



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ



КАТЕДРА „БОТАНИКА И БИОЛОГИЧЕСКО ОБРАЗОВАНИЕ“

ЦВЕТЕЛИНА ГЕОРГИЕВА АНДОНОВА

**ФИТОХИМИЧНИ И БИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ
ВЪРХУ ИНВАЗИВНИТЕ ЗА БЪЛГАРСКАТА ФЛОРА
AILANTHUS ALTISSIMA (MILL.) SWINGLE
И *KOELREUTERIA PANICULATA* LAXM.**

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-р Иванка Жечева Димитрова-Дюлгерова

доц. д-р Илия Желев Славов

Пловдив, 2022 г.

Дисертационният труд се състои от 148 страници, 21 таблици, 25 фигури, 8 приложения. Списъкът с литературните източници включва 247 източника (1 на кирилица и 246 на латиница)

Експерименталните изследвания са проведени в научните лаборатории на катедра „Ботаника и биологическо образование“ на Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, катедра „Химична технология“ на Химически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ на Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, „Лаборатория по приложни биотехнологии“ – Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, (ИЕМПАМ-БАН), катедра „Технология на мазнините, етеричните масла, парфюмерията и козметиката“ при УХТ – Пловдив, „Агробиоинститут“ – София, ССА.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Ботаника и биологическо образование“ на Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“, проведено на 17.10.2022 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 16.12.2022 г. от 13.00 ч. в 14 аудитория на Биологически факултет при 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

проф. д-р Димчо Захариев Иванов

проф. д.н. Катя Нанева Величкова

доц. д-р Детелина Стоянова Белкинова

доц. д-р Пламен Стефанов Стоянов

Автор: Цветелина Георгиева Андонова

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ:

ABTS	2,2'-азино-бис (3-етилбензтиазолин-6-сулфонова) киселина
CUPRAC	мед редуцираща антиоксидантна ативност
DMSO	диметилсулфоксид
DPPH	2,2 дифенил-1-пикрилхидразил
DW	сухо тегло
FRAP	желязо редуцираща антиоксидантна активност
GC/MS (ГХ/МС)	газова хроматография, мас спектрометрия
HPLC (ВЕТХ)	високоэффективна течна хроматография
HT-29	клетъчна линия от човешки колоректален аденокарцином
PC3	клетъчна линия от аденокарцином на простата
Eur Pharm	Европейска Фармакопея
ROS	реактивни кислородни видове
SD	стандартно отклонение
MTT	(3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид)
TE	тролокс еквивалент
АОА	антиоксидантна активност
АМА	антимикробна активност
БАВ	билогично активни вещества
ГФР	Държавна Фармакопея на Русия
GAE	галова киселина еквиваленти
ЕМ	етерично масло
ИЧВ	инвазивни чужди видове
RE	рутин еквиваленти
СФМ	спектрофотометрия

ВЪВЕДЕНИЕ

В търсене на нови източници на биоактивни съединения за профилактика и лечение на различни заболявания, през последните години нараства интересът към растителни екстракти, етерични масла, чисти вещества и др., с цел влагане в природни фитопродукти. Задълбоченото изучаване на химичния състав на растителни видове е важна крачка в откриването на нови химични съединения, които да бъдат достатъчно ефективни и същевременно по-лесно усвоими и с по-малко странични ефекти, предвид тяхния естествен произход. Все повече нараства научният интерес към широко разпространени видове, които се явяват инвазивни за редица страни, поради факта, че потискат и изместват местните видове и представляват заплаха за биоразнообразието. Същевременно обаче, те могат да бъдат ценен и достъпен природен ресурс на биоактивни съединения, проявяващи редица фармакологични ефекти. Обстойни проучвания върху химичния състав на такива видове, както и върху проявени биологични ефекти на растителни екстракти от тях, обогатява набора от растителни видове, източници на лечебни суровини. От друга страна, по-сериозното експлоатиране на такива инвазивни видове с лечебни свойства, би спомогнало за решаване на проблема с неконтролируемото им разпространение.

В България естествената лечебната флора е богата и обект на множество научни изследвания. Що се отнася до чуждите и особено инвазивните видове, изследванията са предимно с екологична насоченост. В настоящия труд интересът е насочен към два дървесни вида, широко разпространени, чужди за територията на страната и Европа, а именно *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle (айлант) и *Koelreuteria paniculata* Lam. (китайски мехурник). Произходът им е свързан с Югоизточна Азия и преди повече от век са внесени с декоративна цел, но подивяват и бързо се разпространяват, особено айланта. Направената оценка на риска от инвазия в различни страни, определя айланта като силно инвазивен, а китайския мехурник като потенциално инвазивен, с възможност за силна инвазивност (Petrova et al., 2013; Ljubojević, et al., 2021). Те представляват заплаха за местните растителни видове, чийто негативен ефект е по-силно изразен в защитените територии, отличаващи се с богато растително разнообразие и по-слабо в градските райони.

K. paniculata (сем. Sapindaceae) е дървесен вид, достигащ до 10 м височина, с яйцевидна корона, сложни нечифтоперести листа и сиво-кафява до черна, набраздена и напукана кора.



K. paniculata



A. altissima

Анемохория, зоохория и хидрохория са типични за вида. Силно адаптивен растителен вид с бърз растеж, издръжлив на суша и вятър. Развива се и върху бедни, варовити почви, като понася замърсявания с тежки метали. В България е широко разпространен (Родопи, Черноморско

крайбрежие, Североизточна България, Предбалкан, и др. места) до 1000 м надм. вис. (Petrova et al., 2013).

A. altissima (сем. Simaroubaceae) е листопаден дървесен вид достигащ до 18-30 м височина. Кората му е сиво-кафява, надлъжно напукана (при по-старите дървесни видове). Листата са големи (0,6 – 1 м), последователни, нечифтоперести. Размножава се чрез семена и коренови издънки. В България се среща навсякъде до 1800 м надм. вис., защото е невзискателен към условията на средата – понася топъл и студен климат, издържа на засушавания, както и излишна влага в почвата, замърсен въздух, расте върху бедни, варовити почви, лесно се размножава и разпространява (Petrova et al., 2013).

Същевременно за *A. altissima* и *K. paniculata* се съобщават данни за наличие на някои ценни вторични метаболити и за проява на различни биологични активности (Kožuharova et al., 2014; Sladonja et al., 2015; Caramelo et al., 2021), като преобладават изследванията върху айланта. Направеният преглед на научната литература показва, че до 2019 г. в България липсват разработки върху химичен състав и биологични активности за двата вида, с изключение на едно изследване върху каротиноидна фракция, изолирана от цветове на китайски мекхурник (Zhelev et al., 2016). Всичко това насочи нашето внимание към тези два растителни вида и определи целта и задачите на настоящия дисертационен труд.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Целта на дисертационния труд е да се проучи фотохимичният състав и някои биологични активности на растителни субстанции от чуждите за българската флора *Koelreuteria paniculata* и *Ailanthus altissima*.

За постигането на целта са поставени следните **задачи**:

1. Проследяване сезонната динамика на натрупване на основни класове фенолни съединения в надземни растителни субстанции от двата вида, в три последователни вегетационни сезона (2019 – 2021 г.).

2. ВЕТХ анализ на надземни растителни субстанции за съдържание на фенолни киселини и флавоноиди.

3. Газхроматографско и масспектрометрично определяне на химичния състав на етанолни екстракти и на етерични масла от надземни части на двата вида.

4. Установяване на физикохимичните характеристики и химичния състав на тлъсти масла от семената на видовете чрез химични и хроматографски анализи.

5. *In vitro* изследвания на някои биологични активности (антимикробна, антиоксидантна и противотуморна) на различни екстракти от видовете.

6. Определяне ДНК защитния потенциал на екстракти от *K. paniculata* и *A. altissima*.

7. Анализ на прах от растителни субстанции от *K. paniculata* и *A. altissima* за определяне на основни микроскопски диагностични белези.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителеният материал от *K. paniculata* и *A. altissima* е събран през периода април – септември (2019 – 2021 год.) в района на гр. Пловдив. Хербарни образци от *K. paniculata* Laxm. (№ 060436) и *A. altissima* (Miller) Swingle (№063263) са депозираны в Хербариума на Аграрен университет (SOA), гр. Пловдив, България. Фитохимично, биологично и микроскопски са изследвани листа, стъблени кори, цветни части (цветни пъпки, цветове) и семена от двата вида. При *A. altissima* са проучени и плодовете (за етеричномаслен състав).

За осъществяване на анализите са използвани реактиви с най-висока аналитична честота закупени от Sigma-Aldrich, Merck, Karl Roth, Германия и Duchefa, Нидерландия. Бактериалните щамове са доставени от Националната банка за промишлени микроорганизми. Клетъчни ли-

нии антибиотици и среди за клетъчни култури са получени от American Type Cultures Collection (ATCC, Manassas, Вирджиния, САЩ) и Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Белгия. За микроскопския анализ на субстанциите е използван тринокулярен светлинен микроскоп Magnum T CETI (Medline Scientific, Oxfordshire, UK). Микрофотографиите са направени с дигитална камера (Si 5000 5 Mpx) към микроскопа.

Подложени на анализи са няколко вида **растителни екстракти**:

➤ Екстракти (70% етанол) с **трикратно екстрахиране** (под обратен хладник) от сухи субстанции за определяне на фенолен профил, антиоксидантна активност.

➤ Екстракти (70% етанол и водни) с **еднократно екстрахиране** (под обратен хладник) от сухи субстанции за изследване на антиоксидантната активност, СФМ.

➤ Сухи екстракти (под вакуум) от **свежи субстанции**, за ГХ/МС анализ, ДНК защитен потенциал, антимикуробна, антитуморна и антиоксидантна активности.

➤ Изолиране на **етерични масла (ЕМ)** от свежи субстанции чрез хидродестилация, с използване на апарат тип Клевинджър.

➤ Изолиране на **тлъсто (глицеридно) масло** от семена. Добре узрели смлени семена са подложени на екстракция с хексан в апарат на Соклет.

