



Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



Катедра „Ботаника и методика на обучението по биология“

ЦВЕТЕЛИНА РУМЕНОВА МЛАДЕНОВА

**ФИТОХИМИЧНО И БИОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА
РЕДКИ ЕТЕРИЧНОМАСЛЕНИ И ЛЕКАРСТВЕНИ
РАСТЕНИЯ ОТ ПРИРОДЕН ПАРК БЪЛГАРКА**

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:

доц. д-р Пламен Стефанов Стоянов

доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска

Пловдив, 2021 г.

Дисертационният труд се състои от 124 страници. Той е онагледен с 35 фигури и 17 таблици. В библиографията са включени 226 литературни източника (от които 14 на кирилица).

Експерименталните изследвания са проведени в научните лаборатории на: катедра *Ботаника и методика на обучението по биология*, катедра *Физиология на растенията и молекулярна биология*, катедра *Биология на развитието* към Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“; катедра *Биоорганична химия* към Фармацевтичен факултет при МУ – Пловдив, и Институт 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 15 часа 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)

доц. д-р Йоана Димитрова Киселова-Кънева (становище)

доц. д-р Детелина Стоянова Белкинова (становище)

доц. д-р Пламен Стефанов Стоянов (становище)

Автор: Цветелина Руменова Младенова

Тема на дисертационен труд: Фитохимично и биологично проучване на редки етеричномаслени и лекарствени растения от Природен парк „Българка“.

СПИСЪК С ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ПП	Природен парк
АОА	антиоксидантна активност
TLC	тънкослойна хроматография
ITS	вътрешна транскрибируема област
HPLC	високо ефективна течна хроматография
ICP-MS	индуктивно свързаната плазмена мас-спектрометрия
HORAC	капацитет за предотвратяване на образуване на хидроксилни радикали
ORAC	абсорбционен капацитет на кислородния радикал
MIC	минимална инхибиторна концентрация

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години се наблюдава нарастваща тенденция в световен мащаб за употребата на растителни лекарствени продукти и добавки за нуждите на здравеопазването (Ekor, 2014). Това увеличено търсене и интерес към употребата им насърчава към нови открития и разработки на лекарства (Ekor, 2014). Много от активните съставки на новите лекарства се получават от лечебни растения (Katiyar *et al.*, 2012). Това обуславя необходимостта от фитохимични проучвания на растенията с цел идентифициране на биологичноактивните вещества в тях.

Фитохимичните изследвания на редки и ендемични растения със специфични местообитания са от научен интерес и по този начин оценката на биологичните особености, разпространението и природните ресурси е важна за тяхното опазване и устойчиво използване (Aneva *et al.*, 2018).

Обект на настоящия труд е фитохимично и биологично проучване на ендемитните растения *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen и *Betonica bulgarica* Degen & Nejš от Природен парк „Българка“.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Природен парк „Българка“ – местоположение и характеристика

Природен парк „Българка“ е защитена територия по смисъла на Закона за защитените територии (1998), включваща разнообразни екосистеми с многообразие на растителни видове и на техните местообитания. Паркът е обявен със Заповед №РД-775/09.08.2002 г. на Министъра на околната среда и

водите. Площта на Парка по цифров модел е 23 691,63 хектара. На територията на ПП „Българка“ са установени синтаксони, отнасящи се към 19 класа, 22 разреда, 33 съюза, 18 асоциации и 25 съобщества с ранг на асоциация и неуточнена синтаксономична принадлежност по класификацията на Браун-Бланке (Marinov *et al.*, 2017; Стоянов, 2017).

Флора и местообитания на ПП „Българка“

През периода 1833 – 1870 г. унгарският природоизпитател Emerich Frivaldszky von Frivald организира 8 експедиции за проучване на флората на Балканския полуостров, от които пряко отношение към българската флора имат първите две (Станев, 2010). Въз основа на събраните материали Frivaldszky публикува 8 статии, в които съобщава 59 нови за науката растения (Frivaldszky, 1835). На базата на хербарийни материали на Frivaldszky е описан видът *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen. (Velenovsky, 1899).

В резултат на проучванията си в Шипченския дял от Централна Стара планина Нейчев (1903) съобщава 17 редки и нови за България растителни вида. Нейчев и Деген описват локалния за Стара планина ендемичен вид *Betonica bulgarica* Degen & Nejč. (Нейчев, 1906).

За видове от флората на района има данни в публикациите на Širjaev (1931); Kožuharov & Petrova (1988); Hájek, Hájková & Apostolova (2005); Petrova & Venkova (2006, 2008); Cheshmedziev & Marinov (2009); Marinov (2009); Petrova, Marinov, Vasilev & Venkova (2009); Ančev & Krendl (2011); Marinov *et al.*, (2015); Стоянов (2017), Маринов (2018) и др.

При проучвания на територията на ПП „Българка“ (фигура 1) са установени и местообитанията на етеричномасленото растение *Micromeria frivaldszkyana*, български ендемит, попадащ в местообитание НЗ.2А13 – Старопланински варовикови хазмофитни съобщества (Marinov *et al.*, 2017). Местообитанието е включено в Червена книга на България, том III. Местообитания с код 08НЗ – Варовикови скали с хазмофитна растителност в категория „уязвимо“, Приложение 1 на Директива 92/43 и в Закона за биологичното разнообразие. В Приложение 1 на Директива 92/43 фигурира с код 8210 – Хазмофитна растителност по варовикови скални склонове (Mladenova *et al.*, 2018).

Маринов (2018) посочва 532 вида лечебни и 41 вида етеричномаслени растения. Част от тях са консервационно значими и редки видове, като българският ранилист (*Betonica bulgarica*) и фривалдскиевата микромерия (*Micromeria frivaldszkyana*).

Micromeria frivaldszkyana е многогодишно тревисто растение, разпространено предимно по скалните райони на Централна и Източна Стара планина в България. Видът е български ендемит, включен в Приложение 3 на Закона за биологичното разнообразие и Червена книга на Р България, Том 1. Растения и гъби под категорията „застрашен“. Видът е оценен по

критериите на IUCN под категорията „почти застрашен“ и фигурира в Червения списък на висшите растения в България под категорията „застрашен“ (Mladenova *et al.*, 2018).



Фигура 1. Проучване на местообитанията на редки етеричномаслени растения в ШП „Българка“.

Българският ендемит *Betonica bulgarica* Degen et Neič. (син. *Stachys bulgarica* Hayek) расте на открито, в каменна и пясъчна почва, в дъбови и букови гори на Стара планина (Централна, Източна) и Тракийската низина (Petrova, 2006). *Betonica bulgarica* е ендемитно растение, включено в Червената книга на България под категория „застрашен“ (Пеев, 2015).

Фитотерапевтични свойства

Видове от род *Micromeria* се използват срещу сърдечни заболявания, заболявания на дихателната система, главоболие, настинки, рани и др. кожни инфекции (Nikolova *et al.*, 2017).

Установено е, че имат различни *in vitro* биологични ефекти: антиоксидантен (Vladimir-Knežević *et al.*, 2011), антимикробен (Herken *et al.*, 2012), антихолинестеразен (Lee *et al.*, 2009), противовъзпалителен и аналгетичен (Shehab *et al.*, 2012). Това е показател за големия им потенциал за използване като билки, лекарства и хранителни добавки (Vladimir-Knežević *et al.*, 2015).

Видовете от род *Betonica* са били използвани в народната медицина от векове за множество цели: за лечение на възпалителни заболявания, язви, склероза на далака, генитални тумори, заразени рани, кашлица, диария, треска, възпалено гърло, чернодробни нарушения, сърдечна слабост, вътрешни кръвоизливи, главоболие, мигрена, невралгия (Háznagy-Radnai *et al.*, 2006).

Фитохимична характеристика

Флавоноидите и фенолните киселини се считат за основен фактор за антиоксидантната активност на лечебните растения (Marinova & Batchvarov, 2011).

Присъствието на кверцетин, рутин, нарингин, хлорогенова киселина и розмаринова киселина е установено в метанолния екстракт от надземните части на *Micromeria frivaldszkyana* чрез тънкослойна хроматография (Vukelić, 2015).

Видовете от род *Betonica* (*Stachys*) съдържат полифеноли като танини, фенилетаноидни гликозиди, фенолни киселини, флавоноиди (Khanavi *et al.*, 2009), 4-кофеилхининова киселина, ахилеин, бетаин, бетоницин, кофеинова киселина, хлорогенова киселина, харпагид, неохлорогенова киселина, розмаринова киселина, стахидрин, (+)-оксистахидрин, (-)-оксистахидрин, танин, турицин (Duke & Beckstrom-Sternberg, 2001).

За видовете *Micromeria*, растящи в България, са докладвани някои резултати за *M. dalmatica* и *M. cristata* (Kostadinova *et al.*, 2007) и за *M. frivaldszkyana* (Zheljazkov *et al.*, 2019; Dimitrova-Dyulgerova *et al.*, 2019).

В научната литература има изследвания върху химичния състав на етеричните масла от различни видове от рода *Stachys* (*Betonica*). Съставът им е различен и зависи от местообитанието и начина на обработка. При разпространените в България видове в най-голямо количество са установени сескитерпеновите въглеродороди, като преобладава муролен (Dimitrova-Dyulgerova *et al.*, 2015).

Биологична активност на фенолните съединения на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*

Фенолните съединения са едни от най-разпространените в растителния свят вторични метаболити. Те се синтезират от растенията с цел предпазване от неблагоприятните условия на

околната среда като суша, UV светлина, насекоми, вируси, бактерии или физически наранявания (Heleno *et al.*, 2015).

Антиоксидантни активности (АОА) са изследвани при три вида *Micromeria* в Хърватия (Vladimir-Knežević *et al.*, 2011). Антиоксидантна и антихолинестеразна активности са установени и при *Micromeria cilicica* в Турция (Öztürk *et al.*, 2011). В предишни изследвания е докладвана само антиоксидантната активност на *Micromeria frivaldszkyana* по метода на DPPH, както и сравнителен TLC анализ на флавоноидните профили на четирите вида *Micromeria*, разпространени в България (Nikolova *et al.*, 2017).

Различни класове биологично-активни съединения от растенията, като флавоноиди, кумарини, полифеноли, танини, терпеноиди, етерични масла, алкалоиди, полизахариди и протеини, оказват активност срещу широк кръг вируси (Naithani *et al.*, 2008).

Необходими са нови подходи и нови алтернативни молекули и за химиопрофилактиката. Изследванията показват, че растенията от семейство Lamiaceae могат да предложат такъв потенциал – да инхибират растежа на ракови клетки на белия дроб, гърдата, простатата и дебелото черво. Във фитохимично отношение те могат да бъдат използвани като модулатори в сигнални пътища в раковите клетки и могат да бъдат ефективни фактори в подкрепа на противотуморното лечение (Sitarek *et al.*, 2020).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Целта на настоящия дисертационен труд е биологично проучване на видовете *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*, разпространени в Природен парк „Българка“ и изследване на техния фитохимичен състав и биологични активности.

Във връзка с целта са поставени следните **задачи**:

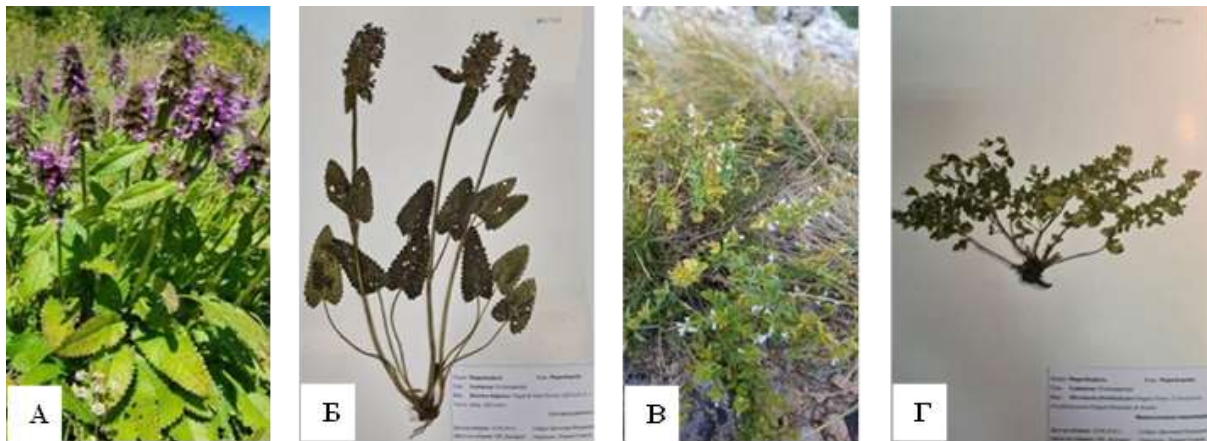
1. Теренни проучвания и събиране на материали от видовете *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*, разпространени в Природен парк „Българка“.
2. Анатомичен анализ на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.
3. Молекулярно-генетично проучване на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.
4. Фитохимично изследване на видовете *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.
5. Изследване на биологичната активност (антиоксидантна, антимикробна, антивирусна, антитуморна) на екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Betonica bulgarica (Български ранилист). Събрана е надземната част (фигура 2А) по време на вегетационния период през 2018 – 2020 г. от Природен парк „Българка“. Хербариен образец е депозиран в хербариума на Аграрен университет – Пловдив, (SOA) под №062646 (фигура 2Б).

Micromeria frivaldszkyana (Фривалдскиева микромерия). Събрана е надземната част (фигура 2В) по време на вегетационния период през 2019 – 2020 г. от Природен парк „Българка“. За събирането на вида *Micromeria frivaldszkyana*, пропадащ в Приложение 3 на Закона за биологичното разнообразие, има издадено писмено разрешение от Министерството на околната среда и водите (Разрешително №777/22.02.2019 г.). Хербариен образец (фигура 2Г) е депозиран в хербариума на Аграрен университет – Пловдив, (SOA) под № 062648.



Фигура 2. *Betonica bulgarica* (А – надземна част, Б – хербариен образец); *Micromeria frivaldszkyana* (В – надземна част, Г – хербариен образец).

Clinopodium vulgare (Обикновен черноврѝх, котешка стѝпка). Събрана е надземната част по време на вегетационния период през 2019 и 2020 г. от Природен парк „Българка“. Хербариен образец е депозиран в хербариума на Аграрен университет – Пловдив, (SOA) под №062645.

Betonica officinalis (Лечебен ранилист). Събрана е надземната част по време на вегетационния период през 2018 – 2020 г. от Природен парк „Българка“. Хербариен образец е депозиран в хербариума на Аграрен университет – Пловдив, (SOA) под №062647.

