

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

НИЗ „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“
Лаборатория „Свободно-радикални процеси“

Алмира Павлова Георгиева

**Сравнителен фитохимичен анализ и
биологични активности на ароматични продукти от
българските маслодайни
Rosa alba L. и *Rosa damascena Mill.***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на

образователна и научна степен

„Доктор“

Научна специалност: „Фармакология“, шифър 03.01.24

Научни консултанти:

Доц. д-р Милка Милева

Доц. д-р Албена Александрова

София, 2020

ВЪВЕДЕНИЕ

Употребата на лекарствените растения е толкова древна, колкото е и човечеството (Pamukoff, 2017). Благоприятните климатични и почвени условия нареждат България на първо място сред страните в Европа и на шесто място в света по събиране, отглеждане, преработка и износ на лечебни растения и билки (Дончева, 2016).

По данни на Световната здравна организация, около 80% от населението на земята за своята първична здравна помощ разчита на лекарства предимно с растителен произход (Farnsworth et al., 1985; Arvigo et al., 1993). В последно време се наблюдава подчертан интерес към етерично-маслените култури поради техните разнообразни биологични ефекти. *Rosa damascena* Mill., световно известна като "маслодайна роза", е емблематичен растителен вид за България. Богата на биологично активни съединения, тя представлява ценен източник на фитопродукти с превантивен и терапевтичен фармакологичен потенциал (Gudin, 2000).

Важен проблем, визиран от Световната Здравна Организация, е ежегодното нарастване на процента на антимикробна резистентност към клинично прилаганите антибиотици, което от своя страна представлява сериозна заплаха за общественото здраве, водеща до увеличение на разходите за здравеопазване. Много често острите бактериални и вирусни инфекции рецидивират в хронични, а те във възпалителни процеси и онкологични заболявания. Здравето е безценен капитал и изборът на адекватни модели за профилактика и терапия на бактериални, гъбични и вирусни инфекции е от изключителна важност.

През последните години се наблюдава висока успеваемост при фитотерапията на редица социално-значими заболявания, които наричаме общо „болести на съвременния живот“, свързани с развитието

на оксидативен стрес в заболялия организъм. В основата ѝ лежи прилагането на фитокомплекси с лечебен ефект, изолирани от растителни видове. Основно предимство на този подход е минимализиране на страничните ефекти от лечението. Задълбоченото изследване на биологичната активност на лечебните растения и продуктите получени от тях е от особено важно значение за подобряване на човешкото здраве и качество на живот.

Огромен е броят на научните публикации, в които се съобщава, че етерично-маслените растения, в това число и розите, са богати на ingredienti, притежаващи богат спектър от биологични активности - противогъбични, антибактериални, антиоксидантни, антитуморни, противовъзпалителни и др.

Проучванията върху неизследвани досега свойства на ароматичните продукти от българските *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. ще допринесат за по-пълното им фармакологично охарактеризиране и насърчаване на потенциалното им използване.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Целта на настоящата работа е да се охарактеризират в сравнителен аспект химичният състав и биологичните активности на ароматичните продукти от българските маслодайни *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. и да се оцени потенциалът им като ресурс за фармакологично приложение.

ЗАДАЧИ

➤ Да се определи съставът на ароматичните продукти: розово масло, хидрозол и абсолю от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

➤ Да се проследят ефектите на ароматичните продукти срещу панел от Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии.

➤ Да се изследват антифунгалните активности на ароматичните продукти срещу микроорганизми от родовете *Aspregillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* и *Alternaria*.

➤ Да се определи антивирусната активност на ароматичните продукти чрез:

– Изследване на ефекта им върху репликацията на Coxsackievirus B1 (CV-B1) (щам Connecticut), човешки респираторен синцитиален вирус A2 (RSV-A2), грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2), вирус на мукозната болест-вирусна диария по телетата (BVDV), херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2).

– Проучване на ефекта им върху инфекция с HSV-1 и HSV-2 в MDBK клетки, след претретиране с изследваните продукти.

➤ Да се изследват антиоксидантните свойства на ароматичните продукти в химични системи, генериращи свободни радикали и в моделни системи *in vitro*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Ароматични продукти от *Rosa alba* L. и *Rosa Damascena* Mill.

Розово масло, хидрозол и абсолю от *Rosa Alba* L. и *Rosa Damascena* Mill. бяха предоставени от Института по розата и етеричномаслените култури, Казанлък

Химикали и реагенти

Използваните реактиви и химикали бяха закупени от Sigma-Aldrich, Германия; гентамицин - от Pharmacia, България; клетъчната среда Dulbecco modified Eagles' medium (DMEM) - от Gibco BRL, САЩ; неутрал ред - от Fluka Chemie AG, Швейцария; гераниол, цитронелол, метилевгинол, нерол - от Givaudan, Швейцария; стерилната пластмасова посуда и филтрите за стерилизиране на среди и разтвори (0.2 µm) - от Orange Scientific, Белгия.

Клетъчни култури, вирусни, бактериални и гъбични щамове

Клетъчни линии

Монослойна клетъчна култура Madin-Darby canine kidney (MDCK), Madin-Darby bovine kidney (MDBK), Hep-2 - от човешки ларингиален карцином и клетъчна линия ВТ, получена от телешка трахея. Клетъчните култури бяха отглеждани в растежна хранителна среда DMEM, съдържаща 10% фетален телешки серум; 10 mM HEPES и антибиотици (penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL). Клетките бяха инкубирани в CO₂ инкубатор (HERA cell 150, Heraeus, Германия) при 37°C; 5% CO₂.

Бактериални щамове

Всички използвани щамове: *Staphylococcus aureus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9627, *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus epidermidis* NBIMCC 3486 бяха от колекцията на Института по микробиология – БАН; *Enterococcus faecalis* ATCC 3915 и *Salmonella abony* ATCC 6017 - от колекцията на Националната банка за

промишлени микроорганизми и клетъчни култури – България; *Streptococcus mutans* щам ATCC 20523 от колекцията DSMZ – Германия.

Гъбичните щамове

A. niger и *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* и *Alternaria* бяха предоставени от Микологичната колекция на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ - БАН, София, които се съхраняваха и поддържаха върху бирен агар, рН 6.3 при 4°C.

Вирусни щамове и модели

Coxsackievirus B1 (CVB1) (щам Connecticut), човешки респираторен синцитиален вирус A2 (HRSV-A2), вирус на мукозната болест-вирусна диария по телетата (BVDV) бяха от колекцията на Институт по микробиология “Стефан Ангелов” - БАН, София;

Грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) беше преоставен от Институт по вирусология “Д. Й. Ивановский” Руска Академия на Науките, Москва;

HSV-1 и HSV-2, чувствителен към ацикловир (ACV) щам Victoria (получен от проф. Стефан Дундаров, НЦЗПБ - София). Щамът се възпроизвежда в клетъчна линия MDBK. Вирусите са реплицирани в присъствието на поддържаща хранителна среда DMEM, съдържаща 0.5% фетален телешки серум. Културите се инкубираха при 37°C в термостат *HeraCell* (Heraeus) при 5% CO₂. Ежедневно се отчиташе цитопатичният ефект (ЦПЕ) и при обхващане на 90–100% от клетъчния монослой културите се замразяваха и размразяваха трикратно (на 24 и 48 час от заразяването). Полученият вирусен сток се съхраняваше при – 20°C.

Методи

Газхроматографски-масспектрален (GC-MS) анализ на етеричните масла

GC-MS анализът бе проведен на 7890 А газов хроматограф, свързан със селективен детектор 5975 С маса (Agilent Technologies).

Разделянето бе извършено на 30 m × 0.25 mm (i.d.) HP-5 ms silica-fused капилярна колона, покрита с 0,25 μm филм поли (диметилсилоксан) като неподвижна фаза (Agilent Technologies).

Газхроматографски-маспектрален (GC-MS) анализ на хидрозоли от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Анализът на хидрозоли от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. беше извършен с Agilent 7890A/5975 GC-MS система, снабдена с HP-5 неполярна колона (60 m x 0,25 mm x 0,25 m). Хидрозолиите трикратно се подлагаха на течно-течна екстракция с диетилов етер, след това на ротационен вакуум изпарител се отстраняваше етерната фаза до пълното отстраняване на разтворителя. Полученият хидрофобен остатък, който беше 0,024% от хидрозола на бялата и 0,095% на червената роза, се анализираше при следните условия: газ-носител хелий, със скорост на потока 1 mL/min. Пробите бяха инжектирани последователно по 1 mL. Параметрите на температурната програма са описани в международната стандартна система (ISO 9842). Идентифицирането на съединенията бе направено чрез сравняване на техните относителни индекси на задържане RI и мас-спектри с чистите вещества от библиотечните база данни на Националния институт по стандарти и технологии.