Приложени са следните **методи**:

✓ Количествени спектрофотометрични методи (СФМ) за определяне на общи водоразтворими полифеноли, танини, общи фенолни киселини и флавоноиди (Eur. Pharm. 10, 2019a, b; ГФР XI, 1990);

✓ ВЕТХ анализ за определяне съдържанието на флавоноиди и фенолни киселини (Krasteva, 2022);

✓ Газхроматографски/масспектрометричен анализ (ГХ/МС) на етанолни екстракти и етерични масла от надземни растителни части;

✓ Химични, физикохимични и хроматографски методи за анализ на химичния състав на глицеридни масла (ISO 659:2014; ISO 12228-1:2014; ISO 9936:2016; ISO 10540-1:2014 и др.);

✓ Методи за *in vitro* изследвания на биологични активности на екстракти – антимикуробна (агар-дифузионен метод); антитуморна (МТТ тест, Mosmann, 1983) спрямо РС3 и НТ-29 клетъчни линии; антиоксидантна – DPPH, ABTS, CUPRAC и FRAP анализи (Kivrak et al., 2009; Ivanov et al., 2014; Thaipong et al. 2006; Apak et al., 2006; Benzie & Strain, 1999); ДНК защитен потенциал – тест със суперспирална плазмидна

ДНК (pUC 19) по Rajiv et al. (2021); светлинно-микроскопски анализ на прахообразни растителни субстанции (Eur. Pharm. 10, 2019c).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

➤ Сезонна динамика на натрупване на основни класове фенолни съединения, проследена в три вегетационни сезона (2019 – 2021)

При *K. paniculata* резултатите от количественото СФМ определяне показват, че **общите водоразтворими полифеноли** в изследваните растителни части са с най-високи стойности при цветни пъпки (12,64%) и цветове (8,55%), следвани от листа и кори. Общите полифеноли в листата са най-високи през месеците май – юни (7,57 – 9,36%) и през трите сезона, докато при корите варирането им през месеците е слабо изразено (2,12 – 3,75%). Аналогична е тенденцията в натрупването и на **танини**. Съдържанието на **флавоноиди** е в следния низходящ ред: листа, цветни пъпки, цветове и кори. Листата освен, че съдържат най-високи количества флавоноиди, показват ясно изразен максимум на отчетените стойности в началото на сезона (април 3,68 – 4,98%). В цветните части съдържанието е 2 – 6 пъти по-ниско, в сравнение с листата. В стъблените кори флавоноидите са около 0,1%, с пик за месец август и през трите сезона. **Общите фенолни киселини** се натрупват в най-високи количества в стъблените кори, с характерен максимум за края на вегетационния период (4,06 – 4,76%), следвани от листа и цветни части. Добре изразен пик за месец май се забелязва за листата (2,76 – 3,14%). Разглежданата група феноли е най-слабо представена в цветните части (около 2% в цветни пъпки и 1,6% за цветове).

Липсват изследвания в научната литературата относно сезонната динамика на проследяваните групи феноли при *K. paniculata*, с които да се направи сравнение.

При *A. altissima* количествените данни от ежемесечно определяните **общи полифеноли** в листните субстанции показват максимални стойности през месеци май – юли (4,12 – 5,08% за 2020 г.; 4,87-5,71% за 2019 и 5,39-6,72% за 2021 г.), в периода на най-активна фотосинтеза. При корите се наблюдава добре изразен пик в края на вегетационния сезон, но при тях измерените количества са значително по-ниски – 1,19 – 1,78%. От трите анализирани генеративни части, най-богати на полифеноли са цветните пъпки (над 5%), следвани от цветове и плодове. **Танините**, определени в растителните субстанции от айлант

ясно следват следния низходящ ред: листа, цветни пъпки, цветове, плодове и кори. Дъбилните вещества при листата показват постепенно покачване по време на вегетацията и достигат максимални стойности през месец септември (между 3,38% за 2020 г. и 4,16% през 2021 г.), които са близо два пъти по-високи в сравнение с началото на сезона. По отношение на цветните части, танините имат най-високо съдържанието в началото на цъфтежа, в цветните пъпки (3,74 – 4,42%), след което намаляват в цветовете и най-малко са в плодовете (около 2,6%). Корите от айлант натрупват малки количества танини (под 1%), като най-високото отчетено количество и през трите години е към края на вегетационния период, през месец септември. **Общите флавоноиди** са най-добре представени в листата (с максималните 4,04% за 2021 г.) от всички изследвани субстанции. Динамиката на натрупване на тази група съединения показва по-високи количества в началото, при разлистване и във фаза на млади листа, докато в края на вегетационния период, те намаляват почти на половина (3,48 – 1,85 за 2019; 2,7 – 1,74 за 2020 и 4,04 – 2,43 % за 2021 г., съответно). В генеративните субстанции, съдържанието им е по-ниско от листата (около 1,7% флавоноиди в добре развитите цветове до 1,1% в плодове). Най-слабо присъствие имат в кори от айлант (максимум от 0,17% за април, 2019 г.). **Общите фенолни киселини** са най-добре представени в субстанциите от листа (1,4 – 2,5%), като по-високите количествени данни са отчетени през летните месеци (юли и август). В цветните пъпки, цветовете и крилатките фенолни киселини са около 1%, и значително по-слабо е натрупването им при стъблените кори от айлант.

Литературните източници съобщават за измерени количества на общи полифеноли и флавоноиди от айлант, но липсват данни относно динамиката на натрупването им по сезони. Marinas et al. (2017) установяват за етанолни фракции (листа и цветове) от *A. altissima* общи полифеноли от порядъка на 24,66 mg GAE/g dw за листа и 17,94 mg GAE/g dw за цветове, а флавоноиди – 1,82 mg QE/g dw (в листа) и 1,11 mg QE/ g dw (в цветовете).

➤ **Фенолен профил на етанолни екстракти от надземни растителни субстанции на *K. paniculata* и *A. altissima***

Осъществен е ВЕТХ анализ за доказване наличието на някои значими биоактивни фенолни съединения в етанолни екстракти от изследваните видове.

В екстрактите от надземните субстанции на *K. paniculata* са идентифицирани 14 фенолни съединения (10 флавоноида, 9 фенолни

киселини (Табл. 1). Данните за съдържанието на **флавоноиди** при *K. paniculata* показват, че листата са с най-висока концентрация на рутин, следвани от хесперидин и кверцетин. Цветните пъпки съдържат висока концентрация на (-)-епикатехин, която в добре развитите цветове намалява 4,5 пъти. В стъблени кори (-)-епикатехинът е най-добре представеният флавоноид, в сравнение с останалите идентифицирани (+)-катехин, кверцетин и рутин. Хесперидин не е открит в кората, а кемпферол – в нито един от анализирания екстракти. В листните екстракти са установени **9 фенолни киселини**, 8 в цветове и цветни пъпки и 7 в стъблените кори. В листата с най-високо съдържание е розмаринова киселина, следвана от галова и ванилова киселини. В цветове и цветни пъпки преобладават *p*-кумарова, розмаринова, салицилова и протокатехова киселини. Най-слабо е присъствието им в корите. Ферулова киселина в кори не е установена. Хлорогенова киселина не е доказана в нито една от растителните проби, а галова е идентифицирана само в листата. Фенолните киселини, показали най-високо съдържание (над 1,0 mg/g dw) могат да бъдат подредени в следния низходящ ред: розмаринова > *p*-кумарова > салицилова > ванилова > галова.

В етанолни екстракти от надземните субстанции на *A. altissima* са идентифицирани 16 фенолни съединения: 6 флавоноида и 10 фенолни киселини (Табл. 2). С най-високо съдържание в **листата** са хесперидин, рутин и (+)-катехин. Кверцетин и (-)-епикатехин и са в значително по-ниски количества. В **цветовете** най-висока е концентрацията на рутин, следван от (+)-катехин. Останалите идентифицирани флавоноиди в цветовете са в значително по-ниски количества. В **стъблените кори**, най-добре представени са катехините: (+)-катехин и (-)-епикатехин, а рутин и хесперидин липсват. Кемпферол е доказан единствено в кори от *A. altissima*. В листните екстракти от *A. altissima* са установени **9 фенолни киселини**, сред които розмаринова киселина е в най-високо съдържание, следвана от салицилова. Същите две киселини са най-добре представени и в цветните части, но в пъти по-ниски концентрации от тези в листата. Протокатехова киселина в листата липсва. В екстрактите от кори са идентифицирани 7 фенолни киселини, от които най-добре представени са ванилова, хлорогенова и розмаринова. Протокатехова, кафеена и *p*-кумарова липсват в стъблени кори от *A. altissima*.

Таблица 1. Съдържание на флавоноиди и фенолни киселини в етанолни екстракти от надземни субстанции на *K. paniculata* (mg/g dw).

№. компонент	Растителна субстанция*				
	лист	кора	цвят	цветни пъпки	
Флавоноиди					
1	Рутин	4.23 ± 0.96 ^a	0.03 ± 0.01 ^{b,c}	0.34 ± 0.08 ^b	0.24 ± 0.09 ^{b,c}
2	Хесперидин	2.97 ± 0.42 ^a	n.d.	0.37 ± 0.07 ^b	0.19 ± 0.06 ^b
3	Кверцетин	2.66 ± 0.54 ^a	0.04 ± 0.01 ^{b,c}	0.42 ± 0.09 ^b	0.24 ± 0.04 ^{b,c}
4	(+)-Катехин	n.d.	0.09 ± 0.02	n.d.	n.d.
5	(-)-Епикатехин	0.38 ± 0.06 ^{b,c}	0.80 ± 0.14 ^b	0.59 ± 0.05 ^{b,c}	2.69 ± 0.82 ^a
6	Кемпферол	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Фенолни киселини					
7	Галова	1.02 ± 0.22	n.d.	n.d.	n.d.
8	Протокатехова	0.30 ± 0.10 ^c	Следи	0.75 ± 0.10 ^a	0.53 ± 0.06 ^b
9	Хлорогенова	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	Ванилова	1.04 ± 0.08 ^a	0.19 ± 0.04 ^{b,c}	0.24 ± 0.04 ^b	0.14 ± 0.05 ^{b,c}
11	Кафеена	0.06 ± 0.02 ^{n.s.}	0.11 ± 0.03 ^{n.s.}	0.10 ± 0.02 ^{n.s.}	0.14 ± 0.08 ^{n.s.}
12	Сирингова	0.13 ± 0.07 ^{ab,c}	0.07 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.08 ^{ab}	0.24 ± 0.06 ^a
13	p-Кумарова	0.26 ± 0.06 ^c	0.05 ± 0.01 ^c	6.97 ± 1.04 ^a	4.97 ± 0.97 ^{ab}
14	Ферулова	0.07 ± 0.02 ^b	n.d.	0.13 ± 0.04 ^b	0.94 ± 0.2 ^a
15	Салицилова	0.39 ± 0.04 ^{b,c}	0.10 ± 0.03 ^{b,c}	0.77 ± 0.17 ^{ab}	1.64 ± 0.65 ^a
16	Розмаринова	10.34 ± 1.80 ^a	0.22 ± 0.08 ^c	3.00 ± 0.38 ^b	2.62 ± 0.93 ^{b,c}

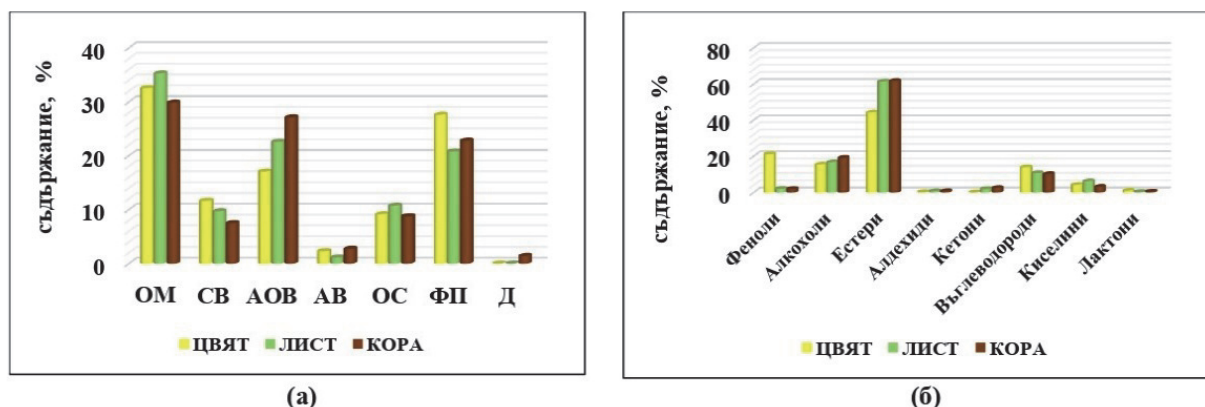
n.d. – неидентифициран компонент; *Пробите са трикратно анализирани и резултатите са изразени чрез средната аритметична; ± стандартно отклонение. Данните са обработени статистически с теста на Tukey ($p < 0,01$); ^{n.s.} - статистически незначима разлика.