Определянето на етеричномаслените и лечебни растения е извършено по Делипавлов и Чешмеджиев (2011), съвместно с д-р Юлиян Маринов и доц. д-р Пламен Стоянов.

Методи

Микроскопският анализ на *Micromeria frivaldszkyana*, *Clinopodium vulgare*, *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* е извършен със светлинен микроскоп (Leica DM 2000 LED, Leica Microsystems, Germany), снабден с камера (Leica DMC 2900) и софтуер за обработка на образи (Leica Application Suite, LAS).

За видовете *Micromeria frivaldszkyana*, *Clinopodium vulgare*, *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* е използван класическият сравнителноанатомичен метод (Metcalfе & Chalk, 1950).

За извършване на молекулярните изследвания беше направена екстракция на тотална растителна ДНК с помощта на кит на фирмата QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit, Германия), като беше следвана процедурата, зададена от фирмата производител. Проведен бе конвенционален PCR за намножаване на целевите региони от генома. За екстракция на PCR продуктите от 1% агарозен гел, беше използван кит на фирмата QIAGEN (QIAquick PCR & Gel Cleanup, Германия). Пробите бяха изпратени за секвениране в оторизирана лаборатория в Германия – Eurofins Genomics.

HPLC-определянето на захари се извършва на HPLC система Agilent 1220 с бинарна помпа и детектор на рефракционен индекс (Agilent Technology, САЩ). Определянето на органични киселини се извършва на HPLC система Agilent 1220 (Agilent Technology, САЩ), с бинарна помпа и UV-Vis детектор (Agilent Technology, САЩ).

Общите полифеноли бяха определени съгласно метода на Singleton & Rossi (1965). Общото съдържание на флавоноиди се определя с реагент AlCl₃ съгласно Chang *et al.* (2002). За определяне на фенолни съединения е използван HPLC метод (Katsarova *et al.*, 2017) на HPLC система (Varian).

Етеричномасленото съдържание е установено посредством апарат на Ликенс-Никерсон. Определянето на качествен и количествен състав на етерично масло на *Betonica bulgarica* е извършено чрез газова хроматография – маспектрометрия.

За микроелементния анализ е използван метода на индуктивно свързаната плазмена маспектрометрия (ICP-MS) за количествен и полуколичествен анализ.

Определянето на антиоксидантната активност е извършено чрез използване на електрохимичен метод, ORAC метод, HORAC метод и определяне на активността на супероксид дисмутаза.

Определянето на антимикробната активност се извърши съгласно Jirovetz *et al.* (2006), като се използва методът за дифузия на агарен диск и определяне на минималната инхибираща концентрация (MIC).

Определянето на антивирусната активност е извършено от Националната референтна лаборатория към Националния център по заразни и паразитни болести – гр. София.

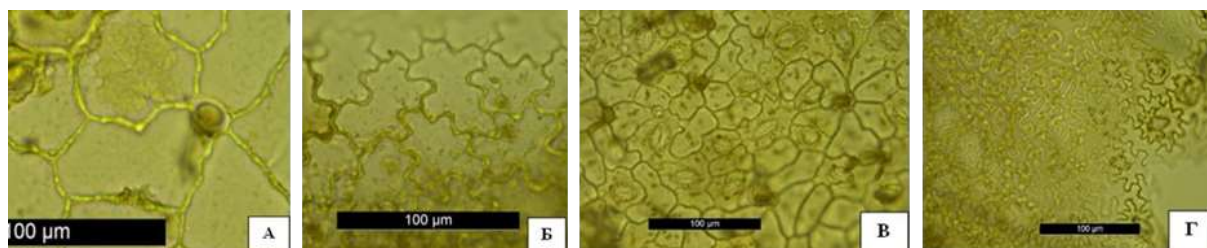
За проучването на *in vitro* цитотоксичност и антигуморна активност са използвани 7 адхерентни клетъчни линии: *HeLa* (ATCC CCL 2, NBIMCC 164) – човешка клетъчна линия, изолирана от цервикален аденокарцином; *A 549* (ATCC CCL 185, NBIMCC 2404), получена от човешки белодробни карциномни клетки; *FL* (ATCC CCL 62, NBIMCC 94), получена от човешки амниотични нормални клетки; HT-29 (ATCC HTB-38) човешка клетъчна линия, установена от колоректален аденокарцином; RAW 264.7 (ATCC TIB-71) – миша клетъчна линия, изолирана от Abelson левкемичен вирус-индуциран тумор, асцит; NIH/3T3 (ATCC CRL-1658) – фибробластна клетъчна линия, изолирана от миши ембрион, LS48 миша перманентна фибробластоподобна клетъчна линия (Германска колекция за микроорганизми и клетъчни култури, Braunschweig (DSMZ) номер DSM ACC 2455; Biotectid, Германия). Проапоптотичният ефект на екстрактите бе проучен чрез оцветяване с Annexin V-FITC и пропидиев йодид последвано от флуоцитометричен анализ.

За статистическа обработка на химичен анализ и антиоксидантна активност е използван параметричен сравнителен анализ (ANOVA) и Student's t-test за оценка на разликите в средната стойност, а за полифенолите данните са анализирани чрез F-тест, последвано от Student t-тест.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Анатомичен анализ на *Micromeria frivaldszkyana*, *Clinopodium vulgare*, *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis*

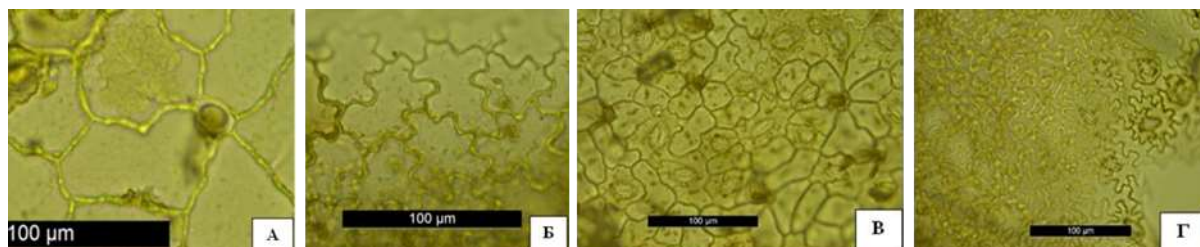
При анализа на горен и долен листен епидермис на *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare* се установи еднослойна структура с основни клетки, имащи различни размери и степен на нагъване на антиклиналните стени (фигура 3).



Фигура 3. Горен листен епидермис на *Micromeria frivaldszkyana* (А) и *Clinopodium vulgare* (Б); долен листен епидермис на *Micromeria frivaldszkyana* (В) и *Clinopodium vulgare* (Г).

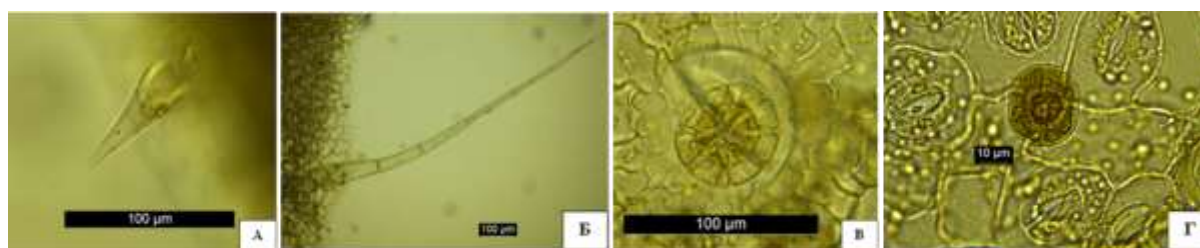
В епидермиса на двата анализирани таксона преобладава диацитен устичен апарат, но на места се откриват и аномоцитни устица (фигура 4). Разположението на устицата и по двата

епидермиса определя листата като амфистоматични. Тези резултати са в съответствие с твърденията на Metcalfe & Chalk (1950) и Naruna & Ashir (2017) за листен тип и устичен апарат при представителите на семейство Lamiaceae.

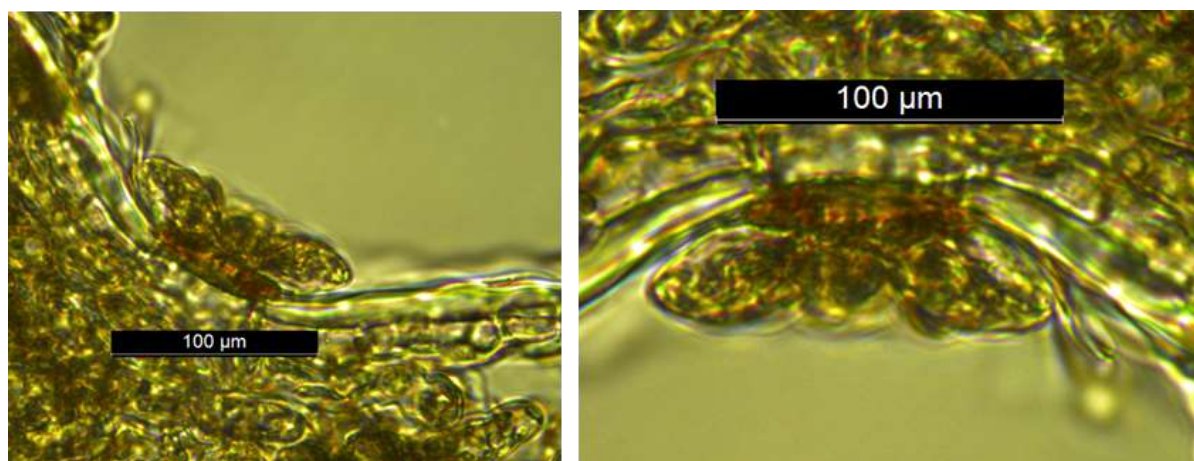


Фигура 4. Диацитен и аномоцитен тип устичен апарат при *Micromeria frivaldszkyana* (А, Б) и *Clinopodium vulgare* (В, Г).

По повърхността на горния и долния епидермис на *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare* са установени два типа трихоми – покривни и жлезисти (фигура 5). Покривните трихоми са многоклетъчни линейни, понякога със закривен връх. Жлезистите трихоми са многоклетъчни, приседнали (фигура 6). Тези резултати са в противовес с получените данни от Ya'ni *et al.* (2018) за други видове от семейство Lamiaceae, при които авторите установяват многоклетъчни жлезисти трихоми, носени от едноклетъчна дръжка. Установената от Al-Zubaidy *et al.* (2015) двуклетъчна структура на жлезистите трихоми при род *Clinopodium* не беше открита в настоящото проучване.



Фигура 5. Покривни трихоми при *Micromeria frivaldszkyana* (А) и *Clinopodium vulgare* (Б); жлезисти трихоми при *Micromeria frivaldszkyana* (В) и *Clinopodium vulgare* (Г).



Фигура 6. Жлезисти приседнали трихоми при *Micromeria frivaldszkyana*.

Резултатите от статистическата обработка на количествените данни чрез прилагане на Student's t-test за долен епидермис при двата вида са представени на таблица 1. От таблицата става ясно, че статистически достоверна разлика ($p < 0.0001$) между двата вида съществува по отношение на всички седем количествени показатели.

Таблица 2 отразява резултатите, получени при обработката на данните за горен епидермис при двата таксона.

Таблица 1. Сравнение на средните стойности за анатомичните показатели при *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare* за долен епидермис. Легенда: X_1 – средна стойност при *M. frivaldszkyana*; X_2 – средна стойност при *C. vulgare*; SEM – стандартна грешка на средната стойност; T – Student's t-test; p – ниво на значимост; $p < 0.0001$ - ***

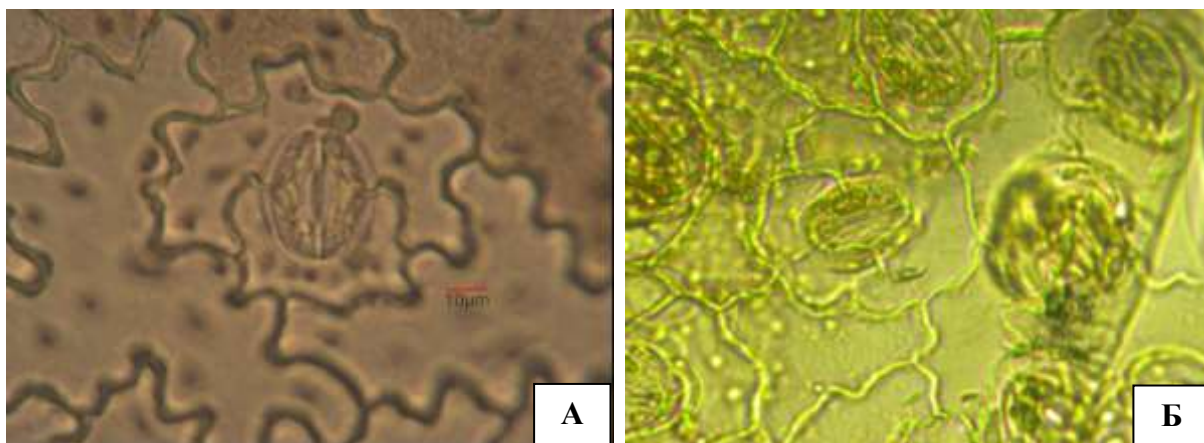
Белег	<i>Micromeria frivaldszkyana</i> $X_1 \pm \text{SEM}$	<i>Clinopodium vulgare</i> $X_2 \pm \text{SEM}$	T	p
Устица (брой)	201.95±3.34	100.49±3.53	20.87	0.000***
Устица (ширина)	4.02±0.06	0.95±0.03	44.15	0.000***
Устица (дължина)	5.87±0.07	5.05±0.05	9.92	0.000***
Епидермални клетки (брой)	865.37±8.46	696.10±6.04	16.29	0.000***
Епидермални клетки (ширина)	5.41±0.07	5.86±0.06	-4.73	0.000***
Епидермални клетки (дължина)	14.81±0.27	18.07±0.26	-8.71	0.000***
Кутикула (дебелина)	1.81±0.03	0.91±0.03	22.43	0.000***

Таблица 2. Сравнение на средните стойности за анатомичните показатели при *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare* за горен епидермис. Легенда: X_1 – средна стойност при *M. frivaldszkyana*; X_2 – средна стойност при *C. vulgare*; SEM – стандартна грешка на средната стойност; T – Student's t-test; p – ниво на значимост; $p < 0.0001$ - ***

Белег	<i>Micromeria frivaldszkyana</i> $X_1 \pm \text{SEM}$	<i>Clinopodium vulgare</i> $X_2 \pm \text{SEM}$	T	p
Устица (брой)	42.93±2.57	37.56±2.33	-1.55	0.125
Устица (ширина)	3.03±0.04	2.87±0.05	-2.51	0.014*
Устица (дължина)	6.10±0.04	4.83±0.05	-21.08	0.000***
Епидермални клетки (брой)	714.15±6.43	465.37±7.97	-24.30	0.000***
Епидермални клетки (ширина)	6.34±0.07	7.96±0.03	20.04	0.000***
Епидермални клетки (дължина)	17.09±0.18	13.01±0.07	-21.23	0.000***
Кутикула (дебелина)	1.91±0.03	1.12±0.03	-19.72	0.000***

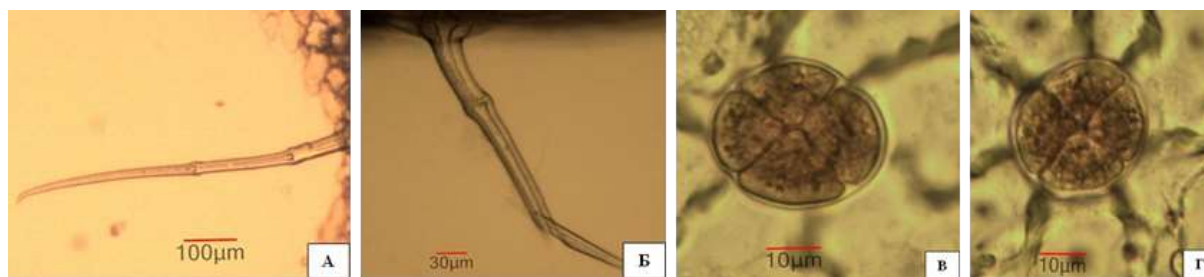
Анализирайки горната листна повърхност се установи, че между броя на устицата при двата вида липсва статистически достоверна разлика, което определя белега като нестабилен. Единствената разлика е по отношение на дължината на епидермалните клетки, която в горния епидермис е по-голяма при *M. frivaldszkyana*. Статистически достоверната разлика ($p < 0.0001$) за белезите дължина на устицата, брой, ширина и дължина на основните епидермални клетки и дебелина на горната кутикула, ги определя като стабилни и подходящи за правилното детерминиране на двата таксона.

