



Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



Катедра „Ботаника и методика на обучението по биология“

ВЕНЕЛИН ХРИСТОВ ПЕТКОВ

**ФИТОХИМИЧНО И БИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА
РАСТЕНИЯ С ВЪЗМОЖНОСТ ЗА ФАРМАЦЕВТИЧНО
ПРИЛОЖЕНИЕ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“
област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление: 4.3. Биологически науки
докторска програма: Ботаника



Научни ръководители:

проф. д.х.н. Марияна Димитрова Аргирова

доц. д-р Пламен Стефанов Стоянов

Пловдив, 2021 г.

Дисертационният труд се състои от 121 страници. Той е онагледен с 32 фигури и 15 таблици. В библиографията са включени 225 литературни източника (от които 3 на кирилица).

Експерименталните изследвания са проведени в научните лаборатории на: катедра „Ботаника и МОБ“ на Биологическия факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, катедра „Биология на развитието“ на Биологическия факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, катедра „Химични науки“ на Фармацевтичния факултет при МУ – Пловдив, катедра „Медицинска физика и биофизика“ на Фармацевтичния факултет при МУ – Пловдив, и Института по органична химия с център по фитохимия – БАН, филиал Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Ботаника и методика на обучението по биология“ при Биологическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“ (Протокол №144/13.04.2021 г.).

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 02.07.2021 г. от 13.00 ч. в 14 аудитория на Биологическия факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“ (гр. Пловдив, ул. „Тодор Самодумов“ №2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Научно жури:

проф. д-р Анели Методиева Неделчева (рецензия)

проф. д-р Димчо Захариев Иванов (рецензия)

проф. д-р Иванка Жечева Димитрова-Дюлгерова (становище)

проф. д.х.н. Марияна Димитрова Аргирова (становище)

доц. д-р Илия Желев Славов (становище)

Автор: Венелин Христов Петков

Тема на дисертационен труд: Фитохимично и биологично проучване на растения с възможност за фармацевтично приложение.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

AChE	ацетилхолинестераза
ACh	ацетилхолин
AU	абсорбционни единици
DM	сухо вещество
DPPH	1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал
FM	свежа маса
GA	галова киселина
GC-FID	газ-хроматография с пламъчно-йонизационен детектор
HPLC	високоэффективна течна хроматография
ICP-MS	индуктивно-свързана плазма – масспектрометрия
IC50	50% инхибираща концентрация
LC-MS	течна хроматография с масдетекция
MIC	минимална инхибираща концентрация
QE	кверцетин
RNS	реактивни азотни форми
RONS	реактивни кислородни и азотни форми
ROS	реактивни кислородни форми
SD	стандартно отклонение
SOD	супероксид дисмутаза
TA	танинова киселина
UHPLC/MS	ултрависокоэффективна течна хроматография с масдетекция
UV	ултравиолетова

Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не следва тази в дисертационния труд.

ВЪВЕДЕНИЕ

Познанията за лечебните растения са стари колкото човешката цивилизация. Одомашняването на растенията и животните и появата на земеделие в Плодородния полумесец (Горна Месопотамия), провело се при благоприятни условия на околната среда, вдъхновява и задвижва общностите за насърчаване на използването на фитотерапията. Всъщност археологически и текстови данни разкриват, че използването на растения и техните производни за лечение на човешка патология е допринесло за нашето разбиране за науката, за медицината и лечението, която се е родила в люлката на процъфтяващите древни цивилизации: Месопотамия и земята между реките Тигър и Ефрат (днешен Ирак). В по-ново време хората по света са търсили и използвали растения за лечение на много болести още преди откриването на широк спектър от биоактивни фитохимични съединения, включително антиоксиданти.

Папратообразните растения (Pteridophytes) имат дълга геоложка история на земята като растения пионери, които колонизират нашата планета в продължение на милиони години. Понастоящем различни видове папрати по света се използват за лечение на различни заболявания, най-вече в развиващите се страни, където растителните продукти все още заемат значително място в първичното здравеопазване по културни и икономически причини.

Папратите в България са слабо проучени видове от фитохимична и фармакологична гледна точка в сравнение с други сухоземни растения.

Род *Asplenium* се състои от около 650 вида и е разпространен в целия свят. Фитохимични и биологични изследвания върху рода показват наличието на широк спектър от вторични метаболити и антиоксидантен потенциал. Няма научни данни за фитохимични и биологични изследвания за българските популации на видовете папрати *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*, принадлежащи към род *Asplenium*, макар че и трите вида са включени в списъка на лечебните растения.

Asplenium ceterach L.= *Ceterach officinarum* Willd. (Лечебна златиста папрат) е вид дребна папрат с късо коренище, покрито с черни нишковидно заострени люспи. Листата са с къса дръжка, която към основата обикновено е чернокафява. Листните петури са пересто нарязани, кожести, презимуващи, дълги от 6 до 20 см. Горната им страна е зелена, а долната е покрита със сребристи или кафяви люспи. Сорите са продълговати до линейни, трудно забележими под люспите (фигура 1А). Расте по варовити, сухи, скалисти припечни места до 1500 м надморска височина. Разпространена основно в Западна и Централна Европа (фигура 1Б). В България се среща почти из цялата страна, предимно в по-южните и по-топли области.

Златистата папрат е включена в Закона за лечебните растения. Листата (*Ceterach officinari folium*) се използват в народната медицина против кашлица, като диуретично и

затягащо средство. Златистата папрат се употребява вътрешно, под формата на отвара, или външно, под формата на лапи срещу болки в ставите.

Asplenium scolopendrium L. = *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman (Обикновен волски език) е сравнително неголяма папрат с късо коренище, в горната част покрито с люспи. Листата са широко ланцетни, целокрайни, достигащи дължина от 15 – 30 см (фигура 2А). Сорите са линейни, дълги, разположени в две редици. Видът е разпространен основно в Европа, рядко в Северна Америка (фигура 2Б). В България расте по влажни сенчести места в горите в почти цялата страна до 1800 м надм. в., с изключение на Тракийската низина, Тунджанската хълмиста равнина и Черноморското крайбрежие.

Asplenium scolopendrium е лечебно растение, включено в Закона за лечебните растения. Използва се запарка от листата (*Scolopendrii folium*). Има противовъзпалително, омекчаващо, отхрачващо, диуретично, дезинфекционно действие, успокоява кашлицата. Употребява се при бронхит, трахеит, кашлица, гръдна жаба, воден плеврит, при жлъчни и бъбречни възпалителни заболявания, нефрит, албуминурия, за лечение на диария, дизентерия, болести на далака и черния дроб. Външно се използва като мехлем за лечение на хемороиди, изгаряния и опарвания.

Asplenium trichomanes L. (Обикновено изтравниче) е дребна папрат с дебело коренище, покрито с кафяви люспи. Листата са прости, перести, дълги от 5 до 20 см, презимуващи, с червеникавокафява листна дръжка и многобройни листни дялчета (от 15 до 40). Сорите са продълговати, разположени от долната страна (фигура 3А). Космополитен вид (фигура 3Б). В България се среща навсякъде по сенчести скалисти места и скални пукнатини до 1700 м надм. в.

Asplenium trichomanes е растение, включено в Закона за лечебните растения. С лечебни цели се прилага запарка от надземната част на растението (*Trichomanes herba*), а по-рядко от неговите корени. Извлекът, направен от листата, има облекчаващо болката, отхрачващо и слабително действие. Той е бил използван при лечение на оплаквания в областта на гърдите и за стимулиране на менструацията. Прилага се също за лечение на страхова невроза, сърдечна невроза, паническо разстройство, уплаха, от където идва и другото му име – страшниче. Повлиява благотворно косопад и маточни възпаления; срещу ставни болки се използва за налагане на местата с лапи.

Въпреки голямото изобилие на папрати в България, широкото разпространение на рода *Asplenium*, множеството известни приложения на тези папрати в народната медицина, за съжаление не могат да бъдат намерени систематизирани съобщения относно химичния им състав. Само отделни вторични метаболити са били идентифицирани без да е ясна тяхната роля в терапевтичните приложения, за които претендира народната медицина. *Asplenium ceterach*,

Asplenium scolopendrium и *Asplenium trichomanes* са достъпни, незащитени растителни видове, и тяхното изучаване може да даде научна обосновка на лечебните им свойства, известни от народната медицина, както и да разкрие техния потенциал за бъдещи фармакологични приложения. В допълнение към вторичните метаболити с ниска молекулна маса, папратите съдържат значителни количества протеини, мазнини, въглеhidрати и микроелементи, което е причината да се използват като храна в много страни. За разлика от африканските, азиатските, страните от Близкия изток, Централна и Южна Америка в България тези растения не са източник на храна и се използват най-вече с декоративна цел. Изолирането и изследването на такива макронутриенти в папратите може да разкрие нови възможности за тяхното практическо приложение.



Фигура 1. *Asplenium ceterach*. А – надземна част; Б – разпространение.



Фигура 2. *Asplenium scolopendrium*. А – надземна част; Б – разпространение.



Фигура 3. *Asplenium trichomanes*. А – надземна част; Б – разпространение.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел на дисертационния труд е да се изследва химичният състав на надземни части от три вида папрати от рода *Asplenium* и чрез *in vitro* методи да се очертаят възможни фармакологични приложения на техни екстракти.

За постигане на тази цел са поставени за решаване следните експериментални задачи:

1. Да се направи количествен анализ на съдържанието на основни градивни вещества (протеини и липиди), както и елементен анализ на важни от биологична гледна точка микроелементи.

2. Да се определи количественото съдържание на основни класове вторични метаболити в растенията (полифеноли, флавоноиди, танини, въглехидрати и др.).

3. Чрез хроматографски методи да се определи съдържанието на някои от основните нискомолекулни биологичноактивни съединения в органичните екстракти.

4. Чрез *in vitro* експерименти да се тестват антиоксидантните, антимикробните, цитотоксичните и антихолинестеразните свойства на екстракти от растенията.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Растителният материал от *Asplenium ceterach* е събиран през есента на 2018 и 2019 година до Асенова крепост, гр. Асеновград. Съгласно флористичното зонироване на Република България мястото на събиране на растителния материал попада във флористичен район Тракийска низина.

Растителният материал от *Asplenium scolopendrium* е събиран през есента на 2018 и 2019 година на територията на Природен парк „Българка“, в близост до кв. Ябълка на гр. Габрово. Съгласно флористичното зонироване на Република България мястото на събиране на растителния материал попада във флористичен район Стара планина.

Растителният материал от *Asplenium trichomanes* е събиран през есента на 2018 и 2019 година на територията на Природен парк „Българка“, в близост до кв. Ябълка на гр. Габрово. Съгласно флористичното зонироване на Република България мястото на събиране на растителния материал попада във флористичен район Стара планина.

Растителен материал от трите вида папрати е идентифициран от доцент д-р Пламен Стоянов (катедра „Ботаника и методика на обучението по биология“ към Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“) и образци от трите вида

папрати са депозирани в Хербариума на Аграрния университет – Пловдив, (SOA) под номера *Asplenium ceterach* L. (No 062643), *Asplenium scolopendrium* L. (No 062644) and *Asplenium trichomanes* L. (No 062649).

Всички използвани **реактиви** за настоящите изследвания бяха с възможно най-висока аналитична чистота и бяха доставени от Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, освен ако изрично не е посочен друг производител. Разтворителите, използвани при хроматографските анализи, бяха с чистота за LC-MS. При всички експерименти бе използвана дейонизирана вода със съпротивление най-малко 18 MΩ. За снемане на електронни спектри и спектрофотометрични анализи беше използван спектрофотометър Spectronic Camspec M550 (Spectronic Camspec Ltd, UK).

Съдържанието на биологично важни **микроелементи** в изсушен растителен материал бе определено с ICP-MS. Количеството **протеини и липиди** беше определено чрез използване на одобрени от ISO методи. Индивидуалният мастнокиселинен състав бе определен чрез GC-FID.

Нискомолекулни биологичноактивни вещества бяха изолирани чрез екстракция със 70% метанол и екстракция с дейонизирана вода. Основните класове вторични метаболити в екстрактите от папрати (общи феноли, флавоноиди, танини, въглехидрати) бяха количествено определени чрез използване на подходящи спектрофотометрични методи. Някои индивидуални вторични метаболити бяха количествено определени чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с UV детектор или ултарвисокоефективна течна хроматография с масдетектор (UHPLC-MS).

