



Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
Катедра „Ботаника и биологическо образование“



ДОНИКА ПЕТРОВА ГЮЗЕЛЕВА

**БИОЛОГИЧНО И ФИТОХИМИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА
РАСТЕНИЯ ОТ БЪЛГАРСКАТА ФЛОРА С ПОТЕНЦИАЛ ЗА
БИОТЕХНОЛОГИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

Биологически науки; докторска програма: Ботаника

Научни ръководители:

проф. д-р Пламен Стефанов Стоянов
доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска, дб

Пловдив, 2024 г.

Дисертационният труд се състои от 128 страници. Той е онагледен с 39 фигури и 12 таблици. В библиографията са включени 257 литературни източника (от които 7 на кирилица).

Експерименталните изследвания са проведени в научните лаборатории на катедрата по Ботаника и биологическо образование, катедрата по Биология на развитието към Биологически факултет, катедра Химична технология към Химически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“; катедрата по Медицинска биохимия към Фармацевтичен факултет при Медицински университет – Пловдив, и Център по растителна и системна биология и биотехнология – Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Ботаника и биологическо образование“ при Биологическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“ (Протокол №173/28.10.2024 г.)

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 31.01.2025 г. от 11.00 часа в 14 аудитория на Биологическия факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“ (гр. Пловдив, ул. „Годор Самодумов“ №2).

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

Научно жури:

проф. д-р Валентина Годорова Тонева
проф. Марияна Димитрова Аргирова, дхн
доц. д-р Детелина Стоянова Белкинова
доц. д-р Цветанка Георгиева Райчева
доц. д-р Станислава Димитрова Иванова

Автор: Доника Петрова Гюзелева

Тема на дисертационен труд: Биологично и фитохимично проучване на растения от българската флора с потенциал за биотехнологично приложение.

СПИСЪК С ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

SEM	сканираща електронна микроскопия
LC-MS	течна хроматография – мас-спектрометрия
NADPH	никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат
UV	ултравиолетова светлина
DPPH	1,1-дифенил-2-пикрилхидразил
АТФ	аденозинтрифосфат
GC-MS	газова хроматография – мас-спектрометрия
UPLC-MS	ултра ефективна течна хроматография – мас-спектрометрия
UPLC-MS/MS	ултра ефективна течна хроматография – синхронизирана мас-спектрометрия
ICP-MS	индуктивно свързаната плазмена мас-спектрометрия
MS	мас-спектрометрия
UPLC	ултра ефективна течна хроматография
QC	контрол на качеството

ВЪВЕДЕНИЕ

Растенията са едни от многобройните дарове на природата (Oluwafemi *et al.*, 2020). Още от дълбока древност те се използват като източник на храна и лекарства. Според Световната здравна организация, приблизително 80% от хората по света използват предимно лечебни растения при много заболявания, поради техните целебни свойства, дължащи се на съдържащите се в тях биологично активни вещества (Elansary *et al.*, 2019).

Лечебните растения чрез съдържащите се в тях биологично активни вещества притежават антимикубни, антивирусни, противогъбични и антиоксидантни свойства (Oluwafemi *et al.*, 2020). Ето защо те са широко използвани за проучване и са основни източници за биотехнологични и фармацевтични разработки (Mumtaz *et al.*, 2017).

Обект на дисертационния труд са видовете *Marrubium friwaldskyanum* Boiss., *Marrubium peregrinum* L., *Marrubium vulgare* L. и *Centaurea thracica* (Janka) Hayek, които са проучени за тяхната фитохимия, биологични активности и възможности за биотехнологично приложение.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Ботанична характеристика

Marrubium friwaldskyanum е български ендемит, включен в Червената книга на Р. България, Том 1. Растения и гъби (Peev, 2015) под категорията уязвим (VU) и фигурира в Червеният списък на висшите растения в България (Petrova & Vladimirov, 2009) също под категорията уязвим (VU). Местообитанията му в България попадат в защитените територии от Европейската екологична мрежа Натура 2000 (Zheljazkov *et al.*, 2022). Стъблото му е единично или разклонено, четириръбесто, влакнесто, достигащо на височина от 20 до 60 cm. Листата са прости, разположени на къси дръжки с дължина 1.2–5.5 cm и широчина 0.7–3.4 cm. По форма листата са кръгли или елипсовидни, равномерно назъбени. Цветовете са жълти до кремавожълти (Jordanov, 1989). Вирее върху плитки, сухи почви, по-често върху варовик. Среща се в Средните и Западните Родопи, както и в Тракийската низина (Meshinev, 2015).

Marrubium vulgare има сходни морфологични белези с тези на *Marrubium friwaldskyanum*. Стъблото е високо 20-80 cm, изправено, разклонено. Листата са яйцевидни до заоблени, дълги до 3 cm, по ръба неравномерно тъпо назъбени, напластени с бели власинки. Цветовете са събрани по 20-50 в прешлени, с линейни прицветници. Чашката е звънчевидна. Венчето е бяло, двуустно, с къса тръбица, горната устна е изправена, до средата двуделна, дяловете са тесни, лентовидни; долната е извита и триделна, средният дял е заоблен; страничните са по-къси, ланцетни и двете устни отгоре са гъсто покрити с прости власинки. Тичинките са 4, двете външни – по-дълги, но не излизат извън тръбицата на венчето. Плодът е сух, разпадащ се на 4 елипсовидни, тръбести, голи орехчета. (Кузманов и кол., 2006). *Marrubium vulgare* е бил един от най-продавания като билкова добавка през 2018 г. за масова употреба в САЩ (Smith & Sawyer, 2019). У нас видът се среща все по-рядко.

Marrubium peregrinum L. е многогодишно растение от семейство Lamiaceae с четириръбесто стъбло, високо 25-105 cm, силно разклонено. Листата са дълги 0.2-1.4 cm, единични, ланцетни, при основатга си целокрайни, нагоре неравни, остро насечени до назъбени. Цветовете са бели. Плодът е орех (Jordanov, 1989). Обитава сухи тревисти и каменисти места край пътища и рудерални терени до към 1 000 м надм.в. Среща се в Европа и Средна Азия и принадлежи към Понтийско-Средиземноморски флористичен район (Diklić, 1974).

Повечето проучвания за род *Marrubium* са върху видове, разпространени в Турция и Иран, тъй като растенията от рода са разпространени в Средиземноморския регион, Азия и Африка (Akgül *et al.*, 2008; Talebi *et al.*, 2019).

Centaurea thracica е многогодишно растение с височина 50-90 cm, обикновено светлозелено. Стъблото е изправено, единично или с 2 до 6 разклонения в горната част, задебелено под съцветието, гъсто овласнено с разклонени трихоми. Листата гъсто разположени, покрити с разклонени трихоми, в основата на растението начленени, лировидни, като върховете са продълговати или триъгълни. Средните и горните листа са прости, продълговати, яйцевидно-ланцетни, заострени към върха. Листчетата, изграждащи инволукриумът са яйцевидни или куполовидни, от 25-35 x 20-28 mm, разположени в няколко реда, кожести, жълто-зелени, без власинки. Жилките им се подават от върховете като единични шипчета с дължина от 4 до 8 mm. Цветовете са жълти, двуполови (Negareh & Rahiminejad, 2015). Разпространена е в България, Гърция и Турция. Обитава предимно тревисти места и храсталаци с надморска височина от 180 до 1300 m. (Negareh & Rahiminejad, 2015).

Фитотерапевтични свойства

Представителите от род *Marrubium* оказват благоприятно влияние върху човешкия организъм. Използват се в народната медицина по целия свят за лечение на различни заболявания (Yabrir, 2018). Лечебни субстанции от растителни видове от род *Marrubium* проявяват антиноцицептивна (De Jesus et al., 2000), антихипертензивна (El Bardai et al., 2004), спазмолитична (Rigano et al., 2009), антиедематогенна (Stulzer et al., 2006), аналгетична (Meyre-Silva et al., 2005), инсектицидна (Pavela, 2004), противовъзпалителна (Sahpaz et al., 2002a), антимикробна (Rigano et al., 2007), антихеликобактерна (Ramadan & Safwat, 2009), цитопротективна (Martin-Nizard et al., 2003) и значителна антилевкемична активност (Alkhatib et al., 2010).

Род *Centaurea* е привлякъл голям интерес към създаването на нови лекарствени форми (Zengin et al., 2018). Представители на този род имат диуретично и леко адстрингентно действие, използват се и като горчиви тоници за стомах (Al-Easa & Rizk, 1992). Прилагат се за лечение на ревматизъм, диабет, диария и хипертония (Sarker et al., 1997). Видовете на рода имат редица биологични ефекти, включително антимикробни, противогъбични, антиплазмодиални (Kaskoos, 2013). Проявяват антиулцерогенни, антиоксидантни, антивирусни, антипротозойни и противоракови свойства (Pires et al., 2018).

Фитохимична характеристика

Род *Marrubium* съдържа редица биологично активни вещества, но е с най-голямо съдържание на фенолни съединения (Kozyra et al., 2020). В екстракти от *Marrubium vulgare* и *Marrubium friwaldskyanum* са открити

свободни фенолни киселини - ферулова, р-кумарова, кафеена и гентизинова киселини (Kozyra et al., 2020).

При фитохимични изследвания на *M. peregrinum* са изолирани различни групи съединения: флаволи (апигенин и лутеолин) (Sahpaz et al., 2002b), флавоноли (кемпферол) (Nagy et al., 1996), гликозилирани флавоноиди, производни на кафеената киселина (Gruenwald & Brendler, 2000) и четири дитерпеноиди (перегринин, перегринол, маррубиин и премарубиин) (Telek et al., 1997).

Zheljazkov et al. (2022) са разкрили наличието на 45 съединения в *M. frivaldskyanum*, които са идентифицирани като флавоноиди, фенолни киселини и (три)терпеноиди.

За *Marrubium vulgare* е установено съдържание на маррубиин, лабданов дитерпен, характерен за рода, както и сложна смес от фенолни съединения (Aćimović et al., 2020).

За род *Centaurea* най-често срещаните съединения са сесквитерпенови лактони (цинаропикрин, гросгемин, репнин). Те са типични компоненти за растенията от семейство Asteraceae (Rustaiyan & Faridchehr, 2021). Установени са също флаволи (апигенин, лутеолин, лутеин, флавоноли), кверцетин и канелени киселини (Fernandes et al., 2019).

Метаноловият екстракт от свежи събрани цветове на *Centaurea scabiosa* съдържа кумаран (2,3-дихидробензофуран), 5-хидроксиметил фурфурал, 3-хидрокси-4-метоксибензоена киселина, метилов естер и 3-метил-кумарин. Тези компоненти представляват 80% от общия брой установени вещества (Sharonova et al., 2021).

Биологична активност на фенолните съединения

Фенолните съединения са продукти от вторичния метаболизъм на растенията. Отговорни са за пигментацията и стипчивостта, действат като защитни агенти срещу UV светлина, също така предпазват растенията от паразити и насекоми (Durazzo et al., 2019). Те са естествени биоактивни молекули, открити главно в растителните тъкани (Albuquerque et al., 2021). Приемът на антиоксиданти помага за понижаване на реактивните кислородни форми, така че да се предотвратят много остри и хронични заболявания (Neha et al., 2019).

Флавоноидите апигенин, хризин, нарингенин, кемпферол, кверцетин, даидзеин и генистеин пречат на образуването на биофилм, докато кверцетинът, лутеолинът, мирицетинът и байкалеинът инхибират репликацията на бактериалната ДНК (Jucá et al., 2020).

Растителните екстракти, получени от билки и прилагани като противотуморни средства имат цитотоксичен ефект спрямо туморните

клетки, без да засягат клетъчната жизнеспособност на здравите клетки (Mouhid *et al.*, 2018). Има малко познания за противораковата активност на род *Marrubium* (Kozyra *et al.*, 2020).

Анализирана е цитотоксичната активност на фенолните киселини, включени в метанолни екстракти от култивиран *Marrubium friwaldskyanum* срещу ракови и нормални клетки. Установена е цитотоксична активност на нехидролизираната фракция на фенолните киселини върху клетъчна линия на човешки меланомен рак и не е открита активност срещу нормални клетки (Kozyra *et al.*, 2020).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Настоящият дисертационен труд има за **цел** чрез биологично и фитохимично проучване на видовете *Marrubium friwaldskyanum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium vulgare* и *Centaurea thracica* да установи значимостта им за приложение в биотехнологични разработки и използването им като лечебни ратения.

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

1. Събиране на материали от видовете *Marrubium friwaldskyanum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium vulgare* и *Centaurea thracica*, разпространени в България.
2. Анатомичен анализ на *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum*.
3. Фитохимично изследване на видовете *Marrubium friwaldskyanum*, *Marrubium peregrinum* и *Centaurea thracica*.
4. Изследване на биологичните активности на екстракти от *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum*.
5. Определяне съдържанието на протеини, масленост, въглехидрати, съдържание на минерални вещества и на неразтворими фибри при *Centaurea thracica*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

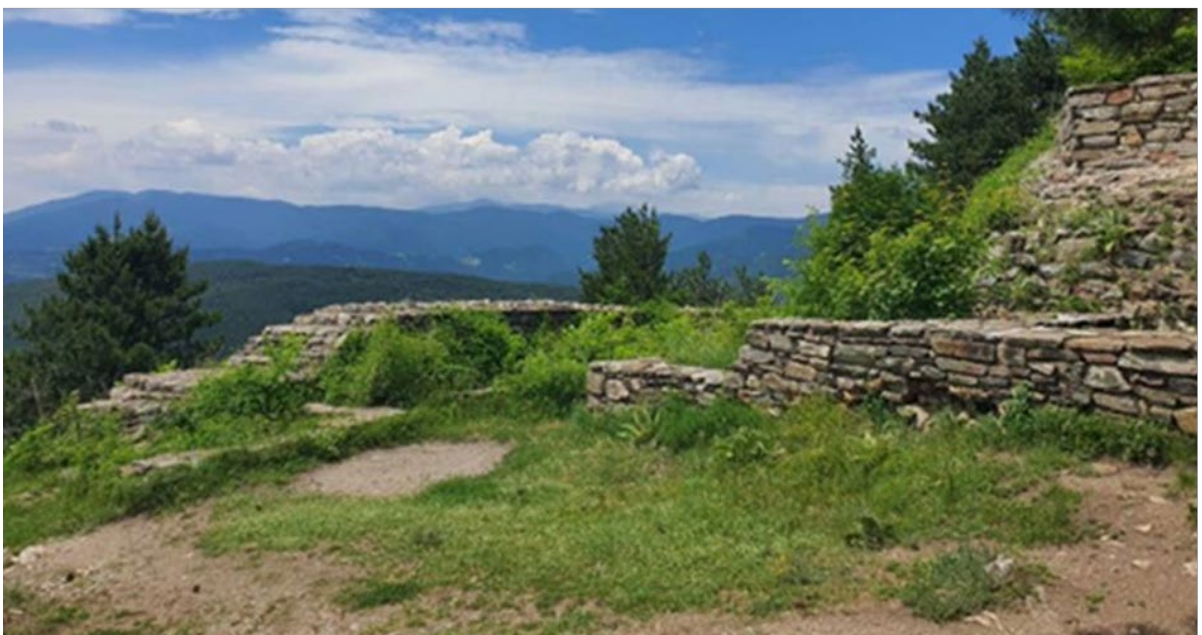
От *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. (Фривалдскиев пчелник) през 2019-2021 г. е събрана надземната част по време на вегетационния период от територията на средновековната крепост Цепина - Баташката планина (фиг. 1).

От *Marrubium peregrinum* L. (Сусерка) през 2020-2021 г. е събрана надземната част по време на вегетационния период от възвишения над град Кричим.

От *Marrubium vulgare* (Обикновен пчелник) е събрана надземната част по време на вегетационния период над град Куклен.

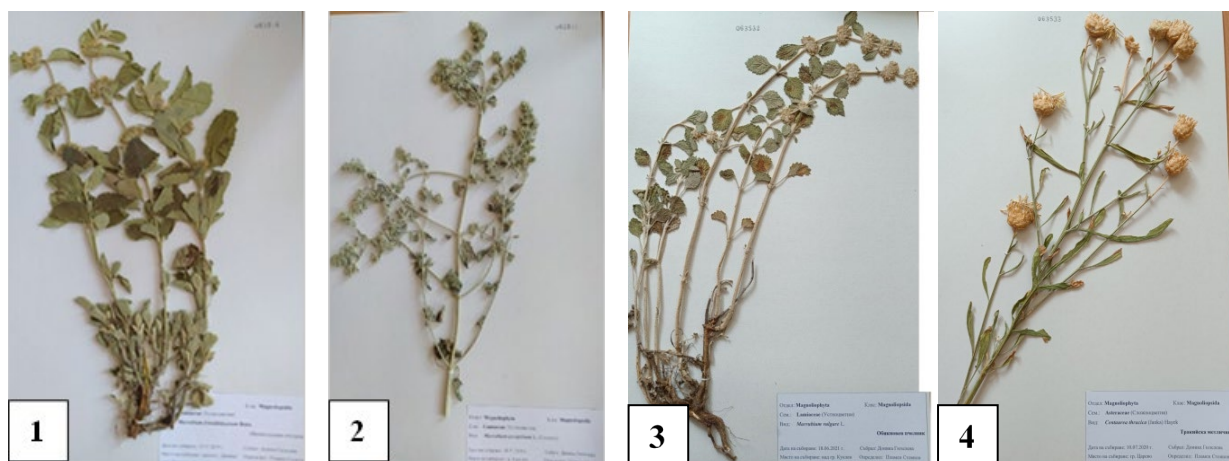
От *Centaurea thracica* (Янка) Науек (Тракийска метличина) през 2020 и 2021 г. е събрана надземната част по време на вегетацията (цъфтеж и семеобразуване) в околностите на гр. Царево. Цъфтящите съцветия от *Centaurea thracica* бяха събрани през юни, а зрелите съцветия и семена през септември.