Литературните данни показват, че таксономичното положение на видовете *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* също е дискуссионно, ето защо бе направено сравнително анатомично проучване и на тези два таксона (Mladenova *et al.*, 2021a). В епидермиса на двата анализирани таксона преобладава диацитен устичен апарат с две околоустични клетки, разположени перпендикулярно на остиолума (фигура 7).



Фигура 7. Диацитен тип устичен апарат при *Betonica bulgarica* (А) и *Betonica officinalis* (Б).

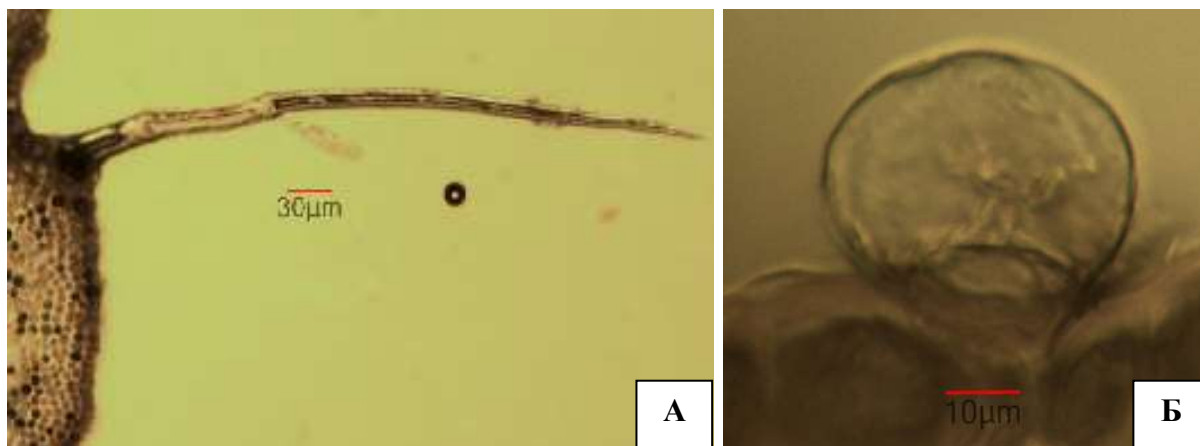
Анализирайки горния и долния епидермис на листата на *Betonica bulgarica* се установи наличие на два типа трихоми – покривни и жлезисти. Покривните трихоми са многоклетъчни линейни, неразклонени, докато жлезистите трихоми са щитовидни, приседнали, с четириклетъчна глава (фигура 8).



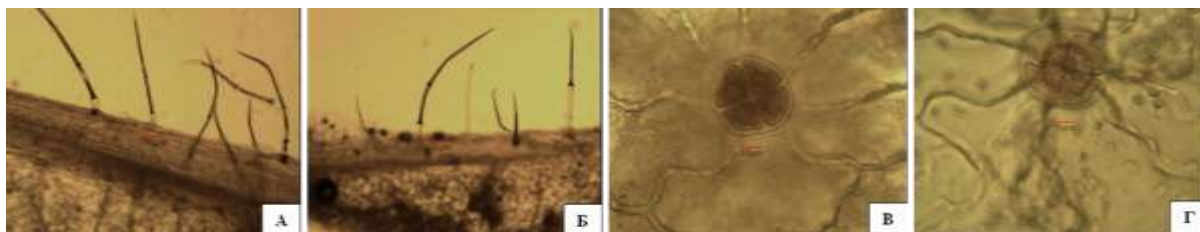
Фигура 8. Трихоми по листния епидермис на *Betonica bulgarica*: А – многоклетъчна, покривна, линейна, неразклонена по горен епидермис; Б - многоклетъчна, покривна, линейна, неразклонена по долен епидермис; В – щитовидна, приседнала трихома с четири излъчващи клетки по горния епидермис; Г - щитовидна, приседнала трихома с четири излъчващи клетки по долния епидермис.

При изследване на стъблената повърхност, освен многоклетъчни линейни, неразклонени трихоми, се установи и наличие на главести приседнали, но завършващи с едноклетъчна глава трихоми (фигура 9). За наличието на такъв тип многоклетъчни жлезисти трихоми с едноклетъчна глава съобщават Ya'ni *et al.* (2018) и при други видове на семейство Lamiaceae.

Анализирайки горния и долния епидермис на листата на *Betonica officinalis*, както при *Betonica bulgarica*, и тук се установи наличие на два типа трихоми – покривни и жлезисти. Покривните трихоми са също многоклетъчни линейни неразклонени, а жлезистите трихоми са щитовидни, приседнали, с четириклетъчна глава (фигура 10).

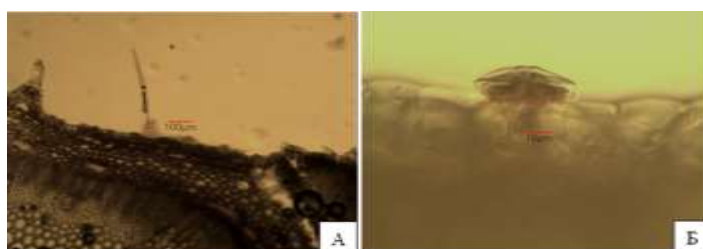


Фигура 9. Стъблени трихоми на *Betonica bulgarica*: А – покривна, многоклетъчна, линейна, неразклонена; Б – жлезиста, главеста, приседнала, с една излъчваща клетка.



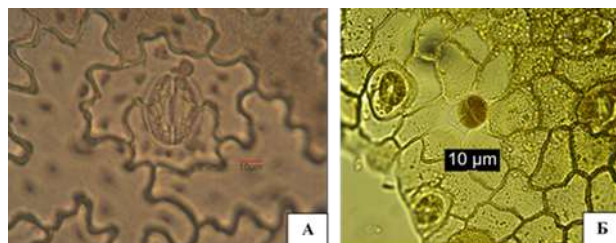
Фигура 10. Трихоми по листния епидермис на *Betonica officinalis*: А – многоклетъчна, покривна, линейна, неразклонена по горен епидермис; Б - многоклетъчна, покривна, линейна, неразклонена по долен епидермис; В – щитовидна, приседнала трихома с четири излъчващи клетки по горния епидермис; Г - щитовидна, приседнала трихома с четири излъчващи клетки по долния епидермис.

При изследване на стъблената повърхност на *Betonica officinalis* установихме многоклетъчни линейни, неразклонени трихоми и едноклетъчни, главести, приседнали трихоми (фигура 11).



Фигура 11. Стъблени трихоми при *Betonica officinalis*: А – покривна, многоклетъчна, линейна, неразклонена; Б – жлезиста, главеста, приседнала, с една излъчваща клетка.

При анализа на листния епидермис се установи, че основните клетки при двата вида са с различна степен на нагъване на антиклиналните стени. При *Betonica bulgarica* стените на епидермалните клетки са силно нагънати (фигура 12).



Фигура 12. Горен листен епидермис на *Betonica bulgarica* (А) и *Betonica officinalis* (Б).

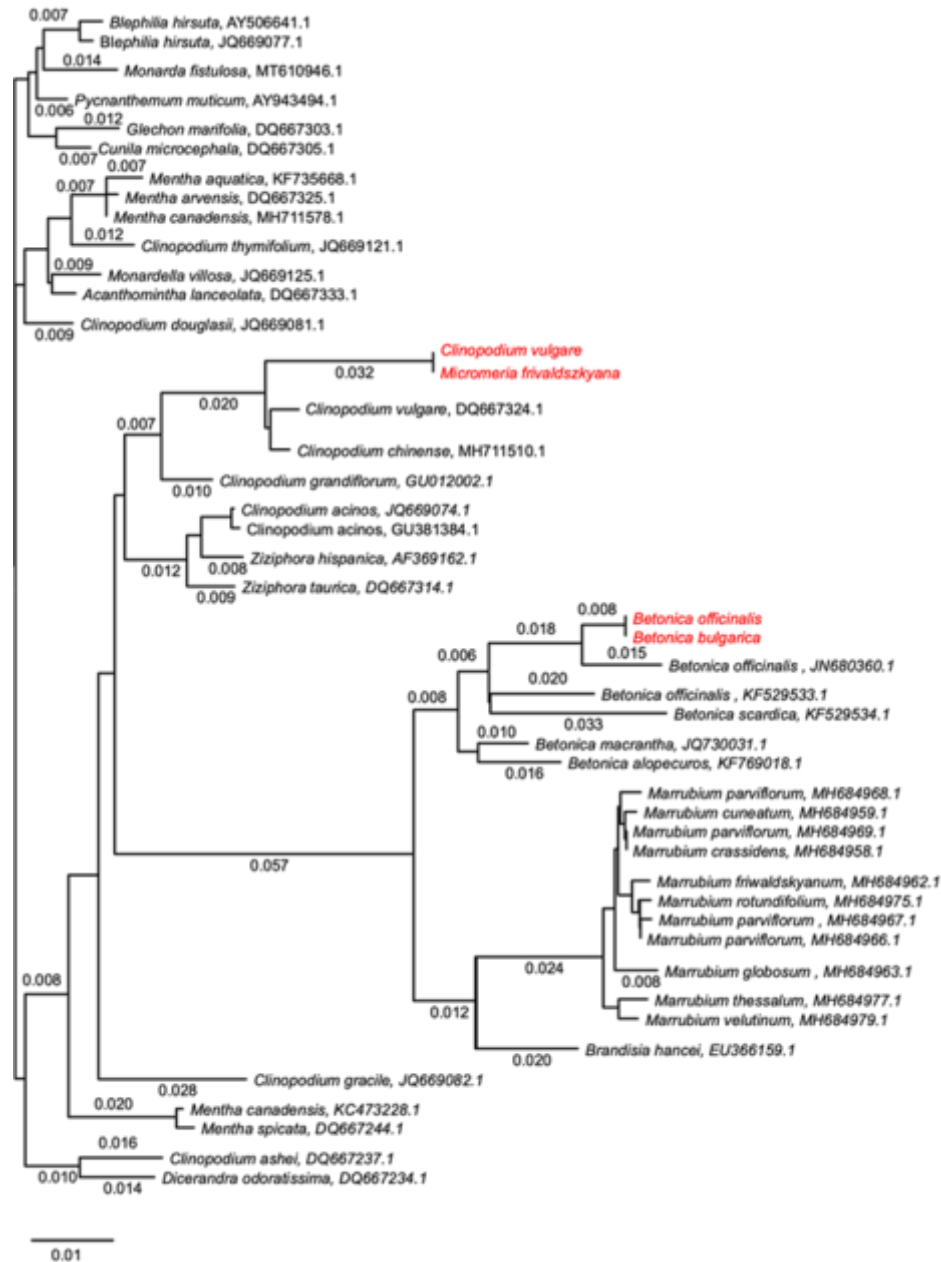
Като изключим този белег, сравнителният анатомичен анализ по предходно проследените белези показва сходство на видовете *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis*.