Определяне на тоталното съдържание на фенолни съединения по метода на Folin-Ciocalteu.

Антибактериални изследвания на ароматичните продукти на *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. чрез оценка на активностите им върху набор от референтни тест-микроорганизми (*Staphylococcus aureus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9627, *Escherichia coli* ATCC 8739; *Staphylococcus epidermidis* NBIMCC 3486; *Enterococcus faecalis* ATCC 3915 и *Salmonella abony* ATCC 6017) по метод на микроразрежданията в течна хранителна среда (BMD). Стойностите на минималната инхибиторна концентрация (МИК) на растителните

екстракти се определят с използване на техники за микроразреждане на бульон (Eloff, 1998).

Хранителна среда – соево-казеинов бульон с добавка 0,5% дрождев екстракт.

Антивирусен скрининг на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *R. damascena* Mill.

Култивиране на вирусите CVB1, RSV, A/Aichi/68/H3N2, BVDV, HSV-1 и HSV-2.

Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните вещества върху монослойна клетъчна култура MDBK, MDCK, Hep-2 и BT.

Определяне на инфекциозните вирусни титри по метода на Rich & Moon.

Определяне на индивидуалния антивирусен ефект на изследваните вещества.

Определяне на селективните индекси (SI).

Антифунгални изследвания

Определяне на минимална инхибираща концентрация (МИК)

Диск-дифузионен тест

Метод на разреждане в агарова среда.

Математически модел за изчисляване на инхибиращия ефект на етеричните масла

Използван е популярният във фармакокинетиката "модел на средния ефект", формулиран от Чоу, (Chou, 1976). Уравнението, което описва зависимостта на параметър, свързан с виталитета на клетките, като функция от дозата на лекарството/веществото, има следния вид:

$$F_a = F_u \cdot \text{Dose}^m / (\text{IC}_{50}^m + \text{Dose}^m) \quad (1)$$

m – коефициент, определящ вида и наклона на кривата, за $m = 1$, кривата има хиперболична форма; за $m > 1$ сигмоидална; за $m < 1$ плоска сигмоидална.

Константите на модела са оценени чрез използване на методите на нелинейно програмиране (Zaharieva et al., 2018). Разработеният програмен продукт е в платформата на MAPLE®.

Изчисляване на комбинационния индекс между маслата от маслодайни рози и нистатин в неконстантно съотношение.

Комбинационният индекс отразява ефекта на взаимодействието на двете вещества върху фунги от вида *A. Flavus*. Беше използвана формулата на Chou, (2006), която може да се представи както следва:

$$CI = D1/Dx1 + D2/Dx2 + \alpha * ((D1/Dx1) * (D2/Dx2)) \quad (2)$$

където $\alpha = 1$

$(Dx)1$ = доза на вещество 1, която инхибира с 50% радиуса на патогенните гъбички;

$(D)1$ = доза на вещество 1 в комбинация с вещество $(D)2$, която инхибира с 50% радиуса на патогенните гъбички;

$(Dx)2$ = доза на вещество 2, която инхибира с 50% радиуса на патогенните гъбички;

$(D)2$ = доза на вещество 2 в комбинация с вещество $(D)1$, която намалява с 50% радиуса на фунгалния растеж.

Условно за различните експериментални сценарии комбинационният индекс (CI) може да отразява взаимодействията между използваните вещества с добра точност, както следва:

$CI > 1,3$ антагонизъм;

$CI =$ от 1,1 до 1,3 умерен антагонизъм;

$CI =$ от 0,9 до 1,1 адитивен ефект;

$CI =$ от 0,8 до 0,9 слаб синергизъм;

$CI =$ от 0,6 до 0,8 умерен синергизъм;

$CI =$ от 0,4 до 0,6 синергизъм;

$CI =$ от 0,2 до 0,4 силен синергизъм.

Алгоритъмът за определяне на ефектите антагонизъм, адитивност и синергизъм включва следните етапи:

(i) определяне на IC_{50} на веществото А (в нашия случай, ЕМ от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. по експериментални данни, използвайки модела в уравнение (1);

(ii) определяне на IC_{50} на веществото В (в нашия случай, нистатин) по експериментални данни, използвайки модела в уравнение (1);

(iii) определяне на IC_{50} на комбинацията от двете вещества АВ по експериментални данни, използвайки модела в уравнение (1);

(iv) определяне на комбинационния индекс по уравнение (2) на базата на получените стойности за IC_{50} , указани по горе.

Антиоксидантна активност

Приготвяне на яйчни липозоми от яйчен жълтък чрез екстракция по Folch (1957).

Определяне на тотален глутатион (GSH) съгласно Rahman et al. (2005).

Определяне активността на глутатион пероксидаза по метода на Gunzler et al. (1972).

Активност на каталаза (CAT) по метода на Ейби (Aebi, 1984).

Липидна пероксидация - беше измерена чрез количеството на реагиращите с тиобарбитурова киселина продукти (TBARS), образувани в клетъчната суспензия на MDBK клетки ($1 \cdot 10^6$ клетки/mL).

Определяне на антирадикалови свойства в:

Система, генерираща хидроксидни радикали по метод на Halliwell et al. (1988).

Система, генерираща супероксидни радикали по метода на Beauchamp и Fridovich, (1971) и **ксантин-ксантин оксидазна моделна система**.

Супероксид анион радикал акцептираща активност - промените, настъпващи в резултат на активността на изпитваните вещества, бяха регистрирани чрез NBT тест (Mileva et al. 2000).

Определяне на редуциращ потенциал - DPPH тест по метода на Brand -Williams et al. (1995).

Определяне на желязоредуциращ потенциал на хидрозолите по метода на Benzie & Strain (1996).

Fe²⁺ - хелиращ капацитет на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. съгласно метода на Decker and Welch (1990), с модификации.

Антиоксиданта активност в липозомна суспензия чрез ТБК тест по количеството на продуктите на липидната пероксидация, реагиращи с 2-тиобарбитурова киселина при λ 532 nm по метод на Bishayee and Balasubramanian (1971), адаптиран от Милева и съавт. (Mileva et al., 2000).

Статистическа обработка на получените резултати

Резултатите бяха представени като средни стойности \pm SD. Данните бяха статистически анализирани с помощта на програми SPSS 13,0 и Microsoft Excel. Данните, получени при изследване влиянието на етеричните масла върху антиоксидантния статус на MBDK клетки, инфектирани с HSV-1 бях отчетени като % инхибиране. Резултатите бяха статистически анализирани с едностъпков ANOVA (тест на Dunnett). $p < 0,05$ беше прието като минимално ниво на статистическа значимост за разликите в средните стойности на популацията.

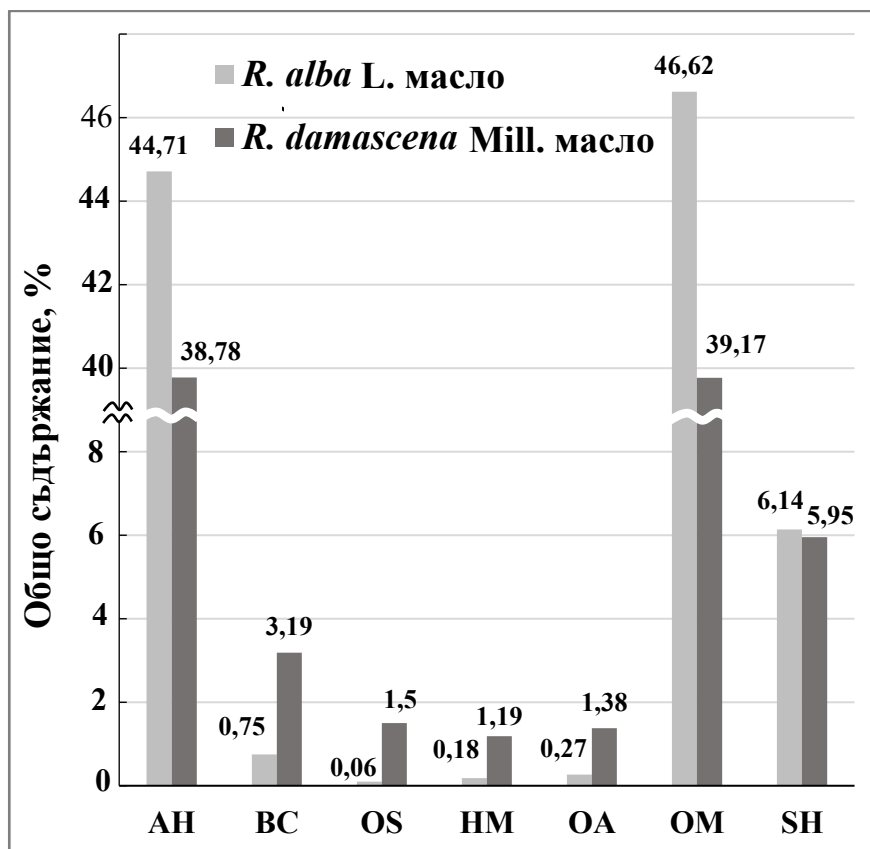
РЕЗУЛТАТИ

Сравнителен анализ на хроматографския профил на ароматичните продукти от *Rosa alba* L. и *R. Damascena* Mill.