Хербариини образци са депозиранни в хербариума на Аграрен университет - Пловдив (SOA) (фиг. 2).





Фигура 1. Изследване и събиране на *Marrubium friwaldskyanum*.



Фигура 2. Хербариини образци на изследваните растения: 1 - *Marrubium friwaldskyanum* (№ 063316); 2 - *Marrubium peregrinum* (№ 063315); 3 - *Marrubium vulgare* (№ 063532); 4 - *Centaurea thracica* (№ 063533).

Методи

Методи използвани при изследванията на видовете от род *Marrubium*

Микроскопският анализ на *Marrubium friwaldskyanum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium vulgare* е извършен със светлинен микроскоп Magnum T Trinocular microscope, снабден със система за фото-документация Si5000. Анализът на листата и стъблото е направен следвайки класическите методи на Metcalfe & Chalk (1950).

Сухият прах от лиофилизираните проби от цялото растение *M. peregrinum* и от листата, стъблата и цветовете на *M. friwaldskyanum* беше подложен на екстракция и фракциониране на метаболитите, при което семиполярната фаза беше използвана при GC-MS и UPLC-MS анализите, а

неполярната – за изследване на липидите. Дериватизацията на първичните метаболити е извършена съгласно Lisec *et al.* (2006).

Екстракцията е проведена съгласно Giavalisco *et al.* (2011) и Salem *et al.* (2020) с малки изменения.

Определянето и последващото аотиране на метаболитите бяха завършени с помощта на вътрешна база данни с референтни съединения, синхронизирана MS (MS/MS) фрагментация и метаболомика (Alseekh *et al.*, 2021).

При аотирането на метаболитите, измерени чрез GC-MS, беше използвана базата данни Golm Metabolome (Kopka *et al.*, 2005). Аотирането на липидите беше извършено главно посредством вътрешно търсене основано на пълно сканиране MS¹ в база данни, състояща се от самостоятелни стандарти, по описания от Hummel *et al.* (2011) метод.

За Определяне на минералното съдържание пробите са подложени на микровълново смилане съгласно протокола, описан от Miller (1998).

Данните от газовата и течната хроматография бяха подложени на мултивариационен анализ посредством MetaboAnalystR (Pang *et al.*, 2022) и софтуер R, версия 4.3.1.

Цитотоксичността и потенциалната антитуморна активност на изолатите от *M. peregrinum* и *M. frivaldskyanum* бяха анализирани *in vitro* с помощта на четири човешки клетъчни линии: A549 (ATCC CCL-185™), изолирана от белодробен аденокарцином; HeLa (ATCC CCL-2™) - цервикална аденокарцинома; HT-29 (ATCC HTB-38 HT29), получена от колоректален аденокарцином и HFFC - фетални фибробласти, изолирани от препуциум (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Германия).

Проведени бяха два типа *in vitro* тестове за цитотоксичност: МТТ тест, основаващ се на редукция на 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,4-дифенил тетразолиев бромид (МТТ) от метаболитно активни неувредени клетки (Edmondson *et al.*, 1988) и NR тест, чийто принцип е свързан с усвояване на неутрално червено (NR) в лизозомите на живите клетки от изследваната проба (Repetto *et al.*, 2008).

За получаване на туморни сфероиди бяха използвани HT29 клетки. Измервания на диаметъра на получените сфероиди след 24 и 96 часа култивиране бяха извършени на микроскоп Inverso (Medline Scientific, Chalgrove, Oxon, UK) с помощта на цифрова камера с висока разделителна способност Si-3000 и специализиран софтуер (Medline Scientific, Chalgrove, Oxon, UK).

За да бъде изследвана антибактериалната активност на пробите от *M. peregrinum* и *M. frivaldskyanum*, бяха проведени дифузионни тестове с два вида микроорганизми – един Грам-отрицателен /*Escherichia coli* (ATCC 25922™)/ и един Грам-положителен вид /*Bacillus cereus* (ATCC 11778™)/.

Статистическите анализи са направени със статистическа програма SPSS версия 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Методи използвани при изследванията на *Centaurea thracica*

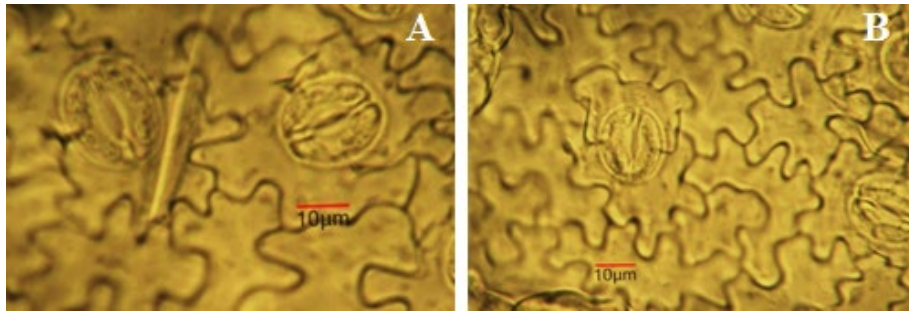
- Метод за определяне на общ азот и общ протеин ([Association of Official Analytical Chemist, 2016](#)).
- Определяне масленото съдържание с апарат на Соксле ([ISO 659:2009](#)).
- Определяне на общото съдържание на въглехидрати ([Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003](#)).
- Определяне на неразтворимите фибри (БДС [EN ISO 6865:2001](#)).
- Определяне на пепелното съдържание (БДС [13491:1976](#)).
- Определяне съдържанието на влага и летливи вещества (БДС [ISO 711:1997](#)).
- Определяне на енергийна стойност ([Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003](#)).
- Определяне на индивидуалния мастнокиселинен състав на глицеридното масло ([ISO 12966-1:2014, ISO 12966-2:2017](#)).
- Определяне на йодно число ([American Oil Chemists Society, 2022](#)).
- Определяне на токоферолов състав ([ISO 9936:2016](#)).
- Изолиране на фосфолипиди и определяне на индивидуалния фосфолипиден състав ([Folch et al., 1957, ISO 10540-1:2014](#)).
- Атерогенният индекс се изчислява въз основа на мастнокиселинния състав на маслото ([Ulbricht & Southgate, 1991](#)).
- Тромбогенният индекс се определя като съотношение между про-тромбогенните и анти-тромбогенните киселини ([Ulbricht & Southgate, 1991](#)).
- Статистическият анализ е проведен чрез използване на статистическа функция на *Microsoft Office Excel*.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултати получени при изследванията на видовете от род *Marrubium*

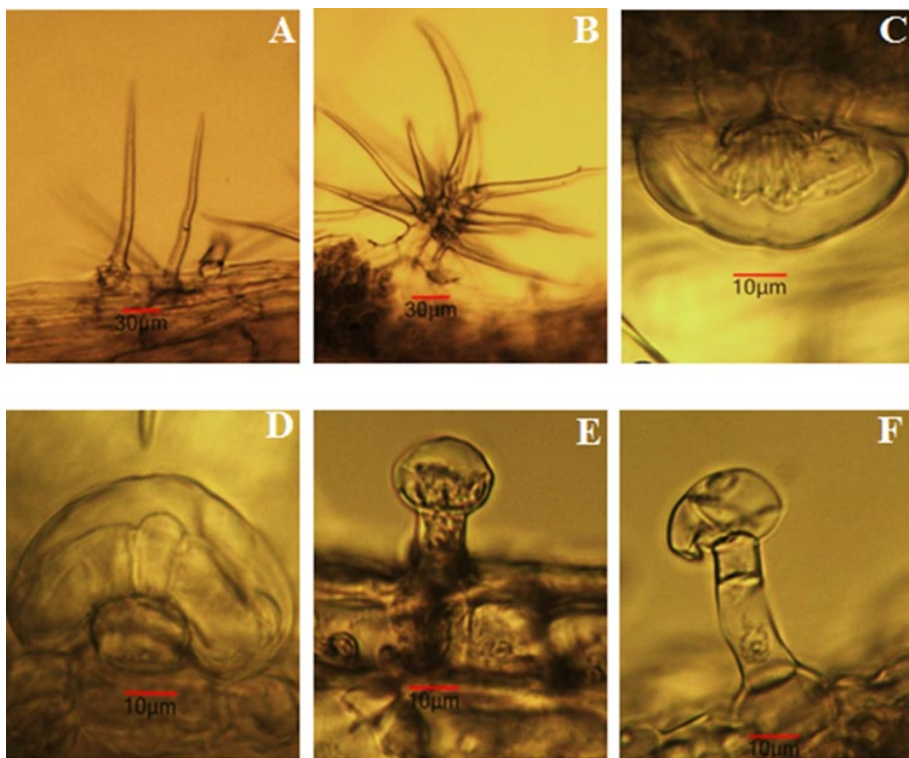
Анатомичен анализ на *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum*

При анализа на листната повърхност се установи, че основните клетки и при двата вида са със зигзаговидно извити клетъчни стени и различни размери, което е в съответствие с класификацията на Aneli (1975) и проучванията на Mladenova et al. (2019). И при двата таксона преобладаващите устица са от диацитен тип, като на места се открива и аномоцитен тип устичен апарат (фиг. 3).



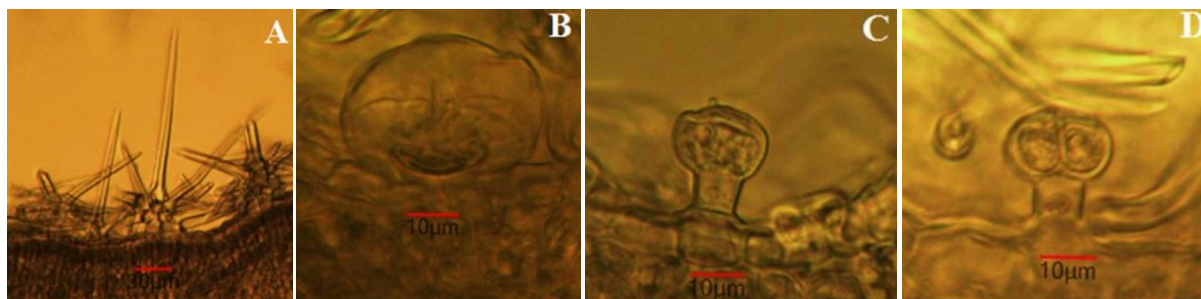
Фигура 3. Диацитен и аномоцитен тип устичен апарат при *Marrubium friwaldskyanum* (A) и *Marrubium peregrinum* (B).

Индументума при *Marrubium friwaldskyanum* е представен от два типа трихоми – покривни и жлезисти. Покривните трихоми биват едноклетъчни линейни и многоклетъчни силно разклонени (фиг. 4A,B). Жлезистите трихоми по своята структура са приседнали щитовидни (фиг. 4C), с къса едноклетъчна дръжка (фиг. 4D,E) или двуклетъчна структура (фиг. 4F).



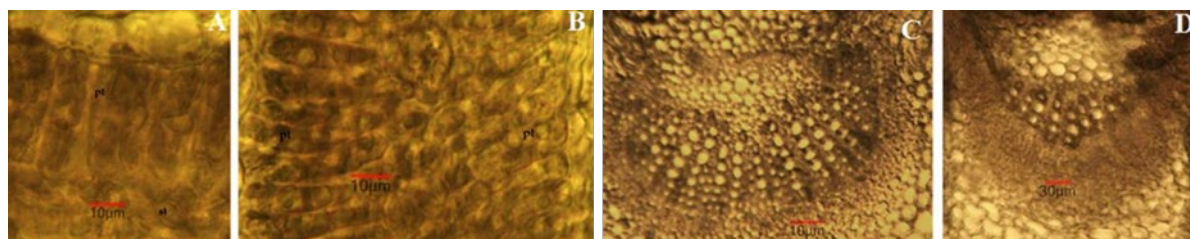
Фигура 4. Типове трихоми при *Marrubium friwaldskyanum*. А – едноклетъчни линейни покривни трихоми; В – многоклетъчна разклонена покривна трихома; С – жлезиста щитовидна трихома; D, E – жлезиста трихома с едноклетъчна дръжка; F – жлезиста трихома с двуклетъчна дръжка.

Установените при *Marrubium peregrinum* трихоми са представени на фигура 5.



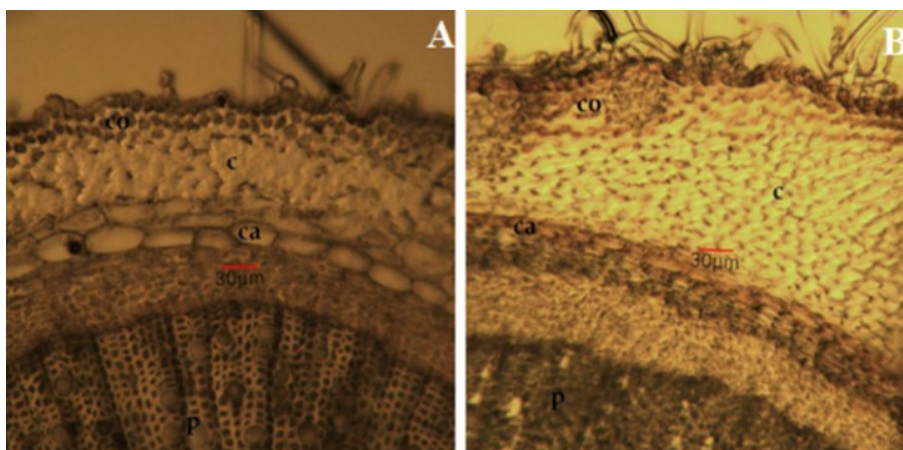
Фигура 5. Типове трихоми при *Marrubium peregrinum*. А – многоклетъчни разклонени покривни трихоми; В – жлезиста щитовидна трихома; С – жлезиста трихома с едноклетъчна дръжка; D – жлезиста трихома с едноклетъчна дръжка и две излъчващи клетки.

Напречният пререз на листната пластинка при двата вида показва бифациална структура. При *Marrubium friwaldskyanum* се различават горен и долен епидермис с мезофил съставен от 1 ред палисадна тъкан към горната повърхност и гъбчести клетки към долната (фиг. 6А). При *Marrubium peregrinum* към двете повърхности се срещат стълбчести клетки (фиг. 6В). Централната жилка на листата и при двата вида е представена от затворени колатерални проводящи снопчета (фиг. 6С, D).



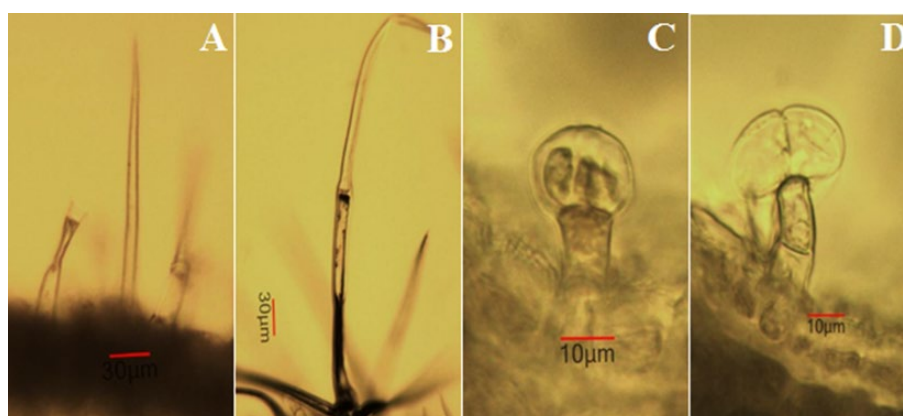
Фигура 6. Напречен пререз на листна пластинка. А – *Marrubium friwaldskyanum*; В – *Marrubium peregrinum*; С – колатерално снопче при *Marrubium friwaldskyanum*; D – колатерално снопче при *Marrubium peregrinum*. (pt – палисадна тъкан, st – гъбчеста тъкан).

При напречния пререз на стъблото ясно разграничими са кора и сърцевина. В кората присъстват главно паренхимни клетки, като в ъглите се наблюдават няколко слоя коленхим. Проводящите тъкани са с неснопчесто устройство (фиг. 7).