Молекулярно-генетичен анализ на *Micromeria frivaldszkyana*, *Clinopodium vulgare*, *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis*

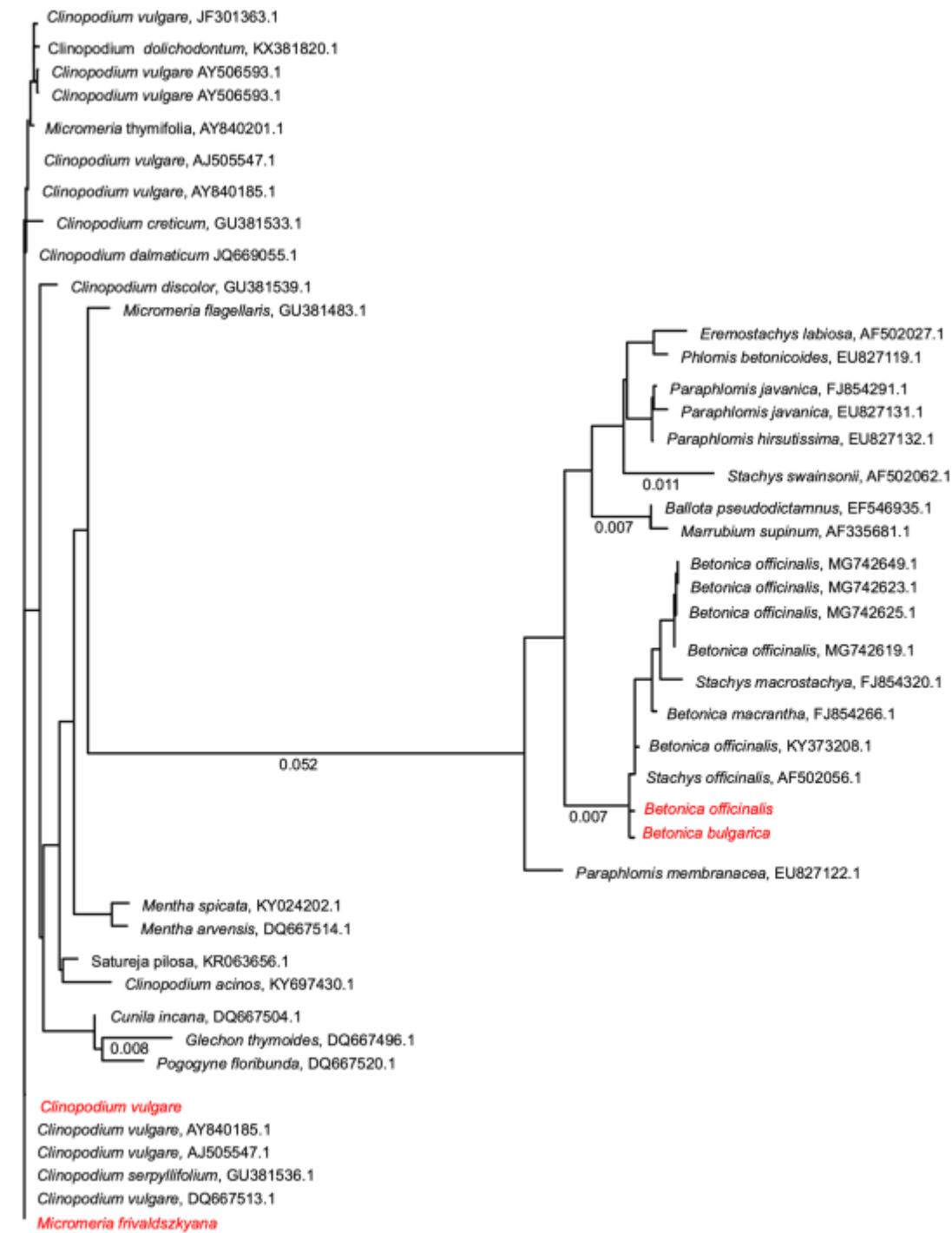
За извеждане на молекулярно-таксономичните анализи на изследваните видове бяха подбрани два различни региона: ITS1, кодиран от ядрения геном и tRNA^{leu}, кодиран в хлоропластния геном. Двата молекулярни маркера дават добра възможност за оценка на молекулярно-таксономичните връзки отношения в рамките на рода и вида.

При използване на ITS1 секвенциите на изследваните видове като филогенетичен критерий беше генерирана кладограма, включваща пет различни кластера. Както е видно от фигура 13, образците с номера *Clinopodium vulgare* и *Micromeria frivaldszkyana* се групират в един кластер заедно с представители на род *Clinopodium* и показват най-висока степен на хомология със секвенциите на видовете *Clinopodium vulgare* и *Clinopodium chinense*. На тази база бихме могли да предположим, че образците *Clinopodium vulgare* и *Micromeria frivaldszkyana* се отнасят към вида *Clinopodium vulgare*. По аналогичен начин образците *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* се групират в кластер в представители на род *Betonica* и се разполагат в непосредствена близост до образци от вида *Betonica officinalis*, т.е. с висока степен на достоверност образците *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* може да се отнесат към същия вид. По аналогичен алгоритъм бяха обработени и секвенциите за tRNA^{leu} спейсърните региони (фигура 14). В този случай се наблюдава групиране на секвенциите в четири големи кластера. Подобно на очакванията образците *Clinopodium vulgare* и *Micromeria frivaldszkyana* отново се групират с кластер с представители на вида *Clinopodium vulgare*, а *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* се групират в кластера на вида *Betonica officinalis*.

Депозирани в базата данни на [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) са ITS и tRNA^{leu} секвенциите на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* под номера: MW743275 (ITS секвенция на *Micromeria frivaldszkyana*); MW743274 (ITS секвенция на *Betonica bulgarica*); MW762672 (tRNA^{leu} секвенция на *Micromeria frivaldszkyana*) и MW762670 (tRNA^{leu} секвенция на *Betonica bulgarica*).



Фигура 13. Кластерен анализ, базиран на секвенцията на ITS1 региона.



0.01

Фигура 14. Кластерен анализ, базиран на секвенцията на tRNA^{leu}.

Характеристика на полифенолите и други фитоконституенти при *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*

Съдържание на захари и органични киселини

Micromeria frivaldszkyana съдържа най-големи количества фруктоза, глюкоза и галактоза (Mladenova et al., 2021b), докато листата на *B. bulgarica* се характеризират с най-голямо количество галактоза и глюкоза (таблица 3).

Таблица 3. Съдържание на захари при *Betonica bulgarica* и *Micromeria frivaldszkyana*.

mg/100g	Фруктоза	Глюкоза	Галактоза	Рамноза	Захароза	Мелибиоза	Общо
<i>B. bulgarica</i> – стъбло	659.5	1116.4	3071.6	281.2	133.0	405.2	5667.4
<i>B. bulgarica</i> – лист	1018.5	1209.6	6347.3	549.0	406.3	354.9	9886.7
<i>B. bulgarica</i> – съцветие	763.6	1039.3	3344.8	136.0	152.3	347.9	5785.2
<i>M. frivaldszkyana</i>	1184.3	2776.2	816.2	-	513.3	206.9	5499.0

Съдържанието на органични киселини при *Betonica bulgarica* и *Micromeria frivaldszkyana* са показани в таблица 4.

Таблица 4. Съдържание на органични киселини *Betonica bulgarica* и *Micromeria frivaldszkyana*.

mg/100g	Хиринова киселина	Ябълчена киселина	Аскорбинова киселина	Лимонена киселина	α-кетоглутарова киселина	Янтарна киселина	Оксалова киселина	Винена киселина
<i>Betonica bulgarica</i> стъбло	1836.9	90.9	152.4	347.0	112.7	172.8	8.5	17.2
<i>Betonica bulgarica</i> лист	2103.3	0.0	204.6	311.6	141.0	298.0	8.2	16.3
<i>Betonica bulgarica</i> съцветие	1648.1	0.0	153.9	595.7	104.4	82.9	11.3	30.2
<i>Micromeria frivaldszkyana</i>	556.3	91.0	83.6	341.5	36.4	125.9	13.1	45.0

Полифенолен състав и съдържание

Изследвано бе съдържанието на общи полифеноли и общи флавоноиди в *M. frivaldszkyana* (Mladenova et al., 2021b). Резултатите са показани на таблица 5.

Таблица 5. Съдържание на общи полифеноли и флавоноиди в стръкове от *Micromeria frivaldszkyana* (mg/100g, mean±SD).

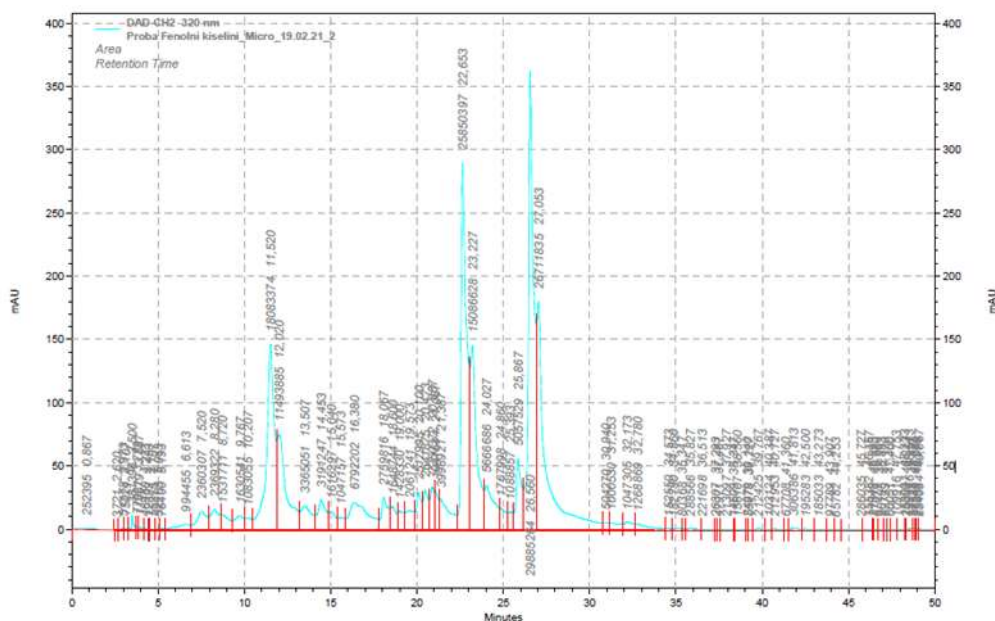
Растителен материал (70% EtOH)	Общи полифеноли	Общи флавоноиди
<i>Micromeria frivaldszkyana</i>	9004.0±255.9	594.2±6.8

Установихме, че най-голямо е количеството на розмаринова киселина (20.40±1.97 mg/g), следвана от хлорогенова киселина (1.380±0.080 mg/g), открихме следи от ферулова киселина и наличие на флавоноида агликон – апигенин (0.12 ±0.01 mg/g) (таблица 6).

Таблица 6. Съдържане на фенолни киселини и флавоноиди в *Micromeria frivaldszkyana*.

Вещества mg/g Растение	Хлорогенова киселина	Кафеена киселина	Ферулова киселина	Розмаринова киселина	Апигенин	Лутеолин
<i>Micromeria frivaldszkyana</i>	1.38±0.08	-	следи	20.40±1.97	0.12±0.01	-

Хроматограма на някои фенолни киселини в изследваният от нас растителен материал от *Micromeria frivaldszkyana* е показана на фигура 15.



Фигура 15. Хроматограма на фенолните киселини в *Micromeria frivaldszkyana*.

При проучване на общите полифеноли установихме, че съдържанието им в листата на *Betonica bulgarica* е два пъти по-високо, отколкото в стъблото, и два пъти по-малко от тези в *Micromeria frivaldszkyana* (таблица 7).

Таблица 7. Съдържание на общи полифеноли и флавоноиди (mg/100g, mean±SD).

Растителен материал (70% EtOH)	Общи полифеноли	Общи флавоноиди
<i>Betonica bulgarica</i> – стъбло	2779.3±51.1	588.4 ±57.8
<i>Betonica bulgarica</i> – лист	4651.9±304.0	878.8 ±13.8
<i>Betonica bulgarica</i> – съцветие	3177.8±56.5	304.7±10.9

При нашите изследвания на *Betonica bulgarica* се установи, че най-голямо е количеството на хлорогенова киселина (4.37±0.39 mg/g), следвана от кафеена (0.20±0.01 mg/g) и наличие на флавоноида агликон – апигенин (3.04±0.28 mg/g) (таблица 8).

Таблица 8. Съдържание на фенолни киселини и флавоноиди в *Betonica bulgarica*.

Вещества, mg/g	Хлорогенова киселина	Кафеена киселина	Ферулова киселина	Розмаринова киселина	Апигенин	Лутеолин
Растение						
<i>Betonica bulgarica</i> – лист	4.37±0.39	0.20±0.01	-	-	3.04±0.28	следи

И при двата ендемични вида се установи наличието на апигенин (в стръковете при *Micromeria frivaldszkyana* и в листата при *Betonica bulgarica*). Апигенинът е флавоноид, който притежава антимикуробни и антиоксидантни свойства, потиска развитието и разпространението на раковите клетки.

Анализ на микроелементен състав

Минералите в *Betonica bulgarica* се разпределят в следния ред: Mn > Sr > Fe > Ba > Si > Ti > Zn > Cu > Al > Rb > Ni > Pb > Mo > Cr > Cs. С изключение на Ba, всички други елементи се намират повече в листата и съцветието, отколкото в стъблото.

По отношение на *Micromeria frivaldszkyana* микроелементите се разпределят в следния ред: Fe > Sr > Si > Zn > Ti > Ba > Mn > Al > Cu > Rb > Pb > Ni > Cr > Mo > Cs. Най-голямо е съдържанието на Fe, макар че не е чувствително повече спрямо листата на *Betonica bulgarica*.

Етеричномаслено съдържание

Ние определихме качествения и количествен състав на етеричното масло от *Betonica bulgarica* (Mladenova *et al.*, 2021a). Установени са 62 компонента в етеричното масло, като β -кариофилен (17.4%) е преобладаващ (таблица 9).

Таблица 9. Качествен и количествен (GC-MS) състав на етерично масло от *Betonica bulgarica*.

№	KI	КОМПОНЕНТ	Лист	Стъбло	Цвят
1	855	trans-Hexenal*	0.6	tr	0.1
2	939	α -Pinene	0.9	tr	2.0
3	960	Benzaldehyde	tr	tr	0.3
4	979	1-Octen-3-ol	3.6	0.5	0.7
5	985	6-Methyl-5-hepten-2-one	tr	n.d.	0.1
6	988	2-Pentyl furan	tr	n.d.	0.1
7	990	Myrcene	0.1	n.d.	n.d.
8	1007	trans, trans-2,4-Heptadienal	0.2	n.d.	0.1
9	1031	Benzyl alcohol	tr	n.d.	0.2
10	1042	Benzene acetaldehyde	0.5	0.1	1.0
11	1081	4-Methylbenzaldehyde	0.1	n.d.	0.4
12	1096	Linalool	1.7	1.2	0.7
13	1100	Undecane	0.1	0.7	tr
14	1108	Phenyl ethyl alcohol	0.6	0.8	0.9
15	1126	α -campholenal	tr	tr	0.2
16	1144	trans-Verbenol	0.4	0.2	0.3
17	1188	α -Terpineol	n.d.	0.4	0.1
18	1195	Myrtenol	n.d.	n.d.	0.1
19	1167	Octanoic acid	1.1	1.1	0.6
20	1205	Verbenone	0.2	tr	0.1
21	1284	trans-Anethole	0.2	0.7	0.4
22	1293	2,4-Decadienal	tr	n.d.	0.2
23	1351	α -Cubebene	1.0	0.9	0.4
24	1359	Eugenol	0.6	0.7	0.3
25	1375	α -Ylangene	0.5	0.4	0.3
26	1376	α -Copaene	1.6	1.1	1.1
27	1388	β -Bourbonene	6.7	5.4	2.0
28	1420	β -Ylangene	0.8	0.4	tr
29	1390	β -Elemene	0.2	0.5	1.6
30	1408	Iso-Caryophyllene	tr	0.1	0.2
31	1419	β -Caryophyllene	8.6	5.9	17.4
32	1432	β -Copaene	2.8	2.1	1.0
33	1434	trans- α -Bergamotene	tr	tr	0.3
34	1433 1441	Gurjunene + Aromadendrene	0.3	0.3	0.4
35	1454	α -Humulene	3.9	2.8	6.4
36	1456	trans- β -Farnesene	1.3	1.7	1.8

37	1479	γ -Muurolene	5.7	4.8	2.6
38	1481	Germacrene D	9.9	2.4	3.6
39	1488	trans- β -Ionone + Unknown	1.1	1.1	n.d.
40	1500	α -Muurolene	0.5	2.4	tr
41	1512	Amorphene	0.3	0.3	0.3
42	1513	γ -Cadinene	4.8	4.3	0
43	1523	δ -Cadinene	6.0	4.6	2.9
44	1534	Cadina-1,4-diene	0.3	0.5	0.1
45	1538	α -Cadinene	0.5	0.6	0.1
46	1545	α -Calacorene	0.4	0.6	0.2
47	1563	1-nor-Bourbonanone	0.2	0.6	0.1
48	1565	β -Calacorene	0.2	0.6	0.2
49	1563	Nerolidol	0.2	tr	0.2
50	1578	Spatulenol	0.8	0.5	0.3
51	1582	Caryophyllene oxide	3.4	4.7	5.2
52	1584	β -Copaen-4- α -ol	1.0	1.2	0.3
53	1594	Salvial-4(14)-en-1-on	0.6	0.8	0.2
54	1608	Humulene 1,2-epoxide	1.3	1.9	1.5
55	1640	τ -Cadinol	1.0	1.5	0.6
56	1650	β -Eudesmol	0.7	2.1	1.3
57	1654	α -Cadinol	1.1	1.8	1.3
58	1913	Farnesyl acetone	0.2	0.3	0.1
59		Hexahydrofarnesyl acetone	0.5	0.6	1.3
60	1943	Phytol	1.1	1.4	0.2
61	1960	Palmitic acid	tr	0.1	0.1
62	2500	Pentacosane	tr	0.2	0.6
		Монотерпени	4.1	3.2	4.4
		Сескитерпени	56.6	54.7	49.9
		Други	39.3	42.1	45.7

КІ – Ковач индекс; * – конкретният изомер не е идентифициран; tr – следи, < 0.1%; n.d. – не се открива.

