

Справка за научните приноси

на гл. ас. д-р Милена Петкова Попова

Справката за научните приноси разглежда трудовете извън дисертационния труд.

Природните продукти, като лечебни растения и гъби са от интерес за медицинската практика като продукти и като източник на нови биологично активни вещества. Сред природните продукти несъмнено е и прополисът - пчелен продукт с растителен произход. В последните години природните вещества и препаратите на растителна основа придобиват все по-голяма популярност, с което е свързано и голямото им разнообразие в търговската мрежа. Изучаването на състава на екстракти от природни продукти, на активните им компоненти, заедно с развитието на методи за стандартизация и качествен контрол са сред основните направления на Химията на природните и физиологично активните вещества.

Основните научни приноси са свързани с получаването на нови данни и потвърждаване на хипотези за структурното разнообразие на биологично активните природни компоненти и могат да се обобщят в следните направления:

Изследвания върху прополис

- Установяване на химичния състав и биологичната активност на прополис от различни географски райони и определяне на растителните му източници
- Разработване и валидиране на методи за количествено отчитане на биологично активни компоненти в прополис
- Обобщаване и сравнителен анализ на данни за прополис

Изследвания върху лечебни растения и гъби

- Установяване на химичния състав на лечебни растения и гъби

I. Изследвания върху прополис

Прополисът (пчелен клей) е едни от най-ценните и загадъчни пчелни продукти с лечебни свойства. Той представлява смес от смолисти растителни секрети, събрани от пчелите от повърхността на пъпките, младите листа или наранена кора на дърветата, и восък. Именно тези секрети са основната му съставка и източник на биологичната му активност. Прополисът е средството на пчелите за борба с бактерии и вируси, а хората го използват за профилактика и лечение на редица заболявания. Непрекъснатите изследвания върху прополиса са резултат от твърде различният му химичен състав, определящ се от растителното биоразнообразие в различните географски и климатични райони. Изучаването на растителния му произход води до формулиране на „типове” прополис, което е от значение при създаването на критерии за неговата стандартизация и качествен контрол, необходими при използването му в медицинската практика.

I.1. Химичен състав, растителни източници и биологична активност на прополис от различни географски райони

Основната насока при изследване на химичния състав на прополиса е свързана с установяване на структурата на веществата, обуславящи биологичната му активност. Като продукт с растителен произход, методите за разработването му включват основни фитохимични подходи, като най-често използваните са ГХ-МС метод (след дериватизиране) и/или изолиране на индивидуални компоненти. За изолиране на индивидуални компоненти са използвани комбинация от хроматографски техники, а структурата на вещества е определена с помощта на спектрални методи, като ЯМР, МС,

УВ и ИЧ. Голяма част от изследванията се основават на изследване състава на 70% етанолен екстракт (балсам) от суровия прополис, формата под която най-често се използва в медицината и апитерапията, и съдържаща биологичноактивните растителни компоненти.

I.1.1. Тополов тип прополис (от България) – източник на активни срещу пчелен патоген компоненти

Прополисът от Европа е един от най-интензивно изследваните, като данните сочат, че основните му и биологично активни компоненти са фенолни съединения (флавоноиди, фенолни киселини и техни естери), произхождащи главно от смолистите секрети на пъпките на черната топола *Populus nigra* - тополов тип прополис.

В последните години, възникват сериозни проблеми с болестите при пчелите, водещи до измиране на цели пчелни колонии. В рамките на проект по 7 РП на ЕС са проведени изследвания с оглед изолиране и тестване на прополисови компоненти срещу пчелни патогени. От тополов тип прополис (от България) са изолирани 5 индивидуални вещества (пиноцембрин, пинобанксин-3-*O*-ацетат, бензил и пентенил ферулати и **9-оксо-10(*E*)-12(*Z*)-октадекадиенова киселина, нова за прополис**), заедно със смес от естери на кафеената киселина (пентенил, изопентенил и фенилетил кафеат), които са тествани *in vitro* срещу *Paenibacillus larvae*. Това е пчелен патоген (бактерия), водещ до заболяване с летален изход нар. американски гнилец. Като резултат, флавоноидите и сместа от кафеати показват значителна и най-висока активност. Това е **първото съобщение за активност на прополисови компоненти срещу *P. larvae*, което ги определя като потенциални антимикробни средства срещу пчелни патогени.** Изолирането, тестването и използването на компоненти от прополис, като средство за борба с болестите при пчелите има предимство с оглед на факта, че са природни и присъстват в пчелните кошери (публ. №27).