Етерични масла

Общят брой идентифицирани съединения в масло от *R. alba* L. бе 38, представляващи 98,78% от общия му състав и съответно 40 в маслото от червената роза, представляващи 91,16%. Идентифицираните ingredienti в състава на маслата от двете рози принадлежат към

следните класове съединения: OM, AH, SH, HM, OS, BC и OA (Фигура 1; Фигура 9 от дисертацията).



Фигура 1. Сравнителен анализ на основните класове химични съединения, участващи в състава на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Хидрозоли

Хидрозолите от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. трикратно се подлагаха на екстракция с диетилов етер, с последващо изпаряване на етерната фаза. Полученият остатък беше 0,024% от хидрозола на бялата и 0,095% от този на червената роза.

Хроматографският състав на хидрофобната фаза от двата хидрозола, изследван чрез GC-MS, е представен в Таблица 1 (Таблица 6 от дисертацията). Общият брой идентифицирани съединения бе еднакъв - 22, но представляващи 92,5% от общия състав на хидрозола от *Rosa alba* L. и 89,62% от общия състав на хидрозола от *Rosa damascena* Mill.

Таблица 1. GC-MS анализ на хидрозол от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

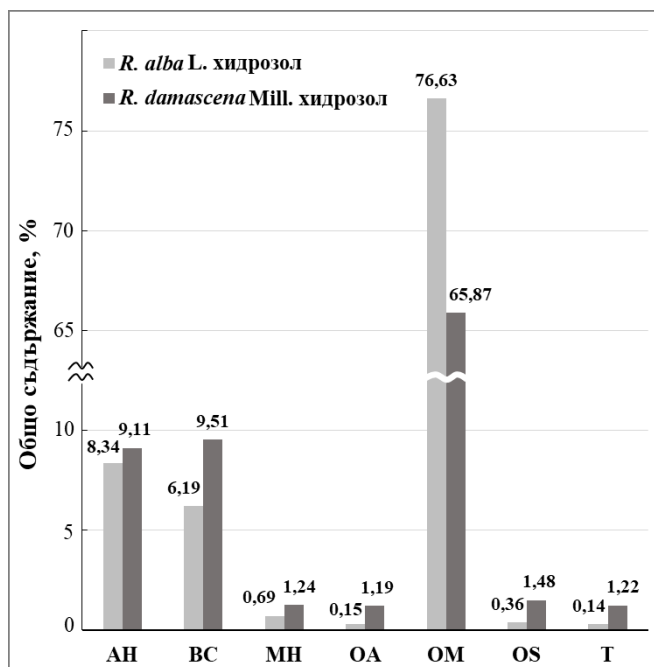
№	Съединение, %	Клас	KI*	<i>Rosa alba</i> L.	<i>Rosa damascena</i> Mill.
1	(Z)- β -ocimene	MH	1032,9	0,26	0,18
2	(E)- β -ocimene	MH	1044,8	0,43	1,06
3	cis-Linalool Oxide	OM	1091,3	0,11	0,41
4	β -Linalool	OM	1095,1	3,61	2,06
5	Phenylethyl Alcohol	BC	1106,3	5,95	4,95
6	α -Terpineol	OM	1187,1	1,56	0,12
7	β -Citronellol	OM	1226,3	28,69	28,70
8	cis-Geraniol	OM	1230,3	6,11	10,81
9	trans-Geraniol	OM	1250,3	36,44	16,44
10	Eugenol	BC	1358,1	0,14	2,73
11	Geranyl acetate	OM	1380,5	0,11	7,33
12	Methyleuge-nol	BC	1404,9	0,10	1,83
13	Pentadecane	AH	1500,1	2,34	0,73
14	Hexadecane	AH	1600,5	1,22	2,14
15	β -Eudesmol	OS	1650,3	0,13	0,59
16	Heptadecane	AH	1700,4	2,15	3,18
17	Farnesol	OS	1725,5	0,23	0,89
18	Lignocerol	OA	1750,6	0,15	1,19
19	Nonadecane	AH	1900,3	0,25	2,05
20	Eicosane	AH	2000,2	1,12	0,45
21	Heneicosane	AH	2100,5	1,26	0,56
22	Squalene	T	2834,2	0,14	1,22
Общо идентифицирани компоненти, %				92,5	89,62

*Съединенията са изброени в реда на тяхното елуиране от HP-5 неполярна колона; KI- Ковач индекс на HP-5 неполярната колона по отношение на n-алкени.

Идентифицираните ingredienti в двата хидрозола спадат към следните класове: AH, BC, MH, OA, OM, OS и (T) (Фигура 2; Фигура 10 от дисертацията). Съединенията от класа MH, OS и T, които бяха идентифицирани в розовия хидрозол, не присъстваха в състава на етеричните масла.

На фигура 2 е показан сравнителният анализ на основните класове съединения в хидрозолите от *R. alba* L., и *R. damascena* Mill.

Съединенията от класа на ОМ преобладават: в хидрозол от *R. alba* L. са 76,63%, които са с 11% повече в сравнение с тези в хидрозола от *R. damascena* Mill. (65,87%), следвани от групата на АН (за *R. alba* L. - 8,34% и 9,11% за червената роза).



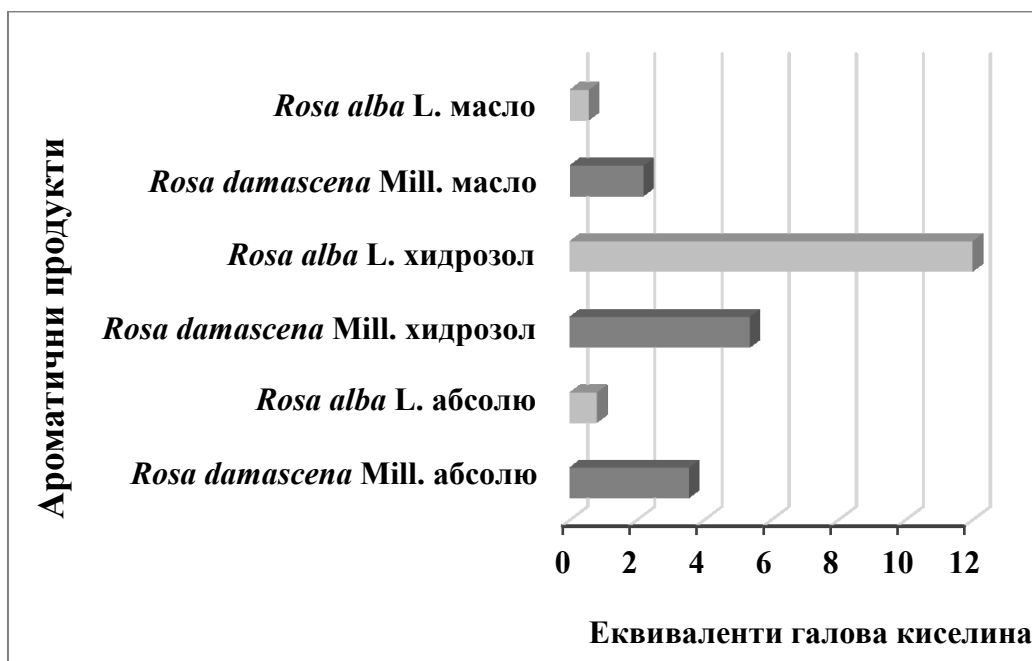
Фигура 2. Съдържание на основните класове съединения в хидрозол от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill., идентифицирани чрез GC-MS анализ, %.