Нашите резултати потвърждават данните от литературата, че етеричните масла на растенията от род *Betonica* са бедни на монотерпенови, но богати на сескитерпенови въглеводороди.

За *Micromeria frivaldszkyana* Dimitrova *et al.* (2019) идентифицират 43 компонента в етеричното масло и установяват, че преобладаващи са пулегон (45.05%), гермакрен Д (18.43%) и лимонен (9.68%). Аналогични резултати са получени от Zheljzkov *et al.* (2019).

Изпитване на биологични активности на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*

Антиоксидантна активност

В настоящето проучване са използвани четири метода за оценка на АОА на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* – електрохимичен, ORAC, HORAC и определяне на SOD.

Антиоксидантна активност чрез електрохимичен метод

АОА беше изчислена спрямо К на тролокс, който е приет за стандарт (таблица 10). При *Micromeria frivaldszkyana* беше установено, че най-висока АОА има в 70%-ния етанолов екстракт – 12.188 (Mladenova et al., 2021b). При листата на *Betonica bulgarica* най-висока АОА също показва 70%-ния етанолов екстракт – 7.837.

Таблица 10. Антиоксидантна активност на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*, измерена с електрохимичен метод.

Растение	Екстрагенти	С, µg/mL	К, µmol/L.min±SD	АОi
<i>B. bulgarica</i> – лист	MeOH	100	19.167±0.948	5.296
	96%EtOH	100	21.527±1.281	5.948
	70%EtOH	100	28.362±1.778	7.837
	H ₂ O	100	15.280±0.902	4.222
<i>B. bulgarica</i> – съцветие	MeOH	100	15.682±0.993	4.333
	96%EtOH	100	18.980±1.122	5.245
	70%EtOH	100	11.259±0.642	3.111
	H ₂ O	100	7.238±0.451	2.000
<i>M. frivaldszkyana</i>	MeOH	100	29.621±1.997	8.185
	96%EtOH	100	30.827±2.075	8.518
	70%EtOH	100	44.109±2.865	12.188
	H ₂ O	100	12.905±0.843	3.566
Trolox	96%EtOH	100	3.619±0.013	1.000

Антиоксидантна активност, измерена чрез ORAC и HORAC методи

Известно е, че АОА на растителните екстракти се дължи на фенолни съединения и особено на флавоноидите в растителния материал (Georgieva et al., 2021). *Micromeria frivaldszkyana* е с най-богато съдържание на полифеноли и флавоноиди (представени главно от розмаринова киселина) и показва най-високата стойност на АОА с ORAC метод. В сравнение с други видове от род *Micromeria*, изследвани по същия метод от Georgieva et al. (2021), *Micromeria frivaldszkyana* показва три пъти по-голяма АОА.

Като се има предвид структурата на фенолните киселини и способността им да отделят H^+ , е логичен и полученият резултат за ORAC. Хелатообразуващата способност на флавоноидите от своя страна допринася и за по-добре изразената активност по HORAC метода (таблица 11).

Таблица 11. Антиоксидантна активност на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*, измерена чрез ORAC и HORAC методи (mean±SD).

Растение	ORAC, $\mu\text{mol TE/g}$	HORAC, $\mu\text{mol GAE/g}$
<i>Betonica bulgarica</i> - стъбло	920.3±49.1	155.7±17.7
<i>Betonica bulgarica</i> - лист	1727.3±107.0	309.7±27.7
<i>Betonica bulgarica</i> - съцветие	1628.3±135.9	349.9±21.3
<i>Micromeria frivaldszkyana</i>	3250.5±208.1	306.1±23.5

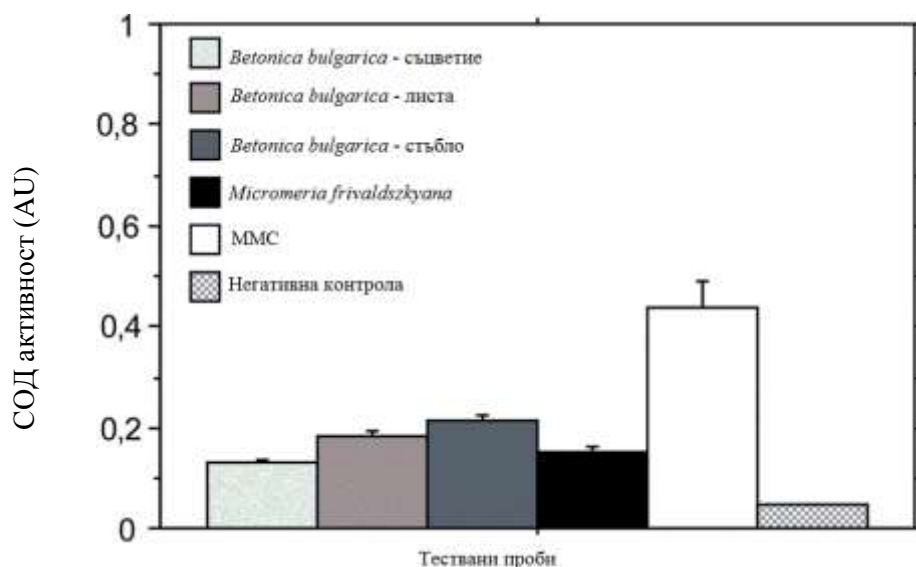
Анализ на активността на супероксид дисмутаза (SOD)

На фигура 16. са отразени абсорбционни единици, отчетени след третиране на HeLa клетки за 24 часа. При проведения колориметричен тест стойността на абсорбционните единици е пропорционална на количеството супероксиден анион. Следователно активността на SOD се отчита като инхибиторен ефект на база редуция на абсорбцията при изследваните проби. Такава редуция е налице при всички проби, третирани с екстракти, за разлика от пробата, третирана с митомицин С. Най-силен ефект се отчита при екстракта от съцветия на *Betonica bulgarica*. На база на тези данни може да бъде заключено, че екстрактите от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* индуцират окислителен стрес, който би могъл да предизвика процес на клетъчна смърт при третираните култури от HeLa клетки.

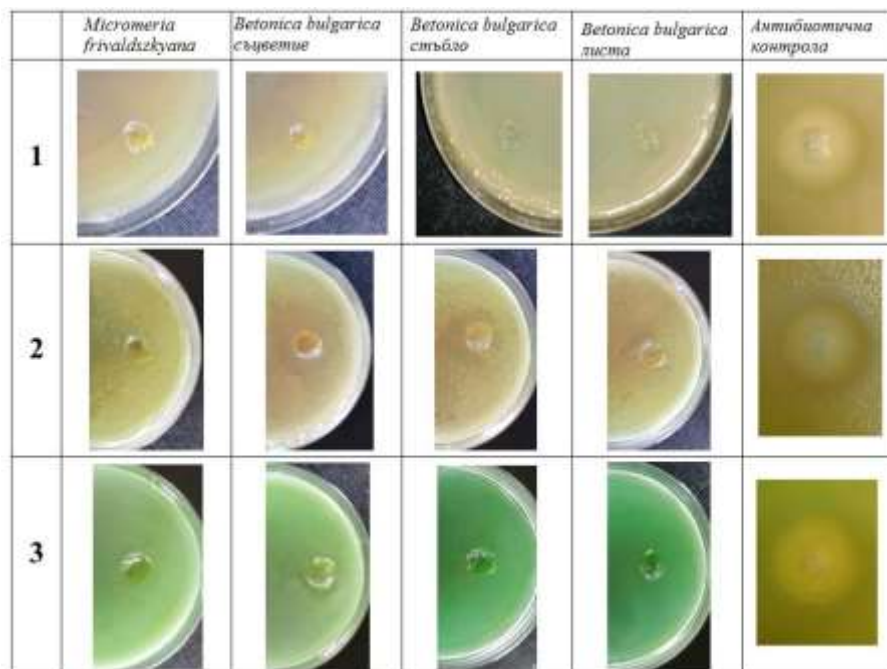
Антимикробна активност

За проучване на антибактериалната активност на екстрактите от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* първоначално бяха използвани три вида Грам-отрицателни бактерии (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) и три Грам-положителни вида (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*). Получените резултати демонстрират, че и трите тествани екстракта от *Betonica bulgarica* имат потенциала да инхибират растежа на *Bacillus cereus*. Отчетените зони на инхибиране на бактериалния растеж бяха със значителен размер, ясно изразени, подобно на антибиотичната контрола (фигура 17). Екстрактите от *Betonica bulgarica* проявиха активност и спрямо Грам-отрицателни бактерии: ниско ниво на инхибиране на растежа на *E. coli* след третиране с екстракти от стъбла и листа, докато при *Ps. aeruginosa* инхибиращ ефект бе налице след третиране с екстракт от съцветия на *Betonica bulgarica*. Въпреки това обаче екстрактите от листа и стъбла на *Betonica bulgarica*, както и екстрактът от *Micromeria frivaldszkyana*, предизвикаха редуция на бактериалния растеж в по-широк диаметър от културалния съд, което е видно от представения снимков

материал. Този резултат предполага, че активни вещества от изследваните екстракти дифундират в хранителната среда и оказват инхибиращ ефект, изразяващ се в забавяне растежа на бактериалната култура.



Фигура 16. Активност на SOD, измерена в *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*. ММС – митомидин С; негативна контрола – проба, съдържаща ензим, но не съдържа клетъчна проба.



Фигура 17. Антибактериална активност на екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*. Грам-отрицателни (1 – *Escherichia coli*, 2 – *Pseudomonas aeruginosa*) и Грам-положителни (3 – *Bacillus cereus*) бактериални щамове са култивирани със съответните екстракти от *M. frivaldszkyana* и *B. bulgarica* в продължение на 24 часа. Като положителна антибиотична контрола е използван 20 µL буферен разтвор, съдържащ 20 IU пеницилин и 20 mg стрептомицин.

Паралелно е проведено и допълнително изследване на екстрактите от *Micromeria frivaldszkyana* (Mladenova et al., 2021b) и *Betonica bulgarica* чрез дискова дифузия и определяне на минимална инхибираща концентрация, освен върху бактерии, и някои гъбни микроорганизми (таблица 12). При този експеримент антибиотиците пеницилин и нистатин бяха използвани като положителни контроли и зоната на инхибиране над 7 mm се счита за положителен резултат. Резултатите показаха инхибиращ ефект на екстрактите от стъбла и листа на *Betonica bulgarica* срещу *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* и *Listeria monocytogenes*.

Таблица 12. Диаметър на зоната на инхибиране на бактериалния растеж след третиране с екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.

Микроорганизми	Концентрация на жизнеспособни клетки, *10 ⁷ cfu/cm ³	<i>Betonica bulgarica</i> стъбло	<i>Betonica bulgarica</i> лист	<i>Betonica bulgarica</i> съцветие	<i>Micromeria frivaldszkyana</i>	Пеницилин, 10 mg/mL	Нистатин, 20 mg/mL
Инхибиращи зони, mm							
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 28089	4.1	-	9	-	-	N/A	18
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	1.2	-	-	-	-	N/A	26
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	1.7	10	9	-	-	N/A	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0	-	-	-	-	N/A	28
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.0	10	-	-	-	25	N/A
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	7.0	9	-	-	-	-	N/A
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	5.0	9	10	-	9	15	N/A
Минимална инхибираща концентрация (MIC), mg/mL							
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 28089		-	10	-	-		
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145		-	-	-	-		
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015		5	10	-	-		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		-	-	-	-		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		5	-	-	-		
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380		10	-	-	-		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111		10	5	-	10		

Легенда: „-“ – липса на инхибиране; N/A – not applied; d well = 6 mm

Екстрактът от *M. frivaldszkyana* не демонстрира антимикуробна активност срещу повечето от тестваните микроорганизми. Само Грам-положителните бактерии – *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, са чувствителни към тествания екстракт от *M. frivaldszkyana* (IZ, 9 mm и MIC, 10 mg/mL). Доколкото ни е известно, няма публикувани данни за антимикуробната

активност на екстракта от *M. frivaldszkyana* срещу *Listeria monocytogenes*, който е един от най-вирулентните хранителни микроорганизми, действащ също като сапрофит или патоген в зависимост от средата. Нистатинът проявява силен инхибиторен ефект срещу всички гъбички, но пеницилинът – само към *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Антивирусна активност

На таблица 13. са показани резултатите, предоставени от Националната референтна лаборатория за антивирусната активност на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.

Таблица 13. Отчетена антивирусна активност на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.