Изследванията върху фармакологичния потенциал на получените екстракти от трите вида папрати включваха:

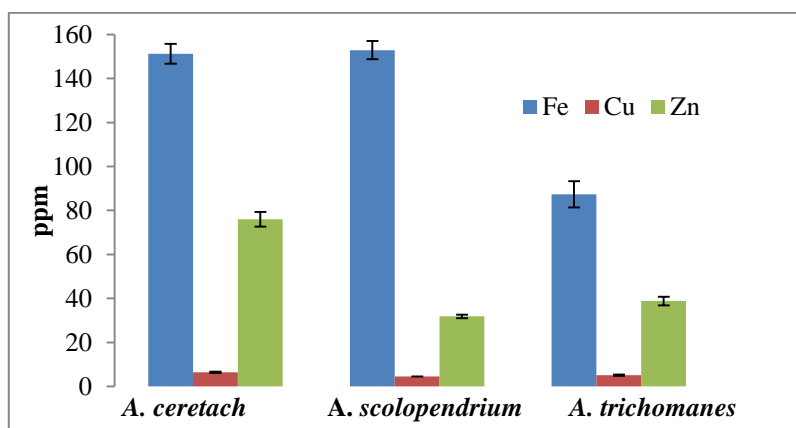
- определяне на **антиоксидантни свойства** на екстрактите чрез използване на два метода – радикал-улавящи свойства спрямо DPPH и общ желязо-редуциращ капацитет;
- оценка на **антимикробни свойства** на екстракти чрез агар дисково-дифузионен метод и определяне на минималната инхибираща концентрация (MIC);
- провеждане на *in vitro* тестове за **цитотоксичност и антитуморна активност**;
- проучване на възможна **антихолинестеразна активност** чрез използване на стомашни гладкомускулни препарати от плъх.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Микроелементен анализ

В това проучване определихме съдържанието на четири биологично важни микроелемента в трите вида *Asplenium*: желязо, мед, цинк и селен. Използван бе методът индуктивно свързана плазма – масспектометрия (ICP-MS).

Количествата на определените чрез ICP-MS микроелементи са показани на фигура 4. Нивата на селен (Se) във всички изследвани проби беше под 30 ppb. Докато изсушените папрати съдържаха много сходни количества на мед и цинк, количеството желязо беше с 1 – 2 порядъка по-високо, особено в *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium*. Трябва да се отбележи, че тези две папрати са събрани от твърде отдалечени популации, докато *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* са от близки популации. Това изключва разликите в почвените и климатичните условия да се отразява в съдържанието на желязо в *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*. Тъй като няма систематични изследвания за съдържанието на микроелементи в папратите от рода *Asplenium*, е трудно да се сравнят нашите резултати с папрати от други популации.



Фигура 4. Съдържание на микроелементи в листа от трите вида папрати. Резултатите са средни стойности от четири скана.

2. Съдържание на протеини и липиди

В литературата липсват данни за съдържанието на протеини и мазнини в изследваните три вида папрати. Greeshma & Sridhar (2019) са сравнили състава на 20 ядливи папрати. Техният състав варира между 0.6 – 24.1% протеин и 0.2 – 21.5% липиди (спрямо сухото вещество). Видовете *Asplenium*, изследвани в нашето проучване, са в средата на тези много широки граници. Съдържанието на протеини слабо варира при отделните видове: 13.6%, 18.4% и 14.3% от теглото на изсушеното растение съответно за *Asplenium ceterach*,

Asplenium scolopendrium и *Asplenium trichomanes*. Установени са подобни незначителни вариации в съдържанието на масло в изсушения растителен материал: съответно 4.0%, 3.1% и 3.3% за *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*.

Общоприето е схващането, че растителните масла са богати на ненаситени мастни киселини. Наистина едно проучване върху 23 вида папрати от 12 рода показва, че полиненаситените мастни киселини са 54.5 – 89.6% от общото съдържание на мастни киселини (Nekrasov *et al.*, 2019). Определянето на индивидуалния мастнокиселинен състав показва, че съдържанието на масло и в трите изследвани вида от род *Asplenium* е доминирано от наситени мастни киселини, особено палмитинова киселина (фигура 5). Мастните киселини са форма на съхранение на енергия и техният синтез *de novo* отразява различната адаптация към околната среда. Папратите обикновено растат на сенчести и хладни места; това стимулира синтеза на наситени мастни киселини, които са по-богати на енергия от ненаситените. *Asplenium ceterach* е най-богатата на полиненаситени омега-3 и омега-6 мастни киселини. Маслата от изследваните папрати съдържат някои необичайни мастни киселини с нечетен брой въглеродни атоми, макар и в малко количество.



Фигура 5. Разпределение на мастните киселини в трите вида папрати.

3. Обща характеристика на екстрактите от трите вида папрати

За екстракция на нискомолекулни вторични метаболити от надземни части на трите вида папрати бяха използвани два разтворителя. Водният 70% метанолов разтвор е най-широко използваният разтворител за извличане на умерено полярни съединения, между които полифенолните киселини и флавоноиди. Обикновено тези съединения са свързани чрез водородни връзки към растителните структури и прибавянето на вода намалява здравината на тези връзки. За целите на някои от биологичните тестове, при които беше невъзможно използването на метанолови екстракти, екстракцията беше направена с дейонизирана вода.

Всички екстракции бяха проведени при съотношение растителен материал:екстрагент 1:10 (w/v) и бяха извършени трикратно. Екстракцията със 70% метанол

бе проведена чрез студена мацерация, а водните екстракти бяха получени при кипене в продължение на 30 min.

Екстракционният добив от растителните материали и минералното съдържание на тези екстракти са представени в таблица 1. Данните в нея показват, че водата като екстрагент извлича по-голямо количество вещество от растителния материал в сравнение със 70% метанол. Могат да бъдат посочени поне две причини за това. На първо място, високата температура, при която се извършва водната екстракция, благоприятства разтворимостта на редица вещества. На второ място, растенията съдържат значително количество водоразтворими неорганични соли, които не могат да бъдат извлечени в метанол.

Както се вижда от данните от фитохимичния скрининг и антиоксидантните анализи, представени по-нататък, водният и водно-метаноловият извлек имат сходен качествен състав по редица от изследваните показатели. Тези резултати показват, че водните извлекци, използвани в народната медицина като запарки или настойки, съдържат значително количество биологичноактивни съединения с потенциални терапевтични свойства.

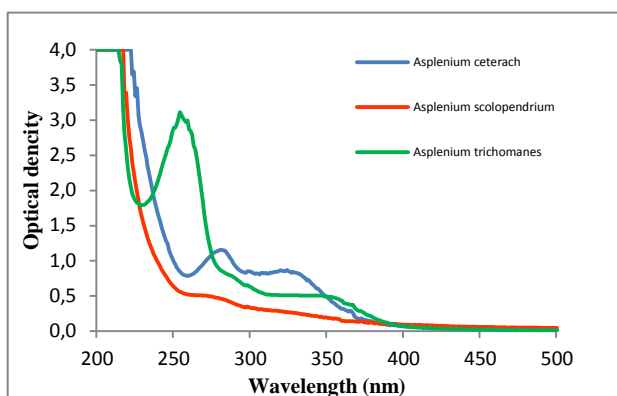
Макар че *in vitro* биологични тестове обикновено се провеждат в присъствие на физиологични буфери с висок буферен капацитет, ако изследван екстракт притежава силно кисело или силно алкално рН, то това би могло да повлияе точността и коректността на провежданото изпитване. Ето защо бе проверена киселинността на получените екстракти преди използването им за биологични изпитвания. Потенциометричното измерване на рН на водни извлекци с еднаква концентрация (1 mg/mL) от трите вида изследвани папрати показва стойности, близки до неутралния пункт – 6.04, 6.21 и 6.26 съответно за *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*.

Таблица 1. Екстракционен добив в съответния разтворител и минерално съдържание на извлекци от трите изследвани вида папрати. Данните са средни стойности от три екстракционни процедури ± стандартно отклонение.

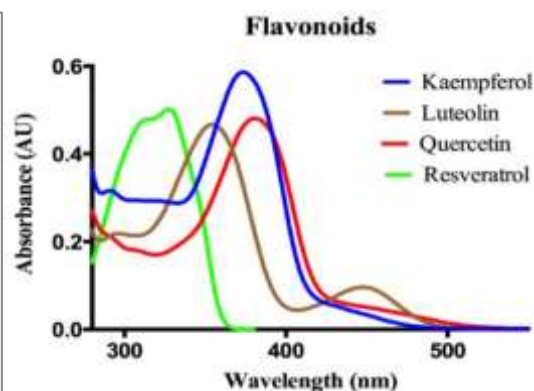
Вид папрат	Екстрахирано вещество спрямо сух растителен материал	(%)	Минерално съдържание на екстракта	(%)
	70% метанол	Дейонизирана вода	70% метанол	Дейонизирана вода
<i>Asplenium ceterach</i>	19.8 ± 0.8	30.7 ± 2.3	12.4 ± 1.8	30.0 ± 3.8
<i>Asplenium scolopendrium</i>	10.83 ± 0.7	20.0 ± 1.1	17.2 ± 2.6	37.5 ± 4.5
<i>Asplenium trichomanes</i>	17.5 ± 0.7	22.1 ± 1.4	24.0 ± 4.5	48.5 ± 6.8

Електронните спектри на екстракти, получени от трите вида папрати, бяха снети в интервала 200 – 500 nm (фигура 6А) и очертаха съществени качествени и количествени разлики в състава им. Спектърът на *Asplenium ceterach* показва наличие на два основни хромофора с максимуми на поглъщане при 281 и 324 nm; в спектъра на *Asplenium scolopendrium* липсваха ясноочертани абсорбционни максимуми, докато в спектъра на *Asplenium trichomanes* бе регистрирана интензивна абсорбция при λ_{\max} 254, която най-често се дължи на присъствие на неспрегнато ароматно ядро.

Тъй като флавоноидите са основен клас вторични метаболити в растенията, притежаващи хромофори, бяха сравнени електронните спектри (по литературни данни) на някои често срещани флавоноиди със спектрите на извлекци от трите вида изследвани папрати. Характерната за стандартните флавоноиди абсорбция (фигура 6Б) при 368 nm (кемпферол), 371 nm (кверцетин) и 370 nm (изорамнетин) липсва в снетите електронни спектри на екстрактите от папрати, което показва, че съдържанието на свободни флавоноиди вероятно е твърде ниско, за да бъде регистрирано в тази сложна смес, тъй като агликоните имат ниска разтворимост във вода.



Фигура 6А. UV-VIS спектри на водни екстракти от трите папрати. Концентрациите на разтворите са посочени в глава „Материали и методи“.



Фигура 6Б. Спектри на някои флавоноиди (по Karak, 2019).

4. Фитохимичен скрининг

Поради голямото разнообразие на представители на отделните класове вторични метаболити резултатите от спектрофотометричните анализи обикновено се представят като еквиваленти на избрано стандартно съединение от съответния клас съединения.

4.1. Общо фенолно съдържание

Резултатите за общото съдържание на полифеноли бяха представени като еквиваленти галова киселина в mg (GAE). Най-високо бе общото фенолно съдържание на

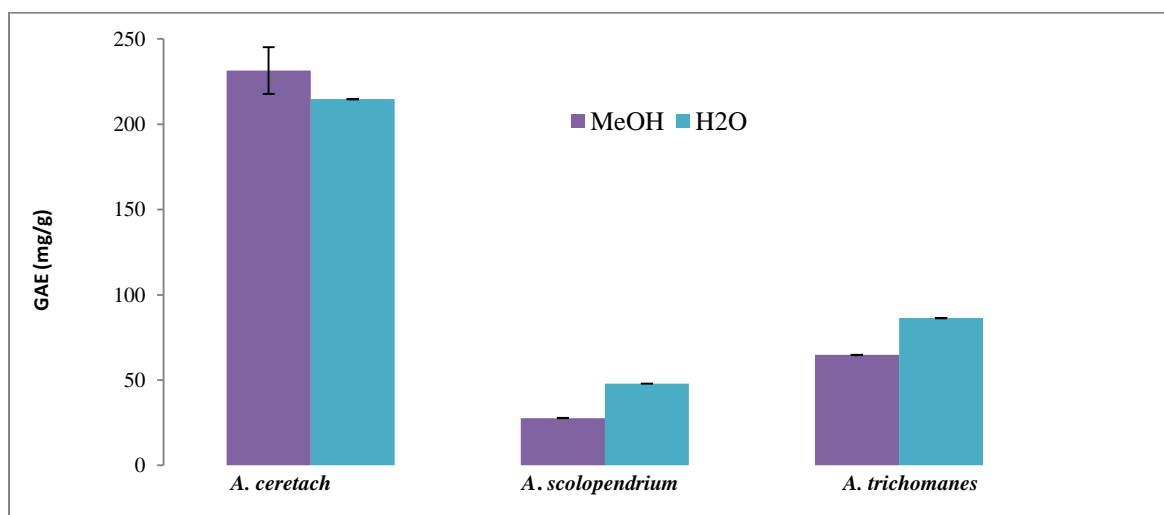
екстрактите от *Asplenium ceterach* (фигура 7); и двата вида екстракти (воден и 70% метанолов) съдържаха над 200 GAE/g сухо вещество в екстракта. Статистически значими бяха разликите между двата вида екстракти за всеки вид папрат поотделно ($p < 0.01$).

В изследване Berk и колеги (Berk *et al.*, 2011) намират 95.14 ± 2.46 GAE/g за водни екстракти на *Asplenium ceterach*, докато друго проучване съобщава само 27.54 ± 0.34 GAE/g за такива екстракти (Kazazic *et al.*, 2016).