Таблица 2. Съдържание на флавоноиди и фенолни киселини в етанолни екстракти от надземни субстанции на *A. altissima* (mg/g dw).

№	компонент	Растителна субстанция *		
		лист	кора	цвят
Флавоноиди				
1	Рутин	1,02±0,026**	n.d	5,68±0,142**
2	Хесперидин	2,67±0,067**	n.d	0,72±0,018**
3	Кверцетин	0,19±0,005 ^b	0,01±0,001 ^c	0,33±0,008 ^a
4	Кемпферол	n.d.	0,11±0,003	n.d.
5	(+)-Катехин	0,95±0,024 ^c	2,15±0,054 ^a	1,55±0,039 ^b
6	(-)-Епикатехин	0,23±0,006 ^b	0,54±0,014 ^a	0,13±0,003 ^c
Фенолни киселини				
7	Галова	0,30±0,008 ^a	0,01±0,001 ^c	0,16±0,004 ^b
8	Протокатехова	n.d.	n.d	0,15±0,004
9	Хлорогенова	0,97±0,024 ^b	0,27±0,007 ^c	1,40±0,035 ^a
10	Ванилова	0,09±0,002 ^c	0,73±0,018 ^a	0,16±0,004 ^b
11	Кафеена	0,13±0,003**	n.d	0,23±0,006**
12	Сирингова	0,20±0,005 ^b	0,08±0,002 ^c	0,39±0,010 ^a
13	p-Кумарова	0,24±0,006**	n.d	1,35±0,034**
14	Ферулова	0,11±0,003 ^b	0,07±0,002 ^b	1,31±0,033 ^a
15	Салицилова	6,19±0,155 ^a	0,07±0,002 ^c	3,81±0,095 ^b
16	Розмаринова	10,32±0,258 ^a	0,13±0,003 ^c	2,01±0,050 ^b

➤ **Химичен състав на етанолни сухи екстракти от *K. paniculata* и *A. altissima***

Получените сухи етанолни екстракти от цветовете, листа и стъблени кори на *K. paniculata* представляват вискозни течности с тъмнокафяв цвят и характерен мирис. Идентифицирани са 56 съединения (40 в цветовете, по 50 в листа и кори), с преобладаващи съединения: пирогалол (цветове), α -терпинил ацетат (листа), нерилацетат (кори). Разпределението на компонентите по химични групи е представено на Фиг. 1а. В трите екстракта преобладават окислените монотерпени (цветове 32,49%, листа 35,21% и стъблена кора 29,84%), следвани от окислени алифатни производни и фенилпропаноиди. Останалите групи са по-слабо представени, а дитерпените са доказани само в корите (1,39%).



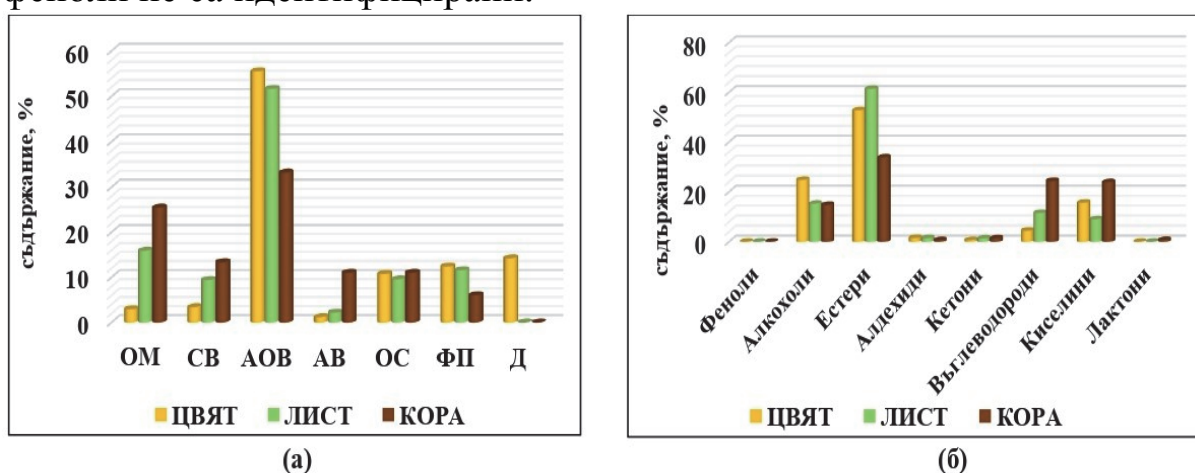
Фигура 1. Химичен състав на етанолни екстракти от *Koelreuteria paniculata* по химични (а) и функционални (б) групи, изразен в (%): ОМ – Окислени монотерпени; СВ – Сесквитерпенови въглеводороди; АОВ – Алифатни окислени въглеводороди; АВ – Алифатни въглеводороди; ОС – Окислени сесквитерпени; ФП – Фенилпропаноиди; Д – дитерпени

Разпределението на идентифицираните съединения по функционални групи (в %) е представено на Фиг. 1б. С най-висок процент и в трите изследвани екстракта е групата на естерите (44,29–61,74%), следвана от алкохолите и въглеводородите. Киселини, феноли, кетони, лактони и алдехиди са много слабо представени в изследваните екстракти, с изключение на високото съдържание на феноли в цветовете (21,13%).

Растителните екстракти от *A. altissima* са вискозни течности с тъмнокафяв и тъмнозелен цвят, и специфична миризма. В трите тествани екстракта са идентифицирани общо 47 компонента (по 31 в цветовете и листа, 42 в кори), с преобладаване на хексенил хексаноат (цветове и листа), α -терпинилацетат, олеинова киселина (кори). Разпределението на идентифицираните компоненти по химични

групи показва, че в трите екстракта преобладават алифатните окислени въглеводороди (55,44 – 33,19%), следвани от окислени монотерпени (25,42% в кората и 15,87% в листата), дитерпени (в цветовете – 14,22%), сесквитерпенови въглеводороди (в кората) и други групи, които са по-слабо представени (Фиг. 2а).

Разпределението на компонентите по функционални групи в етанолните екстракти показва най-високо съдържание на естери (61,33% в листа; 51,72% в цветовете и 33,83% в кората), следвани от алкохоли (24,89% в цветовете; 15,25 в листа; 14,88% в кората), киселини и въглеводороди (Фиг. 2б). Алдехидите и кетоните са слабо представени, лактоните присъстват само в екстрактите от кора, а феноли не са идентифицирани.



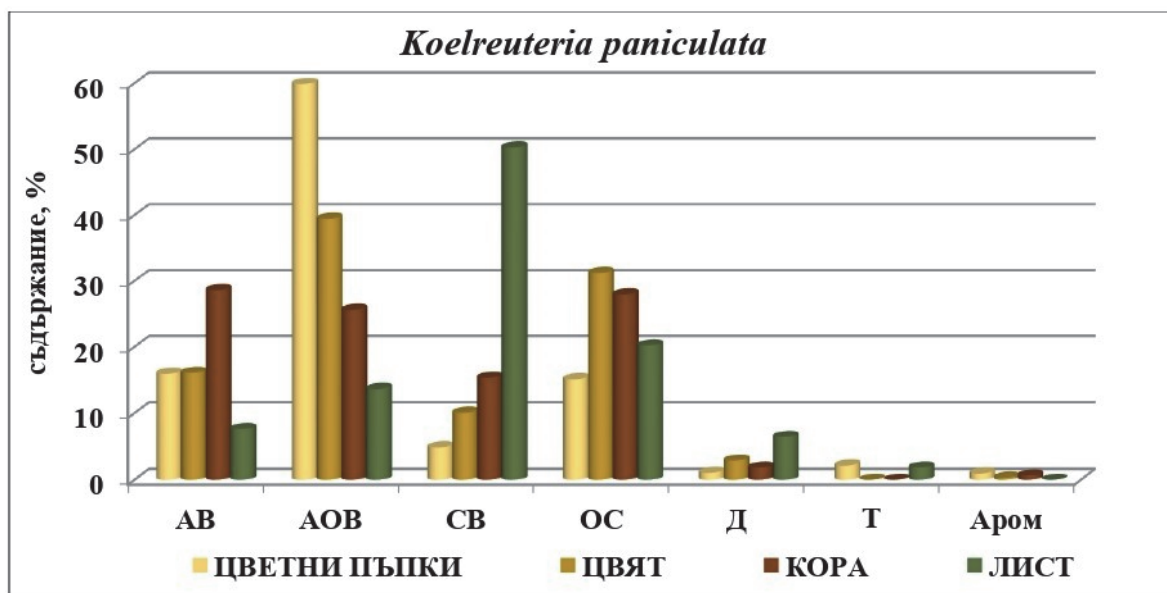
Фигура 2. Химичен състав на етанолни екстракти от *Ailanthus altissima* по химични (а) и функционални (б) групи, изразен в (%): ОМ – Окислени монотерпени; СВ – Сесквитерпенови въглеводороди; АОВ – Алифатни окислени въглеводороди; АВ – Алифатни въглеводороди; ОС- Окислени сесквитерпени; ФП – Фенилпропаноиди; Д – дитерпени.