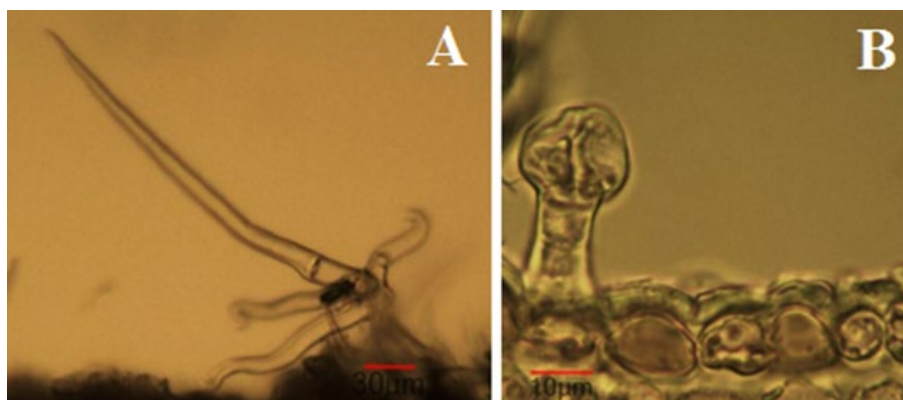
Фигура 7. Напречен пререз на стъбло. А – *Marrubium friwaldskyanum*; В – *Marrubium peregrinum*. (co – коленхим, с – кора, са – камбий, р - сърцевина).

По стъблената повърхност при *Marrubium friwaldskyanum* се срещат както едноклетъчни линейни така и многоклетъчни разклонени покривни трихоми (Фигура 8А,В). Жлезистите трихоми при този вид са два типа: с едноклетъчна дръжка и едноклетъчна излъчваща клетка и с двуклетъчна дръжка и две излъчващи клетки (фиг. 8 С, D).



Фигура 8. Типове трихоми при *Marrubium friwaldskyanum*. А – едноклетъчни линейни покривни трихоми; В – многоклетъчни разклонени покривни трихоми; С – жлезиста трихома с едноклетъчна дръжка и една излъчваща клетка; D – жлезиста трихома с двуклетъчна дръжка и две излъчващи клетки.

При *Marrubium peregrinum* покривните трихоми са многоклетъчни разклонени, а жлезистите трихоми са съставени от двуклетъчна дръжка и две излъчващи клетки (фиг. 9).

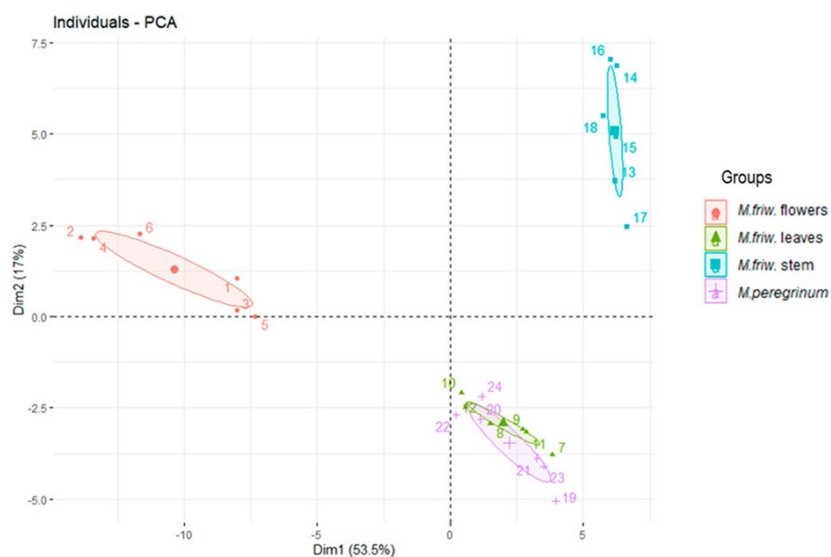


Фигура 9. Типове трихоми при *Marrubium peregrinum*. А – многоклетъчна покривна трихома; В – жлезиста трихома с двуклетъчна дръжка и две излъчващи клетки.

GC-MS анализ на първични метаболити

Идентифицирани бяха общо 80 метаболомни маркера (пикове), класифицирани като аминокиселини, органични киселини, захари и захарни алкохоли.

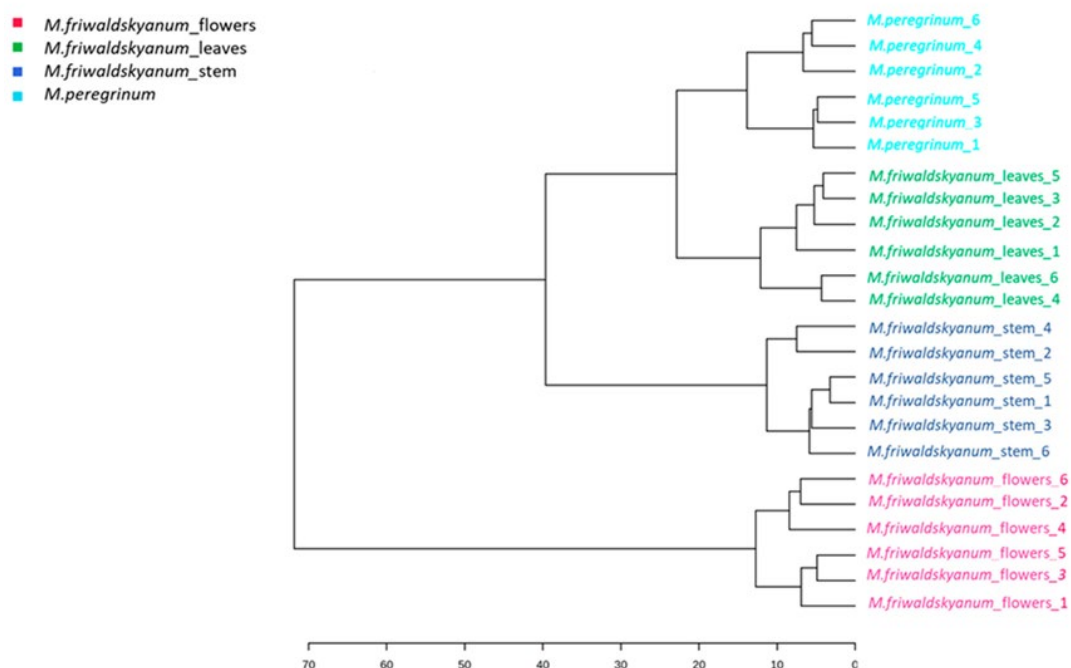
Анализът на главните компоненти (фиг. 10) обяснява приблизително 70.5% от вариацията в пробите, като първият главен компонент (PC1) обяснява 53.5% от вариацията, а вторият главен компонент (PC2) – 17% от нея.



Фигура 10. PCA резултати въз основа на GC-MS анализ, използвайки алгоритъма за клъстър на Ward. Четирите проби са представени, както следва: цветовете на *Marrubium friwaldskyanum* — червени кръгове, листа на *Marrubium friwaldskyanum* — зелени триъгълници, стъбло на *Marrubium friwaldskyanum* — синьо-зелени квадрати и *Marrubium peregrinum* — лилави кръстове.

Ясно се разграничават четирите групи проби разделени в три отделни клъстери: цветовете на *M. friwaldskyanum*, стъбло на *M. friwaldskyanum* и листа на *M. friwaldskyanum* и *M. peregrinum*. Това показва, че съставът на първичните метаболити на листата на *M. friwaldskyanum* не се различава значително от тези на *M. peregrinum*.

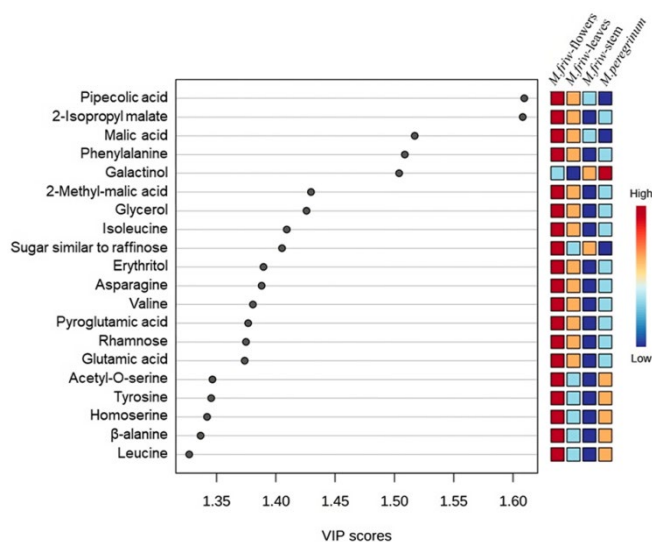
Йерархичният клъстерен анализ (Hierarchical Clustering Analysis – HCA) (фиг. 11) показва подобно групиране, тъй като разпознава листата на *M. peregrinum* и *M. friwaldskyanum* като по-сходни от листата и стъблата за съответните видове.



Фигура 11. Йерархичен клъстерен анализ (HCA), базиран на CG-MS анализ, използвайки алгоритъма за групиране на Ward.

Анализите за VIP (важност на променливата в проекцията) бяха проведени за първите 20 метаболита, за да се разграничат най-важните маркери измежду всички групи проби (фиг. 12).

Уникалното съединение от избраните топ 20 съединения, което се отличава по отношение на своите дискретни нива, е захарният алкохол галактинол, много често свързан със защитата на растителните клетки от окислително увреждане и представен в най-високи концентрации в пробите от *M. peregrinum* (фиг. 12). Първите 20 метаболита за всяка от групите проби (Фигура 13A–D) са специално обозначени.



Фигура 12. VIP резултати показват възможните маркери измежду четирите групи проби.

Резултатите показват, че цветовете на *M. friwaldskyanum* са ясно разграничени от останалите проби главно поради високото натрупване на аминокиселини. Левцин, β -аланин, хомосерин, тирозин, ацетил-О-серин, валин, аспарагин, изолеуцин и фенилаланин са сред аминокиселините, силно представени в цветовете на *M. friwaldskyanum* и допринасят като важни променливи в сравнение с останалите проби.

Беше установено наличието на ябълчена киселина и нейните производни, в качеството им на членове на класа на органичните киселини, както и на някои захари и захарни алкохоли като рамноза, рафиноза-подобна захар, галактинол и еритритол, но главното разграничение бе въз основата на аминокиселинния състав.

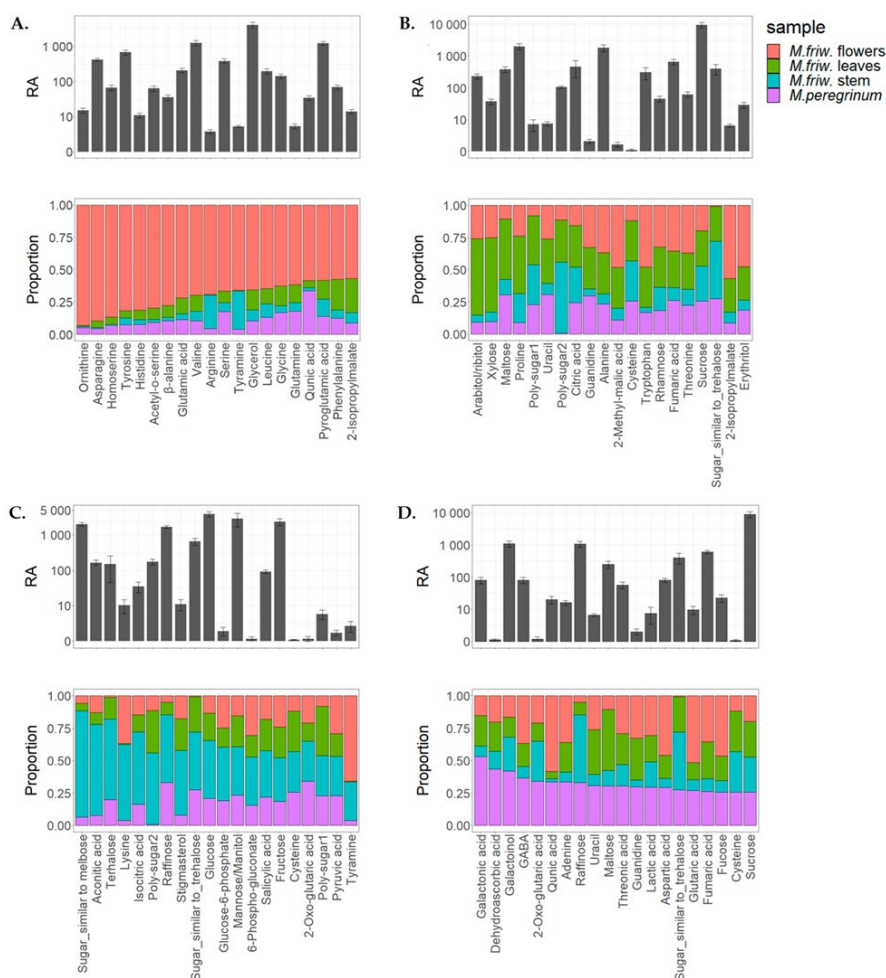
В допълнение високи нива на орнитин, хомосерин, тирозин, аргинин, глутамин, пироглутаминова киселина, глицин, глицерол и изопропил малат бяха открити в цветовете на *M. friwaldskyanum* (фиг. 13А).

В сравнение с цветовете, където несходството в рамките на групите се дължи главно на съдържанието на аминокиселини (почти 80% от силно застъпените маркери са аминокиселини), разпределението на най-първите 20 метаболита от листата включва различия от приблизително 45% в захарите и захарните алкохоли и почти същия процент смеси от аминокиселини и органични киселини (фиг. 13В).

За стъблата на *Marrubium friwaldskyanum* вариацията в захарите показва тенденция на леко повишение в сравнение с листата и достига 50%, но съдържанието на аминокиселини е силно понижено, което обуславя по-голямата застъпеност на органичните киселини (фиг. 13С).

Marrubium peregrinum образува клъстер с проби от листата на *M. friwaldskyanum* и въз основа на 20-те най-важни метаболита, открити в *M. peregrinum*, можем да потвърдим наличието на сходна пропорция на

вариации на органични киселини и съдържание на захари като това, установено за листата на *M. friwaldskyanum*.

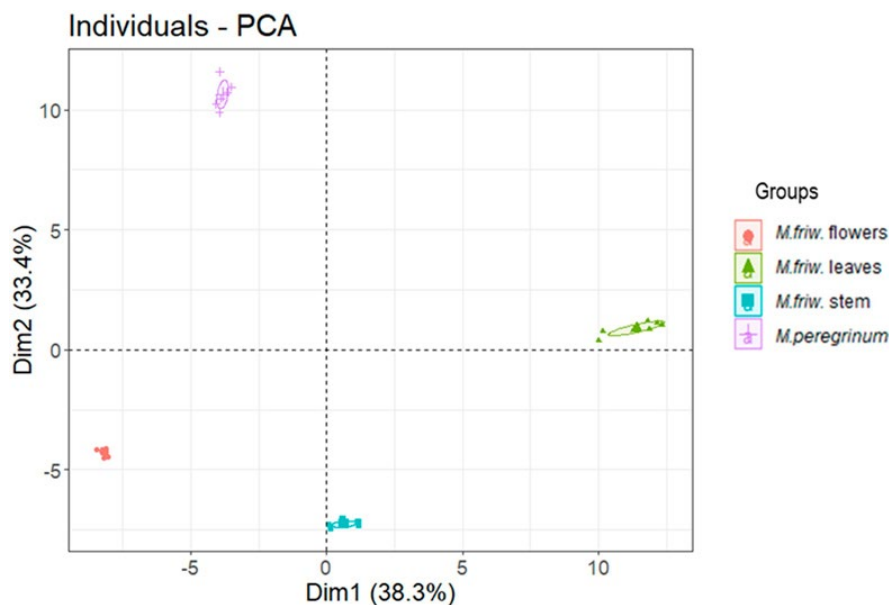


Фигура 13. Тъканното разпределение на първите 20 основни метаболита в цветове на *Marrubium friwaldskyanum* - A; B - листа; C - стъбло; и D - *Marrubium peregrinum*. Четирите проби са представени както следва: цветове на *Marrubium friwaldskyanum* – червен цвят, листа на *Marrubium friwaldskyanum* – зелен цвят, стъбла на *Marrubium friwaldskyanum* – синьо-зелено и *Marrubium peregrinum* – лилав цвят. Горната част на фигурата представя променливото количество (RA) на първите 20 първични метаболита в съответните проби, а долната част показва тяхното съотношение и разпределение.

UPLC-MS/MS анализ на вторични метаболити

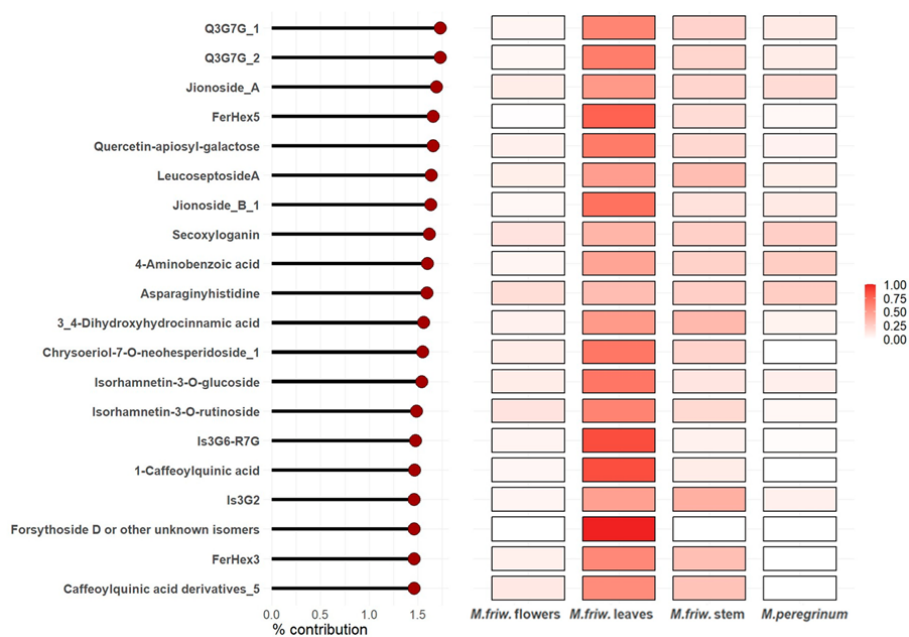
Беше оценен общ набор, състоящ се от близо 400 метаболита, включително различни класове съединения. От тези 400, ние аотирахме предполагаемо 320 съединения, 80 от тях бяха означени като неизвестни.