	<i>Micromeria frivaldszkyana</i> стрък		<i>Betonica bulgarica</i> листа		
	0.00001	0.1	0.00001	0.1	
Клетки Vero-72 часа	0.00001	0.1	0.00001	0.1	
Контрола	0.00001µg/mL	0.1µg/mL	0.00001µg/mL	0.1µg/mL	
0.14526	0.12937	0.13727	0.1148	0.08816	
0.14969	0.09811	0.11769	0.12354	0.09587	
-	0.11871	0,12345	0.11258	0.07294	
0.147475	0.115396667	0.126136667	0.116973333	0.085656667	средна стойност
	78	86	79	58	% преживяемост
Клетки Vero-48 часа	0.00001	0.1	0.00001	0,1	
Контрола	0.00001µg/mL	0.1µg/mL	0.00001µg/mL	0.1µg/mL	
0.12647	0.1082	0.10892	0.11357	0.17904	
0.11397	0.10198	0.10579	0.11261	0.1178	
-	0.10508	0,10835	0.11327	0.09718	
0.12022	0.105086667	0.107686667	0.11315	0.13134	средна стойност
	87	90	94	109	% преживяемост

Проведеното изследване доказва добра антивирусна активност на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* срещу вируса на херпес симплекс.

In vitro цитотоксичност и антитуморна активност

Екстрактите от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* бяха тествани *in vitro* върху панел от 6 клетъчни линии – 3 човешки (HeLa, A549, FL) и 3 миши клетъчни линии (LS48, 3T3, TIB71 /означавана още като RAW 264.7/). Целта на тези изследвания бе да бъде дефиниран потенциалният цитотоксичен и антитуморен ефект на получените екстракти. Най-

висока чувствителност към всички тествани проби проявиха HeLa клетките. Беше отчетен значителен цитотоксичен ефект, на база на който бяха изчислени IC₅₀ стойности и за четирите екстракта (таблица 14).

Таблица 14. *In vitro* цитотоксичност на екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.

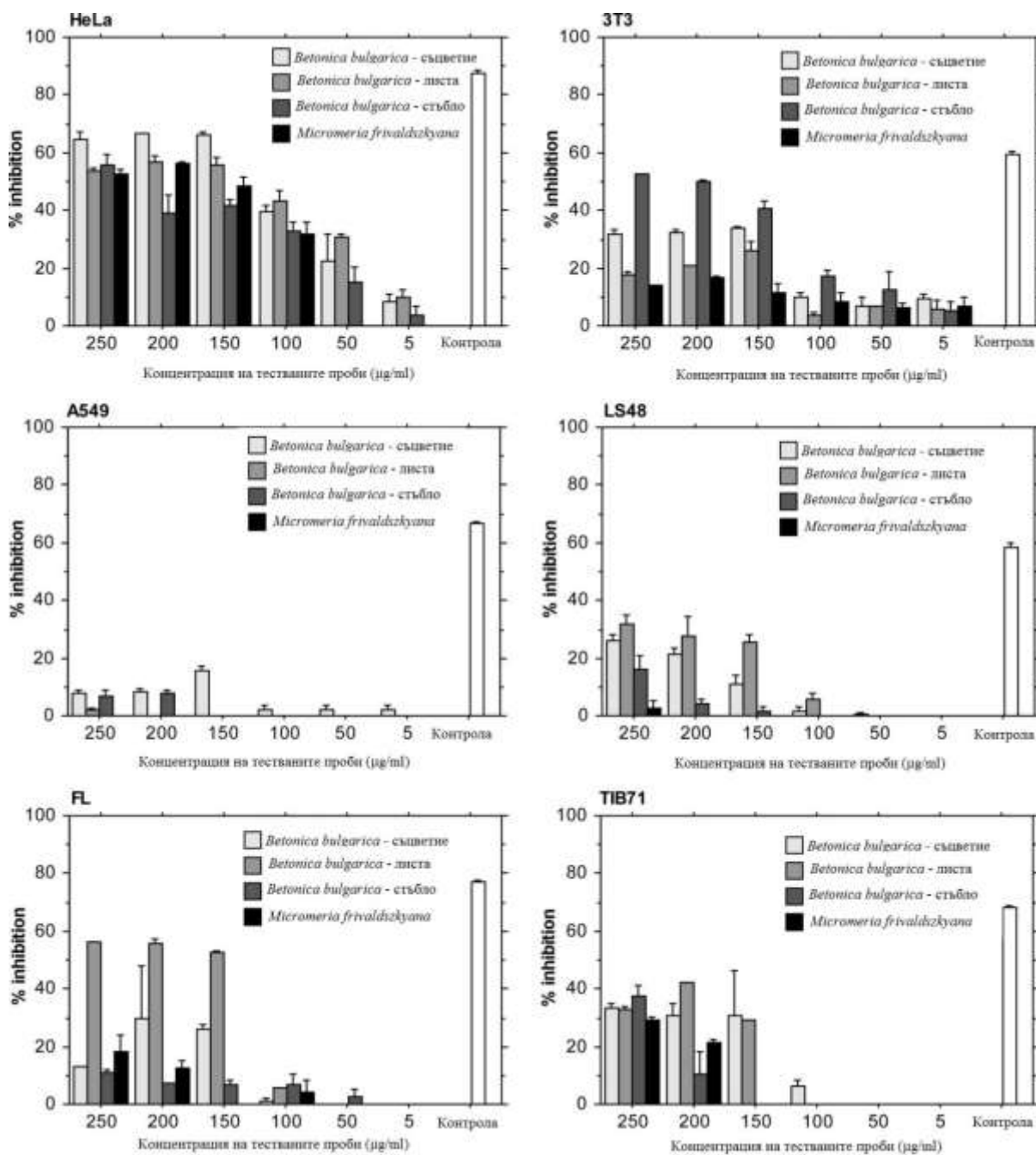
Екстракт	IC ₅₀ (µg/mL)		
	HeLa	FL	3T3
<i>Betonica bulgarica</i> – стъбло	231.34 ± 4.4	-	194.5 ± 2.7
<i>Betonica bulgarica</i> – лист	132.95 ± 3.2	147.2 ± 0.37	-
<i>Betonica bulgarica</i> – съцветие	119.2 ± 2.93	-	-
<i>Micromeria frivaldszkyana</i>	146.8 ± 13.2	-	-

IC₅₀ – концентрация на тест-агента, която предизвиква 50% инхибиране на развитието на клетките в изследваната култура в сравнение с нетретирана контрола.

Получените резултати показват (фигура 19), че екстрактът от съцветия на *B. bulgarica* има най-силен цитотоксичен ефект, тъй като предизвиква 50% инхибиране на развитието на клетъчната култура при концентрация около 120 µg/mL, докато при другите три екстракта IC₅₀ надвишава 120 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 цитотоксичен ефект на тестваните екстракти. При FL клетъчната линия по-силен токсичен ефект бе индуциран единствено от екстракта от листа на *B. bulgarica*. Клетъчната линия A549, получена от карцином на белия дроб, не показва съществена чувствителност спрямо четирите тествани екстракта. При нея бе отчетено най-ниско ниво на инхибиране в сравнение с всички останали клетъчни линии, използвани при изследването. Този резултат показва, че антитуморният ефект на екстрактите от *M. frivaldszkyana* и *B. bulgarica* е специфичен спрямо цервикални карциномни клетки. Най-силен *in vitro* цитотоксичен ефект спрямо мишите клетъчни линии прояви екстрактът от стъбла на *B. bulgarica*. При 3T3 клетъчната линия беше отчетена най-висока чувствителност спрямо изследваните проби. Значим процент инхибиране при тази клетъчна линия бе установен след третиране с екстракти от стъбла и съцветия на *B. bulgarica*. Всъщност, в сравнение с другите клетъчни линии, 3T3 клетките демонстрираха най-висока чувствителност към екстракт от стъбла на *B. bulgarica*.

При LS48 и TIB71 клетките по-силен токсичен ефект предизвикаха екстрактите от листа и съцветия на *B. bulgarica*. Тези резултати дават възможност да бъде предположено, че екстрактите от различни части на *Betonica bulgarica* се различават по състава на биологично активни вещества, а също и че е налице клетъчно-специфичен отговор спрямо тестваните проби.

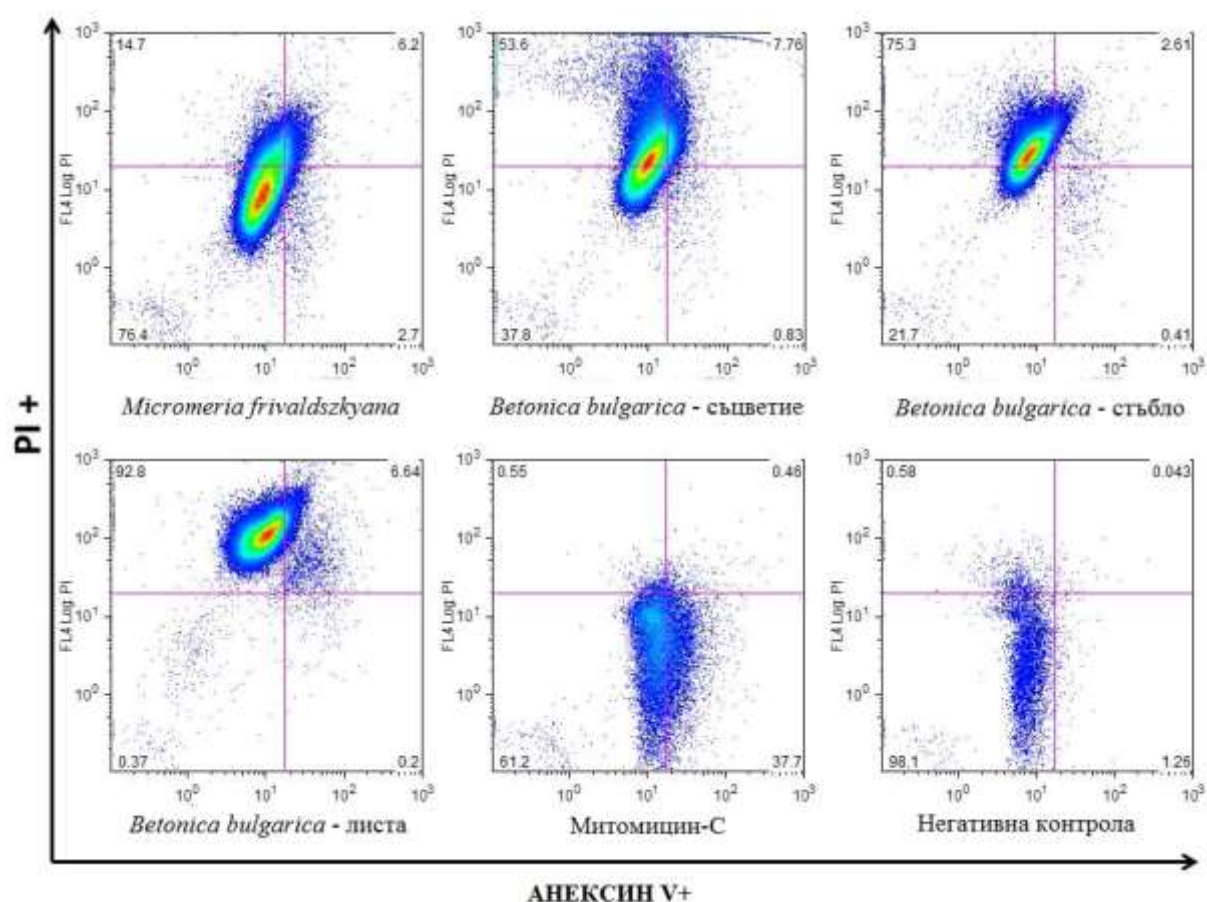
Клетъчната линия LS48, отличаваща се с висока инвазивност и пролиферативна активност, демонстрира най-ниска чувствителност спрямо тестваните екстракти в сравнение с другите две миши клетъчни линии.



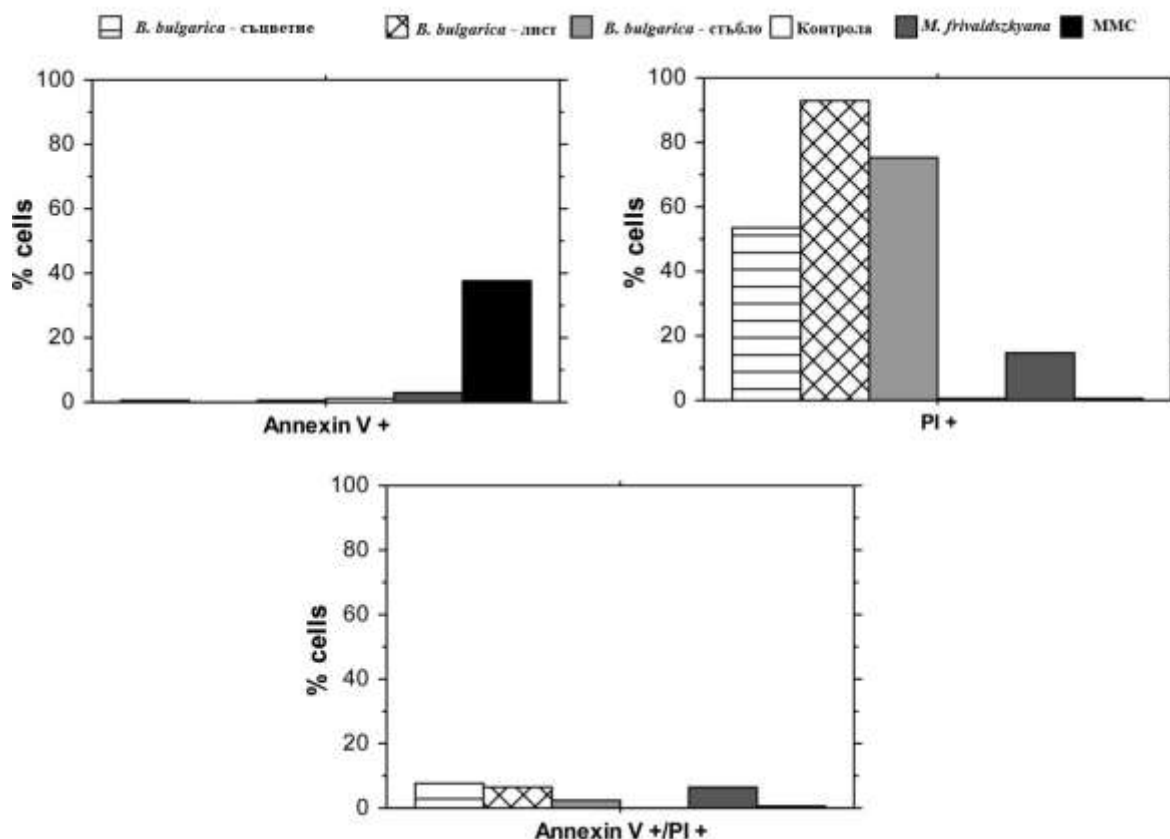
Фигура 19. *In vitro* цитотоксичност и антигуморна активност на екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*. Контрола – положителна контрола за *in vitro* цитотоксичен ефект; отразява процент инхибиране, получен след третиране на клетките с 50 µg/mL митомицин С.