I.1.2. Прополис от европейска Русия (Пермска област)

За първи път е анализиран съставът на прополис от област Перм, европейска Русия, а резултатите доведоха до формулирането на нов смесен тип прополис. Пет проби от различни райони са анализирани чрез ГХ/МС. Установено е, че всички проби принадлежат към специфичен, **нов тип прополис с троен растителен произход: трепетлика-бреза-топола (*Populus tremula-Betula pendula-Populus nigra*)**. Отчетено е количественото съдържание на основните групи биологично активни компоненти, като е определено, че проби с по-високо съдържание на общи флавоноиди проявяват по-висока антибактериална активност (публ. №29).

I.1.3. Прополис от средиземноморската област

Анализиран е химичният състав и антибактериалната активност на прополис от различни райони на Турция. Установено е, че високото съдържание на феноли и флавоноиди, характерни за *P. nigra*, води до по-високо антибактериално действие на прополиса. В проба от източна Анатолия са намерени **глицеролови естери на фенолни киселини, които са хемотаксономични маркери за *P. euphratica***. Този вид *Populus*, широко разпространен в района на Турция, се съобщава за **първи път като източник на прополис** (публ. №8).

Формулиран е **нов тип прополис от Европа – средиземноморски или дитерпенов**. През 2002 г. при изследване на проби от България, Италия и Швейцария чрез ГХ/МС, е установено, че проба от южна Италия (Сицилия) се характеризира с ниско съдържание на феноли и изключително високо съдържание на дитерпени (публ. №Д7 от дисертациония труд). Това беше първата индикация, че в крайните

южноевропейски райони, или в райони от Средиземноморието, е налице нов, различен тип прополис, чийто химичен състав рязко се отличава от този на европейския тополов тип. По-късно от пробата от **Сицилия** са изолирани основните компоненти, дитерпенови киселини от лабданов тип, заедно с дитерпенов алкохол **лабда-8(17),13Е-диен-15-ол, изолиран за първи път от природен продукт**. Видове от семейство *Cupressaceae* са посочени като вероятен източник на пробата. **За дитерпеновите киселини е установена висока антибактериална активност**, а за новия компонент висока цитотоксичност срещу ларви на *A. salina* (публ. №3).

В рамките на пост-докторски проект, финансиран от ФНИ е изследван химичният състав на прополис от **Гърция**, а резултатите потвърдиха наличието на средиземноморски тип прополис. От проба от **остров Крит**, проявяваща висока антимикробна активност, са изолирани и идентифицирани 23 съединения, 20 от които дитерпени (17 от лабданов, 2 от тотаранов и 1 от пимаров тип), заедно с 2 циклоартанови тритерпени и един флавоноиден гликозид. **Пет от компонентите са новооткрити природни съединения**, два от които са лабданови естери на олеинова и палмитинова киселини. **Седем от веществата са нови за прополис**, а останалите са изолирани само от прополис от Бразилия и Средиземноморието. Установено е, че дитерпените проявяват по-висока антибактериална активност, вкл. към орални патогени, докато тритерпените са най-активни срещу гъбички (публ. №20).

Важна насока при изследването на прополис е сравнителният анализ на химичния състав на образци от различни райони с оглед разкриване на типа прополис. **Постигнато е детайлно химично профилиране и охарактеризиране на средиземноморския тип прополис чрез ГХ-МС**. Използвайки изолираните от критския прополис дитерпени, като референтни вещества, както и данни в литературата е идентифицирана значителна част от компонентите, като триметилсилилови етери, в ГХ на 6 проби гръцки прополис. От идентифицираните общо 37 дитерпени, **20 са намерени за първи път в прополис**. Представени са мас-спектрите и индексите на задържане на изолираните дитерпени, формулирани са някои зависимости между структурата на компонентите и съответстващата им МС фрагментация. ГХ-МС подход и получената от него информация е един бърз начин за откриване и охарактеризиране на проби, принадлежащи към този нов тип прополис (публ. №23).

За първи път е изследван прополис от остров Малта (вкл. о. Гозо), като е установено, че и той е представител на дитерпеновия тип. В 16 проби са намерени и терпенилови естери на заместени бензоени киселини, **2 от които, нови за прополис компоненти**, са изолирани и идентифицирани като ацетилирани дауканови естери на *p*-метокси и *p*-хидроксибензоена киселини. Терпениловите естери са характерни за *Ferula communis* (Apiaceae), широко разпространена в Малта и определена като вторичен растителен източник. Отчетена е статистически значима корелация (Pearson test) между съдържанието на естерите и противогъбичната активност (публ. №24).