РСА анализът ясно идентифицира четири различни класа проби, което показва техния уникален биохимичен състав (фиг. 14).

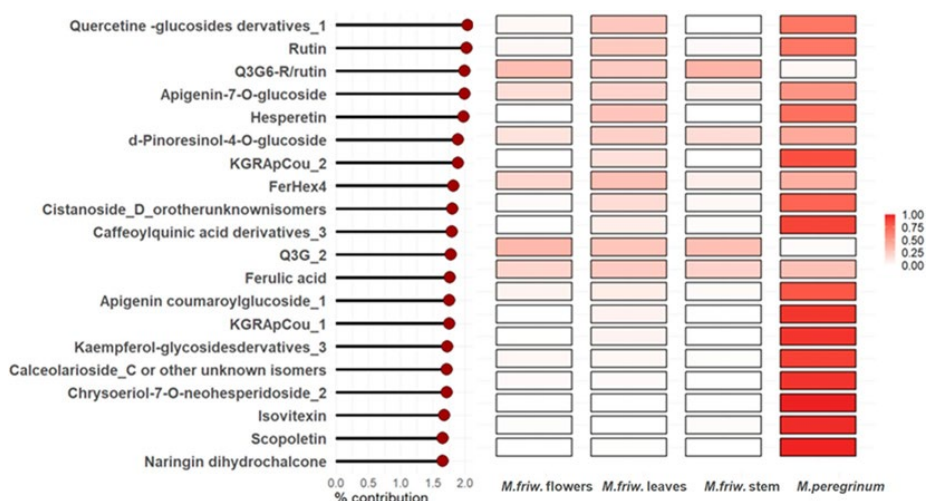


Фигура 14. Диаграми на PCA резултати на базата на UPLC-MS/MS анализ: цветовете на *Marrubium friwaldskyanum* - червени кръгове, листа на *Marrubium friwaldskyanum* - зелени триъгълници, стъбла на *Marrubium friwaldskyanum* - синьо-зелени квадрати и *Marrubium peregrinum* - лилави кръстовете.

Интересното е, че докато по основния си метаболитен състав листата на *M. friwaldskyanum* и *M. peregrinum* са идентични и групирани заедно, по отношение на техния вторичен метаболит, те се различават много и това лесно се вижда на фигури 15 и 16, където са показани първите 20 метаболита с най-голям принос към PC1 и PC2. Разликата между пробите се дължи главно на флавоноидните производни.



Фигура 15. Топ 20 метаболита с най-голям принос към PC1.

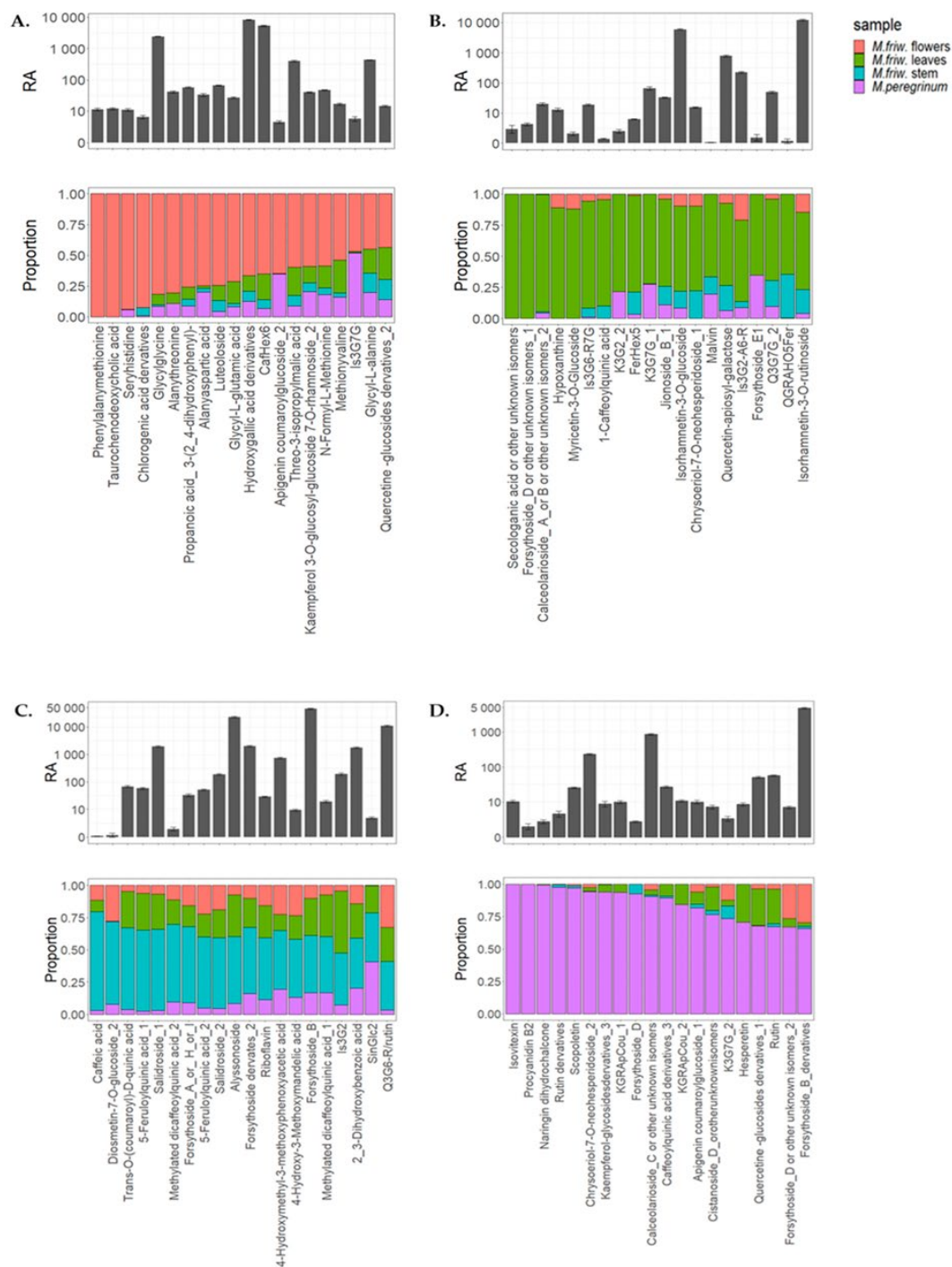


Фигура 16. Топ 20 метаболита с най-голям принос към PC2. Използвани съкращения за съединенията: Q3G7G-кверцетин-3-O-(2"-O-апиозил-6-O"-рамнозил)глюкозидаза; Fer Нех-ферулоил-хексозид; Is3G6R7G-изорамнетин-3-O-(6"-O-рамнозил)глюкозид; Is3G2-изорамнетин-3-O-(2"-O-апиозил)глюкозид; KGRApCou-кемпферол-3-O-Glc-2"-O-Api-6"-O-Rha pCou-7-O-G.

Успоредно с PCA анализа беше изготвен анализ на тъканно-специфичното разпределение на метаболитите (фиг. 17).

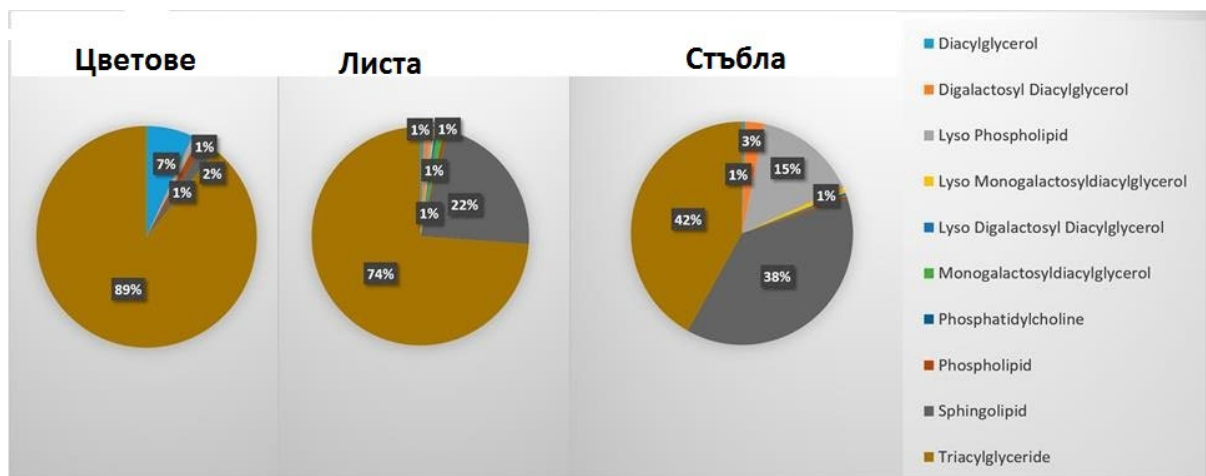
Резултатите ясно подчертават разликите между комплексните биохимични мрежи, възникващи в растителните клетки на тъканно ниво, които могат да бъдат свързани с тъканно-специфичния синтез на определени вторични метаболити.

Метаболитното профилиране е способно да генерира полезни набори от данни, покриващи широк спектър от различни класове съединения и в същото време да определи биохимични маркери за редица биологични процеси. В случая с пробите от *Marrubium* трябва да се обърне внимание и на съединенията с по-широка застъпеност.



Фигура 17. Тъканно-специфично разпределение на вторичните метаболити в *M. friwaldskyanum*: А-цветове; В-листа; С-стъбло; D-*M. peregrinum*. Четирите проби са представени както следва: цветове на *M. friwaldskyanum*—червен цвят, листа на *M. friwaldskyanum*—зелен цвят, стъбла на *M. friwaldskyanum*—синьо-зелен цвят и *M. peregrinum*—лилав цвят. Горната част на фигурата представя относителното изобилие (RA) на първите 20 вторични метаболита в съответните проби, а долната част показва тяхното разпределение в четирите типа проби, където 1 е сумата от сигналите от четирите проби.

Химическото профилиране на неполярната фракция разкри липидния състав и на двата вида. Идентифицирани са 175 липидни съединения, класифицирани в 10 липидни класа. Резултатите ясно показват, че основните липидни дялове принадлежат само на два типа липиди: триацилглицероли (TAGs) и сфинголипиди (SPs). Цветовете на *M. friwaldskyanum* съдържат почти 90% TAGs, следвани от листата, в които съотношението на TAGs:SPs е 74:22%. В стъблото на *M. friwaldskyanum*, двата класа са представени почти в равни дялове и един допълнителен малък дял от 15%, представляващ лизофосфолипиди (LPL). Останалите липидни видове представляват малка част в диапазона 1–7% (фиг. 18).



Фигура 18. Липидно съдържание в тъканни проби от *Marrubium friwaldskyanum*.

Много сходни резултати бяха наблюдавани в пробите от *M. peregrinum*, където TAGs:SPs съотношението бе същото като това в листа на *M. friwaldskyanum* leaves-66:26% (фиг. 19).



Фигура 19. Липидно съдържание в *Marrubium peregrinum*. Името на групата „други“ включва следните липидни класове, представени по-малко от 1%: Диацилглицероли, Лизомоногалактозилдиацилглицероли, Лизодигалактозилдиацилглицероли, Фосфатидилхолин.

Съдържание на минерали

Пробите от изсушени растения бяха първоначално изследвани за наличието на 19 елемента. Средните стойности за три повторения за три независимо подготвени проби са дадени в таблица 1.

Видно от таблица 1, Ca, K и Mg са основните минерални компоненти в анализирани проби, като концентрациите нарастват по следния начин Ca < Mg < K. Концентрациите от основните микроелементи могат да бъдат подредени както следва: Cu < Mn < Fe < Zn. Средното съдържание на Zn в цветовете на *M. friwaldskyanum* достига 581.3 ± 2.4 mg/kg, което е над средното съдържание на Zn за растителна тъкан (Kumar *et al.*, 2016).

Таблица 1. Концентрации (в mg/kg) на елементи в анализирани проби от *Marrubium*. Средни стойности (n = 3) с относително стандартно отклонение (RSD) в скоби.

	Ca	K	Mg	Na	B	Al
<i>Marrubium friwaldskyanum</i> flowers	187.7 (1.8)	9974.6 (1.9)	1726.3 (1.1)	12.4 (3.4)	3.9 (1.2)	12.6 (0.3)
<i>Marrubium friwaldskyanum</i> leaves	304.1 (1.2)	8212.9 (0.8)	2576.7 (0.8)	8.9 (1.1)	3.1 (0.6)	27.4 (0.1)
<i>Marrubium friwaldskyanum</i> stems	98.1 (1.0)	8945.9 (0.6)	824.3 (0.9)	6.9 (2.3)	4.1 (2.5)	4.7 (0.8)
<i>Marrubium peregrinum</i>	247.6 (1.5)	8787.8 (1.2)	1548.6 (2.1)	14.1 (2.4)	7.5 (3.7)	29.0 (1.0)
	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr	Ba
<i>Marrubium friwaldskyanum</i> flowers	16.3 (0.8)	32.1 (0.7)	4.4 (2.2)	581.3 (2.4)	9.0 (1.8)	11.1 (0.7)
<i>Marrubium friwaldskyanum</i> leaves	26.3 (2.4)	73.9 (1.8)	2.7 (0.8)	559.8 (1.0)	9.4 (1.8)	10.4 (0.5)
<i>Marrubium friwaldskyanum</i> stems	9.1 (2.7)	9.4 (0.3)	2.3 (1.5)	472.9 (1.5)	7.8 (3.8)	14.3 (2.5)
<i>Marrubium peregrinum</i>	9.7 (1.5)	57.3 (1.8)	2.0 (1.7)	475.7 (3.7)	3.6 (3.4)	2.2 (1.1)

Други такива изследвания (Rezgui *et al.*, 2021) показват, че видовете от род *Marrubium* имат способността да натрупват Zn, Fe, Cu, Cd, Pb и Bi. Съдържанието на тежки метали в анализирани проби показва, че Fe присъства в най-високо количество (73.9 mg/kg) в листните проби от *M. friwaldskyanum*. Cu се натрупва главно в цветните тъкани на растенията *M. friwaldskyanum* (4.4 mg/kg), като малки количества се натрупва в листата и стъблата. Всички те бяха в рамките на разрешените граници съгласно регулаторните стандарти на ФАО/СЗО [ФАО/СЗО], които прави растенията безопасни за по-сетнешна преработка и употреба.

Цитотоксичност и антитуморен потенциал

Екстрактите от *Marrubium peregrinum* и *Marrubium friwaldskyanum* бяха анализирани чрез *in vitro* тестове, отчитащи ефект върху клетъчния

метаболизъм (основно митохондриална активност) и виталност (МТТ тест), както и лизозомална функционалност и клетъчна виталност (NR тест). Беше използван панел от четири клетъчни линии – три с карциномен произход (HeLa, A549, HT29) и една нормална фибробластна линия (HFFC).

Тези изследвания предоставят възможност да бъде дефиниран както общ цитотоксичен ефект на изследваните проби, така и антитуморен потенциал спрямо различни типове ракови клетки. Получените резултати показваха цитотоксични ефекти, зависещи от времето за третиране и приложената концентрация на тест-проба. Най-висока чувствителност към всички тествани проби проявиха HeLa и HT29 клетките, която бе ясно отчетлива след по-продължителен период на третиране – 72 часа. За този тест-период бяха изчислени IC₅₀ стойности (посочени в таблица 2), използвайки данните от проведените NR тестове.

По отношение на HeLa клетките най-силен токсичен ефект прояви пробата от цвят на *M. frivaldskyanum*, докато HT29 клетките показваха по-висока чувствителност, което се доказва от по-ниските IC₅₀ стойности. Заедно с това, всички четири тест-проби от *Marrubium* предизвикаха значителен инхибиращ ефект спрямо HT29 линията след третиране за 72 часа. Тези резултати (таблица 2) показват, че антитуморният ефект на екстрактите от *M. peregrinum* и *M. frivaldskyanum* е специфичен спрямо карциномни клетки, изолирани от маточна шийка и дебело черво.