Според съдържанието на общото фенолно съдържание Lai & Lim (2011) разделят папратите на 4 групи (съдържанието е представено спрямо свежа маса – FM – на папратта):

- папрати с много високо общо фенолно съдържание (21 – 32 mg GAE/g FM): *Cyathea latebrosa*, *Cibotium barometz*, *Drynaria quercifolia*, *Dicranopteris linearis* и *Blechnum orientale*;
- папрати с високо общо фенолно съдържание (10 – 19 mg GAE/g FM): *Adiantum raddianum* и *Pteris vittata*;
- папрати със средно общо фенолно съдържание (5 – 9.9 mg GAE/g FM): *Acrostichum aureum*, *Nephrolepis biserrata*, *Diplazium esculentum*, *Pityrogramma calomelanos*, *Lygopodium circinnatum* и *Pyrrosia nummularifolia*;
- папрати с най-ниско общо фенолно съдържание (3.20 – 2.00 mg GAE/g FM): *Pteris venulosa* и *Microsorium punctatum*.

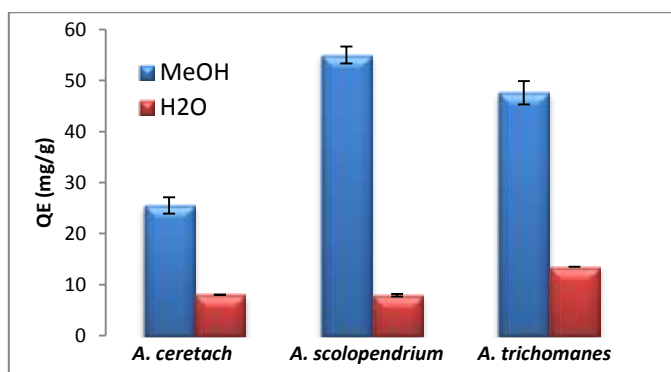
Като се има предвид, че средно от 7 kg свежа папрат се получава около 1 kg изсушен растителен материал, то може да се изчисли, че *Asplenium ceterach* се отнася към папрати с много високо фенолно съдържание, *Asplenium scolopendrium* – към тези с високо, а *Asplenium trichomanes* има умерено фенолно съдържание.



Фигура 7. Общо фенолно съдържание на водно-метанолен и воден екстракт от трите вида папрати. Показани са данни от три измервания; резултатите са представени в еквиваленти галова киселина (GAE) в mg за грам сухо вещество в екстракта.

4.2. Съдържание на флавоноиди

Съдържанието на слабополярните флавоноиди в 70% метанолови екстракти беше 3 – 6 пъти по-високо от това във водните екстракти и при трите изследвани вида папрати (фигура 8). Флавоноидната концентрация във водно-метаноловите екстракти от *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* се различаваше значимо, както между тях самите, така и спрямо флавоноидното съдържание в екстракта от *Asplenium ceterach*.



Фигура 8. Съдържание на флавоноиди във водни и 70% метанолови екстракти от *A. ceterach*, *A. scolopendrium* и *A. trichomanes*. Резултатите са средни стойности от три измервания и са представени в еквиваленти кверцетин (QE) в mg за грам сухо вещество в екстракта.

4.3. Съдържание на танини (mg TAE/g DM)

Танините също принадлежат към групата на фенолните съединения и тяхното съдържание в 70% метаноловите екстракти беше значително по-високо от това на водните екстракти (таблица 2).

Приложеният метод за количествено определяне на танини се основава на утаяването на серумен албумин от компонентите на екстракта и не прави разлика между различните видове танини – хидролизируеми и кондензирани. Утаяването на протеини от танините се дължи на образуване на водородни връзки между многобройните фенолни групи в структурата на танините и полипептидната верига.

Таблица 2. Съдържание на танини във екстракти от трите вида изследвани папрати. Резултатите са представени като еквиваленти танинова киселина (TAE) в mg за g сухо вещество.

Вид папрат	Метанолов екстракт	Воден екстракт
<i>Asplenium ceterach</i>	43.8 ± 0.4	30.0 ± 0.1
<i>Asplenium scolopendrium</i>	31.3 ± 0.6	4.5 ± 0.1
<i>Asplenium trichomanes</i>	10.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1

4.4. Съдържание на въглехидрати

Според авторите на приложения метод той позволява количествено определяне не само на монозахариди, но и на олиго- и полизахариди, а също така и гликозиди. Нагриването на въглехидратите в присъствие на конц. H_2SO_4 предизвиква хидролиза на гликозидните връзки и дехидратация на получените монозахариди до фурфурал или хидроксиметилфурфурал, а тези алдехиди образуват цветен кондензационен продукт с антрона.

Резултатите, представени в таблица 3, показват, че въглехидратите представляват съществена част от сухото вещество на екстрактите, но методът не дава информация дали те са моно-, олиго- или гликозидно свързани въглехидрати. Водно-метаноловите екстракти имат по-високо съдържание на въглехидрати от водните, което е изненадващо, като се има предвид добрата разтворимост на моно- и олигозахариди във вода. От друга страна, както вече беше подчертано, водните екстракти съдържат значително количество неорганични соли, които са част от сухото вещество на екстрактите и затова относителният дял на определяните органични съединения е по-нисък. Подобни закономерности бяха наблюдавани и при количественото определяне на флавоноиди и танини и те могат да бъдат обяснени по същия начин. Единствено общото фенолно съдържание имаше съизмерими стойности за двата екстракта от всеки вид папрат. Едно възможно обяснение на този факт ще бъде представено в раздела, обсъждащ антиоксидантните свойства на екстрактите.

Проведеният фитохимичен скрининг показва, че както 70% метаноловите, така и водните екстракти, съдържат измерими количества от вторични растителни метаболити, с които най-често се свързва биологичната активност на растения и техни водни извлеци. Тези резултати дават основание да се изследват различни биологични свойства на екстрактите.

Таблица 3. Съдържание на въглехидрати във водно-метанолови и водни екстракти от изследваните папрати. Резултатите са представени в еквиваленти глюкоза (GE) в mg за g сухо вещество в екстракта).

Вид папрат	Метанолов екстракт (mg GE/g DM)	Воден екстракт (mg GE/g DM)
<i>Asplenium ceterach</i>	711 ± 23.3	280.8 ± 17.0
<i>Asplenium scolopendrium</i>	731 ± 44.5	138.0 ± 15.2
<i>Asplenium trichomanes</i>	879.9 ± 55.5	319.2 ± 0.9

5. Количествен анализ на индивидуални вторични метаболити чрез хроматографски анализ

Въпреки че спектрофотометричните методи са бързи и прости, липсва им специфичността за конкретни съединения. Прилагането на хроматографски техники

позволиха разделянето и идентифицирането на различни полифеноли в анализираните екстракти.

5.1. Количествен анализ на фенолни киселини чрез високоефективна течна хроматография

Изборът на стандарти за хроматографския анализ на 70% метанолови екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* беше направен по литературни данни за съдържанието на полифенолни киселини в различни видове папрати. Анализът показва, че от десетте търсени и най-често срещани в тези растения фенолни киселини (галова, 3,4-дихидрокси бензоена, хлорогенова, кафеена, ферулова, *p*-кумарова, синапова, розмаринова, цикореева и канелена киселина) в изследваните разтвори бяха открити три – синапова, пара-кумарова и розмаринова киселина (таблица 4). Възможно е някои други от търсените киселини също да присъстват, но техните концентрации да са под границата на откриваемост на метода. Най-богат на фенолни киселини беше екстрактът от *Asplenium trichomanes*.

Таблица 4. Съдържание на някои полифенолни киселини в метанолов екстракт от папрати. Резултатите са представени като mg киселина в 1 g сухо вещество в екстракта.

ПАПРАТИ	Съдържание на фенолни киселини (mg/g)		
	Синапова киселина	<i>p</i> -Кумарова киселина	Розмаринова киселина
<i>Asplenium ceterach</i>	4.048	-	-
<i>Asplenium scolopendrium</i>	1.721	0.339	-
<i>Asplenium trichomanes</i>	-	4.746	3.801

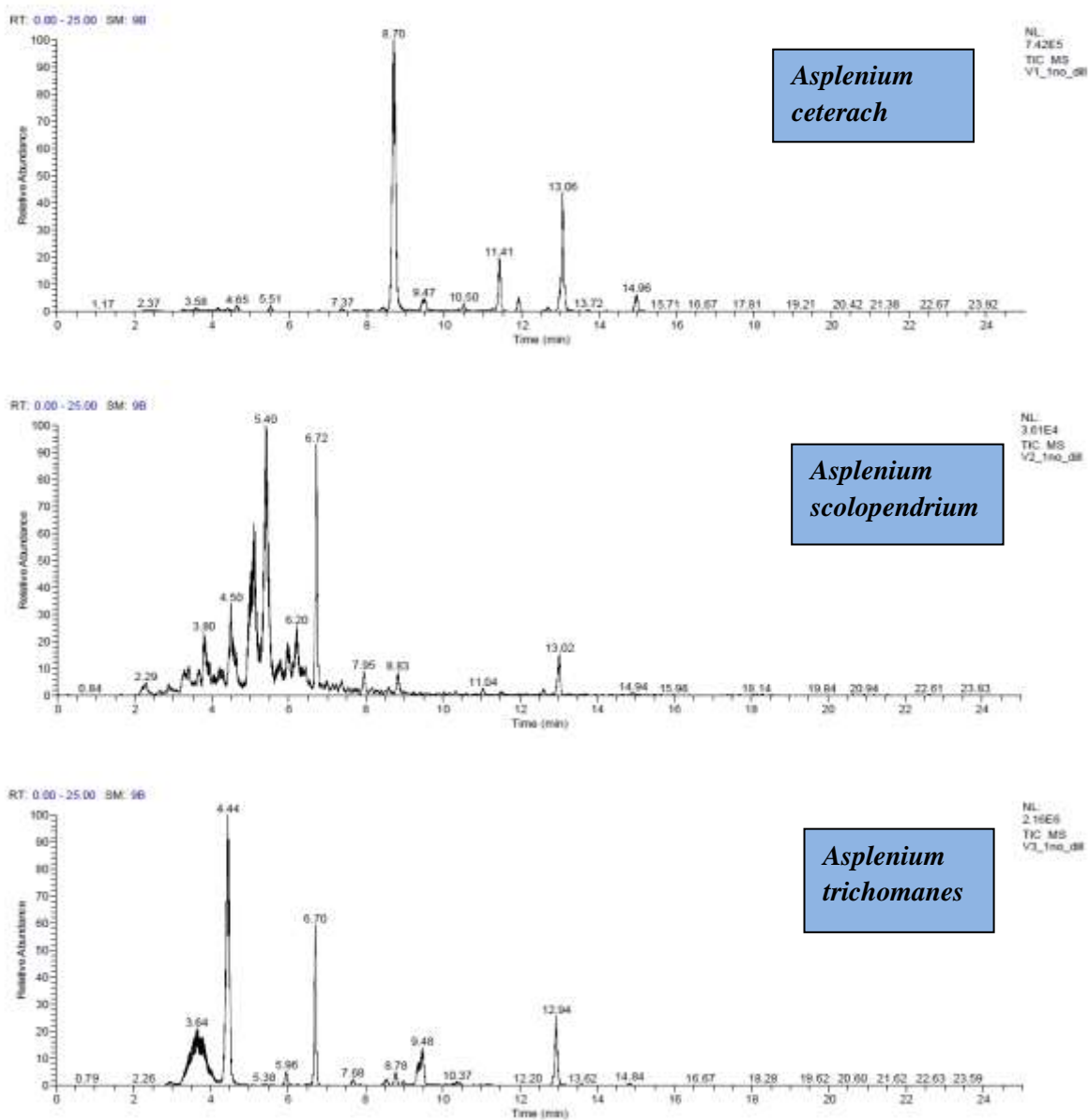
Трябва да се отбележи, че при анализа бяха определени само свободните киселини, докато в растенията те често са под формата на гликозиди или естери с органични киселини.

5.2. Индивидуални флавоноиди, определени чрез UHPLC/MS

Използването на хроматографски метод за разделяне, съчетан с троен квадруполен масдетектор, позволи да се определят количествата на някои индивидуални флавоноиди в тяхната свободна негликозилирана форма. Освен по-високата чувствителност на масдетектора в сравнение с тези, основаващи се на UV-абсорбция, той позволява да се проследяват определени фрагментации на търсените анализи (т.н. преходи) и по този начин се осигурява висока селективност по отношение на търсеното съединение.

При използваните хроматографски условия кверцетинът имаше време на задържане 13.0 min, кемпферолът – 14.9 min и изорамнетинът – 15.1 min. На фигура 9. са показани

хроматограмите на екстракти в 70% метанол от трите вида папрати, а в таблица 5. са представени количествата на отделните флавоноиди.



Фигура 9. Хроматографски профили на 70% метанолови екстракти от три вида папрати.

Таблица 5. Съдържание на три флавоноида в 70% метанолови екстракти от изследваните папрати.

