано е също влиянието на екологичните фактори върху етерично-маслениия състав на девет проби ***S. scardica*** култивар. Установен е значителен химически полиморфизъм и връзка между химичния профил, надморската височина и климатичните условия, при които са отгледани растенията [50].

За първи път е изследван етерично-маслениия състав на ***Inula oculus-christi*** от българско находище. Регистрирани са 46 хроматографски пика, съставляващи 95.0% от етеричното масло. Маслото се характеризира с високо съдържание на О-съдържащи терпени (51.1%), мастни киселини (16.7%) и ароматни съединения (14.8%), а 1,8-цинеол и хексадеканова киселина са основни компоненти. Получените данни са сравнени с единствените досега публикувани за вида с произход Иран. Наблюдаваните повече разлики отколкото прилики в летливите компоненти са сходни с тези намерени за лактонния състав на тези 2 проби и са индикация за вътревидова изменчивост, дължаща се вероятно на специфичните екологични условия на двете страни и/или на генетични фактори [76].

При изследване на летливите компоненти в листа и цветове на ***I. britannica*** L. са регистрирани 83 компонента. Установено е, че маслата са богати на терпеноиди (57.85 и 77.28%), като сескитерпеноидите са преобладаващи. Виридифлорол, химачалол, 6,10,14-триметил-2-пентадеканон, 13-тетрадеканолид и 3-метил-4-пропил-2,5-фурандион са основни компоненти. Получените данни сравнени с наличните в литературата за 2 проби от Украйна и Китай показват отново съществени различия, подобно на тези за лактонния състав [67].

При изследване на летливите компоненти на ***I. aschersoniana*** са регистрирани 42 компонента. Маслото е богато на наситени мастни киселини (55.2%) и алкани (14.1%) и сравнително бедно на терпеноиди (16.7%). От групата на терпеноидите най-голяма е тази на О-съдържащите монотерпени (9.6%). Изследвана е също и връзката на вида с тази на видовете от агрегата *Inula verbascifolia*, за които има публикувани данни. Съгласно проведения клъстерен анализ (CA) изследваните видове се групират в 3 основни групи: с високо съдържание на алкани и мастни киселини, с почти еднакви количества на О-съдържащи монотерпеноиди, сескитерпенови въглеводороди и ароматни съединения и такива богати на терпеноиди (91.6%) [71].

Изследван е етерично-маслениия състав на 5 проби от надземни части на ***Artemisia alba*** отгледани в *in vitro* условия. Сравнението проведено на базата на 34 компонента, регистрирани в концентрации повече от 0.5% в поне една от пробите позволи дефинирането на два основни типа масла. Първият тип се характеризира с високо съдържание на сескитерпеноиди (с основни компоненти гермакрен Д и бициклогермакрен). Във втория тип масло преобладават О-съдържащите монотерпеноиди и по-специално т. нар. неправилни монотерпеноиди (йомоги алкохол, артемизиа алкохол и артемизиа кетон). Установено е съществено влияние на растежните регулатори върху етерично-маслениия състав. Така например, О-съдържащите монотерпеноиди доминират в контролата и в пробите, в които липсват добавки от цитокинини. Неправилните монотерпеноиди преобладават в контролата и в пробата с висока добавка на индол-3-маслена киселина. Добавянето на 6-бензиладенин в хранителната среда води до

значително увеличение на съдържанието на сескитерпеноиди и намаляване това на монотерпеноидите [44].

За разлика от надземните, подземните части на *in vitro* отгледаните ***A. alba*** продуцират главно сескитерпеноиди. Тази съществена разлика особено в пробите, при които се наблюдава силно коренообразуване поражда въпроса за възможна транслокация на тези съединения от надземните към подземните части на растенията и/или съществуването на два отделни биогенетични пътища в тези органи [52].

3. Сравняване на различни техники за екстракция на биологично активни вещества от лечебни растения

Тези изследвания са продължение на изследванията в нашата лаборатория с оглед оптимизиране на условията за извличане на биологично активни вещества от лечебни растения [23, 24 и 33].

Проследено е влиянието на концентрацията на етанол, времето на екстракция, температурата и броя на екстракционните стъпки върху количеството на алантолактон и изоалантолактон в корени от бял оман (***I. helenium***) в условията на ултразвукова екстракция. За количествено определяне на двата лактона е използван ГХ метод. Сравняването с класическите екстракционни методи (мацерация, инфузия и микродестилация-екстракция) показа, че ултразвуковата екстракция на корени от бял оман с 70 и 96% етанол води до по-добро извличане на сескитерпеновите лактони в сравнение с класическата мацерация за 24 ч [30].