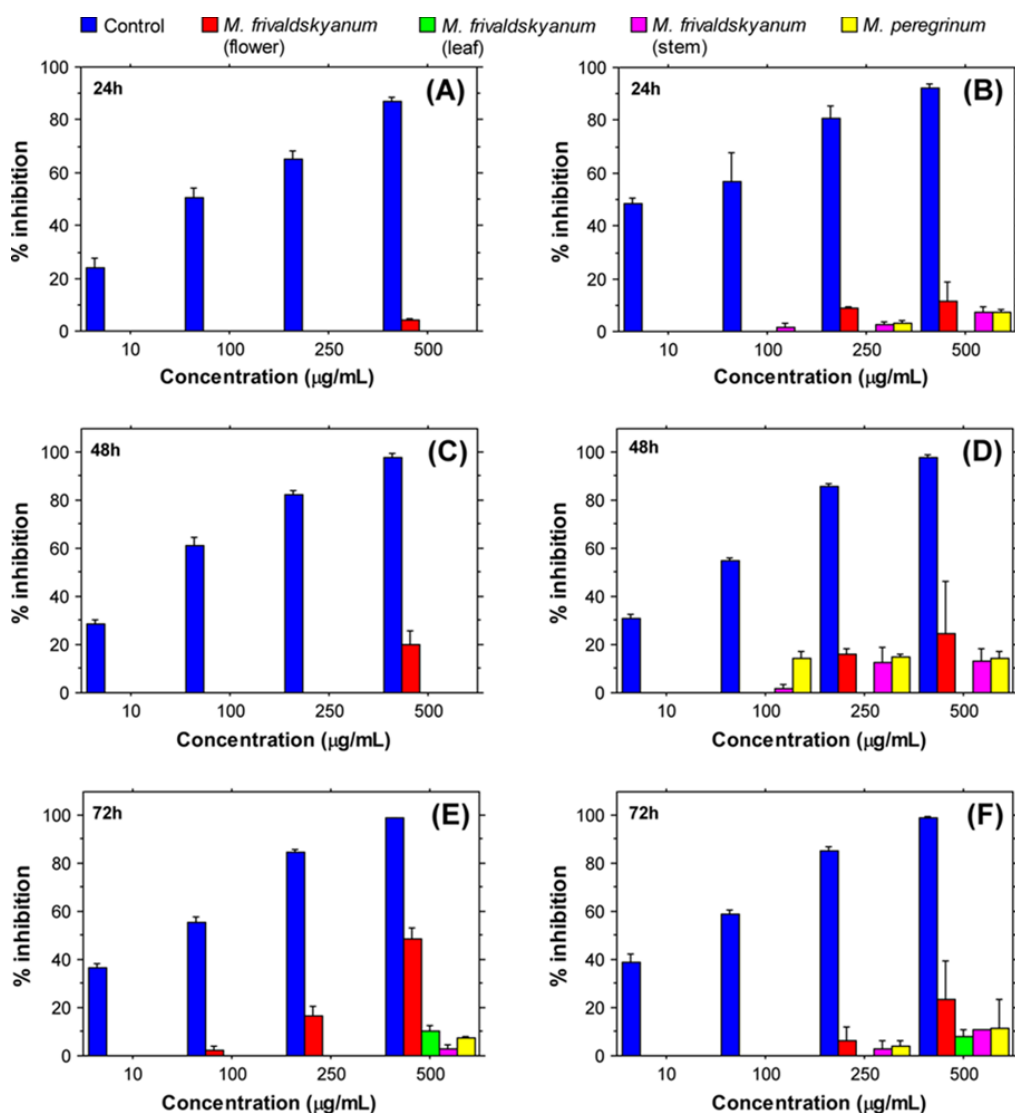
Таблица 2. Средни IC₅₀ стойности, определени чрез NR тест след 72-часово третиране с екстракти от *Marrubium*.

Екстракт	IC ₅₀ (µg/mL)			
	A549	HeLa	HT29	HFFC
<i>Marrubium peregrinum</i>	-	-	221.1	-
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (цвят)	-	390.1	272.7	-
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (стъбло)	-	-	303.4	-
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (лист)	-	-	202.2	-
Митомицин С	58.4	15.6	90.5	< 10

При всички изследвани клетъчни линии по-силен токсичен ефект на пробите от *Marrubium* бе отчетен чрез Неутрал ред тест, което свидетелства за механизъм на действие, специфичен спрямо клетъчните лизозоми (фиг. 20-23).

Клетъчна линия A549, получена от карцином на белия дроб, не показва висока чувствителност спрямо четирите тествани екстракти дори и след по-продължително третиране (фиг. 20). Най-високо ниво на инхибиране бе отчетено за пробата от цвят на *Marrubium frivaldskyanum*, което обаче не надхвърляше 50%. Слаб токсичен ефект (между 5 и 20 %

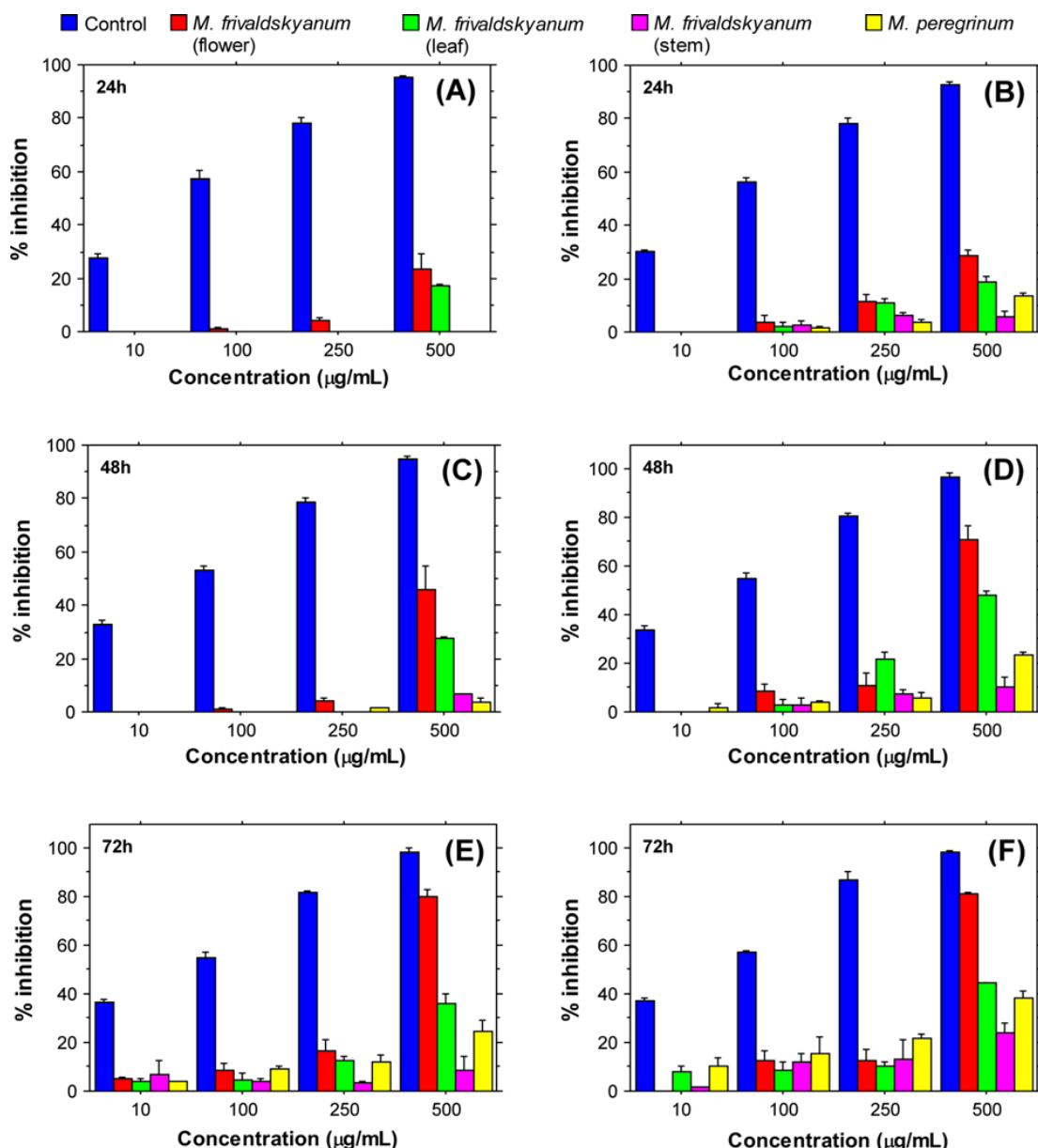
инхибиране) бе отчетен и за останалите проби след 48- (при NR тест) и 72- часово третиране.



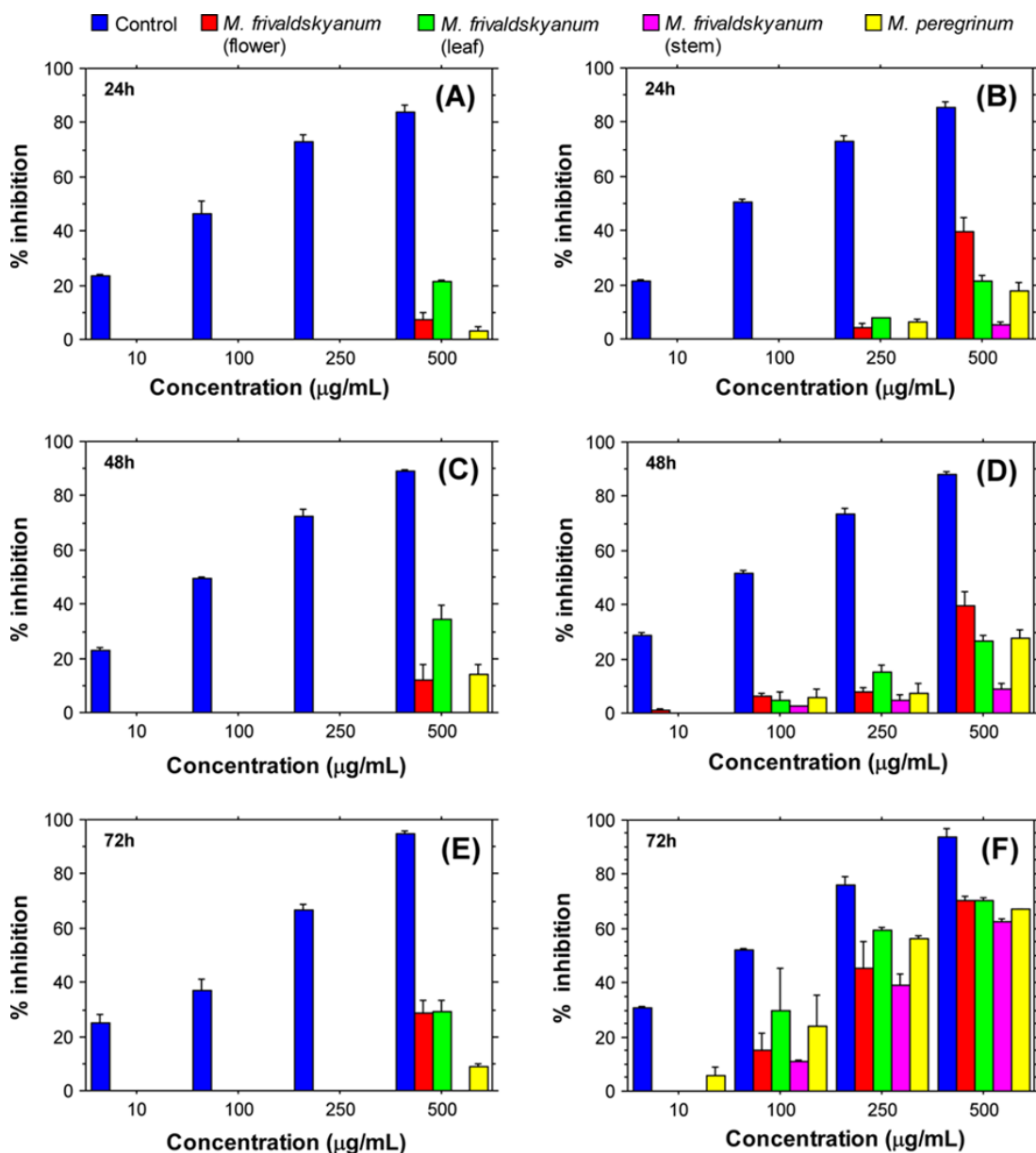
Фигура 20. Цитотоксичност на *Marrubium* спрямо A549 клетки. Графики А, С, Е представят процент инхибиране на метаболитната активност, отчетени чрез МТТ тестове. В, D, F – ефекти на тест-пробите върху клетъчната виталност и лизозомна активност, определени чрез NR тестове. Резултатите са представени като \pm standard error of the mean (\pm SEM) и сравнени с ефекта на контролата за цитотоксичен ефект (митомицин С).

Получените резултати за HeLa клетъчната линия показват, че екстрактът от цвят на *Marrubium frivaldskyanum* има най-силен цитотоксичен ефект, тъй като предизвиква повече от 50% инхибиране на развитието на културите от HeLa клетки при концентрация около 500 µg/mL още на 48-часовия период на третиране, докато при HT29 линията

високо ниво на инхибиране бе отчетено на по-късен етап – 72 часа третиране с екстрактите (фиг. 22). НТ29 клетките реагираха спрямо всички тест-проби от *Marrubium* след 48-часово третиране като този ефект значително нарастна след 72 часа. Най-висок процент инхибиране бе отчетен след третиране с проби от цвят и лист на *M. frivaldskyanum*. Подобна тенденция бе налице при HeLa клетките, както и HFFC фибробласти (изразено със значително по-нисък процент ихибирание в сравнение с раковите клетъчни линии).



Фигура 21. Цитотоксичност на изолати от *Marrubium*, анализирана при HeLa клетки. А, С, Е представят данни от МТТ тестове. В, D, F – ефекти на тест-пробите, отчетени на база усвояване на NR. Резултатите са представени като \pm SEM и сравнени с ефекта на контролата за цитотоксичен ефект (митомицин С).



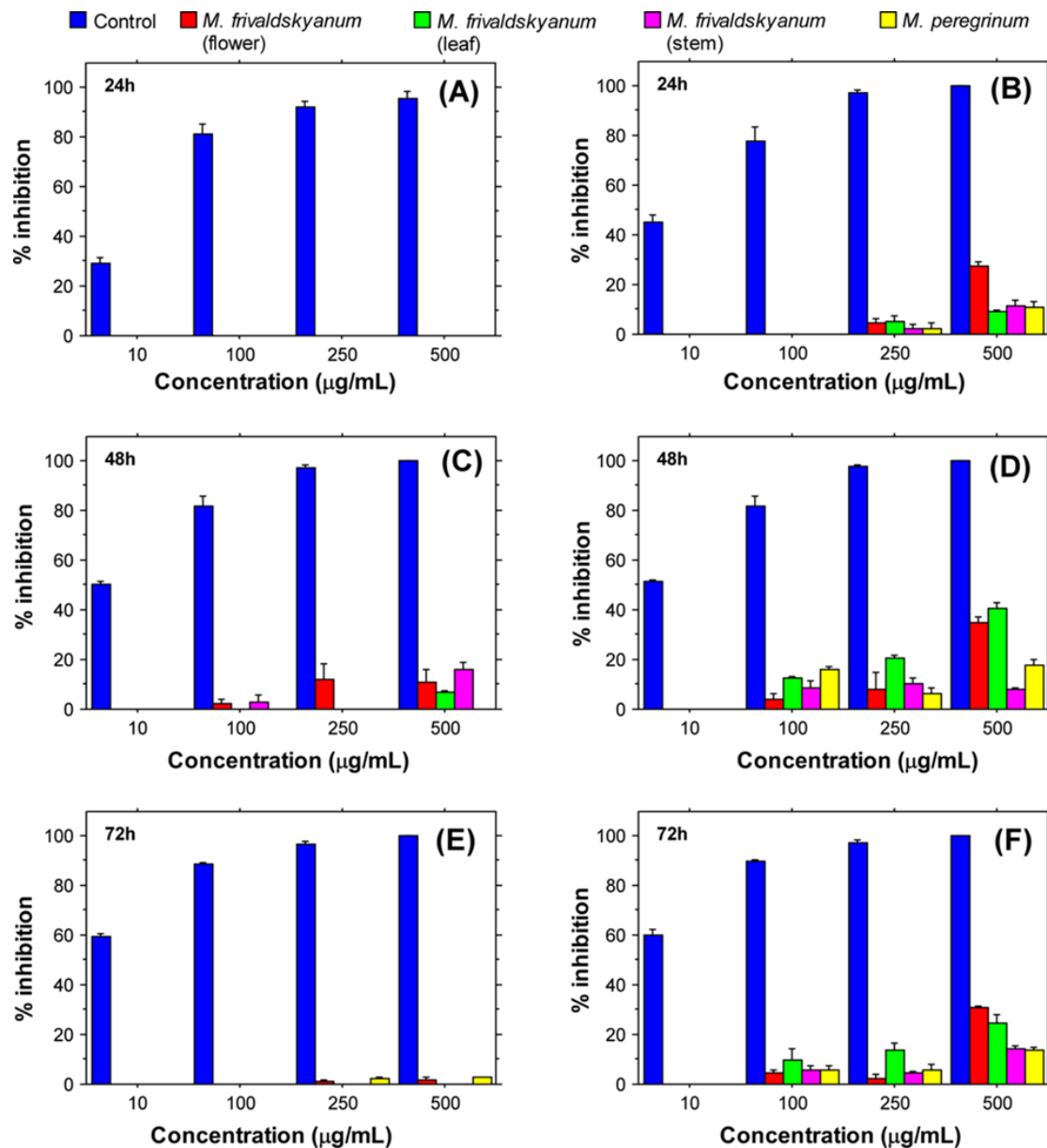
Фигура 22. Цитотоксичност на изолати от *Marrubium*, анализирана при HT29 клетки. А, С, Е представят процент инхибиране, определен чрез МТТ тестове. В, D, F – резултати от NR тестове. Резултатите са представени като \pm SEM и сравнени с ефекта на контролата за цитотоксичен ефект (митомицин С).