Изследване на проапоптотичен ефект на екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*

Проведеният флоуцитометричен анализ (фигура 20) не показва проапоптотичен ефект при третиране на HeLa клетки с екстракти от *M. frivaldszkyana* и *B. bulgarica*. Отчетен бе изключително висок процент некротични клетки (PI⁺) след третиране с екстракти от *Betonica* (основно екстракти от стъбла и лист). Заедно с това бе налице и завишен процент клетки на етап късна апоптоза или вторична некроза (Annexin V⁺/PI⁺) при клетките, култивирани в присъствие на екстракт от *M. frivaldszkyana*, съцветие и лист от *B. bulgarica*. Тези резултати показват, че токсичният ефект на екстрактите се дължи на високия им потенциал за индукция на некроза и/или некроптоза (фигура 21).



Фигура 20. Флоуцитометричен анализ на апоптотични и некротични клетъчни популации след третиране с екстракти от *M. frivaldszkyana* и *B. bulgarica*. HeLa клетките бяха третирани с екстракти от *M. frivaldszkyana*, *B. bulgarica* и митомидин-С като положителна контрола в продължение на 24 часа. Негативните контролни клетки са култивирани в стандартна хранителна среда за същия период без третиране. Точкови графики представят HeLa клетките, оцветени с анексин V-FITC и PI.



Фигура 21. Изследване на проапоптотичен ефект на екстракти от *M. frivaldszkyana* и *B. bulgarica*. % cells – клетъчен процент; Annexin V⁺ – клетъчна популация, показваща апоптичните клетки в изследваната проба; PI⁺ – клетъчна популация, показваща некротичните клетки в изследваната проба; Annexin V⁺/PI⁺ – популацията, включваща клетки на късен етап от апоптозата и клетки, засегнати от вторична некроза (некрптоза).

Таксономично обсъждане

Едно от проучванията върху *Betonica bulgarica* в българската флора, засягащо индументума, е това на Grozeva *et al.* (2016). В него авторите анализират типа на трихомите по цялата надземна част на растението от друг Флористичен район. Различията се явяват по отношение на звездовидните многоклетъчни покривни трихоми, които не са установени при анализираните от нас листни пластинки. В противовес с посочената от тях структура на жлезистите трихоми, настоящото проучване показва четириклетъчна структура на излъчващата клетка. Звездовидни многоклетъчни покривни трихоми са описани и за вида *Stachys officinalis* (L.) Trevisan subsp. *officinalis* (syn. *B. officinalis*) от Giuliani *et al.* (2017).

Gerdzhikova *et al.* (2015), изследвайки четири популации на *B. bulgarica* в ПП „Сините камъни“, отчитат, че видът е изменчив по отношение на размери на листата и тази изменчивост зависи от редица екологични условия като географско положение, почвени и климатични условия. Силна изменчивост по отношение на морфологичните характеристики се установява и при *B. officinalis* (Dušek *et al.*, 2010). Grozeva *et al.* (2016) съобщават, че основните таксономични

белези за разграничаване на близките в морфологично отношение таксони засягат морфологията на техните генеративни органи и по-конкретно сегментите на чашката и орехчетата.

В резултат на направените молекулярно-генетични изследвания по отношение на ITS1 региона, кодиран от ядрения геном, се установи, че двата таксона трябва да се отнасят към *Betonica officinalis*. По отношение на tRNA^{leu} региона, кодиран в хлоропластния геном, видовете *Betonica bulgarica* и *Betonica officinalis* се групират в кластера на вида *Betonica officinalis*.

Въз основа на направените сравнителни анатомични и молекулярно-генетични анализи предполагаме, че се касае за един и същи вид с екологични вариации.

Род *Micromeria* е описан първоначално от Bentham (1829). Авторът посочва, че той е разпространен от Макаронезийско-Средиземноморския регион до Южна Африка, Индия и Китай. Принадлежи към семейство Lamiaceae, подсемейство Nepetoideae, триб Menthae, подтриб Menthinae. Някои таксономи разглеждат рода като част от неясния комплекс *Satureja*, като на базата на голямото разнообразие на морфологичните белези включват в този комплекс няколко рода: *Satureja* L., *Clinopodium* L., *Calamintha* Mill., *Acinos* Mill. и *Micromeria* Benth. (Bentham, 1848; Boissier, 1879; Ball & Getliffe, 1972; Davis, 1982). Други автори отнасят всички тези представители към род *Satureja* (Greuter *et al.*, 1986; Seybold, 1988) или към род *Clinopodium* (Bräuchler *et al.*, 2008). Редица проучвания от последните години, използващи кладистични анализи показват, че комплексът *Satureja* не е монофилетичен (Prather *et al.*, 2002; Trusty *et al.*, 2004; Bräuchler *et al.*, 2008). От изследванията на Morales (1993) до наши дни род *Micromeria* е претърпял редица промени, засягащи броя на включените в него таксони. Govaerts (1999) и Harley & Granda (2000) прехвърлят някои американски видове от род *Micromeria* в род *Clinopodium*. Направените филогенетични анализи, базирани на редица молекулярни, морфологични и анатомични данни от Bräuchler *et al.* (2005) и Ryding (2006), показват, че род *Micromeria* е полифилетична група. Тези резултати стоят в основата на прехвърлянето на видовете *Micromeria*, секция *Pseudomelissa* към род *Clinopodium*.

В резултат на направените молекулярно-генетични изследвания по отношение на ITS1 региона изследваните от нас видове *Clinopodium vulgare* и *Micromeria frivaldszkyana* се групират в един кластер заедно с представители на род *Clinopodium* и показват най-висока степен на хомология със секвенциите на видовете *Clinopodium vulgare* и *Clinopodium chinense*.

По отношение на tRNA^{leu} региона изследваните от нас растения отново се групират в кластер с представители на вида *Clinopodium vulgare*, което е предпоставка да се присъединим към твърденията на Bräuchler *et al.* (2006), че видът *Micromeria frivaldszkyana* може да бъде отнесен към род *Clinopodium* и е най-близък до вида *Clinopodium vulgare*. От друга страна,

установените количествени разлики от нас между някои от изследваните анатомични показатели, са добра основа за разграничаване на двата таксона.

Ние смятаме, че за вземането на по-категорични таксономични решения са необходими още проучвания.

ИЗВОДИ

В резултат от проведените изследвания върху ендемитните видове *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* могат да се направят следните изводи:

Фитохимични проучвания

1. Общите захари са локализирани основно в листата (9886.7 mg/100g) на *Betonica bulgarica*, като преобладаваща е галактозата (6347.3 mg/100g). При *Micromeria frivaldszkyana* е най-голямо съдържанието на глюкоза (2776.2 mg/100g).

2. В изследваните видове са открити 8 органични киселини, като с най-високо съдържание е хининовата. Най-високо е нивото ѝ в екстракти от *Micromeria frivaldszkyana* (556.3 mg/100g), а в листата на *Betonica bulgarica* е преобладаваща (2103.3 mg/100g).

3. В екстракт от листата на *Betonica bulgarica* се съдържат фенолните киселини кафеена и хлорогенова, както и флавоноида апигенин. В *Micromeria frivaldszkyana* се открива много високо съдържание на розмаринова киселина (20.40 ± 1.97 mg/g).

4. В изследваните видове е установено наличие на 15 микроелемента. С най-високо съдържание на Mn (177.2 μ g/g) са листата на *Betonica bulgarica*, а в *Micromeria frivaldszkyana* се открива най-високо ниво на Fe (138.9 ± 5.69 μ g/g).

5. В етеричното масло на *Betonica bulgarica* са идентифицирани 64 компонента, сред които преобладаващи са сесквитерпените въглеводороди (56.6%). От тях в листата с най-голям процент са представени β -кариофилен (17.4%) и гермакрен-D (9.9%).

6. Екстрактите на всички изследвани видове притежават антиоксидантен потенциал. Чрез електрохимичния метод беше установена най-висока антиоксидантна активност при *Micromeria frivaldszkyana* (12.188) и в листата на *Betonica bulgarica* (7.837). Най-висока антиоксидантна активност, измерена чрез ORAC и HORAC методите, показаха листата и съцветието на *Betonica bulgarica*.

Биологични проучвания

1. Екстрактите от *Betonica bulgarica* и *Micromeria frivaldszkyana* проявяват антибактериално действие спрямо *Bacillus cereus* и *Listeria monocytogenes*. Екстрактите на

Betonica bulgarica имат селективно инхибиращо действие към *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus niger*.

2. Доказана е антивирусна активност на *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* срещу вируса на херпес симплекс.

3. Най-силен цитотоксичен ефект и антитуморна активност спрямо HeLa клетъчни линии показва екстрактът от съцветия на *Betonica bulgarica*. При FL клетъчната линия по-силен токсичен ефект индуцира единствено екстрактът от листа на *Betonica bulgarica*. Спрямо мишите клетъчни линии най-силен *in vitro* цитотоксичен ефект проявява екстрактът от стъбла на *Betonica bulgarica*.

4. Молекулярно-генетичните анализи чрез ITS и tRNA^{leu} маркери показаха висока идентичност между секвенциите на видовете *Micromeria frivaldszkyana* – *Clinopodium vulgare* и видовете *Betonica bulgarica* – *Betonica officinalis*.

5. Сравнително-анатомичният анализ на белезите на устичния апарат при *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare* доказва, че те нямат таксономична стойност за видовото им разграничаване. Двата вида се характеризират с идентичен тип устичен апарат (диацитен и аномоцитен) и тип трихоми (многоклетъчни, покривни, линейни и многоклетъчни, жлезисти, приседнали).

6. При видовете *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare* бяха установени статистически значими разлики по отношение на количествените белези на устицата по долен епидермис (брой, ширина и дължина), устицата по горен епидермис (дължина), основните епидермални клетки по двата епидермиса (брой, ширина и дължина) и дебелината на горна и долна кутикула.

7. За установяване на родствените връзки между видовете *Micromeria frivaldszkyana* – *Clinopodium vulgare* и *Betonica bulgarica* – *Betonica officinalis* и вземане на аргументирани таксономични решения е необходимо да бъдат проведени допълнителни молекулярно-генетични (чрез нови маркери), кариологични и морфологични анализи.

ПРИНОСИ

Оригинални научни приноси

1. За първи път е проведен сравнителноанатомичен анализ на структурите на епидермиса и типа на овласиняване при видовете *Micromeria frivaldszkyana* и *Clinopodium vulgare*.

2. За първи път е направено молекулярно-генетично проучване на българските ендемити *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica*.

3. Секвенциите на *Micromeria frivaldszkyana* (MW743275, MW762672) и *Betonica bulgarica* (MW743274, MW762670) са депозирани в базата данни на [National Center for](#)

Biotechnology Information (NCBI), което предоставя възможности за бъдещи генетични изследвания върху тях и близкородствени таксони.

4. За първи път са проведени фитохимични проучвания на ендемитните видове *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* за съдържание на общи захари, органични киселини, микроелементи и сесквитерпените въгледороди. В екстрактите от тях е доказана антиоксидантна, антибактериална и антивирусна активности.

Научни приноси с приложен характер

1. След култивиране видовете *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* могат да бъдат препоръчани при фармацевтични разработки на лекарствени продукти с антивирусна значимост.

2. Установеният специфичен антитуморен ефект на екстрактите от *Micromeria frivaldszkyana* и *Betonica bulgarica* спрямо цервикални карциномни клетки ги прави потенциален източник на фармацевтични разработки на лекарствени продукти за превенция и лечение при някои видове рак.

3. Лечебното растение *Betonica officinalis* може да се използва като обект за провеждане на практическо обучение на студентите по Фармацевтична ботаника при подготовката им върху темата „Покривни и отделителни структури при растенията“.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

- Делипавлов, Д., Чешмеджиев, И. и кол. (2011). Определител на растенията в България. Академично издателство на АУ – Пловдив. 591.
- Закон за защитените територии. Обн. ДВ. бр. 133 от 11 Ноември 1998 г., изм. ДВ. бр. 21 от 12 Март 2021 г.
- Маринов, Ю. (2018). Флора и местообитания на Природен парк „Българка“. Дисертация, ПУ „Паисий Хилендарски“, 206 стр.
- Нейчев, И. (1903). Нови и с малко находища за българската флора растения. *Период. сп.* Бълг. книж. друж., 64: 756-759.
- Нейчев, И. (1906). Няколко нови за българската флора растения. *Год. СУ*, 2: 138-144.
- Пеев, Д. (ред.) (2015). Червена книга на Република България. Т. 1, *Растения и гъби*. ИБЕИ, БАН & МОСВ, София.
- Станев, С. (2010). История на ботаниката в България (до 1944 г.). Универ. изд. „Паисий Хилендарски“. Пловдив, 234-335.
- Стоянов, П. (2017). Водорасли и висши спорови растения на Природен парк „Българка“. Издателство „Лакс бук“, Пловдив, 100 стр.
- AL-Zubaidy, A. M. A., Hassan, K. I., Jabbari, B. S. (2015). A comparative Anatomical Study of The Genera *Clinopodium* L., *Hymenocrater* Fish. & Mey. and *Melissa* L. (Lamiaceae) in Kurdistan Region of Iraq. *Diyala Journal for Pure Sciences*, 11(4): 30-43.
- Ančev, M., Krendl, F. (2011). *Galium* sect. *Leiogalum* (Rubiaceae) in the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*, 17(3): 291-314.
- Aneva, I., Zhelev, P., Nikolova, M., Evtimov, I. (2018). The ecological and floristic characteristics of natural population of *Micromeria juliana* (L.) Benth. ex Rchb. in Bulgaria. *Biologica Nyssana*, 7(2): 91-99.