От класа на ОМ бе установено, че съединението с най-висок относителен процент в хидрозола на *Rosa damascena* Mill. е β -цитронелол - 28,7 %, докато в хидрозола от *Rosa alba* L. това е гераниол, идентифициран в две конформации: транс-гераниол - 36,44% и цис-гераниол (нерол) - 6,11%. Относителният процент на β -цитронелол и в двата вида хидрозола бе еднакъв (Таблица 1; Таблица 6 от дисертацията).

Сравнителен анализ на съдържанието на феноли в ароматичните продукти на *R. alba* L. и *R. damascena* Mill.

На Фигура 3 (Фигура 12 от дисертацията) е представено тоталното съдържанието на феноли (TPC) в масло, хидрозол и абсолю от двете рози. В масло от *R. damascena* Mill. съдържанието им бе 2,2 еквивалента галова киселина (ЕГК)/ μg масло, което беше близо 5 пъти повече в

сравнение с маслото от *R. alba* L. (0,57 ЕГК/μg масло). В хидрозола обратно, фенолите бяха два пъти повече в този от *R. alba* L. (12,01 ЕГК/mL хидрозол) в сравнение с хидрозола от *R. damascena* Mill. (5,37 ЕГК/mL). В двата вида абсолю разпределението на феноли е подобно на това в маслото: 0,81 ЕГК/μg абсолю от *R. alba* L. и 3,5 ЕГК/μg в това от червената роза.



Фигура 3. Съдържание на феноли в състава на ароматичните продукти: етерично масло, хидрозол и абсолю от *Rosa alba* L. и *R. damascena* Mill. *Резултатите са изразени като ЕГК за mL (хидрозол) или μg (етерично масло и абсолю).

Биологичната активност на ароматичните продукти на *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Антибактериални изследвания на масло и хидрозол от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Чрез метода на крайното разреждане в бульон бе определена минимална инхибираща концентрация (МИК, %) на маслата и хидрозолите от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. по отношение на следните Gram (+) бактерии: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* и *Staphylococcus epidermidis* и Gram (-) бактерии: *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*.

Таблица 2. Антибактериална активност на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. срещу панел от Gram (-) и Gram (+) бактерии.

Изследвани микроорганизми	Щам	<i>R. alba</i> L.	<i>R. damascena</i> Mill.	Vancomycine
Gram (+):				
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12228	0,2125 %	0,2125%	0,0002%
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 3915	0,2125 %	0,2125%	0,012%
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 20523	0,0132 %	0,0132%	0,03%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBIMCC 3486	0,83%	0,452%	0,0006%
Gram (-):				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9627	0,1063%	0,1063%	0,2%
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	0,2125%	0,2125%	0,0253%
<i>Salmonella abony</i>	ATCC 6017	0,4472 %	0,4472%	0,003%

*Резултатите са представени като МИК, % (w/v).

Антибактериалната активност на маслата и на двете рози (Таблица 2, Таблица 8 от дисертацията) срещу изследваните Gram (+) микроорганизми бе най-отчетлива при *Streptococcus mutans*, МИК - 0,0132%. Тя беше повече от два пъти по-ниска от МИК на антибиотика ванкомицин (Vancomycine) - 0,03%. При Gram (-) бактерии маслата бяха най-ефективни при *Pseudomonas aeruginosa*, с МИК - 0,1063%, която също беше по-ниска от МИК на ванкомицин - 0,2%. Спрямо *Staphylococcus epidermidis* антибактериалната активност на маслото от *Rosa damascena* Mill. беше по-голяма от тази на маслото на бялата роза, с установената МИК - 0,452%, която беше по-ниска от МИК на маслото от *Rosa alba* L. - 0,83%.

МИК, % (w/v) на хидрозоите от двете рози бяха значително по-високи от тези на ванкомицин. Най-висока антибактериална активност беше установена срещу *Staphylococcus epidermidis* от хидрозола от *Rosa damascena* Mill. с МИК- 45,2%.

Таблица 3. Антибактериална активност на хидрозоли от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. срещу панел от Gram (-) и Gram (+) бактерии.

Изследвани микроорганизми	Щам	<i>R. alba</i> L.	<i>R. damascena</i> Mill.	Vancomycine
Gram (+):				
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12228	91,25%	91,25%	0,0002%
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 3915	91,25%	71,25%	0,012%
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 20523	83,20%	83,27%	0,03%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBIMCC 3486	85,00%	45,20%	0,0006%
Gram (-):				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9627	100,00%	83,63%	0,20%
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	84,20%	88,25%	0,0253%
<i>Salmonella abony</i>	ATCC 6017	94,72%	84,72 %	0,003%

*Резултатите са представени като МИК, % (w/v).

Антифунгално действие на масло и хидрозол от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

На третия ден от инкубирането беше отчетена МИК срещу растежа на следните микроорганизми: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* и *Alternaria*. Резултатите показаха ясна тенденция към намаляване растежа на микроорганизмите с отчетлива доза-ефект зависимост (Таблица 4; Таблица 12 от дисертацията).

Потискане на развитието на *Aspergillus niger* и *Penicillium chrysogenum* беше по-ясно проявено при прилагането маслото от *Rosa damascena* Mill. с МИК 0,10% (Таблица 4).

Таблица 4. Антифунгално активност на масло и хидрозол от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. Данните за МИК са отчетени на 3-я ден след инокулацията.

Микро-организъм	Масло, МИК, %		Хидрозол, МИК, %	
	<i>Rosa alba</i> L.	<i>Rosa damascena</i> Mill.	<i>Rosa alba</i> L.	<i>Rosa damascena</i> Mill.
<i>Aspergillus Niger</i>	0,20	0,10	80	100
<i>Aspergillus Fumigatus</i>	-	0,70	-	-
<i>Trichoderma</i>	0,25	0,25	100	85
<i>Penicilium Chrisogenum</i>	0,25	0,10	100	10
<i>Alternaria</i>	0,25	0,25	100	85

След прилагане на масло от *Rosa alba* L. отчетеният МИК за двата микроорганизма бе 0,20% и 0,25% съответно. Маслото от *Rosa alba* L. не прояви фунгистатичен ефект срещу *Aspergillus fumigatus*. Беше установена слаба фунгистатична активност и за двете масла с МИК 0,25% по отношение на *Trichoderma* и *Alternaria*. Проведените изследвания не установиха наличието на фунгицидна активност на двете масла спрямо изследваните микроорганизми, поради, което не бе определена минимална фунгицидна концентрация. Данните за МИК % на двата хидрозола са получени по същия експериментален протокол (Таблица 4). Антифунгалният ефект на розовите хидрозоли е значително по-слаб от този на маслата. Единствено при *Penicillium chrysogenum* се установи инхибиране на растежа от хидрозола на *Rosa damascena* Mill. с МИК 10%.

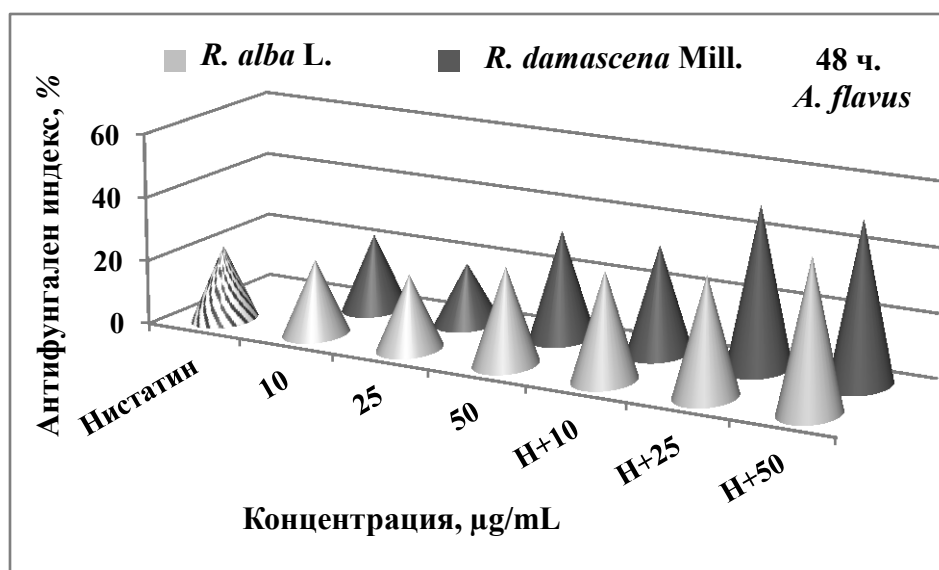
Антифунгален ефект на маслата и комбинацията им с нистатин

Предварителни изследвания на антифунгалното действие на маслата, както и комбинацията им с нистатин по отношение на три вида от рода *Aspergillus* бе направено чрез диск-дифузионен тест след 48 часа

инкубиране. Нистатин бе приложен в минимална концентрация, при която проявява активност – 50 µg/диск. Резултатите показаха концентрационна зависимост на антимикотичната активност на маслата. Антифунгалният ефект срещу изследваните видове беше по-ясно изразен при комбинацията нистатин и 50 µg/mL етерично масло.