Високият цитотоксичен ефект на пробите от *Marrubium* спрямо HeLa и HT29 клетъчните линии е показател за антитуморна активност, тъй като при нормалните клетки (HFFC, фиг. 23) бе отчетен съществено по-слаб цитотоксичен ефект на тестваните екстракти.

При HFFC клетъчната линия ясно изразен токсичен ефект бе индуциран единствено от екстракта от цвят на *Marrubium frivaldskyanum*.

Заедно с това обаче, данните за HFFC фибробластите показват максимално ниво на инхибиращ ефект на 48 час след третиране с тест-пробите, което е последвано от редуция на 72 час, свидетелстващо за

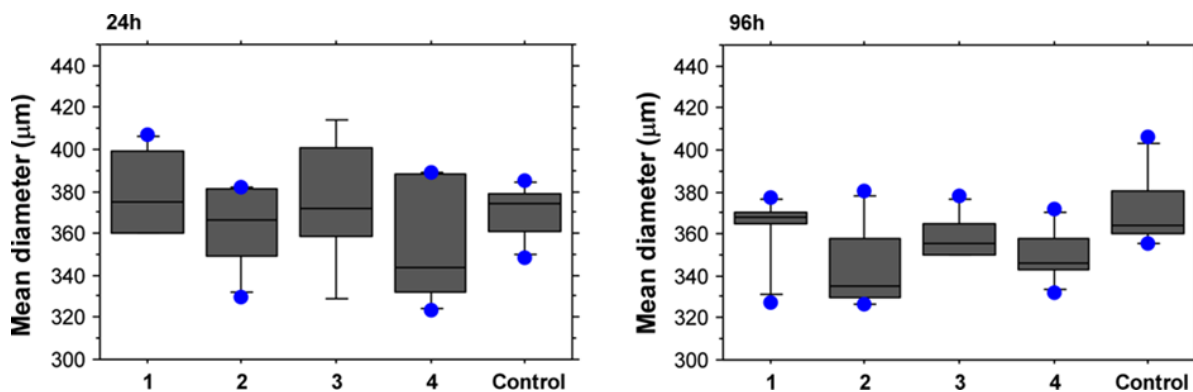
възможност за възстановяване/преодоляване на токсичното действие при неракови клетки. Подобен отговор не е налице при туморните клетъчни линии, за които най-високо ниво на инхибиране бе отчетено на 72 час.



Фигура 23. Влияние на екстракти от *Marrubium* върху виталността и метаболитната активност на HFFC фибробласти. А, С, Е представят процент инхибиране на метаболитната активност, отчетени чрез МТТ тестове. В, D, F – ефекти на тест-пробите върху клетъчната виталност и лизозомна активност, определени чрез NR тестове. Резултатите са представени като \pm SEM и сравнени с ефекта на контролата за цитотоксичен ефект (митомицин С).

Потенциалният антитуморен ефект на пробите от *Marrubium* бе анализиран също с туморни сфероиди, формирани от HT29 клетки. Те представляват подобрен *in vitro* модел за анализ на антитуморна активност,

тъй като дават възможност за оценка на антитуморен ефект на ниво 3D многоклетъчна структура от ракови клетки. При тези изследвания беше отчетена редукция на средния диаметър на сфероидите, третирани с проба от цвят или лист на *M. frivaldskyanum* както след 24 часа, така и след 96-часово третиране. При по-продължително третиране (96 часа) тези ефекти бяха по-силно изразени (фиг. 24).



Фигура 24. Сравнение на размерите на сфероиди от HT29 клетки, третирани с 200µg/mL изолати от *Marrubium* за 24 часа (лява графика) и 96 часа (дясна графика). 1- *M. peregrinum*, 2- *M. frivaldskyanum* (цвят), 3- *M. peregrinum* и *M. frivaldskyanum* (стъбло), 4- *M. frivaldskyanum* (лист), Control – нетретирани сфероиди, култивирани при стандартни условия.

Получените резултати потвърждават установената антитуморна активност на пробите от цвят и лист на *Marrubium frivaldskyanum* и показват потенциала им за инхибиране развитието на многоклетъчен агрегат от ракови клетки.

Антибактериална активност

Проведените тестове за антибактериална активност отличиха пробите от *M. peregrinum* и цвят на *M. frivaldskyanum* (таблица 3 и 4), които показаха инхибиращ ефект върху развитието както на Грам-положителни (*Bacillus cereus*), така и на Грам-отрицателни (*Escherichia coli*) бактерии. Заедно с това, за екстрактът от лист на *M. frivaldskyanum* бе отчетена антибактериална активност, но само спрямо *B. cereus*.

Резултатите представят среден размер на зоната на инхибиране (\pm стандартна грешка).

Таблица 3. Антибактериална активност на изолатите от *Marrubium peregrinum* и *Marrubium frivaldskyanum*.

Тест-проби	Зона на инхибране /диаметър (mm)	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Marrubium peregrinum</i>	7.67 (± 0.33)	7.9 (± 0.33)
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (цвят)	8.25 (±0.45)	8.67 (±0.5)
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (стъбло)	-	-
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (лист)	7.8 (± 0.45)	-
Контрола (пеницилин+стрептомицин)	23.8 (± 0.6)	25.5 (± 0.7)

Таблица 4. Минимални инхибираща и бактерицидна концентрации на пробите от *Marrubium peregrinum* и *Marrubium frivaldskyanum*, определени спрямо *Bacillus cereus* и *Escherichia coli*.

Тест-проби	Минимална инхибираща концентрация (µg/mL)		Минимална бактерицидна концентрация (µg/mL)	
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Marrubium peregrinum</i>	500	1000	1000	>1000
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (цвят)	1000	1000	>1000	>1000
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (стъбло)	1000	>1000	>1000	>1000
<i>Marrubium frivaldskyanum</i> (лист)	500	1000	>1000	>1000
Контрола (цефтрианксон)	7.5	7.5	30	15-30

Минимална инхибираща концентрация бе дефинирана за *Marrubium peregrinum*, цвят и лист на *Marrubium frivaldskyanum* спрямо двата тествани бактериални вида, както и стъбло на *M. frivaldskyanum* спрямо *B. cereus*. Минимална бактерицидна концентрация бе определена само за пробата от *M. peregrinum* спрямо *B. cereus*. За останалите екстракти МБК надвишава 1 mg/mL.

Получените резултати показват, че екстрактите от *M. peregrinum* и цвят на *M. frivaldskyanum* проявяват инхибиращ ефект както спрямо Грам-отрицателни, така и спрямо Грам-положителни бактерии, докато пробата от лист на *M. frivaldskyanum* има селективна активност срещу Грам-положителни бактерии (*B. cereus*).

Резултати получени при изследванията на *Centaurea thracica*

Химичен състав на плодовете

Съдържанието на основните компоненти в състава на неузрели и узрели плодове от *Centaurea thracica* са представени в таблица 5.

Узрелите плодове на *C. thracica* са с по-високо съдържание на въглехидрати и с по-ниско на протеини и на глицеридно масло, което обуславя нарастването на енергийната стойност в сравнение с неузрелите плодове (от 342 kcal/100g (1445 kJ/100g) до 354 kcal/100g (1503 kJ/100g)).

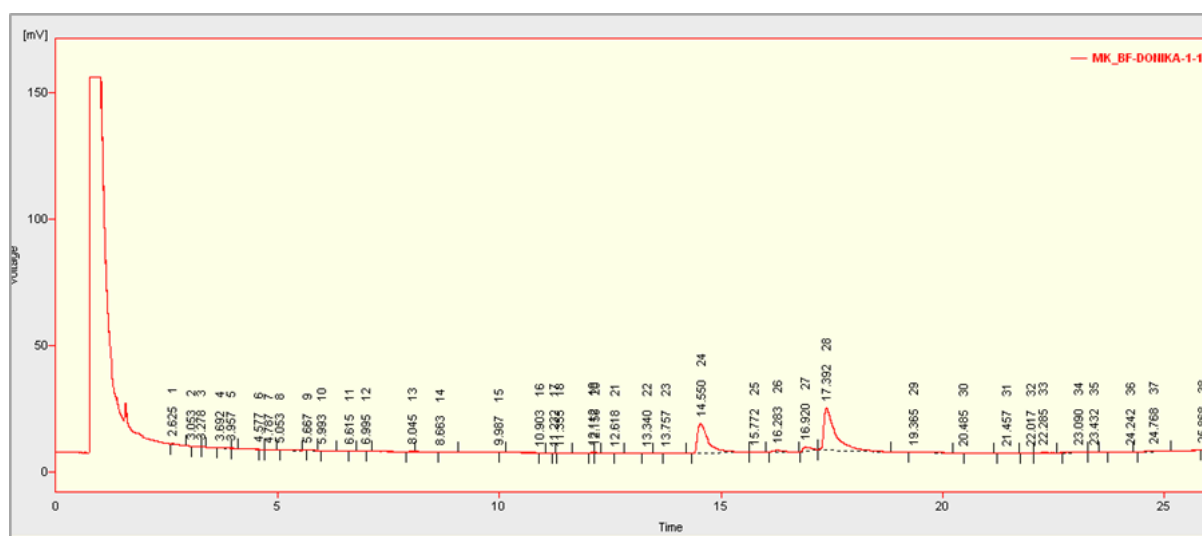
Таблица 5. Промени в общия химичен състав на плодове от *Centaurea thracica*.

Показатели	неузрял плод	узрял плод
Протеини, %	8.7 ± 0.1	7.4 ± 0.2
Масленост, %	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Въглехидрати	72.3	77.2
» фибри, %	28.7 ± 0.4	35.8 ± 0.3
Пепел, %	4.5 ± 0.1	4.2 ± 0.1
Влага, %	12.5 ± 0.1	9.5 ± 0.1
Енергийна стойност, kJ/100g (kcal/100g)	1445 (342)	1503 (354)

Липиден състав на маслото, изолирано от плодовете и семената

Изследван е липидния състав на глицеридно масло, изолирано от плодове и семена от *C. thracica*, т. е. мастнокиселинен състав на глицеридното масло, съдържание на токофероли, съдържание и състав на фосфолипидната фракция.

На фигура 25 е показана хроматограма на метилови естери на мастните киселини на глицеридното масло от семена на *C. thracica*.



Фигура 25. Хроматограма на метилови естери на мастни киселини от масло на семена от *Centaurea thracica*.

В таблица 6 е представен мастнокиселинния състав на глицеридно масло, изолирано от плодовете и семената на *C. thracica*.

Таблица 6. Мастнокиселинен състав на масла, изолирани от *Centaurea thracica*.

Мастни киселини, %		от незрели плодове	от узрели плодове	от семена
C 4:0	маслена	3.4 ± 0.2	*	-
C 6:0	капронова	3.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2	-
C 8:0	каприлова	-	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.02
C 10:0	капринова	-	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.0
C 12:0	лауринова	2.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
C 14:0	миристинова	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.15	0.2 ± 0.05
C 14:1	миристолеинова	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.1 ± 0.0
C 15:0	пентадеканова	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.05
C 15:1	пентадеценива	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	-
C 16:0	палмитинова	32.6 ± 0.5	21.6 ± 0.6	36.2 ± 0.2
C 16:1	палмитолеинова	3.8 ± 0.1	11.7 ± 0.2	-
C 17:0	маргаринова	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.06	0.3 ± 0.05
C 17:1	хептадеценива	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0
C 18:0	стеаринова	4.9 ± 0.3	4.5 ± 0.2	3.7 ± 0.4
C 18:1	олеинова	13.7 ± 0.5	30.9 ± 0.7	53.0 ± 0.5
C 18:2 (ω-6)	линолова	13.8 ± 0.4	20.3 ± 0.3	1.4 ± 0.2
C 18:3 (ω-3)	линоленова	3.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1
C 20:0	арахинова	3.5 ± 0.5	0.2 ± 0.05	-
C 20:1	гадолеинова	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	-
C 20:2 (ω-6)	ейкозадиенова	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.05	0.4 ± 0.1
C 22:0	бехенова	2.9 ± 0.3	1.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
C 22:1	докозенова	0.3 ± 0.1	-	-
C 22:2 (ω-6)	докозадиенова	-	-	0.7 ± 0.1
C 20:5 (ω-3)	ейкозапентаенова	-	-	0.1 ± 0.0
C 23:0	трикозанова	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	-
C 24:0	лигноцеринова	2.8 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.2 ± 0.1
C 24:1	нервонова	-	-	0.2 ± 0.05
C 22:6 (ω-3)	докозахексаенова	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.2
Наситени МК		61.5	34.6	41.7
Ненаситени МК		38.5	65.4	58.3
Мононенаситени МК		20.0	44.1	53.6
Полиненаситени МК		18.5	21.3	4.7
Σ ω-6		14.3	20.5	2.5

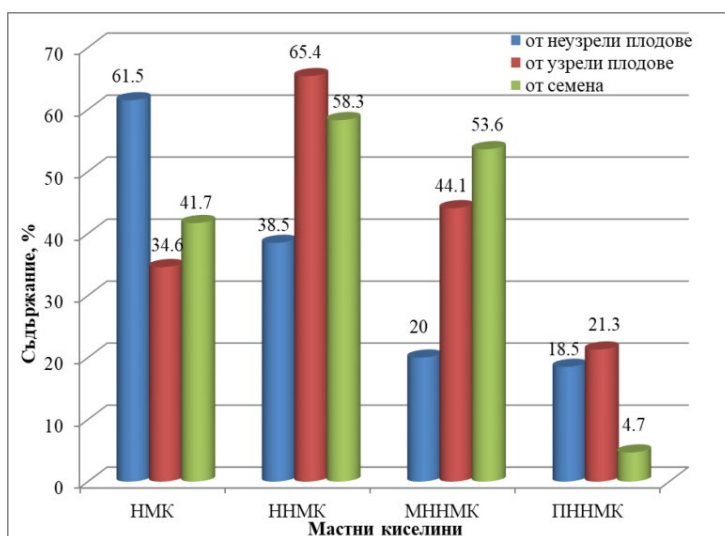
$\Sigma \omega-3$	4.2	0.8	2.2
Съотношение $\omega-6/\omega-3$	3.4	26.6	1.14
Йодно число, gI ₂ /100g	47.2	66.5	53.2

* - не е идентифицирано

В състава на маслото от плодовете на *C. thracica* се съдържат 23 вида мастни киселини, а от семената – 20 вида мастни киселини.

Установено е, че съотношението $\omega-6/\omega-3$ варира в доста широки граници от 1.14 до 26.6. Високото съотношение при маслото от узрелите плодове се дължи на високото съдържание на линолова киселина (20.3%) и на незначителното количество на линоленовата киселина (0.7%).

На фигура 26 е представено съотношението на наситени, ненаситени и в това число на мононенаситени и полиненаситени мастни киселини в маслото, изолирано от от плодовете в различна степен на вегетация и семената на *Centaurea thracica*.



Фигура 26. Съдържание на наситени (НМК), ненаситени (ННМК), мононенаситени (МННМК) и полиненаситени (ПННМК) мастни киселини в масло, изолирано от незрели, узрели плодчета и от семена на *Centaurea thracica*.

От фигурата се вижда, че количеството на наситените мастни киселини преобладават в маслото, изолирано от незрелите плодове (61.5%), докато в маслата, изолирани от узрелите плодове и от семената в най-голямо количество са ненаситените мастни киселини, съответно 65.4% и 58.3%. Основният представител на наситените мастни киселини е палмитиновата киселина (21.6 – 36.2%), следвана от стеариновата (3.7–4.9%). Количествата на мононенаситените мастни киселини при маслата от узрелите плодове (44.1%) и от семената (53.6%) са значително по-високи от тези на полиненаситените мастни киселини, съответно 21.3% и 4.7%,

докато при маслото от неузрели плодове съотношението на мононенаситените (20.0%) към полиненаситените (18.5%) мастни киселини е почти 1:1. Основният представител на мононенаситените мастни киселини е олеиновата киселина (13.7 – 53.0%), а на полиненаситените са линоловата (1.4 – 20.3%) и линоленовата (0.7 – 3.6%) киселина.

Йодното число, което е показател за степента на ненаситеност на мастните киселини в маслата, е относително ниско (47.2 – 66.5 gI₂/100g) и това е вследствие на голямото съдържание на наситени мастни киселини в изследваните масла. Йодното число на изследваните масла е близко до това на масло тип палм-олеин (≥ 56 gI₂/100g) (CODEX STAN 210-1999). Това дава основание изследваните масла да се причислят към несъхливите, които се характеризират с йодно число между 50-100 gI₂/100g.

Въз основа на получените данни за мастнокиселинния състав на маслата, изолирани от плодовете и семената на *Centaurea thracica* за първи път са определени показатели, свързани с оценката на ползите от маслото за здравето на човека и които са критерии за терапевтичния им ефект: съотношение между полиненаситени и наситени мастни киселини, атерогенен и тромбогенен индекс.

В таблица 7 са представени данни за съотношението между полиненаситени и наситени мастни киселини, атерогенния и тромбогенния индекс при плодове и семена от *Centaurea thracica*.