Вид папрат	Кверцетин ($\mu\text{g/g}$)	Кемпферол ($\mu\text{g/g}$)	Изорамнетин ($\mu\text{g/g}$)
<i>Asplenium ceterach</i>	0.40	4.90	0.02
<i>Asplenium scolopendrium</i>	0.01	0.10	0.01
<i>Asplenium trichomanes</i>	1.10	2.86	0.02

Макар че рутинът е гликозид на кверцетина и други автори съобщават за неговото присъствие в папрати от род *Asplenium*, в изследваните екстракти неговото количество беше под границата му на откриваемост. Определените количества свободни агликонни (кверцетин, кемпферол и изорамнетин) бяха доста ниски. От друга страна, многобройни проучвания доказват, че биологичните ефекти на флавоноидите се дължат главно на агликонни и когато гликозилираните флавоноиди се приемат перорално чрез храната, те обикновено се хидролизират до агликонни, за да предизвикат ефекти *in vivo* (Xiao, 2017). По този начин за експериментите *in vitro* (антимикробни, антивирусни, цитотоксични и др.) количествата агликонни могат да бъдат по-важни от общото (агликонни + гликозиди) съдържание на феноли и флавоноиди.

6. Антиоксидантни свойства на екстракти от папрати

6.1. Радикалсвързващ капацитет (DPPH метод)

Измерването на радикалсвързващия капацитет показва висока степен на линейност между изследваните концентрации на екстрактите и количеството уловен DPPH радикал. На базата на линейните уравнения бе изчислена концентрацията на екстракта, която улавя 50% от наличния в разтвора DPPH радикал. Съществуват различни варианти на този метод, които използват различни концентрации на DPPH и различни обеми от неговия разтвор. При избрания метод изходната концентрация на реагента – 60 μM , дава оптимална за количествени измервания абсорбция (~ 0.6 AU), а използваният обем осигурява наличие на 105 nmol радикал.

Най-висок радикал-улавящ капацитет показаха екстрактите от *Asplenium ceterach*, а най-нисък – тези от *Asplenium scolopendrium* (таблица 6). Измерванията бяха направени трикратно и не показаха статистически значими разлики между водните и 70% метанолови екстракти.

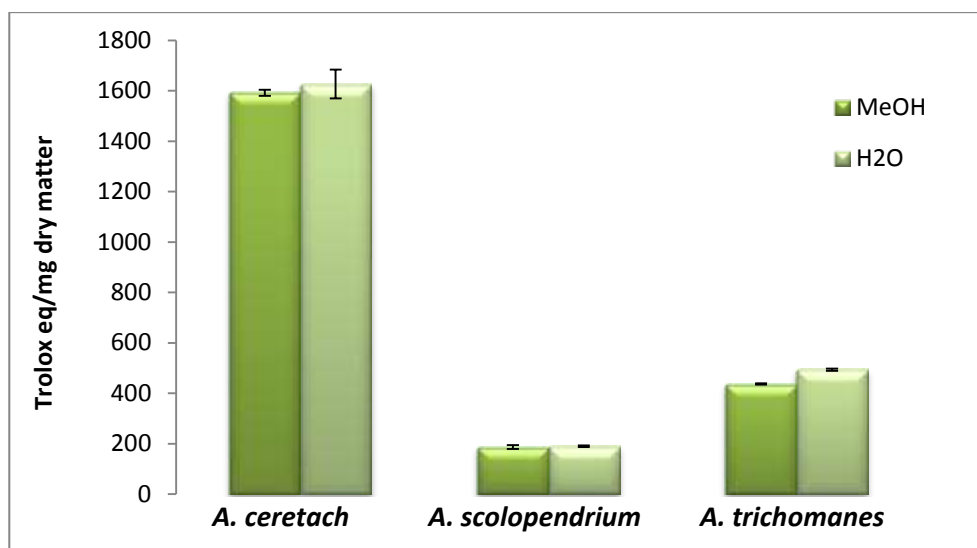
Таблица 6. Количество сухо вещество от екстракта (μg), което улавя 50% от присъстващия в сместа DPPH радикал (~ 50 nmol).

ПАПРАТИ	Антирадикална активност (IC_{50})	
	Метанолен екстракт	Воден екстракт
<i>Asplenium ceterach</i>	14 ± 0.8	19 ± 1.3
<i>Asplenium scolopendrium</i>	139 ± 12.1	122 ± 7.8
<i>Asplenium trichomanes</i>	65 ± 8.3	59 ± 2.1

6.2. Желязо-редуциращ капацитет

Теоретично, добрият антиоксидант трябва да бъде добър редутор и количественото определяне на редуциращата способност по отношение на Fe (III) се използва широко за оценка на антиоксидантните свойства на растителни екстракти, богати на биологично активни вещества, които притежават силни електрон-отдаващи способности. Подобно на анализа за определяне на общо фенолно съдържание този метод използва пренос на електрон от редутор до Fe (III), който се редуцира до Fe (II) и той се определя количествено чрез измерване на образуването на пурпурен цвят на негово координационното съединение с Ferrozine.

Желязо-редуциращият капацитет на водните и водно-метаноловите екстракти не се различаваше значимо (фигура 10), като най-добри редуционни свойства имаха съдържащите се в екстрактите от *Asplenium ceretach* съединения.



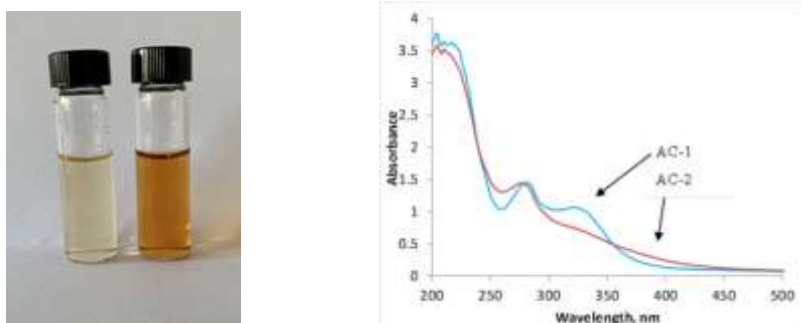
Фигура 10. Желязо-редуциращ капацитет на 70% метанолови и водни екстракти от три изследвани вида папрати.

Данните от този анализ корелираха много добре с тези за общото фенолно съдържание ($R^2 = 0.987$); установена бе и много добра корелация между данните от двата антиоксидантни метода ($R^2 = -0.891$).

6.3. Промяна в свойствата на метаноловия екстракт от *Asplenium ceterach* след отделяне на йони на преходни метали

Тъй като повечето използвани методи за определяне на антиоксидантна активност или капацитет използват окислително-редукционни взаимодействия между метални йони, бе предположено, че някои от йоните на преходните метали, които се съдържат в растенията,

биха могли да повлияват резултатите от тези анализи. Интерес представляват главно желязните и медните йони, които имат две степени на окисление. Тъй като съдържанието на метални йони в едно и също растение е един твърде променлив фактор, зависещ от географско местонахождение, сезонните климатични условия, вида на почвата, замърсяването на околната среда и др., ние предположихме, че елиминирането на тези метални йони в растителните екстракти ще доведе до елиминиране на един толкова непостоянен фактор, влияещ върху резултатите от антиоксидантните методи; като резултат може по-надеждно да бъдат сравнявани антиоксидантните свойства на растителни продукти от различен произход. За да се провери тази хипотеза, бе избран метаноловият екстракт от *Asplenium ceterach* поради най-високото общо съдържание на желязни и медни йони в този вид папрат. Той бе предварително обработен с йонообменната смола Chelex – стиролов дивинилбензен съполимер, съдържащ иминодиацетатни йони. Тази смола има силна селективност по отношение на йони на мед, желязо и други тежки метали. След обработка на екстракта с Chelex (в натриева форма) бе наблюдавана промяна в цвета, в UV спектъра (фигура 11) и рН на разтвора.



Фигура 11. Промяна на цвета и електронния спектър на екстракт от *Asplenium ceterach* преди (AC-1) и след (AC-2) обработка с Chelex.

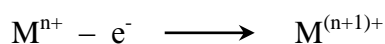
Тъй като рН е стойност, която се отнася за водни разтвори, двата метанолови екстракта бяха разредени с вода до концентрация 1 mg/mL сухо вещество. Измерените стойности на рН при 25.0°C бяха съответно 6.51 и 7.68 за нехелатирания и хелатирания екстракт; т.е. промяна по посока на по-алкални стойности с ΔpH 1.17. Тази промяна на рН на хелатирания екстракт към по-високи стойности предполага заместване на координационно свързани йони на преходните метали с йонно свързан натрий от Chelex смолата. Малко вероятно е обаче тази разлика в рН да оказва влияние върху резултатите от антиоксидантните анализи, тъй като общото съдържание на полифеноли се измерва в основна среда (рН ~ 10) и DPPH анализът се провежда в метанол. Освен това тези анализи използват малки обеми от растителни екстракти в сравнение с общия обем на анализирания разтвор. Прилагането на трите антиоксидантни метода показва статистически значими

разлики в свойствата на двата екстракта – нативния и обеднелия на метални йони разтвор (таблица 7).

Таблица 7. Антиоксидантни свойства, определени чрез 3 метода, на водно-метанолови екстракти от *Asplenium ceterach* преди и след обработка с йонообменна смола Chelex. Показаните стойности са средни от три успоредни проби ± стандартно отклонение. Статистически значимите разлики са оценени чрез р-стойността и за такива са приетети стойности, при които $p < 0.05$.

Вид екстракт	Общо фенолно съдържание (GAE/g DM)		Желязо-редуциращ капацитет (Trolox eq/g DM)		Радикал-свързващи свойства ($\mu\text{g IC}_{50}$)	
	Mean ± SD	P	Mean ± SD	P	Mean ± SD	P
Нехелатиран	2108 ± 60		15974 ± 32		35 ± 0.4	
Хелатиран	1649 ± 9	0.0002	10947 ± 63	0.00001	53 ± 1.4	0.0003

При всички анализи по-добри антиоксидантни свойства показва нативният екстракт. Ако приемем, че в редукционната среда на растителните клетки желязните и медните йони са предимно в своята редуцирана форма – Fe^{2+} и Cu^+ и хелатирани от полифеноли, това би могло да обясни по-високия редуциращ капацитет на необработения растителен екстракт, който е намалял след отстраняване на йони на преходни метали Chelex. В тази ниска степен на окисление желязните и медни йони могат да отдават електрони и също могат да проявяват редукционни свойства, подобно на органичните антиоксиданти, които електрони се приемат:



Резултатите от това проучване показват, че металните хелати се екстрахират в 70% метанол, както се вижда от промените в цвета, UV-VIS спектрите и рН на екстрактите след обработка със смола Chelex. Тези хелатирани йони са редокс активни, тъй като тяхното присъствие или отсъствие в екстрактите дава различни резултати в анализите, основани на единичен електронен трансфер. По отношение на тяхното редокс състояние получените резултати за антиоксидантната активност на естествените и хелатирани екстракти показват, че Fe (II) и/или Cu (I) най-вероятно преобладават, но не е ясно дали това са йоните, естествено присъстващи в растителните източници, или те са получени по време на изолирането на растителни антиоксиданти.

Предложеният метод за предварителното почистване на растителните екстракти от редокс активни метални йони (желязни и медни йони) може да подобри възпроизводимостта на антиоксидантните методи и позволява по-надеждно сравнение на антиоксидантните свойства на определени ботанически видове от различен географски произход.

7. Антимикробна активност

Проучена бе *in vitro* антимикробната активност на екстракти от трите вида папрати срещу 14 микроорганизми по два различни метода – първичен скрининг чрез агар дисково-дифузионния метод и определяне на минималната инхибираща концентрация (MIC). Като положителни контроли заедно с растителните екстракти бяха анализирани антибиотиците пеницилин и нистатин. В приложената концентрация 10 mg/mL екстрактите проявяват антимикробна активност срещу пет щама (*Escherichia coli* ATCC 25922; *Proteus vulgaris* ATCC 6380; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Candida utilis* ATCC 42402; *Fusarium moniliforme* ATCC 38932). Инхибиращата зона за *Escherichia coli* ATCC 25922 достига 8 mm, а за останалите пет щама – 9 mm. Положителните контроли показват силен инхибиращ ефект – нистатин, спрямо всички гъбични щамове, а пеницилин – срещу *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (таблица 8).

Във втория етап от изследването бе определена MIC на екстрактите, показали антимикробна активност (таблица 9). *Bacillus subtilis* ATCC 19659 беше чувствителен само към екстракт от *Asplenium ceterach* и показа MIC 10 mg/ml. Най-ниската MIC (2.5 mg/ml) е на *Asplenium ceterach* срещу *Escherichia coli* ATCC 25922 и е два пъти по-ниска от тази на *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*. Всички екстракти проявяват инхибираща активност към *Proteus vulgaris* ATCC 6380 и *Candida utilis* ATCC 42402 с MIC 10 mg/ml. Подобен ефект беше наблюдаван при тестването им срещу *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium*, MICs 5 mg/ml и *Asplenium trichomanes*, MIC 10 mg/ml). Гъбичките *Fusarium moniliforme* ATCC 38932 бяха чувствителни към тестваните извлеци и показаха MIC 5 mg/ml.