➤ Химичен състав на етерични масла от *K. paniculata* и *A. altissima*

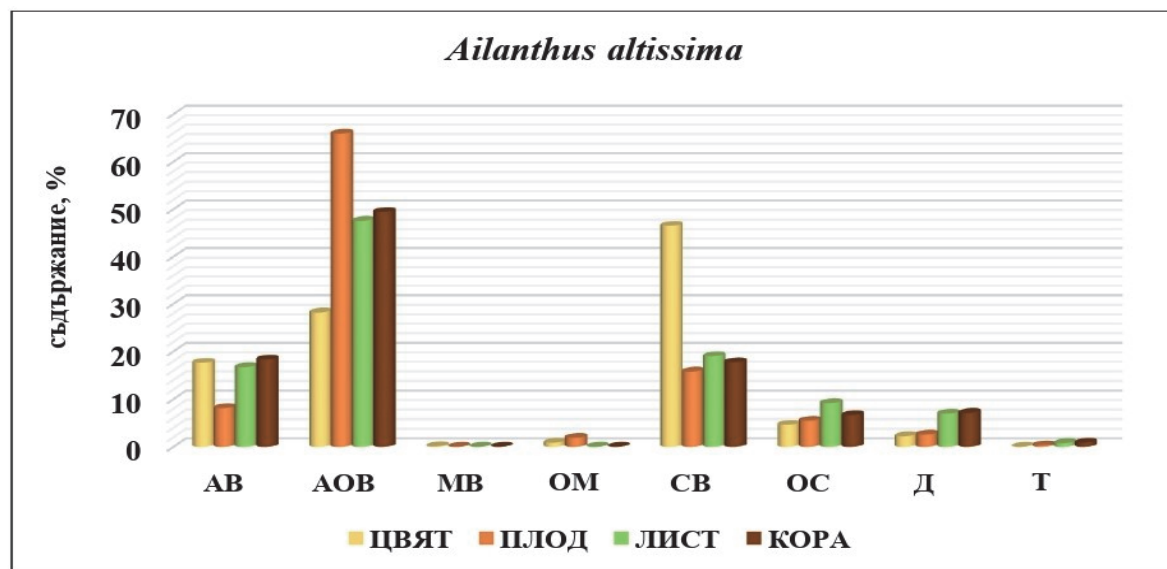
Подложени на анализ са четири етерични масла (ЕМ), получени чрез водна дестилация от стъблена кора, лист, цвят и цветни пъпки. Изолираните ЕМ представляват прозрачни, слабо жълтеникави, маслоподобни течности. Идентифицирани са 54 летливи съединения (49 в листата, 44 в цветните пъпки, 38 в цветовете и 36 в корите), като 32 са общи за четирите ЕМ. Известни разлики се наблюдават и по отношение на техния химичен състав. В цветни пъпки са установени 11 основни съединения (линолова, палмитинова, линоленова киселини и др.), в цветовете 12 основни, сред които (*Z, Z*)-фарнезил ацетон е най-добре представен, в кора -9 основни (дрименол, пентакозан и др.), и 6 основни съединения в листа (α -фарнезен, α -копаен, β -фарнезен, изофитол и др. При

разпределение на компонентите по химични групи (Фиг. 3) преобладават алифатни окислени въглеводороди, следвани от гупите на сесквитерпените. Дитерпени, тритерпени и ароматни са слабо представени.

Липсват данни в литературата относно състава на етерично-маслените дестилати от *K. paniculata*, с които да се направи сравнение.



Фигура 3. Разпределение на съединенията по химични групи в етеричните масла от *K. paniculata* (%): АВ – алифатни въглеводороди; АОВ – алифатни окислени въглеводороди; СВ – сесквитерпенови въглеводороди; ОС – окислени сесквитерпени; Д – дитерпени; Т – тритерпени; Аром – ароматни компоненти



Фигура 4. Разпределение на съединенията по химични групи в етеричните масла от *A. altissima* (%). АВ – Алифатни въглеводороди; АОВ – Алифатни окислени въглеводороди; МВ – Монотерпенови въглеводороди; ОМ – Окислени монотерпени; СВ – Сесквитерпенови въглеводороди; ОС – Окислени сескитерпени; Д – Дитерпени; Т – Тритерпени

Цветове, незрели плодове, листа и стъблени кори от *A. altissima* са анализирани за определяне на етеричномасленото им съдържание. ЕМ от айлант представляват масленоподобни течности с бледожълт цвят. Идентифицирани са общо 75 съединения от различните растителни части на *A. altissima*. Четиридесет и четири са летливите компоненти установени в цветове и плодове, докато в листа и стъблени кори са 41. Общите съединения в четирите растителни субстанции са 14. С подобен ЕМ състав са плодове, листа и кори, имащи 39 общи компонента. В четирите ЕМ преобладават алифатни окислени въглеводороди, следвани от сесквитерпенови и алифатни въглеводороди. Останалите групи съединения са по-слабо представени (Фиг. 4)

➤ **Химичен състав и физикохимична характеристика на тлъсти масла от семена на *K. paniculata* и *A. altissima***

Данните от химичния състав и физикохимични показатели на глицеридните масла са предствени на Табл. 3, 4. Семената от двата растителни вида се отличават със сравнително високо съдържание на глицеридно масло и въглехидрати. Редуциращите захари и инвертната захар са сравнително ниски и в двата вида семена. Установените количества фибри може да характеризират семената от *A. altissima* и *K. paniculata* като добър източник на диетични фибри.

Таблица 3. Химичен състав на семена.

Съдържание	<i>A. altissima</i>	<i>K. paniculata</i>
Глицеридно масло, %	30,7±0,2	20,4±0,3
Протеини, %	18,7 ± 0,1	15,1 ± 0,2
Въглехидрати, %	38,9 ± 0,6	54,5 ± 0,7
» нишесте, %	4,5 ± 0,1	14,2 ± 0,1
» редуциращи захари, %	1,31 ± 0,11	0,48 ± 0,04
» инвертна захар, %	1,67 ± 0,10	2,66 ± 0,16
»фибри, %	29,6 ± 0,3	17,2 ± 0,2
Пепел, %	5,7 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Влага, %	6,0 ± 0,1	6,7 ± 0,1

Маслото от *K. paniculata* показва висока оксидантна стабилност. Пероксидното число е показател, чрез който се отчита степента на окисление на растителните масла, като неговата стойност за маслото от семена на *A. altissima* е значително по-висока (9 пъти), в сравнение с тази за *K. paniculata*. Йодното число на маслото от семена на *A.*

altissima го характеризира като полусъхливо масло, докато това на маслото от семена на *K. paniculata* като несъхливо масло.

Таблица 4. Физикохимични показатели на глицеридните масла

Показатели	<i>A. altissima</i>	<i>K. paniculata</i>
Пероксидно число, meq O ₂ /kg	90,2 ± 0,6	10,0 ± 0,1
Киселинно число, mg KOH/g	4,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0
Йодно число, gI ₂ /100g	125 ± 0,3	44 ± 0,2
Осапунително число, mg KOH/g	210 ± 2	209 ± 1
Относителна плътност	0,8891 ± 0,0002	0,8788 ± 0,0003
Коефициент на рефракция	1,4736 ± 0,0001	1,4661 ± 0,0002
Оксидантна стабилност, h	5,0 ± 0,0	Над 50

Основният компонент в стероловия състав и на двете масла е β – ситостерол, следван от стигмастерол и кампестерол. Холестеролът е идентифициран единствено в маслото от семена *A. altissima*, а кампестерол – само в маслото от семена на *K. paniculata*. От изследваните токофероли, по-голям процент се установи за γ токоферол при айлант (74,6%) и β -токоферол (56,6%) при китайския мехурник. Индивидуалният фосфолипиден състав на семената от *A. altissima* и *K. paniculata* е определен за първи път в настоящото изследване. В семената от *A. altissima* са идентифицирани четири фосфолипидни класа, а в семената от *K. paniculata* – шест. При айлант в най-високо количество е фосфатидилинозитола (29,5%), а в семената от китайски мехурник преобладава фосфатидилхолина (29,1%). Относно изследваното съдържание на мастни киселини в маслата се установи, че ненаситените преобладават и в двете изследвани масла, като тяхното съдържание е съответно 95,3% в маслото от семена на *A. altissima* и 92,2% – в това от мехурник. В маслото от семена на мехурник съдържанието на мононенаситените мастни киселини е преобладаващо (88,7%). Основни мастни киселини при *A. altissima* са олеинова и линолова киселини, а при *K. paniculata* ейкозенова и олеинова киселини.

➤ **Биологични активности на растителни екстракти от изследваните видове**

✓ **Антимикробна активност (АМА)**

Изпитана е АМА върху екстракти от айлант и китайски мехурник срещу 9 щампа патогенни бактерии, докладвани като причинители на инфекции, токсикоинфекции и токсикози: Gram-положителни бактерии *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

subtilis, *Bacillus cereus*; и Gram-отрицателни бактерии – *Escherichia coli*, *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6027, *Proteus vulgaris* и *Klebsiella* (клиничен изолат).

Екстрактът от кората на *K. paniculata* показва най-голяма ефективност срещу *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, и *Proteus vulgaris* при по-високата тествана концентрация (150 µL). Големината на стерилната зона при екстракта от цветовете е доста сходна срещу *P. vulgaris* (10 mm), *B. subtilis* (14 mm) и *B. cereus* (14 mm). Листният екстракт не инхибира тестовите култури с изключение на *E. coli* (6 – 9 mm) (Фиг. 5).

Тест - микроорганизъм	цвет	лист	кора
	Количество на екстракта		
	100 µL/150 µL	100 µL/150 µL	100 µL/150 µL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6027			
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633			
<i>Bacillus cereus</i> NCTC 10320			

Фигура 5. Зони с инхибиран бактериален растеж (над 6 mm); (индикаторната лента показва 10 mm)

Данните от проведеното изследване върху екстракти от *A. altissima* показват, че листните екстракти са с най-значителен инхибиторен ефект срещу *B. subtilis* ATCC 6633 и *Klebsiella* (клиничен изолат) (Фиг 6). Големината на стерилната зона спрямо *B. subtilis* е по-малка и близка до тази на положителната контрола (39 mm), а срещу *Klebsiella*, дори по-голяма от контролната проба (21 mm) с хлорхексидин. Екстрактите от кори са най-активни срещу *L. monocytogenes* и *B. subtilis* (11 – 14 mm, при 150 µL екстракт, съответно). Цветовете не показват активност. Доказаната антимикробна активност при корите би могла да се свърже с установените по-високи стойности на катехини в тази субстанция, при проведения ВЕТХ анализ.

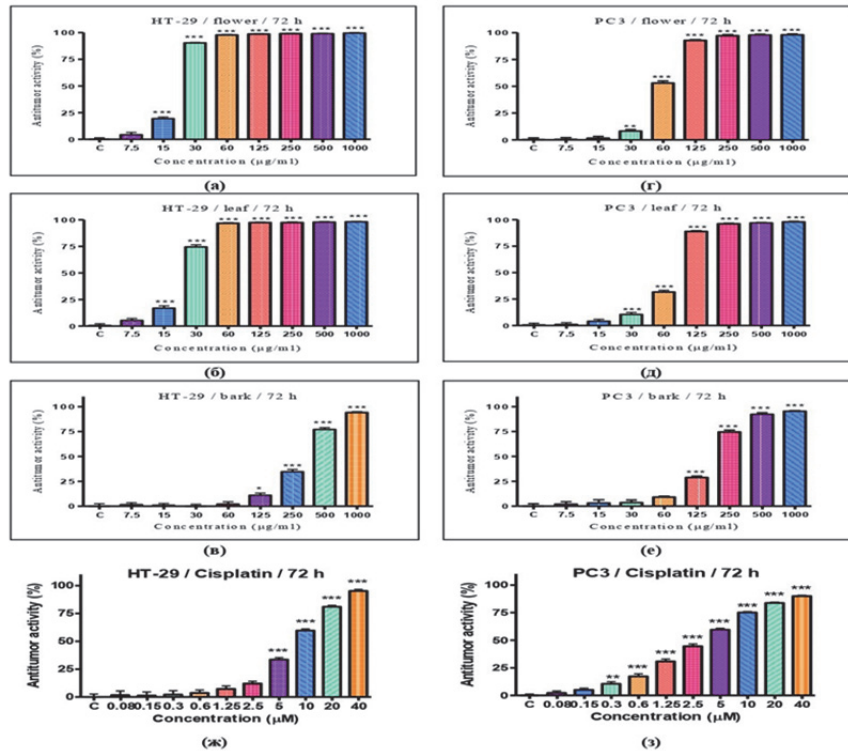
Тест - микроорганизъм	цвет	лист	кора
	Количество на екстракта		
	100 µL/150 µL	100 µL/150 µL	100 µL/150 µL
<i>Klebsiella</i> (клиничен изолат)			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633			
<i>Lysteria monocytogenes</i> NCTC 11994			

Фигура 6. Зони с инхибиран бактериален растеж (над 10 mm). Индикаторната лента показва 20 mm.