Таблица 7. Съотношение между полиненаситени и наситени мастни киселини (ПННМК/НМК), атерогенен и тромбогенен индекс на масла от плодове и семена на *Centaurea thracica*.

Вид масло	ПННМК/НМК	Атерогенен индекс	Тромбогенен индекс
от неузрели плодове	0.30±0.05	1.20±0.2	1.33±0.05
от узрели плодове	0.62±0.02	0.50±0.1	0.82±0.02
от семена	0.11±0.01	0.64±0.1	1.13±0.03

Съотношението полиненаситени и наситени мастни киселини играе важна роля за определяне на различните свойства на клетъчните мембрани, които спомагат за поддържане на нормалния метаболизъм в клетките. Препоръчителното минимално съотношение полиненаситени и наситени мастни киселини е 0.45 като за оптимално съотношение, което води до намаляване на риска от сърдечно-съдови заболявания е 1.0 – 1.5 (Kang *et al.*, 2005).

Съотношението ПННМК/НМК на изследваните масла от плодове и семена на *Centaurea thracica* е много по-ниско от същото съотношение на

соево масло (4.39), царевично масло (4.10), сусамово масло (2.94) и е по-близко до това на палмовото масло (0.18) (Kang *et al.*, 2005).

Атерогенният индекс показва връзката между сумата от основните наситени мастни киселини, които се считат за про-атерогенни и основните ненаситени мастни киселини, притежаващи анти-атерогенен ефект (Cottin *et al.*, 2011). Маслото от неузрелите плодове е с два пъти по-висок атерогенен индекс (1.20) от маслата, изолирани от узрелите плодове и семената (0.50 и 0.64). Анти-атерогенните липиди инхибират натрупването на плака и намаляват нивата на естерифицирани мастни киселини и холестерол, като по този начин предотвратяват появата на микро- и макрокоронарни заболявания (Hooper *et al.*, 2006).

Тромбогенният индекс определя тенденцията към тромбоза в кръвоносните съдове. Стойностите на този индекс за изследваните масла варират от 0.82 до 1.33.

Индексите на атерогенност и тромбогенност на маслата от плодове и семена на *Centaurea thracica* са значително по-високи от тези на зехтина (съответно 0.1250 и 0.3230), аргановото масло (0.1577 и 0.4498) и сусамовото масло (0.1235 и 0.3623), (Alvites Misajel, 2017).

Счита се, че стойности за атерогенния и тромбогенния индекс под 1.0 са показател за по-добри антиатерогенни и антитромбогенни свойства на липидите (Ulbricht & Southgate, 1991). Стойностите на тези индекси за маслото, изолирано от узрелите плодове са по-ниски от 1, докато на другите две изследвани масла са над 1, но под 1.5.

Съдържание на токофероли

Токоферолите са от съществено значение за защитата на полиненаситените мастни киселини (ПННМК) в растенията и животните срещу окисляване. Те проявяват своя антиоксидантен ефект чрез множество биохимични и биофизични механизми, включително поглъщане на активни кислородни видове и свободни радикали (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Съдържанието на токофероли и индивидуалният им състав е определен директно в маслото, като получените резултати са представени в таблица 8.

В изследваните масла от плодове и семена на *Centaurea thracica* е установено наличието само на един представител на токоферолите - α -токоферол.

Таблица 8. Съдържание на токофероли и индивидуален токоферолов състав на масла от плодове и семена на *Centaurea thracica*.

Показатели	от незрели плодове	от зрели плодове	от семена
Токофероли, mg/kg	58 ± 5	110 ± 5	260 ± 10
Индивидуален токоферолов състав			
α – токоферол, %	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0

Токофероловият състав съвпада с този на масла, изолирани от *Centaurea albonitens* и *Centaurea balsamita*, при които α-токоферолът също е преобладаващ. Индивидуалният токоферолов състав на маслото от плодове и семена на *C. thracica* е близък до състава на слънчогледово и сафлорово масло, в които се съдържа предимно α- токоферол (CODEX STAN 210-1999). Химически α-токоферолът е по-ефективен от γ-токоферолът. Премахва свободните радикали, но има недостатъка да действа като "прооксидант" при определени условия (Kamal&Eldin & Andersson, 1997). В растенията α-токоферолът се биосинтезира чрез посредничество на β- или γ-токоферол (Furuya *et al.*, 1987).

Fernandes *et al.* (2019) са установили, че по време на развитието на цвета на растения от род *Centaurea* съдържанието на токофероли в изолираното масло намалява от 3.0 до 2.4 mg/100g dw и индивидуалният токоферолов състав е различен от този на изследваните от нас масла, маслата им съдържат и 4-те основни представителя на токоферолите (α-, β- γ- и δ-токоферол), като преобладаващ е α- токоферола (Fernandes *et al.*, 2019).

Съдържание на фосфолипиди и индивидуален фосфолипиден състав

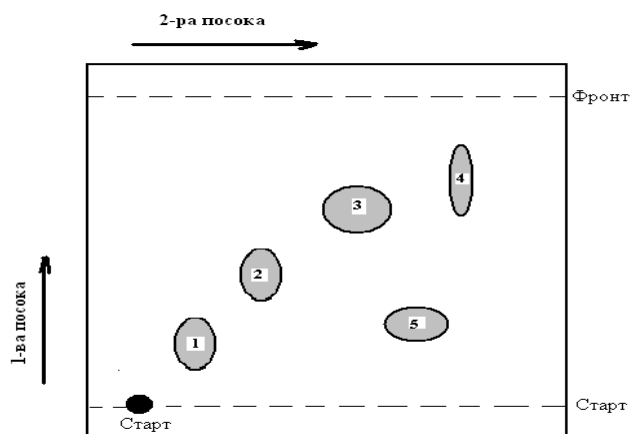
Резултатите относно съдържанието на фосфолипиди в липидите, изолирани от плодовете и семената на *C. thracica* са показани на таблица 9. Съдържанието на фосфолипиди в маслото от незрели плодове е подобно на това в слънчогледовото, лененото, царевичното масло, соевото и рапичното масло (0.7 – 1.0%) (Попов и Илинов, 1986).

Индивидуалният фосфолипиден състав е определен спектрофотометрично, след разделяне на компонентите с помощта на двупосочна тънкослойна хроматография (фиг. 27).

Таблица 9. Индивидуален фосфолипиден състав на липиди, изолирани от плодове и семена на *Centaurea thracica*.

Фосфолипиди, %	от незрели плодове	от узрели плодове	от семена
Фосфатидилхолин	6.6 ± 0.2	23.9 ± 0.5	9.1 ± 0.5
Фосфатидилинозитол	14.6 ± 0.3	10.4 ± 0.4	25.0 ± 1.5
Фосфатидилетаноламин	6.9 ± 0.5	13.9 ± 0.4	31.8 ± 1.1
Сфингомиелин	7.3 ± 0.1	7.6 ± 0.5	11.3 ± 1.1
Фосфатидилсерин	12.5 ± 0.4	4.7 ± 0.1	7.0 ± 1.0
Лизофосфатидилхолин	6.1 ± 0.1	9.4 ± 0.4	2.8 ± 0.4
Лизофосфатидилетаноламин	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.6
Монофосфатидилглицерол	*	1.0 ± 0.1	5.6 ± 0.5
Дифосфатидилглицерол	21.4 ± 0.4	7.3 ± 0.3	4.9 ± 0.2
Фосфатидни киселини	22.1 ± 0.1	19.8 ± 0.4	-
Общо количество на фосфолипидите, %	0.70 ± 0.10	0.35 ± 0.05	0.30 ± 0.04

* - не са идентифицирани



Фигура 27. Тънкослойна хроматограма на индивидуални фосфолипиди: 1–Фосфатидилинозитол, 2–Фосфатидилхолин, 3–Фосфатидилетаноламин, 4–Дифосфатидилглицерол, 5–Фосфатидни киселини.

Във фосфолипидната фракция на липидите от плодовете и семена на *C. thracica* са идентифицирани почти всички основни класове фосфолипиди.

Установено е, че основните представители на фосфолипидите, изолирани от семената са фосфатидилетаноламин (31.8%) и фосфатидилинозитол (25.0%). Във фосфолипидите от семената не са идентифицирани фосфатидни киселини.

ИЗВОДИ

Изводи от проучванията на видовете *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum*

В резултат от проведените изследвания върху видовете *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum* могат да се направят следните изводи:

1. Анатомичното проучване на видовете *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum*, срещащи се в България, обогатява информацията относно биологията на рода.

2. Сравнителноанатомичният анализ на белезите при *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum* доказва:

- амфистоматична структура на листата с диацитен и аномицитен тип устица;

- диференциация на хлоренхима на палисаден и гъбчест;

- едноклетъчни и многоклетъчни покривни трихоми с линейна и разклонена структура;

- приседнали щитовидни, едноклетъчни и двуклетъчни жлезисти трихоми, покриващи листната и стъблена повърхност.

3. Установени са в големи количества флавоноидите апигенин, кверцетин, рутин и техните деривати.

4. Установени са в големи количества фенилетаноидни и фенилпропаноидни гликозиди като форситозид, калцеолариозид и кафеоилхинови киселини.

5. Идентифицирани са 175 липидни съединения, класифицирани в 10 липидни класа (диацилглицероли, дигалактозил диацилглицероли, лизомоногалактозил диацилглицероли, лизодигалактозил диацилглицероли, моногалактозил диацилглицероли, фосфатидилхолин, фосфолипиди, сфинголипиди, триацилглицероли).

6. Установен и количествено определен е елементния състав на растенията, като с най-голяма концентрация са важните за човешкото здраве микроелементи К, Mg, Са и Zn.

7. Екстрактите от *Marrubium peregrinum* и от цвят на *Marrubium friwaldskyanum* проявяват инхибиращ ефект както спрямо Грам-отрицателни, така и спрямо Грам-положителни бактерии.

8. Екстрактът от листа на *Marrubium friwaldskyanum* има селективна активност срещу Грам-положителната бактерия *Bacillus cereus*.

9. Екстрактите от *Marrubium peregrinum* и *Marrubium friwaldskyanum* са със специфичен антитуморен ефект спрямо карциномни клетки, изолирани от маточна шийка и дебело черво. Като най-висока чувствителност към всички тествани проби проявиха HeLa и HT29

клетките.

10. Антитуморна активност на пробите от цвят и лист на *Marrubium frivaldskyanum* са с потенциал за инхибиране развитието на многоклетъчен агрегат от ракови клетки.

Изводи от проучванията върху *Centaurea thracica*:

1. Определен е общия химичен състав на неузрели и узрели плодове от *Centaurea thracica*. Получените резултати за общия химичен състав на плодовете показват по-високо съдържание на въглехидрати в узрелите плодове и по-ниско на протеини и на глицеридно масло, което обуславя нарастването на енергийната стойност при узрелите плодове (от 342 kcal/100g (1445 kJ/100g) до 354 kcal/100g (1503 kJ/100g)).

2. Установен е мастнокиселинния състав на глицеридните масла, изолирани от плодове и семена на *Centaurea thracica*. В състава на маслото изолирано от неузрелите плодове преобладават наситените мастни киселини (61.5%), докато в маслата, изолирани от узрелите плодове и от семената в най-голямо количество са ненаситените мастни киселини, съответно 65.4% и 58.3%. Основните представители на наситените мастни киселини са палмитиновата (21.6 – 36.2%) и стеариновата (3.7 – 4.9%) киселина. Основният представител на мононенаситените мастни киселини е олеиновата киселина (13.7 – 53.0%), а на полиненаситените са линоловата (1.4 – 20.3%) и линоленовата (0.7 – 3.6%) киселини.

3. Стойностите на индексите на атерогенност и тромбогенност описват добри антиатерогенни и антитромбогенни свойства на изследваните масла, както и стойностите на съотношението ПННМК/НМК потвърждават хранителната стойност на маслото.

4. Определен е индивидуалния състав на токофероловата и за първи път на фосфолипидната фракция на липидите от плодове и семена на *Centaurea thracica*.

- При изследване на токофероловия състав е установено, че основният компонент е α - токоферола.

- Във фосфолипидите изолирани от неузрелите плодове преобладават фосфатидните киселини (22.1%) и дифосфатидилглицерола (21.4%), а при узрелите плодове - фосфатидилхолин (23.9%) и фосфатидните киселини (19.8%). Основните представители във фосфолипидната фракция на изследваните семена на *Centaurea thracica* са фосфатидилетаноламин (31.8%) и фосфатидилинозитол (25.0%).

5. Високото съдържание на мононенаситени мастни киселини и на другите биологичноактивни вещества, като токофероли (58–260 mg/kg) и фосфолипиди (0.3–0.7%) определят хранителната и биологична стойност на маслата, изолирани от плодове и семена на *Centaurea thracica* и могат да служат като суровина за разработване на хранителни добавки и

фармацевтични продукти за превенция развитието на редица хронични заболявания.

ПРИНОСИ

Оригинални научни приноси

1. **За първи път** у нас са проведени детайлни изследвания върху химичния, в това число и на липидния състав на плодове и семена от *Centaurea thracica*.

Научни приноси с приложен характер

1. Различията получени в резултат на статистическата обработка на данните за белезите при *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum*: ширина на епидермалните клетки на стъблото, дебелина на кората и дебелина на ксилема и флоема могат да бъдат полезни за **бъдещи таксономични проучвания** в рамките на род *Marrubium*.

2. *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum* имат богат метаболитен състав с множество вторични метаболити и микроелементи, важни за човешкото здраве. Този фитохимичният състав е с доказани антиоксидантни, антибактериални, антиракови и други биоактивни ефекти, което прави двата вида **ценни източници за биотехнологични производства**.

3. Уникалните тъканно-специфични съединения с важни биоактивности прави *Marrubium friwaldskyanum* и *Marrubium peregrinum* подходящи за екстракция и последващо **приложение във фармацевтичната област**.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

- Aćimović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiprovski, B., Sikora, V., & Zeremski, T. (2020). *Marrubium vulgare* L.: A phytochemical and pharmacological overview. *Molecules*, 25(12): 2898.
- Akgül, G., Ketenoğlu, O., Pinar, N. M., & Kurt, L. (2008). Pollen and seed morphology of the genus *Marrubium* (Lamiaceae) in Turkey. *Annales Botanici Fennici*, 45: 1-10.
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1): 14-29.
- Al-Easa, H. S., & Rizk, A. M. (1992). Constituents of *Centaurea* species. *Qatar Univ Sci J*, 12: 27-5.
- Alkhatib, R., Joha, S., Cheok, M., Roumy, V., Idziorek, T., Preudhomme, C., & Hennebelle, T. (2010). Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta medica*, 76(01): 86-87.

- Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepolis, K., D'Auria, J., Ewald, J., & Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature methods*, 18(7): 747-756.
- Alvites Misajel, K. C. (2017). Comparación del perfil de ácidos grasos del aceite de chía (*Salvia hispánica* L.) orgánica y convencional (variedades blanca y negra) cultivadas en el Perú, como una alternativa para aceites vegetales comestibles. Bachelor Thesis, Peruvian University of Applied Sciences.
- American Oil Chemists Society (AOCS), Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, 7th ed.; Calculated Iodine Value; AOCS Press: Champaign, IL, USA, Cd 1c-85, Revised 2022.
- Aneli, N. A. (1975). Atlas of the Epidermis of the Leaf. Metzniireba, Tbilisi, 105.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC) 2016, Official Methods of Analysis, 20th ed.; AOAC International: Arlington, VA, USA, 2016.
- Cottin, S. C., Sanders, T. A., & Hall, W. L. (2011). The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(2): 215-231.
- De Jesus, R. A. P., Cechinel-Filho, V., Oliveira, A. E., & Schlemper, V. (2000). Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*, 7(2): 111-115.
- Diklić, N. (1974). *Marrubium*. *Flora of Republic of Serbia*, 6: 366-371.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9): 2221-2243.
- Edmondson, J. M., Armstrong, L. S., Martinez, A. O. (1988). A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of tissue culture methods*, 11(1):15-17
- El Bardai, S., Lyoussi, B., Wibó, M., & Morel, N. (2004). Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension*, 26(6): 465-474.
- Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Al-Mana, F., Mahmoud, E. A., Zin El-Abedin, T. K. A., & Ekiert, H. (2019). Phenolic compounds of *Catalpa speciosa*, *Taxus cuspidata*, and *Magnolia acuminata* have antioxidant and anticancer activity. *Molecules*, 24(3): 412.
- Fernandes, L., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., Ramalhosa, E., & Casal, S. (2019). Phytochemical characterization of *Borago officinalis* L. and *Centaurea cyanus* L. during flower development. *Food Research International*, 123: 771-778.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1): 497-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food energy—methods of analysis and conversion factors; FAO Food and Nutrition Paper 77, Report of a Technical Workshop; Rome, Italy, 2003.
- Furuya, T., Yoshikawa, T., Kimura, T., & Kaneko, H. (1987). Production of tocopherols by cell culture of safflower. *Phytochemistry*, 26(10): 2741-2747
- Giavalisco, P., Li, Y., Matthes, A., Eckhardt, A., Hubberten, H. M., Hesse, H., & Willmitzer, L. (2011). Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using ¹³C, ¹⁵N and ³⁴S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *The Plant Journal*, 68(2): 364-376.
- Gruenwald, J., & Brendler, T. (2000). PDRc for Herbal Medicines; Jaenicke, C., Ed. *Medical Economics Co, NewYork*, 271-275.