Антибактериалният ефект на папрати е проучен и от други автори ([Chew et al., 2009](#); [Lai et al., 2009](#)). Грам-положителните бактерии са по-чувствителни към екстрактите от папрати в сравнение с Грам-отрицателните. Наличието на външна мембрана при Грам-отрицателните бактерии затруднява дифузията на екстрактите през мембраната към цитоплазмата на клетката, което ги прави по-устойчиви на антимикробни агенти ([Delcour, 2009](#)).

Особено добре са проявени антимикотичните свойства на папратите ([Sahayaraj et al., 2009](#)). Предполага се, че фунгицидната им активност се дължи на наличието на фенолни съединения в тях ([Singh, 1999](#)). Необходими са допълнителни проучвания за потвърждаване на тази хипотеза.

Изследваните екстракти от папрати показаха доста умерена антимикробна активност в сравнение с добре познатите пеницилин и нистатин. Въпреки това антимикробната

резистентност, резултат от употребата на различни антимикробни лекарства (антибиотици, противогъбични, антивирусни, антималярийни и противоглистни средства), е глобален и актуален проблем за СЗО (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>). В този смисъл някои растителни източници, притежаващи макар по-ниска антимикробна активност в сравнение с конвенционалните антимикробни лекарства, могат да помогнат при намирането на нови обещаващи терапевтични форми за преодоляване на антимикробната резистентност или могат да се използват като модифициращи резистентността агенти.

Таблица 8. Размер на инхибиращата растежа на микроорганизми зона (mm), получена при прилагане на екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrim* и *Asplenium trichomanes*. Диаметърът на ямката е 6 mm.

Микроорганизми	Концентрация на жизнеспособни клетки, *10 ⁷ cfu/cm ³	<i>Asplenium ceterach</i>	<i>Asplenium scolopendrim</i>	<i>Asplenium trichomanes</i>	Пеницилин 10 mg/ml	Нистагин 20 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.1	8	8	8	-	N/A
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	9	-	-	-	15	N/A
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	1	9	9	9	-	N/A
<i>Salmonella abony</i> NCTC 6017	1.2	-	-	-	-	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5.1	9	9	9	25	N/A
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1	-	-	-	20	N/A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBIMCC 1370	1	-	-	-	-	N/A
<i>Candida albicans</i> NBIMCC 74	2	-	-	-	N/A	15
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	1.4	9	-	-	-	N/A
<i>Candida utilis</i> ATCC 42402	1.8	9	9	9	N/A	26
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	1	-	-	-	N/A	30
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 28089	2.3	-	-	-	N/A	28
<i>Fusarium moniliforme</i> ATCC 38932	1.2	9	9	9	N/A	18
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	1.2	-	-	-	N/A	25

Легенда: „-“ – няма инхибиция; N/A – неприложимо.

Таблица 9. Минимални инхибиращи концентрации (mg/mL) на екстрактите от три вида папрати по отношение на чувствителните към тях микроорганизми.

Микроорганизъм	<i>Asplenium ceterach</i>	<i>Asplenium scolopendrium</i>	<i>Asplenium trichomanes</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2.5	5	5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	10	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	5	10
<i>Fusarium moniliforme</i> ATCC 38932	5	5	5
<i>Candida utilis</i> ATCC 42402	10	10	10

8. Антитуморна активност

8.1. *In vitro* цитотоксичност и антитуморна активност на екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*

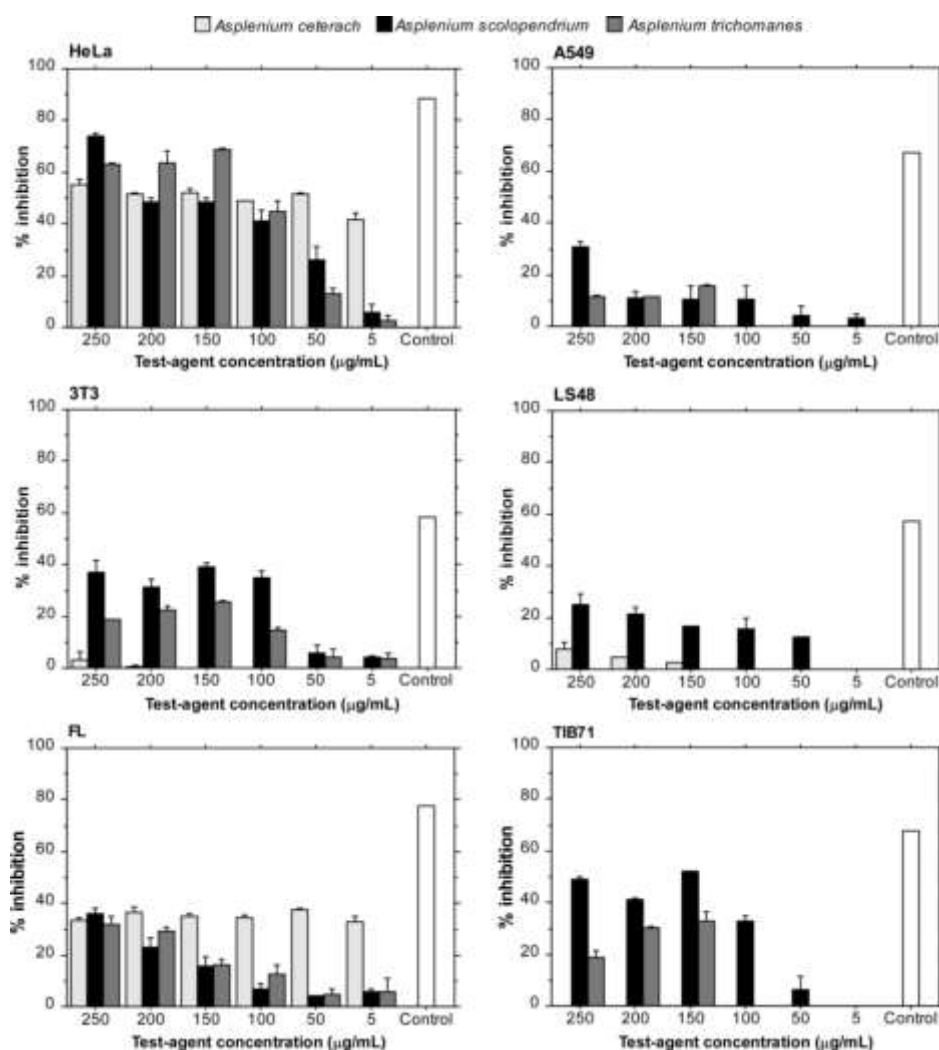
Получените екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* бяха изследвани по отношение на *in vitro* потенциала им за цитотоксичен и антитуморен ефект, използвайки 6 клетъчни линии – 3 човешки (HeLa, A549, FL) и 3 миши клетъчни линии (LS48, 3T3, ПИВ71 /означавана още като RAW 264.7/). Използвано бе оцветяване на мъртвите и увредени клетки с тетразолиева сол МТТ. Най-висока чувствителност към трите тествани екстракта проявиха HeLa клетките. Беше отчетен значителен цитотоксичен ефект, на база на който бяха изчислени IC₅₀ стойности и за трите екстракта (таблица 10).

Таблица 10. Концентрация на екстракта, която инхибира развитието на 50% от клетките в изследваната HeLa култура в сравнение с нетретирана контрола.

Екстракт	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Asplenium ceterach</i>	40.48 ± 6.47
<i>Asplenium trichomanes</i>	120.68 ± 4.7
<i>Asplenium scolopendrium</i>	204.83 ± 3.6

Тези данни показват, че екстрактът от *Asplenium ceterach* има най-силен цитотоксичен ефект, тъй като предизвиква 50% инхибиране при концентрация около 40 µg/mL, докато при другите два екстракта IC₅₀ надвишава 100 µg/mL. Високият *in vitro* цитотоксичен ефект спрямо HeLa клетките е показател и за антитуморна активност, тъй като

при нетуморната човешка клетъчна линия FL бе отчетен по-слаб ефект. Заедно с това, изявената антитуморна активност е селективна, тъй като при другата човешка карциномна клетъчна линия (A549) не се наблюдава значителна цитотоксичност. Нещо повече, екстрактът от *Asplenium ceterach* не оказва инхибиращ ефект върху A549 клетките. При тази клетъчна линия най-силен токсичен ефект прояви екстрактът от *Asplenium scolopendrium* при концентрация 250 µg/mL (фигура 12).



Фигура 12. Концентрация – ефект зависимости на проявената цитотоксичност на екстракти от *A. ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* спрямо различни клетъчни линии. Посочената във всички графики контрола (положителна контрола) представлява % инхибиране, получен след третиране на клетките с 50 µg/mL митомидин С.

Налице е интересна тенденция: дори и при ниска приложена концентрация (5 µg/mL) екстрактът от *Asplenium ceterach* предизвиква значим % инхибиране, близък до резултатите, получени при тестване на по-високи концентрации от екстракта. Това се наблюдава както при HeLa, така и при FL клетъчната линия, като нивото на токсичност при HeLa клетките е по-високо.

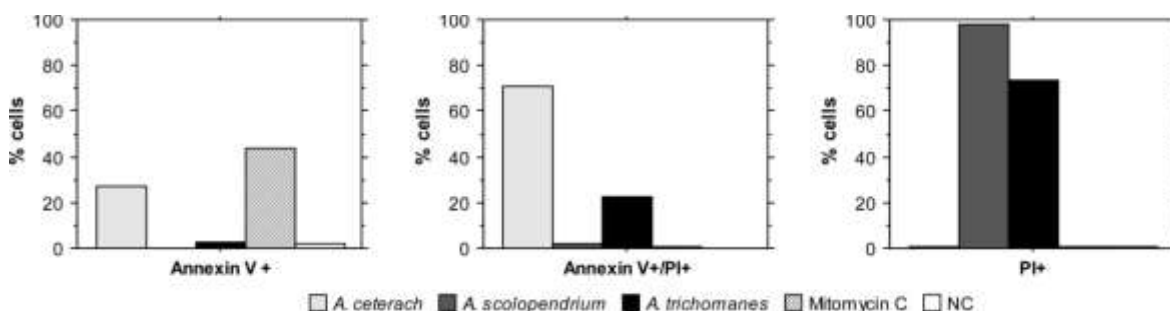
Най-силен *in vitro* цитотоксичен ефект спрямо мишите клетъчни линии прояви екстрактът от *Asplenium scolopendrium*. 3T3 клетъчната линия показва най-висока чувствителност спрямо изследваните проби – % инхибиране бе отчетен при тези клетки дори и при ниски тест-концентрации от екстрактите от *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*. Клетъчната линия LS48, отличаваща се с висока инвазивност и пролиферативна активност, демонстрира най-ниска чувствителност спрямо тестваните екстракти в сравнение с другите две миши клетъчни линии.

И при трите миши клетъчни линии не бе отчетено значително инхибиране при третиране с екстракт от *Asplenium ceterach*, което свидетелства за видово-специфичен ефект и по-висока чувствителност на човешки клетки спрямо този екстракт.

8.2. Изследване на проапоптотичен ефект на екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*

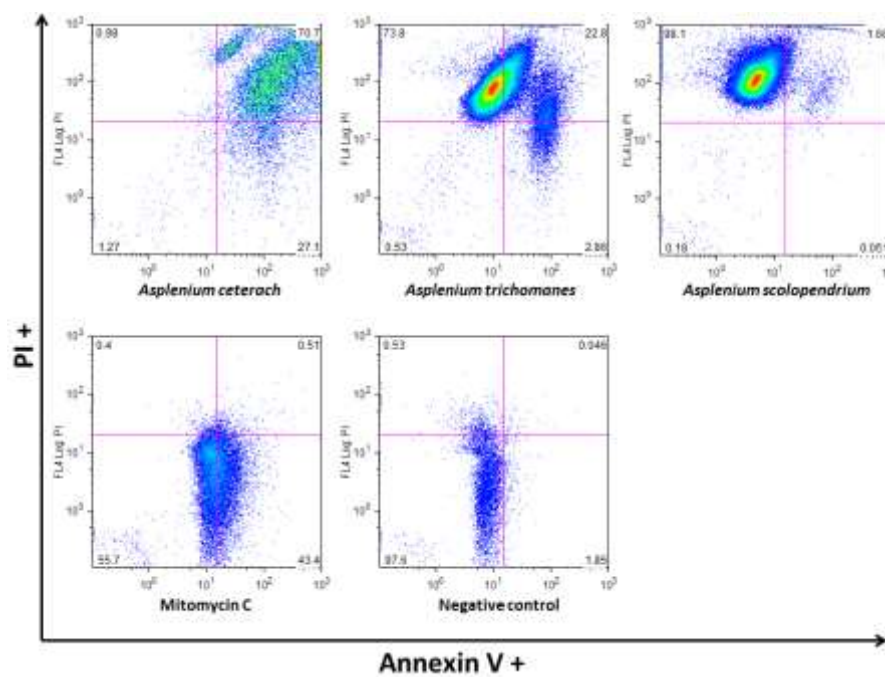
Проведеният флоуцитометричен анализ демонстрира значителен проапоптотичен ефект при третиране на HeLa клетки с екстракт от *Asplenium ceterach*. Отчетен бе изключително висок процент клетки на етап късна апоптоза или вторична некроза (Annexin V +/PI +). Заедно с това бе налице и значим процент апоптотични клетки (Annexin V +) подобно на положителната контрола от третирани с митомицин С клетки. Тези резултати показват, че токсичният ефект на екстракта от *Asplenium ceterach* се дължи на високия му потенциал за индукция на програмирана клетъчна смърт (фигура 13А).