Следваща стъпка е доказване на растителния вид, чийто смолисти секрети, богати на дитерпени, са основната активна съставка на средиземноморския прополис. Анализирани са химичният състав на смола от кипарис *Cupressus sempervirens* и бор *Pinus halepensis*, събрани от Малта, а полученият ГХ/МС профил е сравнен с този на прополис от Малта и Гърция. Съгласно резултатите **кипарисът *C. sempervirens* (Mediterranean Cypress) е основният и/или единствен растителен източник на средиземноморския тип прополис и за първи път се доказва, като източник на прополис** (публ. №26).

Охарактеризирането на средиземноморския тип прополис, както и знанията за биологичната му активност са от съществено значение при бъдеща работата по

неговата стандартизация и качествен контрол, основана на количествено отчитане на основните му биологично активни компоненти - дитерпенови съединения.

I.1.4. Прополис от Северна и Южна Америка

За първи път е изследван прополис от **Канада**, произхождащ от райони извън ареала на разпространение на *P. nigra* (секция *Aigeiros*). Установено е, че пробите проявяват добра антирадикалова активност, дължаща се на различни по структура компоненти. В проба от района на Виктория (крайбрежни тихоокеански гори), са намерени **дихидрохалкони, три от които нови за прополис** и характерни за смолистите ексудати на тополи от секция *Tasamahaca*, в частност *Populus trichocarpa*. Последната е **посочена за първи път като източник на прополис**. Характерната за по-хладните райони на северна Америка бяла топола *Populus tremuloides* (секция *Leuce*), отличаваща се главно с наличие на ароматни киселини, е определена като източник на проба от канадската тайга (Ричмонд) (**публ. №11**).

Антиоксидантната активност на **2 новооткрити природни халкони** (2',3',4-трихидрокси-4'-метокси халкон и 2',3'-дихидрокси-4,4'-диметокси халкон), изолирани от прополис от Салвадор, е тествана при окисление на метиллинолеат в мицеларни разтвори. Установено е, че халконите проявяват добра антиоксидантна активност, по-висока от тази на флавоноида нарингенин, но по-ниска от известните природни антиоксиданти, кафеена киселина и α -токоферол (**публ. №9**).

До началото на нашите изследвания имаше само едно съобщение за състава на **прополис от Венецуела**, основано на ВЕТХ анализ на фенолни компоненти. Ние изследвахме 3 проби венецуелски прополис, като е установен сходен ГХ/МС профил с основни компоненти ди- и тритерпени, и пренилирани бензофенони. Последните са изолирани и структурно охарактеризирани, два в неразделима равновесна смес (скробиккулатон А и В) и два като индивидуални **новооткрити природни вещества (18-етилокси-17-хидрокси-17,18-дихидроскробиккулатон А и В)**. Определено е, че пчелите са събирали смолисти секрети от два растителни източника, единият от които е *Clusia scrobiculata*. Скробиккулатоните А и В проявяват активност срещу *S. aureus* и ларви на *A. salina*. Етанолните екстракти забавят автоокислението на триацилглицероли в свинска мас (**публ. №7 и 10**).

Прополисът от **Бразилия** е най-изследваният тропически прополис. Поради богатата тропическа растителност са формулирани няколко типа, сред които най-добре проучения е този произхождащ от *Baccharis dracunculifolia*, наречен зелен тип. Неговите основни компоненти са пренилирани производни на заместени канелени киселини, за които няма данни за антиокислителен ефект при липидно окисление. Ето защо, 4 основни компонента са синтезирани и тествани: 3-пренил-4-хидрокси-канелена киселина, 3,5-дипренил-4-хидрокси-канелена киселина, 2,2-диметил-6-карбокситенил-2Н-бензопиран и 2,2-диметил-6-карбокситенил-8-пренил-2Н-бензопиран. Съгласно резултатите, монопренилното производно проявява най-висока активност сред синтезираните компоненти, по-висока и от тази на *p*-кумарова и ферулова киселини, но по-слаба от α -токоферол и синапова киселина (**публ. №2**).

За първи път е анализиран химичният състав на червен прополис от Бразилия – нов тип. Изолирани са 14 компонента: производни на фенилпропена, изофлавоноиди, пренилирани бензофенони и тритерпени, заедно с 1 **нафтохинон**, който е **новооткрито природно съединение**. Тритерпенов кетон и сместа от производни на фенилпропена са нови за прополиса вещества. За **изофлавоноида птерокарпан** е установена **висока активност срещу *S. aureus* и *C. albicans***, което се свързва с факта, че птерокарпаните са познати растителни фитоалексини (**публ. №12**).