- Hooper, L., Thompson, R. L., Harrison, R. A., Summerbell, C. D., Ness, A. R., Moore, H. J., & Smith, G. D. (2006). Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *Bmj*, 332(7544): 752-760.
- Hummel, C. S., Lu, C., Loo, D. D., Hirayama, B. A., Voss, A. A., & Wright, E. M. (2011). Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(1): C14-C21.
- International Standard ISO 659 (2009). Determination of Oil Content (Reference Method) in Oilseeds. 4th Edition, 13.
- ISO 10540-1:2014; Animal and Vegetable Fats and Oils. Determination of Phosphorus Content, Part 1: Colorimetric Method. ISO: Geneva, Switzerland, 2014.
- ISO 12966-2:2017. Animal and vegetable fat and oils. Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids.
- ISO 9936:2016. Animal and vegetable fats and oils. Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.
- Jordanov, D. (1989). Flora Reipublicae Popularis Bulgaricae. Volume IX. Acad. Press, Sofia, (in Bulgarian), 540 p
- Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. D. S., Barriga, J. R. D. M., Dias, K. C. F., & Vasconcelos, S. M. M. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural product research*, 34(5): 692-705.
- Kamal&Eldin, A., & Andersson, R. (1997). A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(4): 375-380.
- Kamal&Eldin, A., & Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7): 671-701.
- Kang, M. J., Shin, M. S., Park, J. N., & Lee, S. S. (2005). The effects of polyunsaturated: saturated fatty acids ratios and peroxidisability index values of dietary fats on serum lipid profiles and hepatic enzyme activities in rats. *British journal of nutrition*, 94(4): 526-532.
- Kaskoos, R. A. (2013). In-vitro α -glucosidase inhibition and antioxidant activity of methanolic extract of *Centaurea calcitrapa* from Iraq. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 1(1): 122-125.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., ... & Steinhauser, D. (2005). GMD@ CSB. DB: the Golm metabolome database. *Bioinformatics*, 21(8): 1635-1638.
- Kozyra, M., Korga, A., Ostrowska, M., Humeniuk, E., Adamczuk, G., Gieroba, R., ... & Dudka, J. (2020). Cytotoxic activity of methanolic fractions of different *Marrubium* spp. against melanoma cells is independent of antioxidant activity and total phenolic content. *FEBS Open bio*, 10(1): 86-95.
- Kumar, A., Choudhary, A. K., Pooniya, V., Suri, V. K., & Singh, U. (2016). Soil factors associated with micronutrient acquisition in crops-biofortification perspective. *Biofortification of food crops*, 159-176.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1(1): 387-396.
- Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., Furman, C., Fruchart, J. C., Duriez, P., & Bailleul, F. (2003). Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Planta medica*, 69(03): 207-211.
- Meshinev, T. (2015). *Marrubium friwaldskyanum*. *Red Book in Bulgaria; Peev, D., Vladimirov, V., Petrova, A., Anchev, M., Temniskova, D., Denchev, C., Ganeva, A., Gussev, C., Eds.*
- Metcalf, C. R., & Chalk, L. (1950). Anatomy of Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Vol. 2, Clarendon Press, Oxford.

- Meyre-Silva, C., Yunes, R. A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F., & Cechinel-Filho, V. (2005). Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Il Farmaco*, 60(4): 321-326.
- Miller, O. (1998) Microwave digestion of plant tissue in closed vessels. *In Handbook of reference Methods for plant analysis*. 1st ed.; Kalra, Y.P., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 69–73, ISBN 978-1-57444-124-6.
- Mladenova, T. R., Stoyanov, P. S., Michova-Nankova, I. K., Mladenov, R. D., Boyadzhiev, D. T., Bivolarska, A. V., & Todorov, K. T. (2019). Comparative Leaf Epidermis Analyses of *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen. and *Clinopodium vulgare* L.(Lamiaceae) from Bulgarka Nature Park, Bulgaria. *Ecologia Balkanica*, 11(2).
- Mouhid, L., Gómez de Cedrón, M., Vargas, T., García-Carrascosa, E., Herranz, N., García-Risco, M., & Ramírez de Molina, A. (2018). Identification of antitumoral agents against human pancreatic cancer cells from Asteraceae and Lamiaceae plant extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1): 1-11.
- Mumtaz, A., Ashfaq, U. A., ul Qamar, M. T., Anwar, F., Gulzar, F., Ali, M. A., ... & Pervez, M. T. (2017). MPD3: a useful medicinal plants database for drug designing. *Natural product research*, 31(11): 1228-1236.
- Nagy, M., Gergel, D., Grancai, D., Novomesky, P., & Ubik, K. (1996). Antilipoperoxidative activity of some phenolic constituents from *Marrubium peregrinum* L. *Farmaceuticky Obzor*, 65: 283-285.
- Negaresh, K., & Rahiminejad, M. R. (2015). A taxonomic revision of *Centaurea* sect. *Microlophus* (Asteraceae, Cardueae–Centaureinae) and three new records for the flora of Iran. *Nordic Journal of Botany*, 33(3): 335-353.
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 178: 687-704.
- Oluwafemi, R. A., Olawale, I., & Alagbe, J. O. (2020). Recent trends in the utilization of medicinal plants as growth promoters in poultry nutrition-A review. *Research in: Agricultural and Veterinary Sciences*, 4(1): 5-11.
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., & Xia, J. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature protocols*, 17(8): 1735-1761.
- Pavela, R. (2004). Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, 75(7-8): 745-749.
- Peev, D. (Eds). (2015). Red Data Book of the Republic of Bulgaria. Vol. 1. Plants and Fungi. BAS & MoEW, Sofia
- Petrova A., Vladimirov, V. (Eds). (2009). Red List of Bulgarian vascular plants. *Phytologia Balcanica*, 15(1): 63-94
- Pires, T. C., Dias, M. I., Barros, L., Calhella, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105: 580-588.
- Ramadan, M. A., & Safwat, N. A. (2009). Antihelicobacter activity of a flavonoid compound isolated from *Desmostachya bipinnata*. *Aust J Basic Appl Sci*, 3(3): 2270-2277.
- Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7): 1125-1131.
- Rezgui, M., Basma, M., Neng, N., Nogueira, J. M., Bettaieb Ben-Kaab, L., & Machado Araújo, M. E. (2021). Evaluation of *marrubium vulgare* growing wild in Tunisia for its potential as a dietary supplement. *Foods*, 10(11): 2864.
- Rigano, D., Aviello, G., Bruno, M., Formisano, C., Rosselli, S., Capasso, R., & Borrelli, F. (2009). Antispasmodic effects and structure– activity relationships of labdane

- diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Journal of natural products*, 72(8): 1477-1481.
- Rigano, D., Formisano, C., Basile, A., Lavitola, A., Senatore, F., Rosselli, S., & Bruno, M. (2007). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4): 395-397.
- Rustaiyan, A., & Faridchehr, A. (2021). Constituents and biological activities of selected genera of the Iranian Asteraceae family. *Journal of Herbal Medicine*, 25: 100405.
- Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., & Bailleul, F. (2002a). Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3): 389-392.
- Sahpaz, S., Hennebelle, T., & Bailleul, F. (2002b). Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural product letters*, 16(3): 195-199.
- Salem, M. A., Yoshida, T., Perez de Souza, L., Alseekh, S., Bajdzienko, K., Fernie, A. R., & Giavalisco, P. (2020). An improved extraction method enables the comprehensive analysis of lipids, proteins, metabolites and phytohormones from a single sample of leaf tissue under water-deficit stress. *The Plant Journal*, 103(4): 1614-1632.
- Sarker, S. D., Savchenko, T., Whiting, P., Šik, V., & Dinan, L. N. (1997). Moschamine, cis-moschamine, moschamindole and moschamindolol: four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Natural Product Letters*, 9(3): 189-199.
- Sharonova, N., Nikitin, E., Terenzhev, D., Lyubina, A., Amerhanova, S., Bushmeleva, K., & Sinyashin, K. (2021). Comparative Assessment of the Phytochemical Composition and Biological Activity of Extracts of Flowering Plants of *Centaurea cyanus* L., *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. *Plants*, 10(7): 1279.
- Smith Jr, J. P., & Sawyer Jr, J. O. (2019). Checklist of the Families and Genera of Vascular Plants of California. Available online: https://digitalcommons.humboldt.edu/botany_jps/88 (accessed on 21 September 2021)
- Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Zampirolo, J. A., Cechinel-Filho, V., & Schlemper, V. (2006). Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of ethnopharmacology*, 108(3): 379-384.
- Talebi, S. M., Sheidai, M., & Ariyanejad, F. (2019). Stem anatomical study of some Iranian *Marrubium* L. species. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(9).
- Telek, E., Toth, L., Botz, L., & Mathe, I. (1997). Chemical tests with *Marrubium* species. Official data on *Marubii herba* in Pharmacopoeia Hungarica VII. *Acta pharmaceutica Hungarica*, 67(1): 31-37.
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The lancet*, 338(8773): 985-992.
- Yabrir, B. (2018). Chemical composition and biological activities of some *Marrubium* species essential oil: A review. *Chemistry Journal of Moldova*, 13(2): 8-23.
- Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Gevrenova, R., Nedialkov, P., Mocan, A., Ćirić, A., & Mahomoodally, M. F. (2018). Identification of phenolic components via LC-MS analysis and biological activities of two *Centaurea* species: *C. drabifolia* subsp. *drabifolia* and *C. lycopifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149: 436-441.
- Zheljazkov, V. D., Semerdjieva, I. B., Stevens, J. F., Wu, W., Cantrell, C. L., Yankova-Tsvetkova, E., & Astatkie, T. (2022). Phytochemical Investigation and Reproductive Capacity of the Bulgarian Endemic Plant Species *Marrubium friwaldskyanum* Boiss.(Lamiaceae). *Plants*, 11(1): 114.
- БДС 13491:1976, Зърно. Метод за определяне пепелното съдържание, 1976.

БДС EN ISO 6865:2001. Фуражи. Определяне съдържанието на сурови влакнини. Метод с междинно филтриране (ISO 6865:2000).

БДС ISO 711:1997, Зърно и зърнопродукти. Определяне съдържанието на влага. Основен метод.

Кузманов, Б. и кол. (2006). Специализирана енциклопедия на лечебните растения. Издателство „Труд“, София.

Попов А., Илинов П. (1986). Химия на липидите. Издателство „Наука и изкуство“, София.

Участия в научни форуми по темата на дисертационния труд

5TH BALKAN SCIENTIFIC CONFERENCE ON BIOLOGY. April, 15-16, 2021. Plovdiv, Bulgaria. Poster: Leaf and stem anatomy of Bulgarian endemic *Marrubium frivaldskyanum* Boiss. (Lamiaceae). Authors: **Donika Gyuzeleva**, Plamen Stoyanov, Tsvetelina Mladenova, Anelia Bivolarska, Rumen Mladenov, Krasimir Todorov.

2ND INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT SYSTEMS BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (ICPSBB). September, 25-27, 2023. Plovdiv, Bulgaria. Poster: Metabolome profiling of *Marrubium peregrinum* L. and *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. reveals their potential as sources of plant-based pharmaceuticals. Authors: **Donika Gyuzeleva**, Maria Benina, Valentina Ivanova, Saleh Aseeckh, Tsvetelina Mladenova, Rumen Mladenov, Krasimir Todorov, Anelia Bivolarska, Plamen Stoyanov.

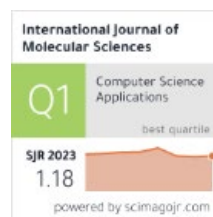
ЮБИЛЕЙНА КОНФЕРЕНЦИЯ „ФАРМАЦИЯ – НАУКА С БЪДЕЩЕ“, 17-19 ноември 2023 г., Пловдив. Постер: Някои антиоксидатни свойства на водни извлеци от *Marrubium peregrinum* и *Marrubium friwaldskyanum* и влиянието им върху съкратителната активност на изолирани гладки мускули от плъх. Автори: **Доника Гюзелева**, Цветелина Младенова, Красимир Тодоров, Пламен Стоянов, Румен Младенов, Ивица Димов, Анелия Биволарска, Виктор Йотов, Райна Ардашева, Наталия Присадова, Екатерина Зайцева, Валентин Турийски

Научни публикации по темата на дисертационния труд

Gyuzeleva, D., Stoyanov, P., Bivolarska, A., Mladenov, R., Mladenova, Ts., Petkov, V., Todorov, K. (2022). Anatomical Investigation of *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. and *Marrubium peregrinum* L. (Lamiaceae) from Bulgaria. *Ecologia Balkanica*, 14(1): 87-101. **WoS**, **Scopus Q4 SJR 0.202**



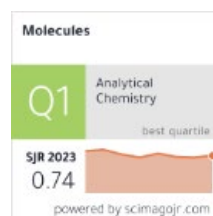
Gyuzeleva, D., Benina, M., Ivanova, V., Vatov, E., Alseekh, S., Mladenova, T., Mladenov, R., Todorov, K., Bivolarska, A., Stoyanov, P. (2023). Metabolome Profiling of *Marrubium peregrinum* L. and *Marrubium friwaldskyanum* Boiss Reveals Their Potential as Sources of Plant-Based Pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23):17035, 1-23. **WoS Q1 IF 4.9, Scopus Q1 SJR 1.179**



Gyuzeleva, D., Batsalova, Ts. Dzhambazov, B., Teneva, I., Mladenova, Ts., Mladenov, R., Stoyanov, P., Todorov, K., Moten, D., Apostolova, D., Bivolarska, A. (2024). Assessment of the biological activity of *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. (*Lamiaceae*). *Heliyon*, 10(11): 1-14. **WoS (2023) Q1 IF 3.4, Scopus (2023) Q1 SJR 0.617**



Teneva, O., Petkova, Z., Antova, G., Angelova-Romova, M., Stoyanov, P., Todorov, K., Mladenova, T., Radoukova, T., Mladenov, R., Petkov, V., Bivolarska, A., **Gyuzeleva, D.** (2024). Chemical Composition and Lipid Bioactive Components of *Centaurea thracica* Dwelling in Bulgaria. *Molecules*, 29(14), 1-14, 3282. **WoS (2023) Q2 IF 4.2, Scopus (2023) Q1 SJR 0.744**



Установени цитирания

1. Gyuzeleva, D., Stoyanov, P., Bivolarska, A., Mladenov, R., Mladenova, Ts., Petkov, V., Todorov, K. (2022). Anatomical Investigation of *Marrubium friwaldskyanum* Boiss. and *Marrubium peregrinum* L. (*Lamiaceae*) from Bulgaria. *Ecologia Balkanica*, 14(1): 87-101.

Цитирана в:

- Hassaïne, S., Elyebdi, N., Medjahed, H., Yazid, K. (2022). Contribution to the Microscopic Study of Three Plant Species (Parsley, Spanish Scolyme and White Marrube) Commonly Used in Traditional Algerian Medicine. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants*, 5(2): 118-126.
- Acimovic, M.; Stankovic Jeremic, J.; Miljkovic, A.; Rat, M.; Loncar, B. (2023). Screening of Volatile Compounds, Traditional and Modern Phytotherapy Approaches of Selected Non-Aromatic Medicinal Plants (*Lamiaceae*, *Lamioideae*) from Rtanj Mountain, Eastern Serbia. *Molecules*, 28, 4611. **WoS Q2 IF 4.2, Scopus Q1 SJR 0.744**
- Koçak, K. V., & Kandemir, N. (2023). Taxonomic importance of Anatomical, Ecological and Trichome Features of *Marrubium astracanicum* subsp. *astracanicum* Jacq. (*Lamiaceae*). *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 6(3), 199-209.
- Demiröz, A., & Baykan, S. (2023). Morphological And Micromorphological Investigation Of *Marrubium* L.(*Lamiaceae*) Taxons Distributed In The Aegean Region. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(1), 51-75. **Scopus Q3 SJR 0.153**

- Koçak, K. V., & Kandemir, N. (2024). Anatomical, Ecological and Trichome Micro-Morphological Features of Two *Marrubium* L. Taxa (Lamiaceae). *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 5-6.

2. Gyuzeleva, D., Benina, M., Ivanova, V., Vatov, E., Alseekh, S., Mladenova, T., Mladenov, R., Todorov, K., Bivolarska, A., Stoyanov, P. (2023). Metabolome Profiling of *Marrubium peregrinum* L. and *Marrubium friwaldskyanum* Boiss Reveals Their Potential as Sources of Plant-Based Pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23):17035, 1-23

Цитирана в:

- Avşar, Ö. K., Kasbolat, S., Ak, G., Nilofar, N., Caprioli, G., Santanatoglia, A., ... & Zengin, G. (2024). Integrating chemical analysis with in vitro, in silico, and network pharmacology to discover potential functional compounds from *Marrubium astracanicum* subsp. *macrodon*. *Journal of Molecular Liquids*, 398, 124204. [WoS \(2023\) Q2 IF 5.3](#), [Scopus \(2023\) Q1 SJR 0.918](#)
- Ivanova, S., Dzhakova, Z., Staynova, R., & Ivanov, K. (2024). *Salvia verticillata* (L.) - Biological Activity, Chemical Profile, and Future Perspectives. *Pharmaceuticals*, 17(7), 859. [WoS \(2023\) Q1 IF 4.3](#), [Scopus \(2023\) Q1 SJR 0.845](#)