Влияние на етеричните масла, нистатин и комбинацията им върху радиалния растеж на видовете от рода *Aspergillus* при различна времева експозиция

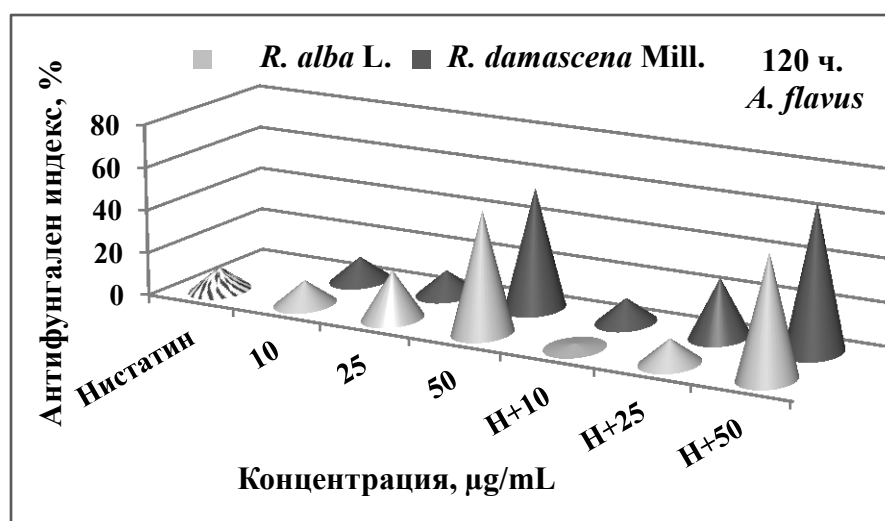
На Фигура 4 (Фигура 13 от дисертацията) е представена количествената оценка на противогъбичните ефекти на двете масла и тяхната комбинация с нистатин (Н), изразена чрез антифунгалния индекс (АИ), който бе изчислен на 48-ия час след инокулирането със суспензия с концентрация на 1×10^5 /mL на клетки от *A. flavus*. По-голямата стойност на АИ на дадено вещество или комбинация, показва по-силен антифунгален ефект.



Фигура 4. Зависимост на антифунгалния индекс срещу *A. flavus* на 48-мия час от инокулирането от концентрацията на маслата. от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill.

*Антифунгален индекс, АИ% = $(1 - \text{Дпр} / \text{Дк}) \times 100$; Да: диаметър на зоната на растеж; Дпр: диаметър на зоната на растеж на контролата; нистатин (Н) (50 µg/mL), масло от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. в концентрации; 10, 25 и 50 µg/mL и комбинациите на Н с маслата със същите концентрации, съответно.

Илюстрираният на Фигура 5 (Фигура 14 от дисертацията) АИ на Н, маслата от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. (10 µg/mL), показаха еднакви стойности и в трите случая – около 23% АИ. С увеличаване концентрацията на маслата се наблюдава дозозависимо нарастване на АИ, който бе максимален при 50 µg/mL (АИ на маслото от *R. alba* L. – 30%, а на другата роза 33,33%). При комбинацията нистатин + розово масло, АИ аналогично нарастваше с увеличаване концентрацията на маслото, като бе най-висок при комбинацията Н + масло 50 µg/mL, (*R. alba* L +Н 46,66% и *R. damascena* Mill. + Н 50%), което сравнено с АИ на чистите масла при тази концентрация е близо 1,5 пъти по-висок.



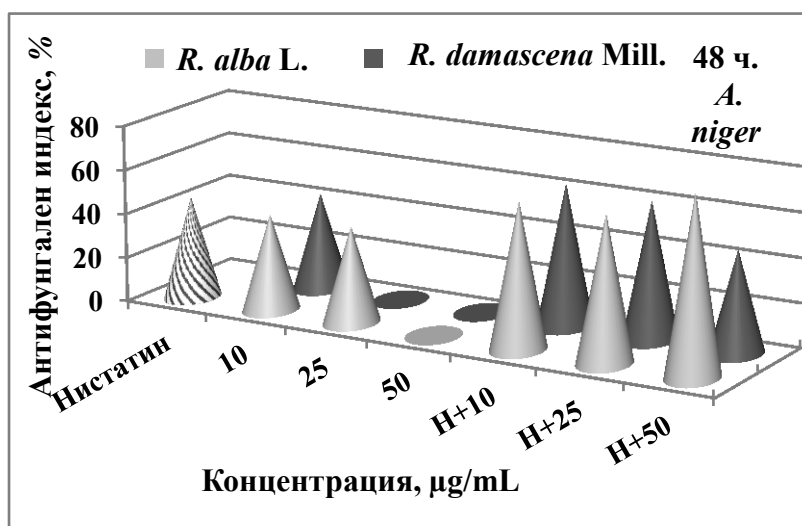
Фигура 5. Зависимост на антифунгалния индекс срещу *A. flavus* на 120^{тия} час от инокулирането от концентрацията на маслата от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill.

*Експерименталните условия са както описаните под Фигура 13.

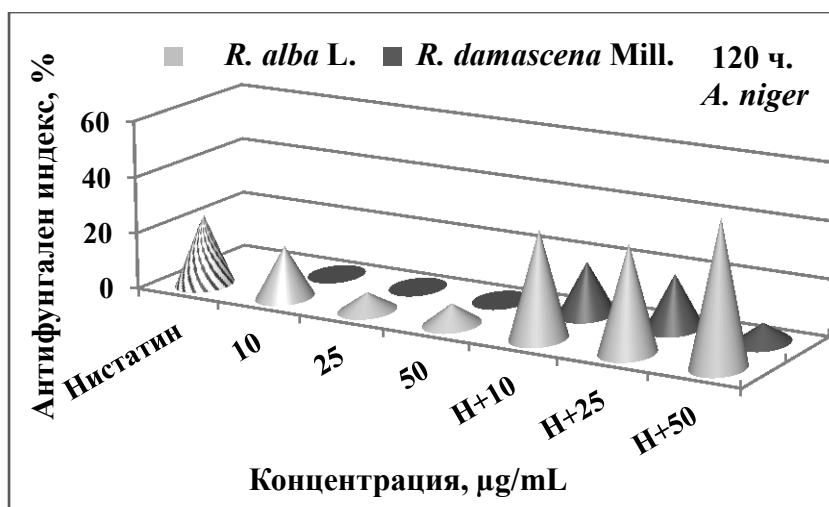
При ниските концентрации на маслата и съответните им комбинации с Н, АИ на 120 час от инкубирането на *A. flavus* (Фигура 5; Фигура 14 от дисертацията) е по-нисък в сравнение с този при същите концентрации на 48-мия час. При единичното третиране с масла при концентрация 50 µg/mL, АИ бе еднакъв за двете рози (55,56%) и беше почти двойно по-висок от този изчислен на 48-мия час от инкубирането, докато при комбинацията им с Н, АИ е 55,56% за Н + масло от *R. alba* L. и 66, 67% за комбинацията Н + масло от *R. damascena* Mill.

Сравнителното изследване на АИ на маслата (50 µg/mL) от двете рози в комбинацията им с Н срещу *A. flavus* при 120 час на инкубиране, показва предимството на червената роза, с изразен ефект - потиска радиалния растеж на колонииите с 11% по-ефективно.