Завишен процент Annexin V +/PI + клетки се наблюдава и при третиране с екстракт от *Asplenium trichomanes*. Тези данни също кореспондират с отчетените *in vitro* цитотоксични ефекти – налице е по-нисък потенциал за индукция на програмирана клетъчна смърт в сравнение с екстракта от *Asplenium ceterach*, което съответства на получените по-високи IC50 стойности за *Asplenium trichomanes* (необходимо е прилагане на по-висока концентрация от екстракта, за да се постигне 50% инхибиране на клетъчното развитие).



Фигура 13А. Количествена оценка на проапоптотичните свойства на екстрактите.

Екстрактът от *Asplenium scolopendrium* не предизвиква програмирана клетъчна смърт, което предполага различен механизъм на действие в сравнение с другите два екстракта. Тази хипотеза е подкрепена от получените резултати, тъй като флоуцитометричният анализ показва висок брой некротични клетки (PI+) при пробите, третирани с екстракт от *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* (фигури 13А и Б).



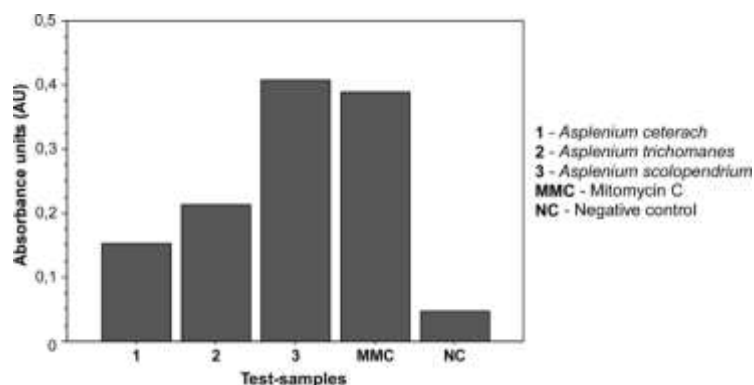
Фигура 13Б. Резултати от оцветяване с Annexin V. Annexin V + клетъчна популация представлява апоптичните клетки в изследваната проба. Annexin V +/PI + популацията включва клетките на късен етап от апоптозата и клетките, засегнати от вторична некроза (некроптоза).

8.3. Анализ на маркер за оксидативен стрес (активност на супероксид дисмутаза)

При проведения колориметричен тест стойността на абсорбционните единици (AU) е пропорционална на количеството супероксиден анион. Следователно намаляването на абсорбцията в присъствие на изследваните екстракти се отчита като инхибиращ ефект върху активността на SOD.

На фигура 14. са отразени AU, отчетени след третиране на HeLa клетки за 24 часа. Намалена абсорбция е налице при пробите, третирани с екстракт от *Asplenium ceterach* и *Asplenium trichomanes*. Отново най-силен ефект се отчита при екстракта *Asplenium ceterach*. На база на тези данни може да бъде заключено, че екстрактите от *Asplenium ceterach* и *Asplenium trichomanes* индуцират оксидативен стрес, който би могъл да предизвика процес на програмирана клетъчна смърт при третираните култури от HeLa клетки. Отчетеният

проапоптичен ефект на екстрактите от *Asplenium ceterach* и *Asplenium trichomanes* подкрепя тази хипотеза.



Фигура 14. Резултати от колориметричен тест за количество на супероксиден анион радикал. Проба 1 съответства на екстракт от *Asplenium ceterach*, проба 2 – екстракт от *A. trichomanes*, а проба 3 – екстракт от *A. scolopendrium*. MMC – митоминин С, NC – негативна контрола (съдържа ензим, не съдържа клетъчна проба).

9. Ефект на екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* върху тонуса и съкратителната активност на стомашни гладки мускули

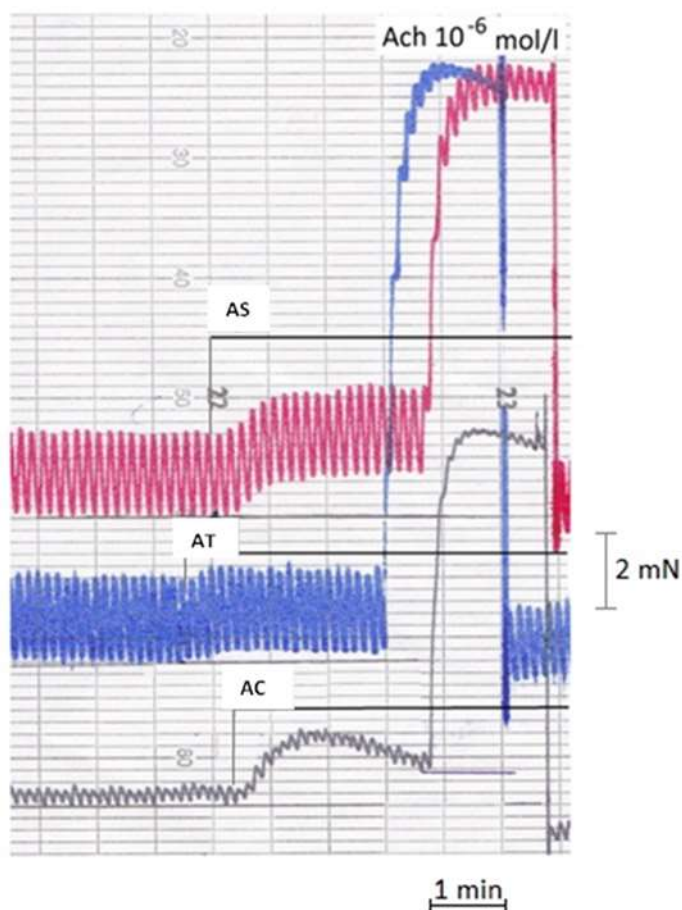
За да се провери дали екстракти от изследваните папрати имат влияние върху активността на ацетилхолинестеразата, беше разработен модел, при който водни екстракти въздействаха *ex vivo* върху стомашни гладки мускули. Гладкомускулните клетки са претърпели сравнително ниска диференциация и специализация през филогенезата и притежават разнообразни рецептори. Специфично въздействие върху тези рецептори води до контракция или релаксация на гладкомускулната тъкан, които могат да бъдат регистрирани експериментално.

Добре известно е, че водоразтворимите молекули, включително тези на водните екстракти от изследваните папрати, не са в състояние спонтанно да преодолеят липидния бислой на клетъчната мембрана и да повлияят директно на контрактилния апарат на гладкомускулните клетки. В този смисъл нашите усилия бяха насочени към идентифициране на потенциални мембранни и извънклетъчни мишени на тези молекули, които имат способността да провокират промени в контрактилната активност на мускулите. Такива структури, изходни точки на клетъчните информационни пътища в стомашните гладкомускулни клетки, са мембранно-разположените рецептори на ацетилхолин и серотонин, които имат основна роля в контрола и поддържането на хомеостазата в стомашно-чревния тракт, както и ензимни системи, модулиращи сигналните пътища.

Въздействие с трите екстракта от папрат в концентрация 0.15 mg/ml предизвика тонични контракции на гладкомускулните препарати (фигура 15): *Asplenium ceterach* – 1.40 ± 0.48 mN (n = 6), *Asplenium scolopendrium* – 1.33 ± 0.22 mN (n = 5) и *Asplenium trichomanes* – 1.04 ± 0.39 mN (n = 11).

За изследване причината и природата на тези контракции по-нататък в изследването бяха използвани някои рецепторни агонисти или антагонисти.

ACh в концентрация 1×10^{-6} mol/L също контрахира гладкомускулните препарати. Сравнението между амплитудата на ACh-индуцирани контракции на фона на екстракти от папрат, които вече се намират в тъканната баня с контроли, е показано в таблица 11. Единствено екстрактът от *Asplenium trichomanes* предизвика статистически значимо намаление на амплитудата на мускулната контракция, предизвикана от ACh.



Фигура 15. Полиграфен запис на контракциите на стомашни гладки мускули, причинени от 0.15 mg/mL воден екстракт от папрат. AC – *A. ceterach*, AS – *A. scolopendrium*, AT – *A. trichomanes*, ACh – ацетилхолин.

Таблица 11. Влияние на екстракти от изследваните папрати (0.150 mg/mL) върху амплитудата на контракции, предизвикани от ACh (1×10^{-6} mol/L). Резултатите са представени като средни стойности \pm стандартно отклонение. Сравнението е направено между контролните стойности (само в присъствие на ACh) и тези, в присъствие на съответния екстракт. n – брой на гладкомускулните препарати; *показва статистически значима разлика.

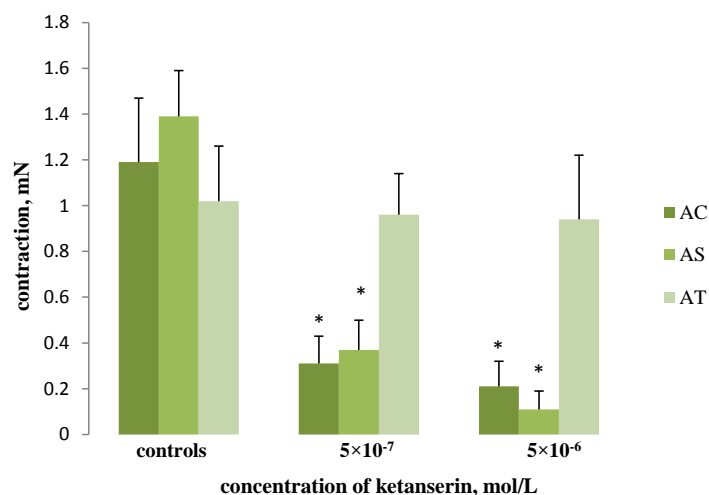
Вид папрат	Амплитуда на контракциите, предизвикани от ACh, mN		n	P	t
	контрола	на фона на екстракт от папрат			
<i>Asplenium ceterach</i>	11.03 \pm 1.81	10.85 \pm 1.85	4	0.87	0.16
<i>Asplenium scolopendrium</i>	9.23 \pm 2.01	8.93 \pm 2.22	5	0.40	0.69
<i>Asplenium trichomanes</i>	8.51 \pm 1.86	11.37 \pm 2.34*	13	0.041	

Атропинът (1×10^{-6} mol/L), който е конкурентен, обратим антагонист на мускариновите (M) ацетилхолинови рецептори, повлиява по различен начин контрактилните ефекти на екстрактите от папрат (таблица 12). Отново само екстрактът от *Asplenium trichomanes* предизвика статистически значимо намаление на амплитудата на мускулната контракция. Не бяха регистрирани промени в характера и силата на *Asplenium ceterach*- и *Asplenium scolopendrium*-индуцираните реакции в присъствието на атропин. Това дава основание да се предположи, че ефектът на тези екстракти върху стомашните гладки мускули не е свързан с активиране на M-рецептори и не включва холинергичния сигнален път.

Таблица 12. Промени в амплитудата на контракциите, предизвикани от екстракти от папрати (0.150 mg/mL) при блокирани M-холинорецептори. Резултатите са представени като средни стойности \pm SD. n – брой гладкомускулни препарати; *показва статистически значима разлика между контракциите на екстрактите и след добавяне на атропин.