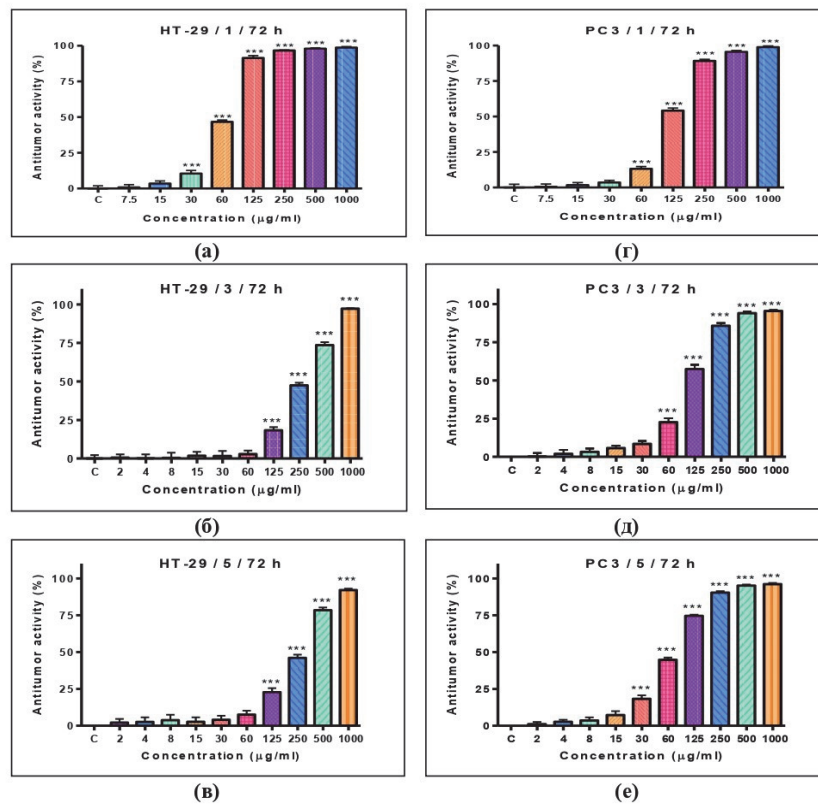
✓ *Антитуморна активност*

Изследвана е антипролиферативната активност на етанолни екстракти от китайски мехурник и айлант върху две туморни клетъчни линии: HT-29 (колоректален аденокарцином) и PC3 (простатен карцином). Получените резултати (Фиг. 7) при *K. paniculata* показват най-добра активност за екстракта от цветове върху двете (IC₅₀ – 21,44 µg/mL за HT-29; IC₅₀ – 58,76 µg/mL за PC3) клетъчни линии. Екстрактът от листа има почти същата активност, както екстракта от цветове върху HT-29 клетъчната линия (IC₅₀ – 23,63 µg/mL), докато PC3 раковите клетки са по-малко чувствителни към този екстракт (IC₅₀ – 80,56 µg/mL). Екстрактът от кора показва слаб (дозозависим) ефект върху клетъчните линии.

Данните от антитуморната активност при *A. altissima* (Фиг. 8) установяват най-добър ефект спрямо клетъчна HT-29 линия при екстракта от цветове (IC₅₀ – 64,85 µg/mL) и по-слабо (над четири пъти) изразен такъв от другите два екстракта към същата клетъчна линия (IC₅₀ – 275,9 µg/mL и 278,4 µg/mL, съответно листа и кора). Екстрактът от кората оказва най-силна потискаща способност върху растежа на PC-3 (71,28 µg/mL) клетъчна линия. От двете линии PC-3 е по-чувствителна на съставките в етанолните екстракти от *A. altissima*. Антипролиферативната активност на екстрактите от кора и листа е дозозависима и при двете клетъчни линии, и също така наподобява антипролиферативния ефект на цисплатина (контрола в изследването).



Фигура 7. Противотуморна активност на етанолови екстракти от *K. paniculata* върху клетъчни линия HT-29 (човешки колоректален аденокарцином), съответно от: цвят, лист, кора (а, б, в) и РСЗ (човешки простатен карцином) от: цвят, лист, кора (г, д, е) и стандарти за HT-29 (ж) и РСЗ (з).



Фигура 8. Противотуморна активност на етанолови екстракти от *A. altissima* върху клетъчни линия HT-29 (човешки колоректален аденокарцином), съответно от: цвят, лист, кора (а, б, в) и РСЗ (човешки простатен карцином) от: цвят, лист, кора (г, д, е).

✓ Антиоксидантна активност (АОА)

Определена е АОА на етанолни екстракти, с трикратно екстрахиране от сухи смлени субстанции – листа, стъблени кори, цветове и цветни пъпки при използване на няколко различни метода (DPPH, ABTS, CUPRAC и FRAP) (Табл. 5). Екстракти от цветовете на *K. paniculata* показват най-добър антиоксидантен потенциал, следвани от тези на цветните пъпки, листата и кората. Подредбата се различава само при CUPRAC теста, където получените количествени стойности за екстрактите от корите следват тези на цветовете. За по-пълно изясняване ролята на начина на екстрахиране върху АОА на изследваните субстанции, е направен анализ на водни и етанолни екстракти с еднократно екстрахиране, както и на етанолни сухи (под вакуум). Получените резултати от изпитаните върху тях ABTS и DPPH анализи показват следната тенденция: екстрактите от цветове са с най-висок радикал-улавящ капацитет, следвани от листа и кори (Табл. 6). Най-силно изразен АОА ефект показват етанолните вакуумни екстракти от свежи листа и цветове. При корите, обаче този тип екстракти, показват по-ниски стойности, отколкото екстрактите от сухи субстанции с температурна обработка.

Всички растителни проби от *A. altissima* показаха АОА, обобщена в Табл. 7, 8. Активността (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP методи) на изследваните етанолни екстракти, с трикратно екстрахиране намалява в следната последователност: екстракти от цветове > листа > стъблени кори. При сравнение на трите начина на получаване на екстрактите, най-пълно екстрахиране на антиоксидантните компоненти от цветни части и стъблени кори от вида се получава при вакуумните екстракти, докато за листа при екстракти, получени с еднократно екстрахиране (воден и 70% етанол). Очевидно термичната обработка способства за по-добро екстрахиране на БАВ от листата.

Таблица 5. *In vitro* антиоксидантна активност на етанолни екстракти от сухи субстанции на *K. paniculata*.

Субстанция	ABTS-анализ mmol TE/g dw ¹	DPPH-анализ, mmol TE/g dw	FRAP-анализ, mmol TE/g dw	CUPRAC- анализ, mmol TE/g dw
лист	645,88±1,83 ^c	751,27±1,27 ^c	1838,92±2,42 ^c	576,68±2,58 ^d
кора	342,55±0,98 ^d	278,39±1,44 ^d	637,62±3,16 ^d	846,16±2,17 ^b
цвят	1437,49±0,76 ^a	1133,47±1,97 ^a	4308,02±2,84 ^a	1748,50±2,69 ^a
цветни пъпки	686,68±1,45 ^b	904,12±1,75 ^b	2464,10±2,93 ^b	731,81±1,88 ^c

¹mmolTE/g dw—mmol Trolox Еквивалент (Trolox: 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) на гр. сухо тегло (dw). Пробите са анализирани в три повторения и резултатите са изразени като средна стойност ± стандартно отклонение. Статистическата обработка е по теста на Tukey ($p < 0,01$).

Таблица 6. *In vitro* антиоксидантна активност на различни екстракти от *K. paniculata*.

Субстанция/Екстракт	ABTS-анализ mmol TE/g dw ¹	DPPH-анализ, mmol TE/g dw
воден		
лист	1529,17±3,00 ^c	1306,20±1,51 ^c
кора	554,15±4,00 ^d	399,16±2,68 ^d
цвят	2810,88±2,51 ^b	2565,57±4,10 ^b
цветни пъпки	4082,02±3,05 ^a	5282,16±3,52 ^a
70% етанолен		
лист	1626,52±4,01 ^c	1434,96±1,52 ^c
кора	686,69±1,67 ^d	664,26±1,51 ^d
цвят	2976,90±4,01 ^b	2647,49±2,02 ^b
цветни пъпки	4135,17±3,25 ^a	5285,02±3,00 ^a
етанолен сух(вакуумен)		
лист	6142,05±3,05 ^b	3722,73±2,50 ^b
кора	418,12±1,52 ^c	524,21±1,56 ^c
цветни части	8191,37±1,94 ^a	5337,21±3,08 ^a

Таблица 7. *In vitro* антиоксидантна активност на етанолни екстракти от сухи субстанции от *A. altissima*.

Растителен екстракт	ABTS-анализ mmol TE/g dw ¹	DPPH-анализ, mmol TE/g dw	FRAP-анализ, mmol TE/g dw	CUPRAC-анализ, mmol TE/g dw
лист	299,54±4,29 ^b	225,62±3,36 ^b	906,01±1,53 ^a	548,07±1,54 ^b
цвят	893,14±1,54 ^a	729,72±2,04 ^a	661,48±1,50 ^b	789,54±2,19 ^a
кора	31,24±1,01 ^c	24,96±1,52 ^c	16,65±1,02 ^c	10,22±0,53 ^c

¹mmolTE/g dw – mmol Trolox Еквивалент (Trolox: 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) на гр. сухо тегло (dw). Пробите са анализирани в три повторения и резултатите са изразени като средна стойност ± стандартно отклонение. Статистическата обработка е по теста на Tukey ($p < 0,01$).

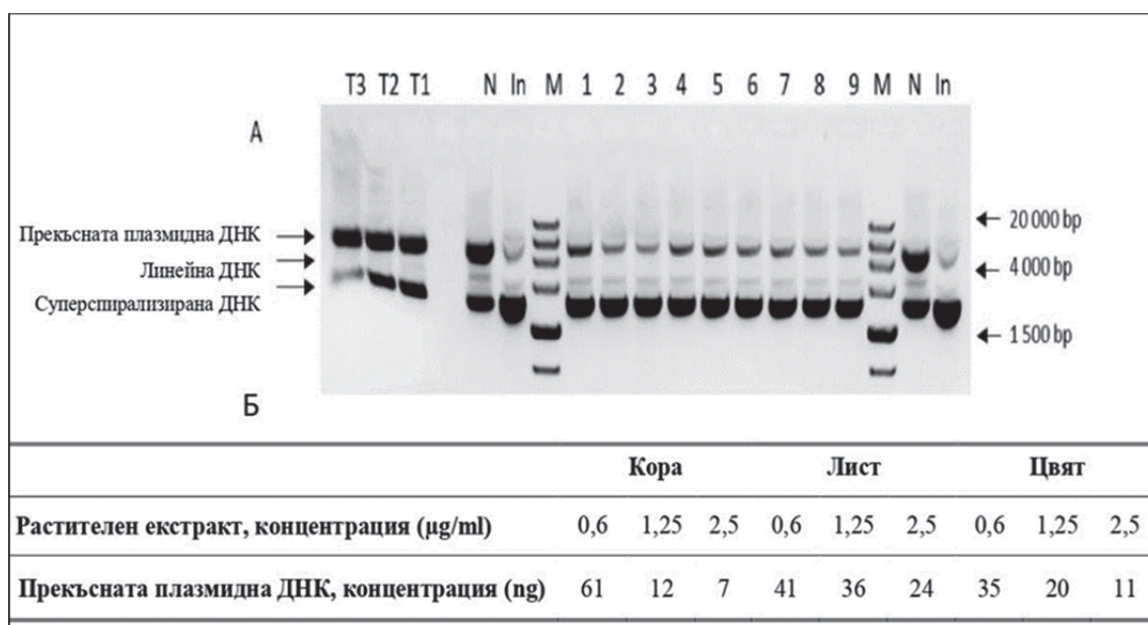
Таблица 8. *In vitro* антиоксидантна активност на различни екстракти от *A. altissima*.