Активностите на маслата и нистатин, изразена чрез определяне на АИ индивидуално и в комбинация срещу *A. niger*, са изобразени на Фигура 5 (Фигура 17 от дисертацията). На 48-мия час от култивирането, а на 120-тия час на Фигура 6 (Фигура 18 от дисертацията). При прилагането на Н, на 48 час АИ е 45,45%, а на 120 час - 25%. Концентрационна зависимост на АИ се наблюдава на 48-мия и на 120-тия час след прилагането на комбинацията Н с масло от *R. alba* L. Най-висока стойност на АИ беше получена при концентрация на маслото 50 µg/mL - 79,54% за 48-мия час, като при 120-тия час ефектът беше значително по-нисък - 50,14%.



Фигура 6. Зависимост на антифунгалния индекс срещу *A. niger* на 48-мия час от инокулирането от концентрацията на маслата от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill.



Фигура 7. Зависимост на антифунгалния индекс срещу *A. niger* на 120-тия час от инкубирането от концентрацията на маслата от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill.

Резултатите, представени като АИ показват, че и двете етерични масла имат ефект срещу изследваните микроорганизми в диапазон на концентрация от 25 - 50 $\mu\text{g/mL}$. Срещу *A. fumigatus* и при двете времена на отчитане на радиалния растеж бе наблюдаван по-голям ефект между Н и маслата: за *R. alba* L. при концентрация 25 $\mu\text{g/mL}$ и *R. damascena* Mill. с концентрация 50 $\mu\text{g/mL}$. Радиалният растеж на *A. flavus* и *A. niger* беше инхибиран от комбинациите на маслата от *R. damascena* Mill. + Н и *R. alba* L. + Н., което показва ясно изразен антифунгален ефект.

Моделиране на комбинирания ефект на масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. индивидуално и в комбинация с нистатин върху вида *Aspergillus flavus*

За оценка на инхибиращите ефекти на етеричните масла от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. самостоятелно и в комбинация с нистатин беше адаптиран специфичен алгоритъм. Експерименталните резултати от инхибиране развитието на *A. flavus*, обработени по математическия модел, заедно с изчислените комбинационни индекси са показани в Таблица 5 (Таблица 11 от дисертацията).

Таблица 5. Количествена оценка на инхибиращите ефекти на комбинациите между нистатин и масло от *Rosa alba* L. или *Rosa damascena* Mill. (в неконстантно съотношение) върху радиалния растеж на вида *A. flavus*.

<i>Rosa alba</i> L. - 10, 25, 50 µg/mL		
Самостоятелно приложение	Комбинация с 50 µg/ml nystatin	Комбинационен индекс
<p><i>A. flavus-Rosa alba L. oil; 120 h</i> —Model ◆Exp.Data</p>	<p><i>A. flavus-Rosa alba L. oil + 50N</i> —Model ◆Exp.Data ■Exp.Data</p>	<p><i>Plot-CI-Rosa alba L. oil + 50Nystatin</i></p>
<p>IC₅₀ = 56.26 µg/mL m = 1.328 R = 0.989</p>	<p>IC₅₀ (Combo) = 102.675 µg/mL m (Combo) = 4.81 R (Combo) = 0.998</p>	<p>CI (Combo 10+50) = 1.0 CI (Combo 25+50) = 1.1 CI (Combo 50+50) = 1.22</p>
<i>Rosa damascena</i> Mill. - 10, 25, 50 µg/mL		
Самостоятелно приложение	Комбинация с 50 µg/ml nystatin	Комбинационен индекс
<p><i>A. flavus-Rosa dam oil; 120 h</i> —Model ◆Exp.Data</p>	<p><i>A. flavus-Rosa dam oil + 50N</i> —Model ◆Exp.Data ■Exp.Data</p>	<p><i>Plot-CI-A. flavus-Rosa dam oil + 50N</i></p>
<p>IC₅₀ = 105.64 µg/mL m = 1.15 R = 0.954</p>	<p>IC₅₀ (Combo) = 90.675 µg/mL m (Combo) = 4.8 R (Combo) = 0.999</p>	<p>CI (Combo 10+50) = 0.47 CI (Combo 25+50) = 0.52 CI (Combo 50+50) = 0.58</p>

Легенда: IC₅₀ = инхибиторна концентрация, която намалява радиуса на *A. flavus* с 50%; m = наклон на кривата; R = корелационен коефициент, отразяващ корелацията между експерименталните данни и тези на избрания модел на инхибиране; Combo = комбинация между съответното розово масло и нистатин; CI = комбинационен индекс.

Изчислените CI на комбинациите на нистатин и масло от *Rosa alba* L. в неконстантни отношения са:

$$CI (\text{Combo } 10+50) = 1,0$$

$$CI (\text{Combo } 25+50) = 1,1$$

$$CI (\text{Combo } 50+50) = 1,22$$

Изчислените комбинационни индекси на нистатин и масло от *R. damascena* Mill. при същия експериментален подход и условия са:

$$CI (\text{Combo } 10+50) = 0,47$$

$$CI (\text{Combo } 25+50) = 0,52$$

$$CI (\text{Combo } 50+50) = 0,58$$

Според теорията на Chou (2006), условно отразяващият ефекта комбинационен индекс (CI), показва че взаимодействието между нистатин и масло от *Rosa alba* L. е с адитивен ефект при инхибирането на радиалния растеж на *A. flavus* за време на култивиране 120 часа при концентрации на маслото в комбинацията 10 и 25 μL , а при 50 μL беше наблюдаван умерен антагонизъм.

Прилагайки теорията на Chou (2006), можем да заключим, че тази комбинация на нистатин и масло от *R. damascena* Mill., е със синергичен ефект от тяхното взаимодействие при инхибирането на радиалния растеж на *A. flavus* за време на култивиране 120 часа при всичките изпитвани концентрации на маслото в комбинацията с нистатин.

Антивирусен скрининг на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Изследван беше антивирусният ефект на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. и някои от техните съставки срещу coxsackievirus B1 (CVB1) от семейство *Picornaviridae*, респираторен синцитиален вирус (HRSV) от *Paramyxoviridae*, грипен вирус A/Aichi/68/H3N2 от *Orthomyxoviridae* и (BVDV) вирусна диария по говедата от семейство *Flaviviridae* и HSV-1 и HSV-2 от семейство *Herpesviridae*.

Изследване на индивидуалната цитотоксичност на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. спрямо клетъчните култури: Hep2, MDCK, ВТ и MDBK

Преди извършване на антивирусния скрининг на изследваните вещества, бяха определени техните CC_{50} спрямо използваните клетъчни култури. Тяхната цитотоксичност бе сравнена с тази на референтни антивирусни вещества.

Както се вижда от Таблица 6 (Таблица 12 от дисертацията), от тестваните екстракти, този на *Rosa alba* L. бе с най-ниска цитотоксичност срещу MDBK, Hep-2 и MDCK клетки (CC_{50} – 589 $\mu\text{g/mL}$; 498 $\mu\text{g/mL}$ и 342 $\mu\text{g/mL}$, съответно). Екстрактът от *Rosa damascena* Mill. показва най-ниска цитотоксичност срещу MDBK и ВТ клетки (CC_{50} – 564 $\mu\text{g/mL}$ и 367 $\mu\text{g/mL}$ съответно). Спрямо Hep-2 клетките, в които се репликират CVB1 и HRSV, от всички изпитвани вещества най-ниската цитотоксичност бе на масло от *Rosa alba* L., чиято CC_{50} беше 498 $\mu\text{g/mL}$, много по-голяма в сравнение с тази на маслото от *Rosa damascena* Mill. - CC_{50} -144 $\mu\text{g/mL}$, техните ingredienti и референтните антивирусни вещества - Oxoglaucine, Disoxaril и Ribavirin. Аналогични бяха наблюденията и при изследването цитотоксичността спрямо MDCK: масло от роза *Rosa alba* L. бе с най-ниска цитотоксичност, с CC_{50} - 342 $\mu\text{g/mL}$, а масло от *Rosa damascena* Mill. - CC_{50} - 188 $\mu\text{g/mL}$, а специфичният инхибитор на грипен вирус A/Aichi/68/H3N2, Remantadin бе с CC_{50} - 6,7 $\mu\text{g/mL}$, показва десетки пъти по-висока цитотоксичност от маслата и техните ingredienti. От всички изследвани вещества, маслото от червената роза показва най-ниска цитотоксичност спрямо ВТ клетките, с CC_{50} два пъти по-висока от тази на бялата роза (CC_{50} - 367 $\mu\text{g/mL}$; CC_{50} - 188 $\mu\text{g/mL}$).