Вид папрат	Сила на контракциите, mN		n	P	t
	контроли	след добавяне на атропин			
<i>Asplenium ceterach</i>	2.06 \pm 0.48	2.00 \pm 0.14	5	0.53	0.64
<i>Asplenium scolopendrium</i>	1.33 \pm 0.17	1.35 \pm 0.42	4	0.92	0.11
<i>Asplenium trichomanes</i>	0.89 \pm 0.14	0.20 \pm 0.22*	5	0.001	3.53

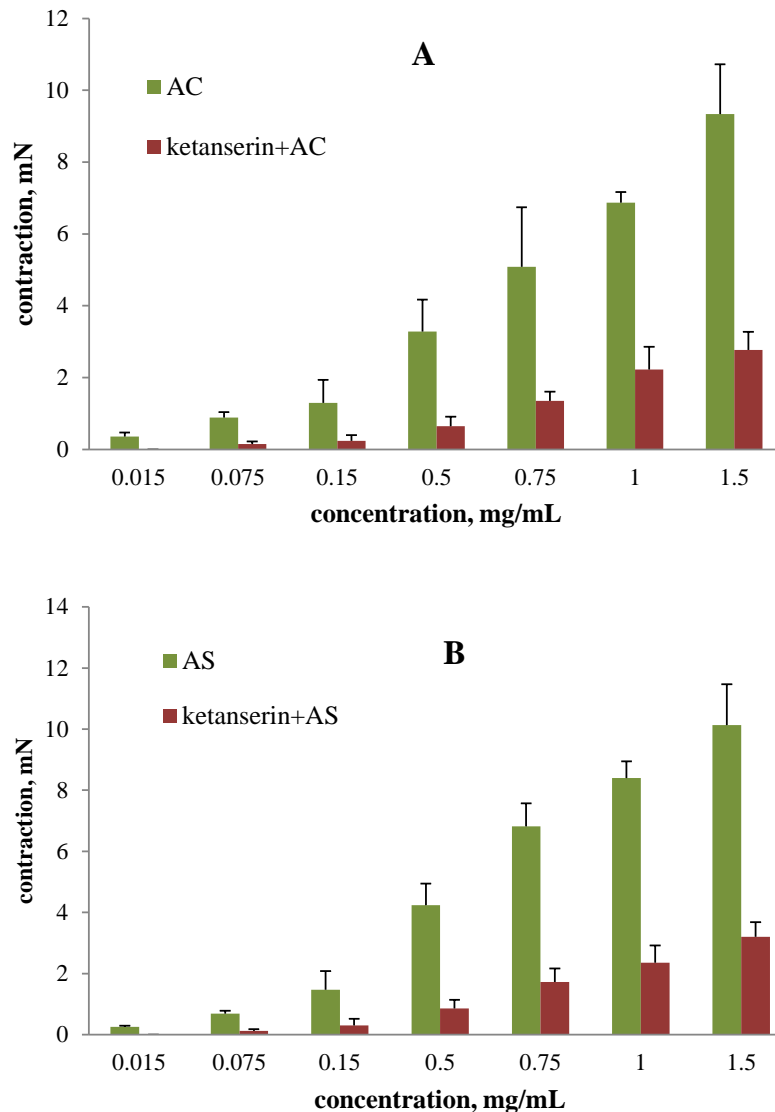
Друг вид рецептори, свързани с мускулната контракция в стомашно-чревния тракт, са серотониновите 5-HT₂ и 5-HT₅. В присъствието на 5×10^{-7} mol/L кетансерин, антагонист на серотониновите 5-HT₂ рецептори, силата на контрактилната реакция, предизвикана от *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium*, беше значително намалена, докато тази, предизвикана от *Asplenium trichomanes*, не се промени (фигура 16).



Фигура 16. Промяна в амплитудата на контракции, предизвикани от екстракти на папрати (0.150 mg / ml) при блокирани 5-HT₂ рецептори. Резултатите са представени като средна стойност ± SD; * P < 0.05. AC – *A. ceterach*, AS – *A. scolopendrium*, AT – *A. trichomanes*.

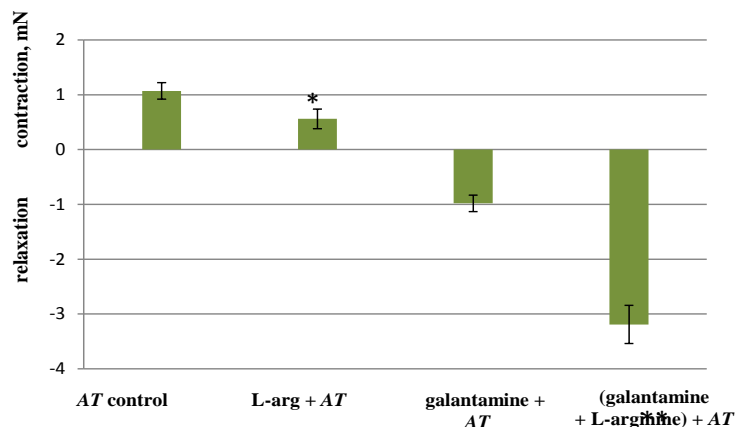
Същата тенденция бе наблюдавана и при по-високи концентрации на *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium* (до 1.5 mg/mL). Всички съкратителни ефекти, причинени от екстракти от папрати, са статистически различни от тези, регистрирани след предварителна обработка на мускулните препарати с кетансерин (5×10^{-7} mol/L) (фигура 17 А, В). Тези резултати показват, че 5-HT₂ рецепторите са мишени за съединения в екстрактите от *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium* и участват в иницирането на мускулните съкратителни ефекти.

За разлика от екстрактите на *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium*, съкратителният ефект на *Asplenium trichomanes* е свързан с влияние върху гладкомускулна холинергична сигнална система. Освен това, когато препаратите бяха предварително контрактирани с АСhЕ инхибитора галантамин (3×10^{-7} mol/L), *Asplenium trichomanes*-предизвикана контракция (0.84 ± 0.06 mN) се трансформира в релаксация (-1.30 ± 0.23 mN, n = 6, p < 0.0001, t = 9.57). Това е причина да предположим, че *Asplenium trichomanes* инхибира активността на АСhЕ и по този начин увеличава нивото на системно освобождавания АСh от интрамурални холинергични неврони в гладкомускулни тъкани. При тези условия натрупването на АСh води до активиране на М-тип холинергични рецептори, деполяризация на клетъчната мембрана и вследствие на това – промени в контрактилните процеси.



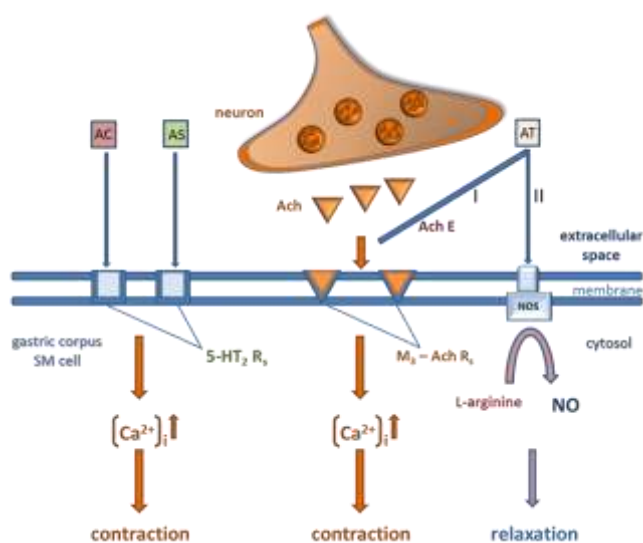
Фигура 17. Ефект на 5×10^{-7} mol/L кетансерин върху амплитудата на А) *A. ceterach* и В) индуцирани от *A. scolopendrium* контракции (използвани са шест гладкомускулни препарата за всеки екстракт). Резултатите са представени като средна стойност \pm SD. Всички стойности на контракциите, предизвикани от *A. ceterach* и *A. scolopendrium*, се различават значително от тези в присъствието на кетансерин.

Добавянето на L-аргинин (5×10^{-4} mol/L) в тъканната баня леко намалява амплитудата на контракция и тонуса на гладките мускули. При тези условия прилагането на екстракт от *Asplenium trichomanes* (0.150 mg/mL) значително намали силата на контрактилния отговор (фигура 18). Тази релаксация беше много по-изразена на фона на инхибираната ацетилхолинестеразна активност (3×10^{-7} mol/L галантамин) и присъствието на L-аргинин (фигура 18). Този факт е основание за предположение, че екстрактът проявява специфичен релаксационен ефект върху съкратителната механична активност на използваните тъкани, който е маскиран от доминиращия съкратителен ефект, описан по-горе.



Фигура 18. Промяна в амплитудата на гладкомускулните реакции, предизвикани от екстракт на *A. trichomanes* при инхибирана активност на AChE или/и активиран синтез на NO. Положителните стойности се отнасят до мускулна контракция, а отрицателните – до релаксация. Резултатите са средни \pm SD; $n = 5$. * $p < 0.0013$; сравнението е между контролната контракция и ефекта след L-аргинин; ** $p < 0,000001$; сравнението е между релаксационните ефекти на инхибираната активност на AChE с и без L-аргинин.

Нашите експерименти показаха, че L-аргининът играе роля в този релаксиращ ефект. Добавянето на аминокиселината в тъканната баня незначително намалява тонуса на гладките мускули и намалява амплитудата на техните спонтанни контракции. На този фон индуцираната от *Asplenium trichomanes* контракция е значително намалена в сравнение с контролата. Промяната в реактивността на мускулите спрямо *Asplenium trichomanes* е повлияна от L-аргинин, най-вероятно поради стимулиран синтез на азотен оксид (NO), предшественик на който е L-аргинин. Всички тези процеси на въздействие на екстрактите от трите вида папрати са обобщени на фигура 19:



Фигура 19. Рецептор-активирани пътища за влияние на екстракти от *A. ceterach* (AC), *A. scolopendrium* (AS) и *A. trichomanes* (AT) върху контрактилната активност на стомашни гладки мускули.

Заклучение

Изследваните папрати, въпреки че принадлежат към един и същи род, показват значителни разлики в техния химичен състав, антиоксидантни и биологични свойства. Получените данни биха могли да представляват интерес за фармацевтични, хранителни и биомедицински изследвания, както и за ботаници, изучаващи видовото разнообразие. Биотехнологиите биха могли да се възползват от относително високото съдържание на протеини и мазнини в трите папрати. Някои от данните, представени тук, не са докладвани в научната литература и са солидна основа за сравнение със същите видове, растящи в други географски и климатични условия, което може да повлияе на техните лечебни свойства. По-нататъшни тестове за биологичната активност и токсичността на трите екстракта от папрати и отделните компоненти на техните екстракти могат да отворят нови възможности за тяхното лечебно приложение.

ИЗВОДИ

1. Изследваните видове папрати съдържат значително количество протеини, което слабо варира между отделните видове (13.6%, 18.4% и 14.3% от теглото на изсушеното растение съответно за *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*). Сходно е и съдържанието на мазнини – 4.0%, 3.1% и 3.3% съответно за *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*. И в трите изследвани вида *Asplenium* преобладават наситени мастни киселини.

2. Изсушените надземни части от *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium* са богати на микроелементи, главно желязо (над 150 ppm) и цинк (над 75 ppm); съдържанието на мед в трите вида папрати е от порядъка на 4.5 – 6.5 ppm.

3. Както водните, така и водно-метаноловите екстракти на трите вида папрати, съдържат съединения – вторични метаболити, на които най-често се дължи биологичната активност на растенията. Най-високо е съдържанието на фенолни съединения в екстракти от *Asplenium ceterach*, а най-ниско – в тези от *Asplenium scolopendrium*. Сред индивидуалните намерени и количествено определени фенолни съединения в екстрактите са фенолните киселини розмаринова, р-кумарова и синапова, както и флавоноидите кверцетин и кемпферол.

4. Най-добри антиоксидантни свойства притежава екстрактът от *Asplenium ceterach*. Съдържанието на фенолни съединения в трите екстракта показва отлична корелация с антиоксидантните им свойства, измерени чрез два метода – улавяне на DPPH радикал и

желязо-редуциращ капацитет. Съдържанието на редокс активни метални йони оказва влияние върху резултатите от тези анализи.

5. Активни вещества в екстрактите проявяват умерена антимикробна активност спрямо 5 от общо 14 тествани патогенни микроорганизми с минимални инхибиращи концентрации между 2.5 и 10 mg/mL. Този резултат е основа за бъдещи изследвания върху пречистване и идентифициране на конкретните съединения, с която тази антимикробна активност е свързана.

6. Метанолови извлекци от трите вида папрати проявяват цитотоксичен ефект спрямо 6 изследвани туморни клетъчни линии, като този ефект е най-добре проявен при човешка клетъчна линия, изолирана от цервикален аденокарцином (HeLa). Екстрактите показват IC₅₀ между 40 µg/mL (*Asplenium ceterach*) и 205 µg/mL (*Asplenium trichomanes*). Ефектът е тумор-специфичен, тъй като не се проявява при нетуморни клетъчни линии и с по-висока чувствителност към човешки клетки в сравнение с миши. Вероятно цитотоксичният ефект на екстракта от *Asplenium ceterach* се дължи на високия му потенциал за индукция на програмирана клетъчна смърт чрез дезактивиране на SOD и причинения от това оксидативен стрес.

7. Водни извлекци от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* оказват влияние върху механичната активност на стомашни гладки мускули. Механизмът на контрактилната реакция, предизвикана от *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium*, е свързан с активиране на серотонинови (5-HT₂) рецептори. Контрактилната реакция, предизвикана от екстракта на *Asplenium trichomanes*, е свързана с инхибиране на AChE, натрупване на ACh и активиране на M-тип холинергични рецептори. При инхибирана активност на AChE екстрактът предизвиква мускулна релаксация, която вероятно е свързана с активиране на азотен оксид синтазата (NOS).

ПРИНОСИ

Оригинални научни приноси

1. За първи път се представят данни за количеството на микроелементите Fe, Cu, Zn и Se в *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* в България.

2. За първи път в научната литература се представят данни за съдържанието на протеини, липиди и мастнокиселинния състав на трите вида папрати от род *Asplenium*.

3. За първи път са представени данни за съдържанието на танини и въглехидрати в българските представители на *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*.

4. За първи път е показано, че антиоксидантните свойства на растителните екстракти се влияят от присъствието на редокс активни метални йони.

5. За първи път е показано, че екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*, събрани в България, притежават антимикробна и антитуморна активности.