Субстанция/Екстракт	ABTS-анализ mmol TE/g dw ¹	DPPH-анализ, mmol TE/g dw
воден		
лист	399,59±4,00 ^c	361,92±1,13 ^c
кора	81,78±1,51 ^d	52,19±2,51 ^d
цвят	803,76±2,24 ^b	721,61±1,50 ^b
цветни пъпки	1548,76±3,17 ^a	932,11±1,54 ^a
70% етанолен		
лист	504,75±1,66 ^b	404,72±1,66 ^c
кора	80,26±2,01 ^c	52,54±1,60 ^d
цвят	1022,62±2,03 ^a	961,51±1,50 ^a
цветни пъпки	1018,62±2,21 ^a	953,16±2,53 ^b
сух етанолен (вакуумен)		
лист	392,01±1,53 ^c	52,96±1,00 ^b
кора	411,61±2,53 ^b	53,19±2,05 ^b
цвят	3272,28±2,13 ^a	2125,67±1,07 ^a

¹ mmolTE/g dw—mmol Trolox Еквивалент (Trolox: 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) на гр. сухо тегло (dw). Пробите са анализирани в три повторения и резултатите са изразени като средна стойност ± стандартно отклонение. Статистическата обработка е по теста на Tukey ($p < 0,01$).

✓ ДНК защитен потенциал

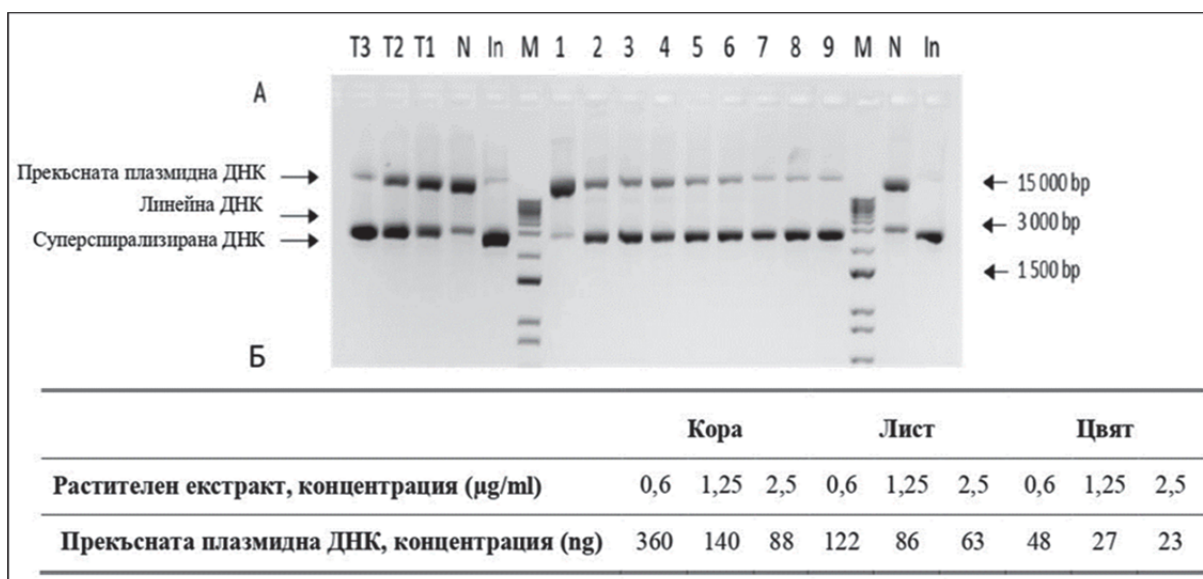
Изведеният експеримент демонстрира способността на антиоксидантите, съдържащи се в растителните екстракти от *A. altissima* и *K. paniculata* да неутрализират окислителните ДНК увреждания, причинени от реактивните кислородни форми (ROS). Пълна защита на ДНК от увреждания е установена при по-високите тествани концентрации на екстрактите от листа, цветове и кори (5,25 до 10 µg/ml), получени от двата растителни вида. Резултатите, получени за *K. paniculata* при по-ниските тествани концентрации (0,6 – 2,5 µg/ml), показват най-добър защитен ефект при използването на екстракти от кори, следвани от екстракти от цветове и листа (Фиг. 9). Ясно изразена градация на защитния ефект е наблюдавана при кори и цветове и по слабо при листовите екстракти от вида.



Фигура 9. Оценка на ДНК защитния потенциал на екстракти, с концентрации в диапазона 0,6 – 2,5 µg/ml от *K. paniculata*. Разделяне на реакционните продукти на 1,5% агарозен гел (А); Концентрация на едноверижно прекъсната плазмидна ДНК, определена по денситометричен метод (Б); Т3-Trolox 25 µg/ml; Т2-Trolox 50 µg/ml; Т1-Trolox 100 µg/ml; N-отрицателна контрола; In-добавено количество pUC19; М – 1kbPlus ДНК маркер (Thermo Scientific, SM1373); 1 – 3 *K. paniculata* екстракт от стъблена кора при концентрации от 0,6, 1,25, и 2,5 µg/ml; 4–6 *K. paniculata* екстракт от лист при концентрации от 0,6, 1,25, и 2,5 µg/ml; 7–9 *K. paniculata* екстракт от цветове при концентрации от 0,6, 1,25, и 2,5 µg/ml.

При изпитаните екстракти от *A. altissima* също се забелязва, че с намаляването на концентрацията им се увеличава степента на ДНК уврежданията. Както се вижда от Фиг. 10, най-висок защитен потенциал показват екстрактите от цветове (линии 7,8,9), следвани от листа (линии 4,5,6) и най-слабо кори (линии 1,2,3). При цветове и ко-

ри отново се наблюдава градиране на защитния ефект, докато за листа този ефект е по-слабо изразен.

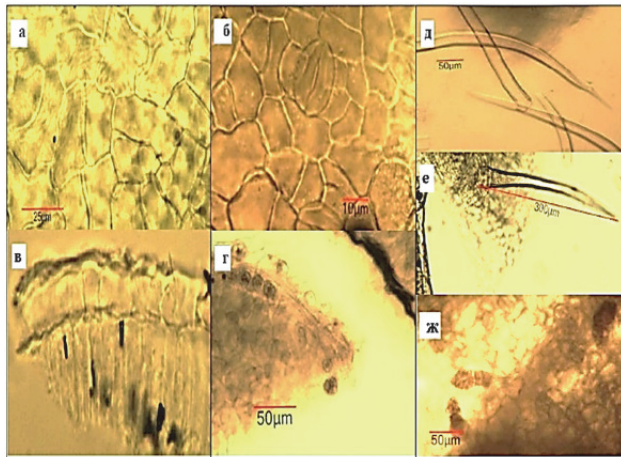


Фигура 10. Оценка на ДНК защитния потенциал на екстракти, с концентрации в диапазона 0,6 – 2,5 µg/ml от *A. altissima*. Разделяне на реакционните продукти на 1,5% агарозен гел (А); Концентрация на едноверижнопрекъсната плазмидна ДНК, определена по денситометричен метод (Б); Т1-Trolox 25 µg/ml; Т2-Trolox 50 µg/ml; Т3-Trolox 100 µg/ml; N-отрицателна контрола; In-добавено количество pUC19; М – 1kbPlus ДНК маркер (Thermo Scientific, SM1373); 1 – 3 *A. altissima* екстракт от стъблена кора при концентрации от 0,6, 1,25, и 2,5 µg/ml; 4–6 *A. altissima* екстракт от лист при концентрации от 0,6, 1,25, и 2,5 µg/ml; 7–9 *A. altissima* екстракт от цветовете при концентрации от 0,6, 1,25, и 2,5 µg/ml.

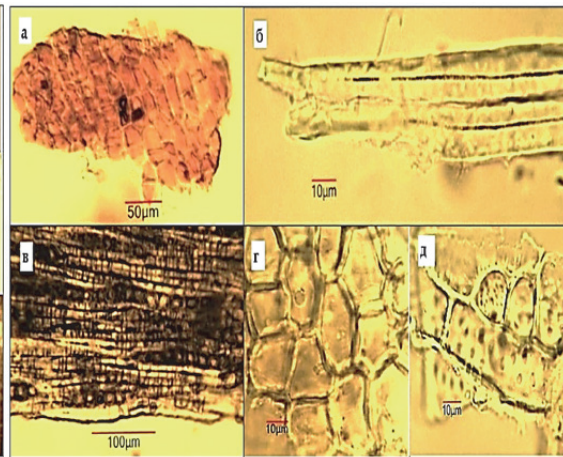
➤ **Определяне на основни диагностични микроскопски белези на проучваните растителни субстанции**

Идентифицирането на субстанциите от лечебни растения е първата стъпка при провеждането на фармакогнозтичен анализ, при който микроскопското изследване играе важна роля. Обекти на микроскопския анализ са смлени на прах стъблени кори, листа, цветни части (цветове и цветни пъпки) от двата дървесни вида (при използване на разтвор на хлоралхидрат).

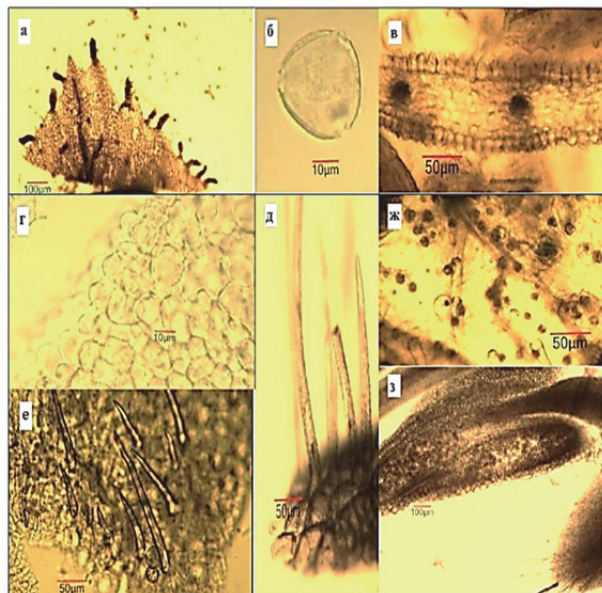
Някои по-важни микроскопски белези наблюдавани в прах от листа, кори и цветни части от *K. paniculata* са представени на Фиг. 11, 12, 13. Прахообразните проби от листа, кори и цветни части имат различен цвят (тревистозелен, светло кафяв и жълтеникав, съответно).