4. Количествено определяне на биологично активни вещества в лечебни растения

Класическите спектрофотометрични методи, хроматографските (GC, HPLC и др.) и спектроскопски методи (ЯМР) за количествено определяне на основни групи съединения (общо фенолно съдържание, общо съдържание на флавоноиди, танини и др.) и на основни компоненти в екстракти са използвани с оглед качествен контрол, проучване на фактори повлияващи вторичния метаболизъм на лечебни растения, оценка на ефективността при опити за тяхното култивиране, търсене на връзка с биологичното действие на екстрактите и на хемотаксономични връзки и др. Резултатите от тези **интердисциплинарни** изследвания имат не само **научни**, но и **научно-приложни приноси**.

4.1. Сескитерпенови лактони в *Arnica montana*

Известно е, че сескитерпеновите лактони и по-специално на тези от хеленалинов тип са отговорни за активността на билката A. montana. Затова и опитите за нейното култивиране са насочени към оптимизиране на условията за повишаване на качеството на билката, т.е. към повишаване на количеството на хеленалиновите сескитерпенови лактони.

Изследвано е съдържанието на сескитерпенови лактони и лактонния профил на *A. montana* L. в *in vitro* и *in vivo* размножени растения от семена с произход Германия, Украйна и Австрия и отгледани в две различни експериментални полета и събрани във фази на пълен цъфтеж и семеобразуване. Използван е ГХ метод за количествено определяне на сескитерпенови лактони. Намерено е, че *in vitro* размножените двугодишни растения във фаза пълен цъфтеж акумулират по-високи количества лактони в сравнение с *in vivo* размножените 3-годишни растения и тези във фаза семеобразуване. Хеленалините преобладават в *in vivo* размножените 2-годишни или в *in vitro* размножените 3-годишни растения. 2-Метилбутиратът (2MeBu) е основния естер в пробите, в които преобладават хеленалини, докато изобутиратът (iBu) – в пробите, в които доминират 11,13-дихидрохеленалините. Резултатите показват, че екологичните условия в планината Витоша са по-благоприятни за култивиране на *A. montana,* водещи до по-високо съдържание на сескитерпенови лактони [62].

4.2. Вторични метаболити в *Centaurea davidovii*.

Ендемичният C. davidovii Urum. се среща на много ограничени места във флористичен район Стара планина, което налага предприемане на мерки за неговото запазване чрез някои in situ и ex situ консервационни действия. В сътрудничество с колеги от ИБЕИ, са отгледани in vitro култури при различни условия – в агарова среда без и с добавки от растежни регулатори и в течна среда, които по-късно са ex vitro адаптирани и аклиматизирани във естествени условия.

Натрупването на *фенолни съединения и флавоноиди* е проследено чрез спектрофотометрични методи, а това на *сескитерпеновия лактон* 8α-(5'-хидроксиангелоил)-салонитенолид чрез HPLC. Установена е зависимост между количеството на вторичните метаболити и растителната среда, в която са отгледани растенията. Най-високите концентрации на вторични метаболити са открити в аклиматизираните растения по време на пълен цъфтеж. Съдържанието на сескитерпеновия лактон достига стойност от 56.2 mg/g DW, която е няколко пъти по-висока от тази в другите проби. Получените резултати са обещаващи и показват ефективността, както на биотехнологичния подход за размножаване и консервация на редки и застрашени видове, така и на възможността *ex vitro* адаптираните растения *C. davidovii* да бъдат използвани като източник на вторични метаболити с потенциална биологична активност [**59**].

4.3. Общо съдържание на фенолни съединения и флавоноиди във видове *Artemisia alba, Inula britannica и I. oculus-christi*

Изследвано е също общото съдържание на фенолни съединения и флавоноиди в екстракти от листа и цветове на *A. alba, I. britannica* и *I. oculus-christi*, както и техния антиоксидантен капацитет спрямо DPPH˙и $ABTS^{\cdot+}$ с помощта на спектрофотометрични методи. Наблюдавана е корелация между общото съдържание на фенолни съединения и антирадикаловата активност. Установено е, екстрактът от цветове на *A. alba* притежава по-добра антирадикалова активност и е с по-високо съдържание на фенолни съединения и флавоноиди в сравнение с екстракта от листа [**74**]. Аналогични резултати са получени и при изследване на *I. oculus-christi*, т. е. цветовете са по-богати на тези групи съединения и по-добри уловители на свободни радикали [**66**]. Метанолните екстракти както от цветове, така и от листа на *I. britannica* са с по-високо съдържание на фенолни съединения и флавоноиди и по-добра антирадикалова активност в сравнение с съответните хлороформените екстракти [**64**].