I.1.5. Прополис от Африка

Прополисът от Африка е най-слабо проученият, като изследванията са ограничени до прополис от северните райони. Изследване е съставът на 2 проби от **Кения**, оличаващи се с различен химичен профил (ГХ/МС, ТСХ), както помежду си, така и от известните типове прополис. От проба от района на Муинги, са изолирани **3 арилнафталенови лигнани, 2 от които са новооткрити природни компоненти, а 1 е изолиран за първи път от прополис**. Намерените лигнани могат да послужат като маркери при определяне на растителния източник на пробата. Изолираните от проба от Вой, **2 геранилстилбена и 1 геранил флавонол са нови за прополис и характерни за *Macaranga schweinfurthii*, широко разпространен храст в източна Африка – вероятен растителен източник на пробата**. Изолираните компоненти, както и етанолните екстракти проявяват слаба антибактериална и антирадикалова активност (публ. №22).

I.1.6. Прополис от югоизточна Азия

Изследван е прополис от източната част на **о. Ява, Индонезия**. Изолирани са 11 компонента, **алкил и алкенил резорциноли (нови за прополис)**, заедно с пренилирани флаванони и тритерпенови хидроксикиселини от циклоартанов тип. Установено е, че **пробата е с двоен растителен произход, което я отличава от известния тихоокеански или *Macaranga* тип прополис** (от Тайван и Окинава). Докато геранил флаваноните са характерни за смолистия повърхностен секрет на плодовете на дървото *Macaranga tanarius*, то източникът на **циклоартановите киселини е *Mangifera indica* (манго)**. Значителна антирадикалова активност е отчетена за пренилираните флаванони (публ. №25).

I.2. Методи за количествено отчитане на биологично активни компоненти и тяхното приложение (научно-приложни приноси)

Разликите в химичния състав на прополиса и необходимостта от стандартизация и качествен контрол е довела до идеята за формулиране на „локални” типове прополис и въвеждане на „локални” стандарти. Познаването на типа прополис означава познаване на структурата на основните активни компоненти, чието количествено отчитане е път за създаване на критерии за контрол и стандартизация.

В процеса на **разработване на стандарти за тополов тип прополис са развити и валидирани спектрофотометрични процедури за количествено отчитане на трите основни групи биологично активни компоненти: общи феноли, общи флаволи и флавоноли, общи флаванони и дихидрофлавоноли при подходящо подобрени стандарти**. Методите са валидирани с помощта на моделна смес от 14 характерни и основни за тополов тип прополис компоненти в количества близки до тези в реални проби. Спектрофотометричните процедури са полезни за рутинен анализ, поради тяхната опростеност, добра възпроизводимост и точност (публ. №5). Процедурите са валидни само за тополов тип прополис, което изисква неговото доказване. За целта е разработен тънкослойно хроматографски тест, основан на използването на смес от 7 компонента, таксономични маркери за видове *Populus*, главно *P. nigra*. Прилагането му е от значение, тъй като окачествяването на друг тип прополис води до незадоволителни или погрешни резултати, поради неподходящи процедури и/или стандарти. Пример за това е отчетеното изключително високо съдържание на фенолни компоненти в проба от южна Италия (I-3), която е дитерпенов тип прополис (публ. №4).

Разработените процедури са приложени към голям брой проби (114) тополов тип прополис от различен географски произход. Определено е количеството балсам (70% етанол екстракт) в суровия прополис, което е характеристика за количеството

смолист секрет събран от пчелите, и антибактериалната му активност срещу *S. aureus*. Въз основа на получените резултати са предложени характеристиките, гарантиращи добро качество на тополов тип прополис за приложение в хранителната и фармацевтичната промишленост. За първи път е отчетена статистически значима корелация между съдържанието на общи феноли в балсам и антибактериална активност (МИК) (публ. №16).

Спектрофотометричните процедури са приложени за окачествяването на прополисови проби при изпълнение на договори с фирми Поленержи (Франция), Непентес (Полша), Тенториум (Русия) и Макросърв (Сингапур).

Развита и валидирана е спектрофотометрична процедура чрез 2,4-динитрофенилхидразин за определяне на пренилирани флаванони, основните активни вещества в тихоокеански или *Macaranga* тип прополис (от Тайван и Окинава). Методът е валидиран чрез използване на моделна смес от 4 основни компонента, прополини С, D, F и G, като добра точност и възпроизводимост е постигната при използване на смесен стандарт - прополини С и D (4:1). Методът е приложен за първи път за определяне на пренилирани флаванони и е подходящ за окачествяването на този тип прополис (публ. №21).