Фигура 11. Микроскопски снимки на прахообразни проби от лист на *Koelreuteria paniculata*: (а) горен листен епидермис в анфас; (б) долен листен епидермис в анфас с аномоцитен тип устица; (в) фрагменти от листна пластинка в напречен разрез с горен епидермис и палисаден паренхим; (г) оксалатни друзи около проводящо снопче; (д) изолирани покривни трихоми; (е) едноклетъчна покривна трихома с част от епидермиса; (ж) жлезисти трихоми на долния листен епидермис.

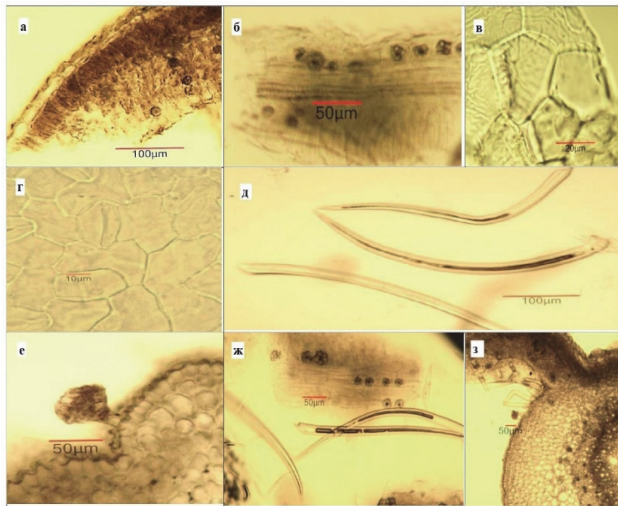


Фигура 12. Микроскопски снимки на прахообразни проби от кората на стъблото на *Koelreuteria paniculata*: (а) корк в анфас; (б) изолирано снопче от флоемни влакна; (в) влакна с кристални друзи от калциев оксалат; (г) паренхимни клетки в анфас; (д) склериди.

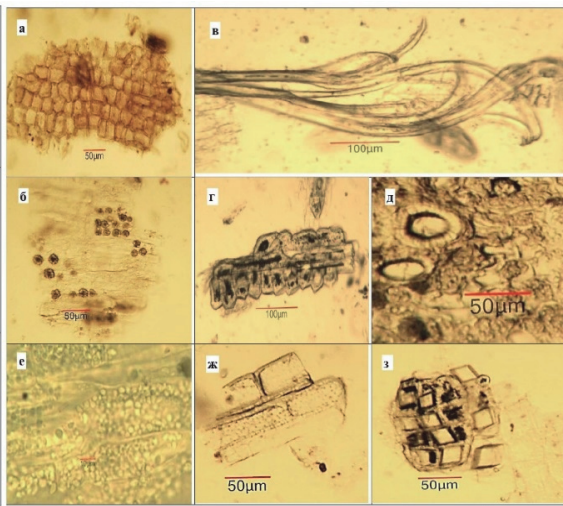


Фигура 13. Микроскопски снимки на прахообразни проби от цветни части на *Koelreuteria paniculata*: (а) фрагмент от венчелистче и прашецови зърна; (б) прашецово зърно; (в) фрагмент от венчелистче в напречен разрез; (г) папилозни епидермални клетки на венчелистчето в анфас; (д) фрагмент от чашка с едноклетъчни покривни трихоми с повърхностни инкрустации; (е) фрагмент от чашка с покривни трихоми; (ж) фрагмент от чашка с оксалатни друзи; (з) фрагмент от цветни пъпки с прашник и части от околоцветника.

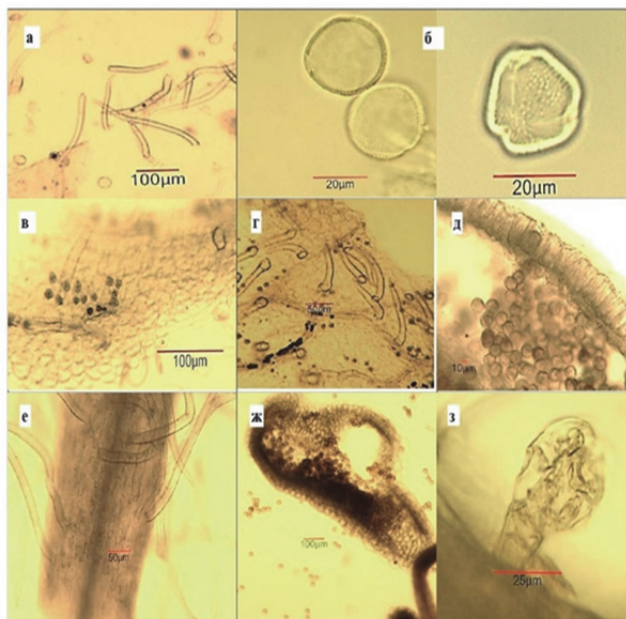
Основните микроскопски белези наблюдавани в прах от растителните субстанции от *A. altissima* са представени на Фиг. 14, 15, 16. Листните прахообразните проби имат тревистозелен цвят, стъблените кори – светло сив и цветните части-жълто зелен цвят, съответно.



Фигура 14. Микроскопски снимки на прахообразни проби от лист на *Ailanthus altissima*: (а) фрагмент от листна пластинка в напречен срез, с горен и долен епидермис, със стълбчест паренхим и гъбчест паренхим с кристални друзи от калциев оксалат; (б) оксалатни друзи около проводящо снопче; (в) горен листен епидермис в анфас; (г) долен листен епидермис в анфас, с аномоцитен тип устица; (д) изолирани едноклетъчни извити покривни трихоми; (е) жлезиста главеста трихома по жилката; (ж) едноклетъчни линейни покривни трихоми (изолирани дълги извити и прави и с част от епидермис къси извити), части от гъбчест мезофил с кристални друзи; (з) фрагмент от централна жилка с листна пластинка в напречен пререз и трихоми (покривни и жлезисти) по епидермиса.



Фигура 15. Микроскопски снимки на прахообразни проби от стъблена кора на *Ailanthus altissima*: (а) корк в анфас; (б) ликов паренхим с кристални друзи; (в) снопче от ликови фибри; (г) група склереиди около снопче ликови фибри; (д) секреторни вместилища сред ликото; (е) фрагмент от фелодерма с хлоропласти; (ж) фрагмент от ликови цеви; (з) оксалатни кристални кубчета около група склереиди.



Фигура 16. Микроскопски снимки на прахообразни проби от цветни части на *Ailanthus altissima*: (а) разпръснати поленови зърна и покривни трихоми; (б) поленови зърна; (в) фрагмент от венчелистче с папилозен епидермис и кристални друзи, (г) фрагмент от чашелистче с едноклетъчни покривни трихоми по епидермиса и кристални друзи предимно около жилките; (д) фрагмент от прашник с екзотеций, ендотеций и полен; (е) фрагмент от фуникулус с покривни трихоми; (ж) фрагменти от прашник и яйчник и множество поленови зърна; (з) жлезиста трихома по цветна дръжка.

ИЗВОДИ

А) По отношение на растителния вид *K. paniculata*

1. СФМ анализ на растителни субстанции от китайски мехурник показва, че общите водоразтворими полифеноли и свързаните с тях дъбилни вещества се натрупват най-много в цветни пъпки и цветове, следвано от листа и най-слабо в кори, при общите флавоноиди листата заемат първата позиция, а при фенолните киселини – корите. Проследената сезонна динамика на натрупване показва, че най-подходящ период за събиране за листата е фаза разлистване и млади листа, за корите – края на вегетационния сезон, а за съцветията – начален цъфтеж.

2. ВЕТХ анализ на фенолния профил на етанолни екстракти от *K. paniculata* показва наличие на пет флавоноида и девет фенолни киселини. Рутин, хесперидин и кверцетин в листата и (-)-епикатехин в цветните пъпки са в най-високи концентрации (над 2,6 mg/g dw). Фенолни киселини, показали най-високо съдържание (от 1,0 до 10 mg/g dw), подредени в следния възходящ ред, са: галова < ванилова < салицилова < *p*-кумарова < розмаринова.

3. ГХ/МС анализ на етанолните екстракти от *K. paniculata* показва широк набор от общо 56 съединения, сред които преобладават окислените монотерпенови производни. От идентифицираните компоненти с най-високи концентрации (над 10%) са: пирогалол (в цветовете) и α -терпинил ацетат (в листата и цветовете), нерилацетат (в кори) и α -терпинил изобутаноат (в цветовете).

4. Идентифицирани (ГХ/МС) са 54 съединения в ЕМ от надземни субстанции (стъблени кори, листа, цветове и цветни пъпки) на *K. paniculata*, като са констатирани известни различия в химичния състав. В ЕМ от цветни пъпки и цветове преобладават кислородни алифатни съединения, в ЕМ от листа – сесквитерпени, а при ЕМ от кори – алифатни въглеродороди, окислени алифатни и окислени сесквитерпени. Основни съединения в маслата, над 10%, са: линолова и палмитинова киселини (цветни пъпки); фарнезилацетон (цветове); фарнезен (листа) и дрименол (кори).

5. Маслото от семената на вида показва висока оксидантна стабилност и то би могло да бъде добър източник на ненаситените олеинова и ейкозенова к-ни, както и на β – ситостерол, вит. Е и фосфолипиди.

6. Доказана е активност спрямо следните бактериални щамове: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* NCTC 10320, *Escherichia*

coli ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6027, и *Proteus vulgaris* ATCC 6380, като екстрактите от кори и листа показват по-добър антимикробен потенциал.

7. Всички тествани екстракти показват *in vitro* антиоксидантна активност, определена чрез DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC анализи, като най-висока е регистрирана в цветните части, следвани от листа и най-слаба – при кори. Видът на растителните субстанции (свежи или сухи) и начина на екстрахиране оказват влияние върху АОО.

8. Значима антипролиферативна активност спрямо HT-29 клетъчна линия (човешки аденокарцином на дебелото черво) е установена за екстрактите от цветове и листа на *K. paniculata*.

9. Екстрактите от листа, цветове и кори на *K. paniculata* в концентрации от 5,25 до 10 µg/ml проявяват пълна защита от окислително увреждане на ДНК. При по-ниски концентрации на растителните екстракти (0,6 – 2,5 µg/ml) ДНК защитният потенциал е дозозависим и най-добър при кори.

10. Анализирани са основните фармакогнозтични микроскопски белези на смлени на прах субстанции от листа, кори и цветни части на *K. paniculata*, данни които до момента липсват.

Б) По отношение на растителния вид *A. altissima*

1. Листата са растителните субстанции, натрупващи най-големи количества от четирите изследвани групи фенолни съединения, като подходящ период за тяхното събиране е както на фаза разлистване (за флавоноиди), така и при добре развити листа (за полифеноли, танини и фенолни киселини). Цветни пъпки и цветове са следващи по съдържание на разглежданите БАВ, а в корите те са най-слабо представени.