4.4. Общо съдържание на флавоноиди и танини във видове *Alchemilla*

Като част от проект на ИБЕИ за опазване и устойчиво използване на високопланински защитени, ендемични и редки лечебни растения са проведени опити за култивиране на 3 вида от род Alchemilla, а за оценка на ефективността на тези опити е определено спектрофотометрично количеството на флавоноиди и танини в съответните проби.

Сравняването на проби *A. mollis* от *in vitro* култивиране (в различни среди и растежни регулатори), от *ex vitro* адаптиране и аклиматизиране показа най-високо съдържание на флавоноиди в пробите отгледани *in vitro* в контролната MS среда и в *ex vitro* адаптираните растения. Най-богати на танини са в пробите отгледани в ½ MSA среда и в *ex vitro* адаптираните растения [**47**].

Култивирането *ex situ* на *A. mollis, A. achtarowii* и *A. jumrukczalica* в две високопланински експериментални полета (Витоша и Западни Родопи) показа, че то може да бъде успешно в условия близки до естествения ареал на тези растения и не води до съществени различия в съдържанието на флавоноиди и танини. По-съществени различия са наблюдавани в съдържанието на тези групи съединения в зависимост от възрастта на растението, отколкото между растенията отгледани в двете различни опитни полета. *A.*

jumrukczalica се оказа най-богата на флавоноиди и танини, следвана от *A. mollis* и *A. achtarowii*. Установено е също, че флавоноидите се акумулират главно в листната маса на растенията, а танините – в цветоносните стъбла. *A. mollis* цветоносните стъбла продуцират повече флавоноиди и танини от тези на *A. achtarowii* и *A. jumrukczalica* [54].

4.7. Фуранокумарини във видове *Heracleum*

За количественото определяне на фуранокумарини в различните растителни части (листа, плодове и корени) на 4 вида *Heracleum* е използвана ЯМР спектроскопия. Установено е, че тяхното количеството варира в широки граници като най-богати на този клас природни съединения са корените и плодовете. Корените на всички изследвани видове се характеризират със съдържание на един основен компонент – изопимпинелин. Бергаптен и императорин са основни съединения в плодовете на *H. sibiricum* и *H. verticillatum*, съответно, а биакангеликол – в плодовете на *H. angustisectum* и *H. ternatum.* Установено е сходство във фуранокумариновия профил на българският ендемит *H. angustisectum* и *H. ternatum*. Данните от анализа на балканския ендемит *H. verticillatum* са в съответствие с литературните данни за този вид от български произход, докато данните от анализа на *H. sibiricum* показват както прилики, така и различия с тези публикувани в литературата. Трябва да се отбележи, че получените от нас резултати са в съответствие с хемотаксономичната класификация на видовете в род *Heracleum* предложена от Ušjak et al, съгласно която *H. verticillatum* трябва да бъде отделен от *H. sphondylium* групата поради много различния фуранокумаринен състав на плодовете му. Химичният профил на новоизследвания вид *H. angustisectum* е сходен с този на *H. sibiricum* и *H. ternatum* и следователно може да бъде поставен в същата група [79].

Перспективи за научни изследвания през следващите 5 години:

През следващите 5 години ще продължат изследванията в тематичните направления, по които работя и сега, а именно:

- фитохимични изследвания на лечебни, ароматични, ендемични, ин витро култивирани и неизследвани до сега растения, целящи откриване на нови биологично активни вторични метаболити (терпеноиди и фенолни съединения) и търсене на хемотаксономични връзки и връзка структура-биологична активност;
- използване на съвременни методи за екстракция и структурно охарактеризиране на биологично активни вещества от лечебни растения и от отпадни продукти от производства, използващи ароматични и лечебни растения;
- разработване на методи за количествено определяне на биологично активни вещества в лечебни растения и/или за стандартизиране на продукти от тях;

Част от тези изследвания са свързани с участието ми в проектите на ИОХЦФ-БАН по Програма Хоризонт 2020 на ЕК, Националната научна програма „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“ и Центъра за компетентност за устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти.

Ще продължат научните изследвания, както чрез активно сътрудничество в рамките на ИОХЦФ и българската научна общност (ИБЕИ-БАН, БФ-СУ и др.), така и чрез международни сътрудничества с колективи от Университета в Белград (Сърбия), от Анадолския Университет (Турция), Университета в Кайро (Египет) и с Чешката Академия на науките и др.