Таблица 6. Цитотоксичност на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. спрямо следните типове клетки: Hep2, MDCK, ВТ и MDBK.

Етерични масла и осн. им компоненти	Цитотоксичност				
	CC ₅₀ (µg/mL)*				МТС (µg/mL)
	Hep2	MDCK	ВТ	MDBK	MDBK
Nerol	282	53	68	473	100
Citral	61,5	55	54	273	32
Eugenol	147	57	125	339	100
Citronellol	156	157	143	492	100
Methyleugenol	128	38	64	485	100
Geraniol	191	82	70	495	100
<i>Rosa alba</i> L.	498	342	188	589	320
<i>R. damascena</i> Mill.	144	188	367	564	нт
Oxoglaucine	18	нт	нт	нт	нт
Disoxaril	9	нт	нт	нт	нт
Ribavirin	13	нт	нт	нт	нт
Remantadin	Nt	6,7	нт	нт	нт
Acyclovir	нт	нт	нт	1963	нт

* По-висока стойност на CC₅₀ означава по-слаба токсичност. нт - не е тестван. МТС –максимална толерантна концентрация, при която веществото не уврежда монослоя.

Определяне на индивидуалния антивирусен ефект на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Антивирусният скрининг на етерични масла и техните основни съставки (Таблица 7; Таблица 13 от дисертацията) бе проведен, както следва: Hep-2 клетки бяха инфектирани с CVB1 и HRSV; MDCK клетки, бяха инфектирани с A/Aichi/68/H3N2 и ВТ клетки, инфектирани с BVDV, а MDBK клетки инфектирани с HSV-1 и HSV-2. Изследваните вещества бяха приложени в различните клетъчни култури според техните CC₅₀ (Таблица 6; Таблица 12 в дисертацията). Чистите

компоненти на двете розови масла, гераниол, нерол, цитронелол, евгенол и метилевгенол показаха много слаб антивирусен ефект активност срещу CVB1 (нерол, цитрал, евгенол, цитронелол и метилевгенол показват много слаб антивирусен ефект срещу CVB1 (SI =3,9; 1,6; 0,9; 1,0; 1,0 и 0,8 Съответно) (Таблица 7; Таблица 13 от дисертацията). Маслата не показаха активност срещу CVB1 и RSV, A/Aichi/68/H3N2 и BVDV.

Нерол, цитрал и евгенол показаха незначителен антивирусен ефект срещу HRSV (SI = 0,7; 1,0 и 1,0 съответно). Никое от изследваните чисти вещества и етерични масла не показа активност спрямо репликацията на A/Aichi/68/H3N2, BVDV, HSV-1, HSV-2. Антивирусните ефекти на изследваните вещества бяха сравнени със специфични инхибитори за всеки използван в скрининга вирус: Охоглаусине и Disoxaril - антипикорнавирусни съединения; Ribavirin - гуанозинов аналог, с антивирусна активност срещу респираторен синцитиален вирус; Remantadin - ефективен е срещу A/Aichi/68/H3N2 и Асусловир, който е специфичен инхибитор на репликацията на HSV-1 и HSV-2. При използвания протокол, маслата не показаха антивирусен ефект спрямо тестваните микроорганизми.

Таблица 7. Антивирусни активности на етеричните масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. и основните им компоненти.

ЕМ и основните им компоненти	CVB1		HRSV		Aichi H3N2		BVDV		HSV-1		HSV-2	
	IC ₅₀ *	SI*	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
Nerol	174,00	1,60	133,00	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-
Citral	65,60	0,90	90,00	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	135,00	1,00	145,00	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronellol	143,00	1,00	50,00	2,60	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyleugenol	145,00	0,80	28,50	2,40	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	48,00	3,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rosa alba</i> L.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. damascena</i> Mill.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxoglaucine	0,35	51,00	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт
Disoxaril	0,70	12,80	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт
Ribavirin	нт	нт	0,39	33,30	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт
Remantadin	нт	нт	нт	нт	0,04	176,30	нт	нт	нт	нт	нт	нт
Acyclovir	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	1,47	881,6	1,74	744,8

IC₅₀ - 50%, концентрацията на веществото, която инхибира 50 % от вирусната репликация в сравнение с контрола на вируса; SI - индекс на селективност, изчисляван от съотношението CC₅₀/IC₅₀; нт - не е тестван.

Изследване антихерпесната активност на масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. и основните им химически съставки при претретиране на клетки MDBK и последваща инфекция с HSV-1

Получените резултати показаха, че предварителната обработка на монослоевете MDBK с етеричните масла, води до протекция на клетките от HSV-1 (Таблица 8; Таблица 14 от дисертацията). Маслото от бялата роза показва, най-добър протективен ефект върху MDBK клетките при претретиране 90 мин. и 120 мин. ($\Delta\log$ 2,00 и за двете времена). Минимален протективен ефект ($\Delta\log$ 1,00) беше отчетен при претретиране от 15 мин., т.е. ефектът на маслото от *Rosa alba* L. показва зависимост от времето на претретиране, докато маслото от червената роза за всички времена показва един и същ ефект ($\Delta\log$ 1,50).

Таблица 8. Антихерпесна активност на масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. и основните им химически компоненти при претретиране на MDBK клетки с HSV-1.

Розово масло и основните му компоненти	$\Delta\log$					
	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
<i>Rosa alba</i> L.	1,00	1,50	1,75	1,75	2,00	2,00
<i>R. damascena</i> Mill.	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Nerol	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Citrol	0,75	0,75	1,00	1,00	1,25	1,25
Eugenol	0,50	0,50	0,75	0,75	1,00	1,00
Citronellol	0,50	0,50	0,50	0,75	0,75	0,10
Methyl isoeugenil	0,75	0,75	1,00	1,00	1,50	1,50
Geraniol	0,75	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00

*Способността на етеричните масла и техните основни компоненти да инхибират вирусната репликация е изразена като $\Delta\log$ s, в сравнение с вирусна контрола (нетретирани клетки).

Протективната активност на чистия компонент нерол ($\Delta\log$ 1,25) не се повлия от продължителността на претретирането на клетките, докато активността на цитрал ($\Delta\log$ 0,75 – 1,25), цитронелол и евгенол, които показаха идентична активност ($\Delta\log$ 0,50 – 1,00) и гераниол ($\Delta\log$ 0,75 – 1,00) зависеше от продължителността на въздействието върху MDBK клетките. Цитронелол и евгенол показаха най-слаба протекция

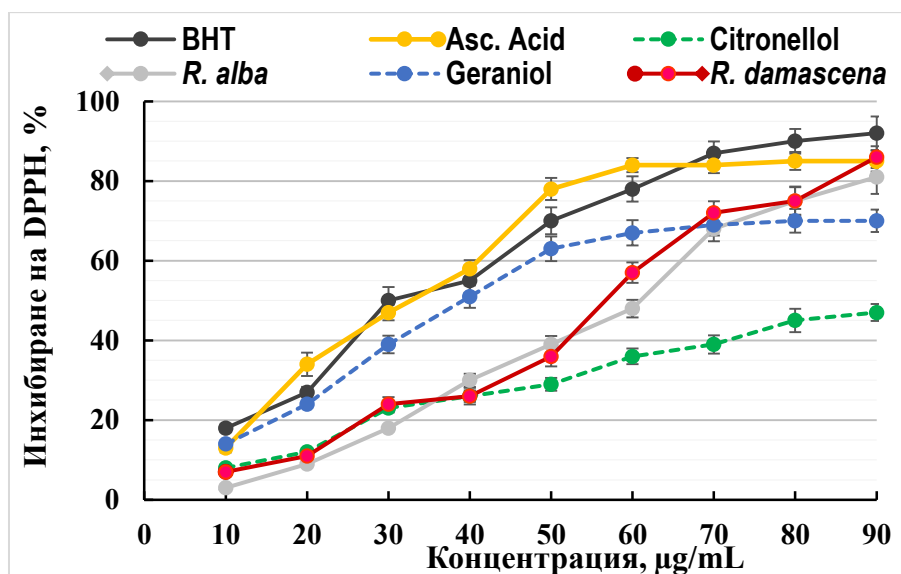
($\Delta\log$ 0,50 - 1,00), а метил изоевгенол ($\Delta\log$ 0,75 -1,50) показа силна зависимост от продължителността на претретиране и при най-дълготрайното въздействие активността му беше както на маслото от *Rosa damascena* Mill.