2. Фенолният профил на екстрактите от *A. altissima* доказва 16 съединения, от които 6 флавоноида, като най-добре представени са рутин (5,68 mg/g dw в цветовете), хесперидин (2,67 mg/g dw в листата) и (+)-катехин (2,15 mg/g dw в корите). Розмаринова и салициловата киселини са доминиращи (2-10 mg/g dw) сред десетте установени фенолни киселини (в листата и цветовете).

3. В етанолните екстракти от цветове, листа и кори са идентифицирани 47 компонента при проведеното газхроматографско изследване, сред които преобладават алифатните кислородни производни. Основен компонент в екстрактите от цветове и листа е (3Z)-хексенил хексаноат (28,59%, 12,61%), а корите – α-терпинилацетат (15,55%).

4. Идентифицирани са 75 съединения в ЕМ от различни надземни субстанции на *A. altissima*. Алифатните кислородни производни (главно мастни киселини, техни естери) преобладават в ЕМ от плодове, листа и кори, докато в цветовете – сесквитерпенови въглеводороди. Основните съединения в ЕМ (над 10 %) са: β -кариофилен и гермакрен D (в ЕМ от цветовете); олеинова киселина (в ЕМ от кора, листа и плодове), палмитиновата киселина (в ЕМ от плодове).

5. В маслото от семена на айлант се съдържат мастни киселини (основно олеинова и линолова), β – ситостерол, γ -токоферолът, както и фосфолипиди.

6. Доказана е антибактериална активност на екстракти от листа и кори на *A. altissima* спрямо 6 от тестваните патогенни щамове, като най-силен е ефектът срещу *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Klebsiella*, клиничен изолат.

7. Антиоксидантен потенциал показват всички тествани екстракти, като най-добре изразен е при цветни пъпки и цветовете. Тестваните различни видове екстракти показват, че най-висок антиоксидантен ефект при цветовете и кори се отчита при вакуумните екстракти, получени от свеж материал, докато за листата – при етанолните екстракти, получени от сухи субстанции, с температурна обработка.

8. Антипролиферативна активност спрямо две клетъчни линии проявяват екстрактите от цветовете на айлант (спрямо HT-29) и тези от стъблени кори (спрямо PC-3 –човешки аденокарцином на простатата).

9. Екстрактите от кори, листа и цветовете от *A. altissima* показват пълна защита на ДНК от окислителни увреждания при концентрация над 5,25 $\mu\text{g/ml}$. При по-ниски концентрации (0,6-2,5 $\mu\text{g/ml}$) ДНК защитният ефект е най-силен при цветовете.

10. Направеният фармакогнозтичен микроскопски анализ на смлени на прах цветни части от *A. altissima* до момента не е публикуван, а получените резултати за кори и листа обогатяват наличната информация.

ПРИНОСИ

Оригинални научни приноси:

1. За първи път са посочени основни диагностични микроскопски белези на прахообразни растителни субстанции от цветовете, листа и стъблени кори от *K. paniculata*, и цветовете от *A. altissima*
2. За първи път е проследена сезонната динамика в натрупване на общи водоразтворими полифеноли, танини, флавоноиди и фенолни киселини в растителни субстанции от *K. paniculata* и *A. altissima* за период от 3 години.
3. За първи път са изолирани чрез водна дестилация и идентифицирани чрез ГХ/МС анализ летливи компоненти от надземни части на *K. paniculata*.
4. За първи път е проучен фенолен профил (флавоноиди и фенолни киселини) на етанолни екстракти от сухи субстанции (цветни пъпки, цветовете, листа и стъблени кори) от *K. paniculata* чрез ВЕТХ анализ.
5. За първи път е проучен фитохимичният състав (ГХ/МС) и различни биологични активности (антимикробна, антиоксидантна, антипролиферативна) на етанолни екстракти от свежи растителни субстанции на *K. paniculata* и *A. altissima*.
6. За първи път е посочен фосфолипиден профил на тлъсти масла от семена на *A. altissima* и *K. paniculata*.
7. За първи път е доказан ДНК-защитен потенциал на етанолни екстракти от цветовете, листа и стъблени кори от *K. paniculata*, както и от цветовете и листа от *A. altissima*.

Научно-приложни приноси:

1. Установеният химичен състав на изолираните етерични масла от *K. paniculata* показва, че те биха могли да бъдат потенциален природен източник за влагане в храни, козметични и лекарствени продукти.
2. Проученият състав на тлъстите масла от семена на двата вида показва, че те са богати на полезни омега мастни киселини, фосфолипиди, стероли и витамин Е, което ги прави ценен източник на тези компоненти с възможни бъдещи приложения.
3. Поради наличие на ценни БАВ в екстракти от надземни субстанции от *K. paniculata* и *A. altissima* (особено цветовете и листа) те биха били добър източник на естествени антиоксиданти.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА В АВТОРЕФЕРАТА

- Государственная Фармакопея России (ГФР) – XI издание, 1990, Москва – „Медицина“, Россия, 323-325.
- Арак, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciens and Nutrition*, 57(5-6), 292–304.
- Арак, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciens and Nutrition*, 57(5-6), 292–304.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*. Academic press: Cambridge, MA, USA, 299, 15-27.
- Caramelo, D., Pedro, S. I., Marques, H., Simão, A. Y., Rosado, T., Barroca, C., ... & Gallardo, E. (2021). Insights into the Bioactivities and Chemical Analysis of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. *Applied Sciences*, 11(23), 11331.
- European Pharmacopoeia 10.0(1) (2019). Methods in Pharmacognosy. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). Strasbourg: Council of Europe, 310 (a); 1602-1603 (b); 317 (c).
- European Pharmacopoeia 10.0(1) (2019). Methods in Pharmacognosy. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). Strasbourg: Council of Europe, 310 (a); 1602-1603 (b); 317 (c).
- ISO 10540-1:2014. Animal and vegetable fats and oils. Determination of phosphorus content. Part 1: Colorimetric method.
- ISO 12228-1:2014. Part 1: Animal and vegetable fats and oils. Determination of individual and total sterols contents. Gas chromatographic method.
- ISO 659:2014. Oilseeds. Determination of oil content (Reference method).
- ISO 9936:2016. Animal and vegetable fats and oils. Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.
- Ivanov, I.G., Vrancheva, R.Z., Marchev, A.S., Petkova, N.T., Aneva, Y., Denev, P.P., Georgiev, V.G., & Pavlov, A.I. (2014). Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 296–306.

- Kivrak, İ., Duru, M.E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M., & Topçu, G. (2009). Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia Potentillifolia*. *Food Chemistry*, 116(2), 470–479.
- Kožuharova, E.; Lebanova, H.; Getov, I.; Benbassat, N.; Kochmarov, V. (2014). *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle—A terrible invasive pest in Bulgaria or potential useful medicinal plant? *Rev. Pap. Bothalia*, 44(3), 213–230.
- Krasteva, G. (2022). Effect of basal medium on growth and polyphenols accumulation by *Gardenia jasminoides* Ellis cell suspension. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 45). EDP Sciences
- Ljubojević, M., Tomić, M., Simikić, M., Savin, L., Narandžić, T., Pušić, M., ... & Marinković, M. (2021). *Koelreuteria paniculata* invasiveness, yielding capacity and harvest date influence on biodiesel feedstock properties. *Journal of Environmental Management*, 295, 113102.
- Marinaş, I C., Dinu M., Ancuceanu R., Hovanet M., Oprea E., Genă, E-I., & LazărV. (2017). The phenols content and phytotoxic capacity of various invasive plants. *Romanian Biotechnological Letters*, 23.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63.
- Petrova, A., Vladimírov, V., & Georgiev, V. (2013). *Invasive alien species of vascular plants in Bulgaria*. Sofia, Bulgaria: Neo print Press. ISBN 978-954-9746-30-3.
- Rajiv, C., Roy, S. S., Tamreihao, K., Kshetri, P., Singh, T. S., Sanjita Devi, H... & Sonia, C. (2021). Anticarcinogenic and antioxidant action of an edible aquatic flora jussiaea repens L. Using in vitro bioassays and in vivo zebrafish model. *Molecules*, 26(8), 2291.
- Sladonja, B., Sušek, M., & Guillermic, J. (2015). Review on invasive tree of heaven (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle) conflicting values: assessment of its ecosystem services and potential biological threat. *Environmental management*, 56(4), 1009-1034.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Zhelev, I., Georgiev, K., & Dimitrova-Dyulgerova, I. (2016). In-vitro antioxidant and antineoplastic activities of carotenoids from flowers of *Koelreuteria paniculata*. *World Journal of Pharmaceutical Reserch*, 5(5), 53-60.

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

1. **Andonova T.**, Dimitrova-Dyulgerova I., Slavov I., Muhovski Y., Stoyanova A. (2020). A Comparative Study of *Koelreuteria paniculata* Laxm. Aerial Parts Essential Oil Composition. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 23 (6), 1363-1370. SJR_{Q3} (2020): 0.36; IF_{Q3}: 1,541 (2020)
2. **Andonova T.**, Muhovski Y., Fidan H., Slavov I., Stoyanova A., Dimitrova-Dyulgerova I. Chemical compounds, antitumor and antimicrobial activities of dry ethanol extracts from *Koelreuteria paniculata* Laxm (2021). *Plants*, 10 (12), 2715. SJR_{Q1} (2021): 0.77; IF_{Q1} (2021): 4.658

ПОЛОЖИТЕЛНИ ЦИТИРАНИЯ (ДАНИИ SCOPUS) ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Kumar, S., Paliya, B.S., Singh, B.N. (2022). Superior inhibition of virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by phyto-synthesized silver nanoparticles through anti-quorum sensing activity. *Microbial Pathogenesis* 170,105678. **(статия 2)**
2. Todorova, T., Boyadzhiev, K., Shkondrov, A., (...), Kozuharova, E., Chankova, S. (2022). Screening of *Amorpha fruticosa* and *Ailanthus altissima* extracts for genotoxicity/ antigenotoxicity, mutagenicity/antimutagenicity and carcinogenicity/anticarcinogenicity. *BioRisk* 17, 210-212. **(доклад от конференция, 2020)**
3. He, Q., Zhou, T., Sun, J., (...), Bai, L., Liu, Z. (2021). Transcriptome profiles of leaves and roots of goldenrain tree (*Koelreuteria paniculata* laxm.) in response to cadmium stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(22),12046. **(статия 1)**
4. Ljubojević, M., Tomić, M., Simikić, M., (...), Srđan Vejnović, Marinković, M. (2021). *Koelreuteria paniculata* invasiveness, yielding capacity and harvest date influence on biodiesel feedstock properties. *Journal of Environmental Management*,295,113102 **(статия 1)**

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

International Conference on Technics, Technologies an Education ICCTE 2020, 4-6 November. Ts G Andonova, I Zh Dimitrova-Dyulgerova, I Zh Slavov, I N Dincheva, A S Stoyanova. Volatile compounds in flowers, samaras, leaves and stem bark of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, growing in Bulgaria.

International Conference on Technics, Technologies an Education ICCTE 2021, 3-5 November. Ts G Andonova, H N Fidan, I Zh Slavov и I Zh Dimitrova-Dyulgerova. „Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle extracts from Bulgaria“.