I.3. Обобщени и сравнителни данни за прополис

Обобщени и сравнителни данни за прополис са представени в обзорни работи, публикувани в научни списания и книги (по покана). Те са насочени, съответно към:

Насоки и методи за стандартизация на прополис, количествена оценка на основни индивидуални компоненти и/или групи от компоненти, с акцент прополис от видове *Populus* (публ. №6). Съпоставката на данните показва предимството на количественото отчитане компонентите по групи, пред това като индивидуални. Това се основава главно на факта, че активността на прополиса се дължи на съвкупност от много на брой компоненти.

Растителни източници на прополис от различни географски и климатични райони, данни публикувани в периода 2000 - 2006 г. Специално внимание е обърнато на растителните източници определени на базата на сравнение състава на прополис и растителен материал, както и на директното наблюдение върху поведението на пчелите (публ. №13).

За първи път е събрана и обобщена наличната информация за химичния състав, биологичната активност и растителните източници на прополис от безжилни пчели. Те спадат към триб Meliponini и се срещат в райони с тропичен и субтропичен климат. Безжилните пчели, както и медоносната пчела *Apis mellifera*, събират растителни секрети, за да „произвеждат” прополис (публ. №15).

Химичен състав, биологична активност и растителни източници на прополис, данни публикувани в периода 2000-2008 г. Специално внимание е обърнато на новооткритите природни и прополисови компоненти. Фактът, че за период от 7 години над 120 компонента са намерени за първи път в прополис, а голяма част от тях са новооткрити природни съединения показва, че макар и „известен от древността” прополисът остава предизвикателство с оглед химични и фармакологични изследвания. Неговият анализ води до откриването на ценни растителни компоненти, които иначе би било трудно да се открият сред разнообразната растителност (публ. №17).

Химичен състав, биологична активност и растителни източници на прополис от Средиземноморието. Анализът на данните показва, че типичен дитерпенов профил, показват проби произхождащи главно от островни и крайбрежни райони в средиземноморската климатична област. Факт е, че за Европа прехода от север към юг

е обусловен с преход от умерен към субтропичен климат, което е свързано с промяна на растителността, и следователно промяна в състава на прополиса (публ. №28).

II. Изследвания върху лечебни растения и гъби

Охарактеризиран е алкалоидният състав на листа от *Uvaria chamae*, събрани от района на Гвинея. Видове *Uvaria* са разпространени в тропическите райони на Африка и се използват в традиционна им медицина, като средство против малария. Изолирани са 7 алкалоида: 2 от бензилизохинолинов тип и 5 от апорфинов тип. **За първи път от род *Uvaria* (състоящ се от повече от 150 вида) се изолират бензилизохинолинови алкалоиди.** Други три апорфинови алкалоиди са нови за вида. Установено е, че компонентите проявяват цитотоксична активност срещу ракови клетки (публ. №1).

Чрез фитохичното изследване на плодове от *Angelica lucida* (Apiaceae), събрани от ботаническата градина в Люблин (Полша), са изолирани и идентифицирани **пет нови за вида фуранокумарини.** *A. lucida*, известна с името морски страж, е широко разпространена по крайбрежните зони на източна Азия и северна Америка, а стъблата ѝ са използвани от ескимосите като храна и тонизиращо средство. Установено е, че компонентите са активни срещу серия от бактерии, вкл. орални патогени (публ. №19).

Събрани и обобщени са данните, публикувани в литературата, за химичния състав и биологичната стойност на лозови листа (*Vitis vinifera*). Представени са основните им компоненти, както и ролята им за устойчивостта на лозите към патогени и медицинската и хранителната стойност на листата (публ. №14, кратък обзор).

За първи път се анализира дървесната гъба *Fomitopsis rosea* по отношение наличието и структурата на съдържащите се в нея вторични метаболити. *F. rosea* вирее в бореалната зона на Европа, Азия и северна Америка, а също и в планински местности на континентална Европа. Тя е **защитен вид, включен в Червената книга на много страни, вкл. на България.** Изолирани и охарактеризирани са **2 новооткрити природни тритерпени - ланостанови киселини с оксепанов пръстен,** заедно с три познати ланостанови тритерпени и епидиокси стерол. Изолираните съединения проявяват активност само срещу *S. aureus*. Всички тритерпени се отличават с наличие на допълнителен въглероден атом при C-24, което е характерно за дървесната гъба *Daedalea quercina* и потвърждава близката родствена връзка между *Fomitopsis* и *Daedalea* (публ. №18).