- Ball, P.W., Getliffe, F.M. (1972). Satureja, Acinos, Clinopodium, Calamintha. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (Eds.) *Flora europea* 3. Cambridge University Press, Cambridge pp. 163-167.
- Bentham, G. (1829). *Micromeria*. *Bot. Reg.*, 15, 282.
- Bentham, G. (1848). Labiatae. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, 12: 262-358.
- Boissier E (1879). *Flora Orientalis* Vol. 4, pp. 897-986. Basel/Genève: Georg.
- Bräuchler, C., Meimberg, H., Abele, T., Heubl, G. (2005). Polyphyly of the genus *Micromeria* (Lamiaceae) - evidence from cpDNA sequence data. *Taxon*, 54(3): 639-650.
- Bräuchler, C., Meimberg, H., Heubl, G. (2006). New names in Old World *Clinopodium* - the transfer of the species of *Micromeria* sect. *Pseudomelissa* to *Clinopodium*. *Taxon*, 55(4): 977-981.
- Bräuchler, C., Ryding, O., Heubl, G. (2008). The genus *Micromeria* (Lamiaceae), a synoptical update. *Willdenowia*, 38(2): 363-410.
- Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3): 178-182.
- Cheshmedziev, I., Marinov, Y. (2009). *Allium phthioticum*: new species for the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*, 15(3): 385-388.
- Davis, P. (ed.) (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* 7., Edinburgh.
- Dimitrova-Dyulgerova, I., Marinov, Y., Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Stoyanova, A. (2019). Essential Oils Composition of the Endemic Bulgarian Plant Species *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen. (Lamiaceae). *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*. 72(11): 1484-1491.
- Duke, J., Beckstrom-Sternberg, S. (2001). *Handbook of Medicinal Mints (Aro-mathematics): Phytochemicals and Biological Activities*. CRC Press, LLC, USA, pp. 305.
- Dušek, K., Dušková, E., & Smékalová, K. (2010). *Betonica officinalis* L. in the Czech Republic. I. Variability of morphological characteristics. *Herba Polonica*, 56(2): 7-20.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4: 177.
- Frivaldszky, E. (1835). Közlések a Balkáy vidéken tett természettudományi utazásról. *Magyar Tud. Tars. Évk.*, 2: 249.
- Georgieva, Y., Katsarova, M., Stoyanov, P., Mladenov, R., Denev, P., Teneva, D., ... & Dimitrova, S. (2021). Metabolite Profile and Antioxidant Activity of Some Species of Genus *Scutellaria* Growing in Bulgaria. *Plants*, 10(1), 45.
- Gerdzhikova, M., Grozeva, N., Pavlov, D., Panayotova, G., Todorova, M. (2015). Leaves area characteristics of *Betonica bulgarica* Degen et *Neicircumflex*. during vegetation. *Agricultural Science and Technology*, 7(4): 486-493.
- Giuliani, C., Pellegrino, R. M., Selvaggi, R., Tani, C., Tirillini, B., Maleci Bini, L. (2017). Secretory structures and essential oil composition in *Stachys officinalis* (L.) Trevisan subsp. *officinalis* (Lamiaceae) from Italy. *Natural product research*, 31(9): 1006-1013.
- Govaerts, R. (1999). World checklist of seed plants. Volume 3, part 1, the species. pp. 567
- Greuter, W., Burdet, H. M., Long, D. (1986). *Med-Checklist* 3. Genève & Berlin.
- Grozeva, N. H., Gerdzhikova, M. A., Pavlov, D. H., Panayotova, G. D., Todorova, M. H. (2016). Morphological variability of the Bulgarian endemic *Betonica bulgarica* Degen et Neič. (Lamiaceae) from Sinite Kamani Natural Park, Eastern Balkan Range. *Acta Botanica Croatica*, 75(1): 81-88.
- Hájek, M., Hájková P., Apostolova, I. (2005). Notes on the Bulgarian wetland flora including new national and regional records. *Phytologia Balcanica*, 11(2): 173-144.
- Harley, R. M., Paucar, A. G. (2000). List of species of tropical *American Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. *Kew Bulletin*, 917-927.
- Haruna, H., Ashir, H. (2017). Leaf epidermal structures and stomata ontogeny in some members of the Lamiaceae family. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 10(1): 670-675.
- Háznagy-Radnai, E., Czigle, S., Zupkó, I., Falkay, G., Máthé, I. (2006). Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia*, 77(7-8): 521-524.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, 173: 501-513.

- Herken, E. N., Celik, A., Aslan, M., & Aydımlık, N. (2012). The constituents of essential oil: antimicrobial and antioxidant activity of *Micromeria congesta* Boiss. & Hausskn. ex Boiss. from East Anatolia. *Journal of medicinal food*, 15(9): 835-839.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Stoyanova, A., Murgov, I., Gearon, V., ... & Geissler, M. (2006). Comparative study on the antimicrobial activities of different sandalwood essential oils of various origin. *Flavour and fragrance journal*, 21(3): 465-468.
- Katiyar, C., Gupta, A., Kanjilal, S., Katiyar, S. (2012). Drug discovery from plant sources: an integrated approach. *Int. J. Ayurveda. Res.*, 33: 10-19.
- Katsarova, M., Dimitrova, S., Lukanov, L., & Sadakov, F. (2017). Determination of phenolic acids, flavonoids, terpenes and ecdysteroids in medicinal plant extracts and food supplements. *Comptes rendus l'Académie Bulg des Sci.* 70(7): 947956
- Khanavi, M., Hajimahmoodi, M., Cheraghi-Niroomand, M., Kargar, Z., Ajani, Y., Hadjiakhoondi, A., Oveisi, M. R. (2009). Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. *African Journal of Biotechnology*, 8(6): 1143-1147.
- Kostadinova, E., Alipieva, K., Stefanova, M., Stafilov, T., Antonova, D., Evstatieva, L., Matevski, V., Kulevanova, S., Stefkov, G., Bankova, V. (2007). Chemical composition of the essential oils of three *Micromeria* species growing in Macedonia and Bulgaria. *Macedonian Journal Of Chemistry And Chemical Engineering*, 26(1): 3-7.
- Kožuharov, S., Petrova, A. (1988). Atlas Florae Europaea notes. 12. News and adjustments concerning Bulgarian Ranunculaceae. *Ann. Bot. Fennici*, 25: 389-390.
- Lee, I. T., Luo, S. F., Lee, C. W., Wang, S. W., Lin, C. C., Chang, C. C., ... & Yang, C. M. (2009). Overexpression of HO-1 protects against TNF- α -mediated airway inflammation by down-regulation of TNFR1-dependent oxidative stress. *The American journal of pathology*, 175(2): 519-532.
- Marinov, Y. (2009). *Cynoglossum germanicum* (Boraginaceae) – an endangered species in Bulgarian flora. *Flora Mediterranea*, 9: 67-71.
- Marinov, Y., Cheshmedzhiev, I., Mladenov, R. (eds). (2015). Floristic analysis of the central part of Mt Shipka (Central Balkan, Bulgaria). *Phytologia Balcanica*, 21(3): 297-308.
- Marinov, Y., Radoukova, Tz., Stoyanov, P., Mladenova, Tz. (2017). Natural Habitats in the forest-free zone of Malusha peak (Protected Area Bulgarka BG0000399 and Protected Area Central Balkan - buffer BG0001493). *Ecologia Balkanica*, 9(2): 41-49.
- Marinova, G., Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1): 11-24.
- Metcalf, C. R., Chalk, L. (1950). Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Vol. 2, Clarendon Press, Oxford.
- Mladenova, Ts., Petkov, V., Sirakov, S., Stoyanov, P. (2018). Biological study of *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen. (Lamiaceae). (Article in Bulgarian with English Abstract). Collection of articles from the National Scientific Conference “15 Years of Pharmacy in Medical University – Plovdiv”, 280-284.
- Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Todorov, K., Davcheva, D., Kirova, G., Deneva, T., Gyuzeleva, D., Mladenov, R., Bivolarska, A. (2021a). Phytochemical and Biological Traits of Endemic *Betonica bulgarica* (Lamiaceae). *Separations*, 8(11): doi.org/10.3390/separations8020011
- Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Denev, P., Dimitrova, S., Katsarova, M., Teneva, D., Todorov, K., Bivolarska, A. (2021b). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the Balkan endemic *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen. (Lamiaceae). *Plants*, 10, 710. <https://doi.org/10.3390/plants10040710>
- Morales, R. (1993). Sinopsis y distribución del género *Micromeria* Benth. *Botanica Complutensis*, 18: 157-168.
- Naithani, R., Huma, L. C., Holland, L. E., Shukla, D., McCormick, D. L., Mehta, R. G., Moriarty, R. M. (2008). Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(11): 1106-1133.
- Nikolova, M., Aneva, I., Zhelev, P., Dimitrova, M. (2017). Flavonoid compounds and antioxidant activity of Bulgarian species of *Micromeria*. *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie*, 102(4): 7-13.

- Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G., Öksüz, S., Choudhary, M. I. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, 126(1): 31-38.
- Petrova, A. (ed). (2006). Atlas of Bulgarian endemic plants. Gea-Libris Publishing House. Sofia, pp. 400.
- Petrova, A., Marinov, Y., Vasilev, R., Venkova, D. (2009). Reports 38-45. - In: Vladimirov, V. *et al.* New floristic records in the Balkans: 5. *Phytologia Balcanica*, 15(1): 125-127.
- Petrova, A., Venkova, D. (2006). *Epipactis leptochila* (Orchidaceae) a new species for the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*, 12(1): 75-78.
- Petrova, A., Venkova, D. (2008). *Epipactis exilis* and *E. greuteri* (Orchidaceae) in the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*, 14(1): 69-73.
- Prather, L. A., Monfils, A. K., Posto, A. L., Williams, R. A. (2002). Monophyly and phylogeny of *Monarda* (Lamiaceae): Implications of sequence data from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. *Syst. Bot*, 27, 127-137.
- Ryding, O. (2006). Revision of the *Clinopodium abyssinicum* group (Labiatae). *Botanical Journal of the linnean society*, 150(3): 391-408.
- Seybold, S. (1988). Die Arten der Gattung *Satureja* L. (Labiatae) in Äthiopien. *Stuttgarter*, pp. 38.
- Shehab, N. G., Abu-Gharbieh, E. (2012). Constituents and biological activity of the essential oil and the aqueous extract of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *serpyllifolia*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 25(3): 687-692.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Širjaev, G. (1931). De plants nonnullis bulgaricus. II. Изв. Българ. Бот. Д-во, 4: 34-35.
- Sitarek, P., Merez-Sadowska, A., Śliwiński, T., Zajdel, R., Kowalczyk, T. (2020). An In Vitro Evaluation of the Molecular Mechanisms of Action of Medical Plants from the Lamiaceae Family as Effective Sources of Active Compounds against Human Cancer Cell Lines. *Cancers*, 12(10): 2957.
- Trusty, J. L., Olmstead, R. G., Bogler, D. J., Santos-Guerra, A., Francisco-Ortega, J. (2004). Using molecular data to test a biogeographic connection of the Macaronesian genus *Bystropogon* (Lamiaceae) to the New World: a case of conflicting phylogenies. *Systematic Botany*, 29(3): 702-715.
- Velenovsky, J. (1899). Über *Micromeria frivaldszkyana* Deg. und *M. balcanica* Vel. Österr. Bot. Z. 49; 291.
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Bival Štefan, M., Alegro, A., Kőszegi, T., Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules*, 16(2): 1454-1470.
- Vladimir-Knežević, S., Cvijanović, O., Blažeković, B., Kindl, M., Štefan, M. B., Domitrović, R. (2015). Hepatoprotective effects of *Micromeria croatica* ethanolic extract against CCl₄-induced liver injury in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1): 1-12.
- Ya'ni, A., Hassan, S., Elwan, Z., Ibrahim, H., & Eldahshan, O. (2018). Morphological and anatomical studies on selected Lamiaceae medicinal plants in Bani Matar District, Sana'a (Yemen). *Taekholmia*, 38(1): 17-39.
- Zheljazkov, V., Micalizzi, G., Semerdjieva, I., Mondello, L. (2019). Chemical Composition of the Essential Oil of the Endemic Species *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen. *Molecules*, 24(440): 1-11.




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

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“, 01 – 03 юни 2018 г., Девин, България. Постер: *Biological study of Micromeria frivaldszkyana (Degen) Velen. (Lamiaceae)*. Authors: Tsvetelina Mladenova, Venelin Petkov, Semir Sirakov, Plamen Stoyanov.

4th World Congress and Expo on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems. March, 25-26, 2019, Milan, Italy. Poster: Antioxidant Activity of *Micromeria frivaldszkyana (Degen) Velen. (Lamiaceae)*. Authors: Anelia Bivolarska, Tsvetelina Mladenova, Plamen Stoyanov, Stela Dimitrova, Mariana Katsarova.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

Публикации по дисертационния труд	Web of Science	Scopus SJR
Mladenova, Ts., Petkov, V., Sirakov, S., Stoyanov, P. (2018). Biological study of <i>Micromeria frivaldszkyana (Degen) Velen. (Lamiaceae)</i> . Collection of articles from the National Scientific Conference “15 Years of Pharmacy in Medical University – Plovdiv”, 280-284.	-	-
Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Michova-Nankova, I. Mladenov, R., Boyadzhiev, D., Bivolarska, A., Todorov, K. (2019). Comparative Leaf Epidermis Analyses of <i>Micromeria frivaldszkyana (Degen) Velen.</i> and <i>Clinopodium vulgare L. (Lamiaceae)</i> from Bulgarka Nature Park, Bulgaria. <i>Ecologia Balkanica</i> , 11(2): 133-140	*	 Q4 SJR 0.134 (2019)
Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Todorov, K., Davcheva, D., Kirova, G., Deneva, T., Gyuzeleva, D., Mladenov, R., Bivolarska, A. (2021). Phytochemical and Biological Traits of Endemic <i>Betonica bulgarica (Lamiaceae)</i> . <i>Separations</i> , 8(11) doi.org/10.3390/separations8020011	Q3 IF 1.900 (2019)	 Q2 SJR 0.485 (2020)
Mladenova, Ts., Stoyanov, P., Denev, P., Dimitrova, S., Katsarova, M., Teneva, D., Todorov, K., Bivolarska, A. (2021). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the Balkan endemic <i>Micromeria frivaldszkyana (Degen) Velen. (Lamiaceae)</i> . <i>Plants</i> , 10, 710. doi.org/10.3390/plants10040710	Q1 IF 2.762 (2019)	 Q1 SJR 0.892 (2020)

ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Статия: Мladenova, Ts., Stoyanov, P., Todorov, K., Davcheva, D., Kirova, G., Deneva, T., Gyuzeleva, D., Mladenov, R., Bivolarska, A. (2021). Phytochemical and Biological Traits of Endemic *Betonica bulgarica* (Lamiaceae). *Separations*, 8(11) doi.org/10.3390/separations 8020011

Цитирана в: Ciocarlan, A., Hristozova, G., Aricu, A., Dragalin, I., Zinicovscaia, I., Yushin, N., Grozdov, D., Popescu, V. (2021). Determination of the Elemental Composition of Aromatic Plants Cultivated Industrially in the Republic of Moldova Using Neutron Activation Analysis. *Agronomy*, 11(5): 1011. <https://doi.org/10.3390/agronomy11051011> **Q1** **IF 2.603 (2019)** **Q1** **SJR 0.707 (2020)**