6. За първи път е показано, че екстракти от *Asplenium ceterach* и *Asplenium scolopendrium* съдържат съединения антагонисти на серотониновите рецептори. Екстрактът от *Asplenium trichomanes* влияе както върху активността на ацетилхолинестеразата, така и върху активността на азотен оксид синтазата.

Научни приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е наличието на 3 фенолни киселини и 3 флавоноиди в българските представители на *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes*.

2. Високата корелация между съдържание на фенолни съединения и антиоксидантната активност на растителните екстракти потвърждава тезата, че фенолите са доминиращите антиоксиданти в растенията.

Научни приноси с приложен характер

1. Предложен е метод за предварителното третиране на растителни екстракти с йонообменната смола Chelex, което води до по-възпроизводими резултати от антиоксидантните анализи и позволява коректно сравнение на антиоксидантните свойства на растителни видове от различни популации.

2. Високата антитуморна активност на *Asplenium ceterach* срещу HeLa туморни клетки, антимикробното действие срещу *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida utilis* и *Fusarium moniliforme* на водните екстракти от *Asplenium ceterach*, *Asplenium scolopendrium* и *Asplenium trichomanes* са солидна основа за по-нататъшно пречистване и идентифициране на отделни компоненти, които да бъдат използвани за лечение на туморни заболявания и като антимикробни агенти във фармацевтичната промишленост.

3. Доказаното инхибиращо действие на екстракт от *Asplenium trichomanes* върху активността на ензима ацетилхолинестераза би позволило използването му при лечение на патологични състояния, които са резултат на нарушения в тези ензимни пътища.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА В АВТОРЕФЕРАТА

- Йорданов, Д. и кол. (1963). Флора на НР България, т. I., Издателство на БАН, София, 507.
- Николов, Ст. (ред.). (2006). Специализирана енциклопедия на лечебните растения в България, Издателство Труд, София, 580.
- Amoroso, V. B. (2017). Phytochemical Screening, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Three Fern (Polypodiaceae) Species in Bukidnon, Philippines. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 6, 28-33.
- Bahadori, M. B., Mahmoodi Kordi, F., Ali Ahmadi, A., Bahadori, S., & Valizadeh, H. (2015). Antibacterial evaluation and preliminary phytochemical screening of selected ferns from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(2), 53-59.
- Baskaran, X. R., Vigila, A. V. G., Zhang, S. Z., Feng, S. X., & Liao, W. B. (2018). A review of the use of pteridophytes for treating human ailments. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 19(2), 85-119.
- Berk, S., Tepe, B., Arslan, S., & Sarikurucu, C. (2011). Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8902-8908.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., & Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2(11), 1770-1778.
- Buettner, G. R., & Czapski, P. G. (1986). Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free radical research communications*, 1(6), 349-353.
- Cao, J., Zheng, Y., Xia, X., Wang, Q., & Xiao, J. (2015). Total flavonoid contents, antioxidant potential and acetylcholinesterase inhibition activity of the extracts from 15 ferns in China. *Industrial Crops and Products*, 75, 135-140.
- Chew, Y. L., Goh, J. K., & Lim, Y. Y. (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food chemistry*, 116(1), 13-18.
- Choudhury, J., Majumdar, S., Roy, S., & Chakraborty, U. (2017). Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Two Edible Wetland Pteridophytes *Diplazium esculentum* (Retz) Sw and *Marsilea minuta* L.—A Comparative Study. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(9), 195-203.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808-816.
- Denni, M. & Mammen D. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*, 135, 1365-1368.
- Diniz-Silva, H. T., Magnani, M., de Siqueira, S., de Souza, E. L., & de Siqueira-Júnior, J. P. (2017). Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses norA. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 324-326.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
- Durdevih, L., Mitrović, M., Pavlović, P., Bojović, S., Jarić, S., Oberan, L., et al. (2007). Total phenolics and phenolic acids content in leaves, rhizomes and rhizosphere soil under *Ceterach officinarum* D.C., *Asplenium trichomanes* L. and *Adiantum nigrum* L. in the gorge of Sićevo (Serbia). *Ekologija (Bratislava)*. 26(2), 164-73.
- Erecevit, P., & Kırbağ, S. (2017). Antimicrobial activity of some plant species used for the medical purpose in Turkey.

- Farràs, A., Cásedas, G., Les, F., Terrado, E. M., Mitjans, M., & López, V. (2019). Evaluation of anti-tyrosinase and antioxidant properties of four fern species for potential cosmetic applications. *Forests*, 10(2), 179.
- Ferrazzano, G. F., Roberto, L., Catania, M. R., Chiaviello, A., De Natale, A., Roscetto, E., Pinto, G., Pollio, A., Ingenito, A., & Palumbo, G. (2013). Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Fluck, R. A., & Jaffe, M. (1974). The acetylcholine system in plants. In: *Current Advances in Plant Sciences* (E. Smith, ed.), Vol, 5, pp. 1-22, Sciences, Engineering, Medical and Data Ltd, Oxford.
- Froissard, D., Fons, F., Bessière, J. M., Buatois, B., & Rapior, S. (2011). Volatiles of French ferns and “fougère” scent in perfumery. *Natural product communications*, 6(11), 1934578X1100601138.
- Goswami, H. K., Sen, K., & Mukhopadhyay, R. (2016). Pteridophytes: evolutionary boon as medicinal plants. *Plant Genetic Resources*, 14(4), 328-355.
- Greeshma, A. A., & Sridhar, K. R. (2019). Nutraceutical and bioactive significance of ferns with emphasis on the medicinal fern *Diplazium*. In *Medically important plant biomes: source of secondary metabolites* (pp. 115-131). Springer, Singapore.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 26(4), 809-812.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., et al. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.
- Haldar, D., Sen, D., & Gayen, K. (2017). Development of spectrophotometric method for the analysis of multi-component carbohydrate mixture of different moieties. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(4), 1416-1434.
- Hammami, S., Snène, A., El Mokni, R., Faidi, K., Falconieri, D., Dhaouadi, H., Piras, A., Mighri, Z., Porcedda, S. (2016). Essential oil constituents and antioxidant activity of *Asplenium* ferns. *Journal of chromatographic science*, 54(8), 1341-1345.
- Imperato, F. (1979). Two new kaempferol 3, 7-diglycosides and kaempferitrin in the fern *Asplenium trichomanes*. *Experientia*, 35(9), 1134-1135.
- Imperato, F. (1983). A flavanone glycoside from the fronds of *Ceterach officinarum*. *Phytochemistry*, 22(1), 312-313.
- Ismail, A., Al-Khasreji, T., Maulood, B. (2019). Phytochemical and Antioxidant Activity of *Asplenium* Species (spleenworts) Extracts from Northern Districts of Iraq,” *Engineering and Technology Journal*, 37(1), 248-251.
- ISO 659:2009 Oilseeds – Determination of oil content (Reference method).
- Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: An overview. *IJPSR*, 3, 1567-1574.
- Kazacic, M., Djapo, M., & Ademovic, E. (2016). Antioxidant activity of water extracts of some medicinal plants from Herzegovina region. *Int. J. Pure App. Biosci*, 4(2), 85-90.
- Khan, M. S., & Ullah, S. (2018). Analgesic, anti-inflammatory, antioxidant activity and phytochemical screening of *Dryopteris blanfordii* plant. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 536-541.
- Kuemmerle, J. F., Murthy, K. S., Grider, J. R., Martin, D. C., & Makhlof, G. M. (1995). Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology*, 109(6), 1791-1800.
- Lai, H. Y., & Lim, Y. Y. (2011). Antioxidant properties of some Malaysian ferns. In *3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering. IPCBEE* (Vol. 20).
- Lai, H. Y., Lim, Y. Y., & Tan, S. P. (2009). Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73, 1362-1366.
- Mir, S. A., Mishra, A. K., Reshi, Z. A., & Sharma, M. P. (2013). Preliminary phytochemical screening of some Pteridophytes from district Shopian (J&K). *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(4), 632-7.

- Miura, G. A., Broomfield, C. A., Lawson, M. A., & Worthley, E. G. (1982). Widespread occurrence of cholinesterase activity in plant leaves. *Physiologia Plantarum*, 56(1), 28-32.
- Mizuno, M., Kyotani, Y., Iinuma, M., Tanaka, T., Kojima, H., & Iwatsuki, K. (1990). Kaempferol glycosides in *Asplenium scolopendrium* Newm. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 45(3-4), 143-146.
- Morado-Castillo, R., Quintanilla-Licea, R., Gomez-Flores, R., & Blaschek, W. (2016). Total Phenolic and Flavonoid Contents and Flavonoid Composition of Flowers and Leaves from the Mexican Medicinal Plant *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. *European Journal of Medicinal Plants*, 1-8.
- Mukherjee, I. (1980). The effect of acetylcholine on hypocotyl elongation in soybean. *Plant and Cell Physiology*, 21(8), 1657-1660.
- Nekrasov, E. V., Svetashev, V. I., Khrapko, O. V., & Vyssotski, M. V. (2019). Variability of fatty acid profiles in ferns: Relation to fern taxonomy and seasonal development. *Phytochemistry*, 162, 47-55.
- Rajesh, K. D., Vasantha, S. U. B. R. A. M. A. N. I., Panneerselvam, A., Rajesh, N. V., & Jeyathilakan, N. (2016). Phytochemical analysis, in vitro antioxidant potential and gas chromatography-mass spectrometry studies of *Dicranopteris linearis*. *Asian J Pharm Clin Res*, 9(2), 1-6.
- Sahayaraj, K., Borgio, J. F., & Raju, G. (2009). Antifungal activity of three fern extracts on causative agents of groundnut early leaf spot and rust diseases. *Journal of Plant Protection Research*, 49 (2), 142-144.
- Sharma, B. D., & Vyas, M. S. (1985). Ethnobotanical studies on the ferns and fern allies of Rajasthan. *Nelumbo*, 27(1-4), 90-91.
- Singh, H. B. (1999). Potential medicinal pteridophytes of India and their chemical constituents. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 23(1), 63-78.
- Soare, L. C., & Şuţan, N. A. (2018). Current trends in pteridophyte extracts: from plant to nanoparticles. In *Current Advances in Fern Research* (pp. 329-357). Springer, Cham.
- Sohn, Y. M., Chin, Y. W., Yang, M. H., & Kim, J. W. (2008). Terpenoid constituents from the aerial parts of *Asplenium scolopendrium*. *Natural Product Sciences*, 14(4), 265-268.
- Taylor, P., & Brown, J. H. (2005). Chapter 11. Acetylcholine. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Scott Brady, George Siegel, R. Wayne Albers, Donald Price (Editors). Elsevier Academic Press, 7th edition., pp. 185-209.
- Tomou, E. M., & Skaltsa, H. (2018). Phytochemical investigation of the fern *Asplenium ceterach* (Aspleniaceae). *Natural Product Communications*, 13(7), 1934578X1801300715.
- Valizadeh, H., Sonboli, A., Kordi, F. M., Dehghan, H., & Bahadori, M. B. (2015). Cytotoxicity, antioxidant activity and phenolic content of eight fern species from North of Iran. *Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 18.
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(9), 1874-1905.
- Xie, J., & Schaich, K. M. (2014). Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4251-4260.
- Živković, S., Skorić, M., Šiler, B., Dmitrović, S., Filipović, B., Nikolić, T., & Mišić, D. (2017). Phytochemical characterization and antioxidant potential of rustyback fern (*Asplenium ceterach* L.). *Lekovite sirovine*, 37, 15-20.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. Tomova, T., **Petkov, V.**, Slavova, I., Stoyanov, P., Argirova, M. (2020). Naturally present metal ions in plants could interfere with common antioxidant assays. *MethodsX*, 7: 100995, DOI: 10.1016/j.mex.2020.100995. **Q2** SJR (2020) 0.356

2. **Petkov, V.**, Slavova, I., Teneva, D., Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Argirova, M. (2021). Phytochemical study and biological activity of three fern species of the *Asplenium* genus growing in Bulgaria. *The Natural Products Journal*, 11, DOI: 10.2174/2210315511666210512024716. **Q3** SJR (2020) 0.205

3. **Petkov, V.**, Ardasheva, R., Prissadova, N., Kristev, A., Stoyanov, P., Argirova, M. (2021). Receptor-mediated biological effects of extracts obtained from three *Asplenium* species. *Zeitschrift für Naturforschung – Section C*; DOI: 10.1515/znc-2020-0223. **Q4** IF (2019) 1.238 **Q3** SJR (2020) 0.301

4. **Petkov, V.**, Batsalova, T., Stoyanov, P., Mladenova, T., Kolchakova, D., Argirova, M., Raycheva, T., Dzhambazov, B. (2021). Selective Anticancer Properties, Proapoptotic and Antibacterial Potential of Three *Asplenium* Species. *Plants*, 10, 1053. DOI: 10.3390/plants10061053 **Q1** IF (2019) 2.762 **Q1** SJR (2020) 0.892



УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Tomova, T., **Petkov, V.**, Slavova, I., Stoyanov, P., Argirova, M. Naturally present metal ions in plants could interfere with common antioxidant assays (постер). Third International Conference on Bio-antioxidants “*Natural bio-antioxidants as an inspiration for food chemistry and pharmacy*” 17 – 21 септември 2019 г., гр. Несебър, България.