Маслото от *Rosa alba* L. показва значително по-силен ефект от маслото на *Rosa damascena* Mill.

Антиоксидантна активност на масло от *R. alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Редуциращ потенциал

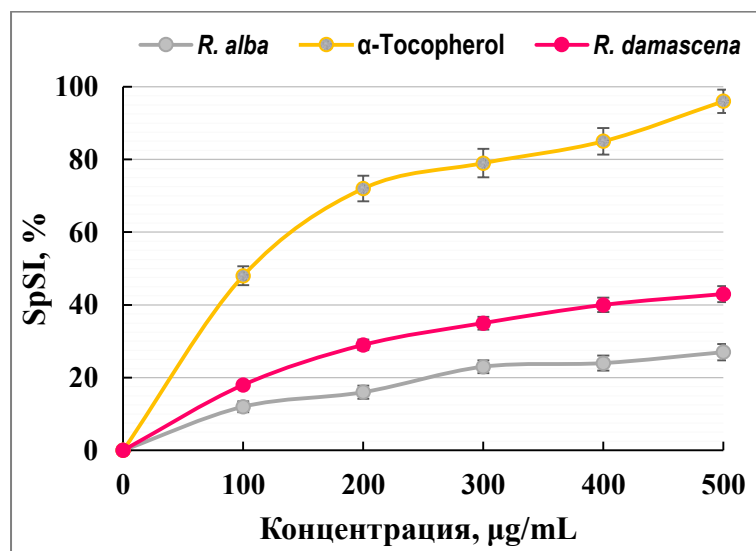
Способността да дотират Н към DPPH радикалите на етеричните масла заедно с цитронелол, гераниол и референтни антиоксиданти аскорбинова киселина и ВНТ в концентрационния диапазон 10-90 $\mu\text{g/mL}$ е изобразена на Фигура 8 (Фигура 19 от дисертацията). При най-високата тествана концентрация 90 $\mu\text{g/mL}$, ЕМ, показаха много добра способност да дотират Н към DPPH радикалите, което бе демонстрирано от намаляване абсорбцията при 517 nm, което за *R. alba* L беше 81% и *Rosa damascena* Mill, (86%). Гераниол и цитронелол показаха по-слаба редуцираща способност при тази концентрация (70% и 47%, съответно).



Фигура 8. Редуциращ потенциал на етеричните масла от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. в система на DPPH радикали.

Изследване супероксид скевинджър активност на маслата от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. в ксантин-ксантин оксидазна (ХО) моделната система за генериране на супероксиден анион радикал $\bullet\text{O}_2^-$

Етеричните масла при изследваните концентрации от 0 до 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ проявиха умерен антирадикалов ефект срещу генерираня в реакционната смес супероксид анион радикал (Фигура 9; Фигура 20 от дисертацията). В сравнение с липофилния антиоксидант токоферол, който при концентрация 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ показва спектрофотометричен скевинджър индекс (SpSI) 95%, при същата концентрация маслото от *Rosa damascena* Mill. показва два пъти по-ниска активност (SpSI 42%), а маслото от *Rosa alba* L. – близо три пъти (SpSI 26%). Сравнявайки двете масла, това от червената роза имаше двойно по-голяма супероксид анионрадикал скевинджър активност.

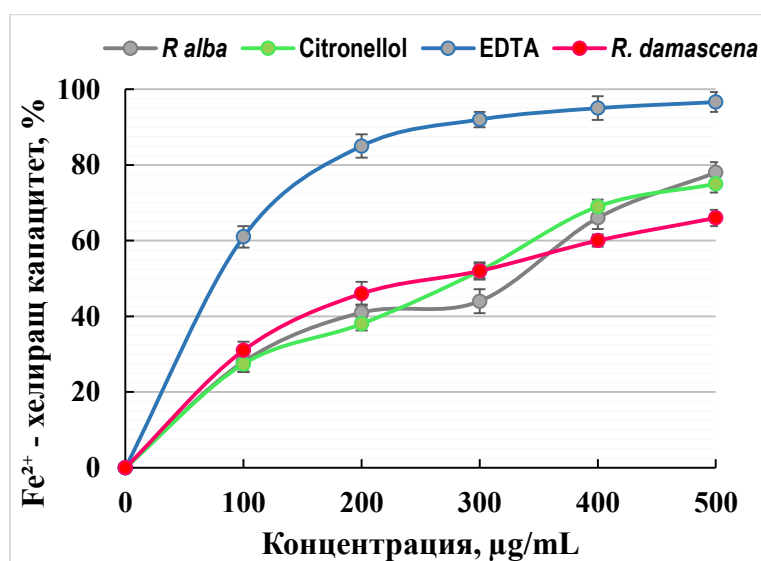


Фигура 9. Активност на етерично масло от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill като уловител на супероксид анион радикали, генерирани в ксантин-ксантиноксидазна система.

*Данните са представени като спектрофотометричен скевинджър индекс (SpSI,%) – изчислен по формулата: (SpSI) – изразен по формулата: $\text{SpSI, \%} = 100\% - (A_{560, \text{проба}}/A_{560, \text{контрол}}) \times 100$

Fe^{2+} хелиращ капацитет на етеричното масло *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Данните, представени от Фигура 10 (Фигура 21 от дисертацията) показват, че при най-високата тествана концентрация (500 $\mu\text{g/mL}$) маслото от *Rosa alba* L. имаше по-ефективна способност за свързване на желязо (78% хелиращ капацитет), следван от цитронелол (75%). Най-нисък Fe^{2+} хелиращ потенциал показва маслото от *Rosa damascena* Mill. (66%). Като положителна контрола е използван разтвор на ЕДТА.



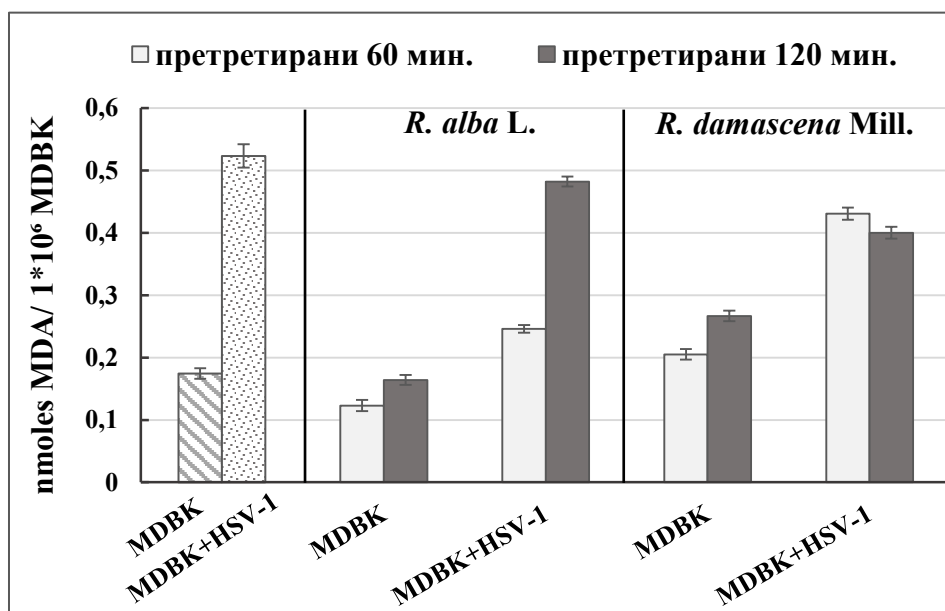
Фигура 10. Fe^{2+} хелиращ капацитет на етеричното масло *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Ефект на маслата върху антиоксидантния статус на MDBK клетки с експериментална HSV-1 инфекция

Ефект на ЕМ от R.alba L. и Rosa damascena Mill. върху спонтанна липидна пероксидация в MDBK клетки, инфектирани с експериментална HSV-1 инфекция

На Фигура 11 (Фигура 22 от дисертацията) е показан ефектът на маслата върху спонтанната ЛП в MDBK клетки, инфектирани с HSV-1. Претретирането на неинфектираните клетки с масло от *R. alba* L. за 60 мин. показва статистически достоверно слабо намаляване на ЛП в сравнение с чистата култура MDBK клетки. Неинфектирани MDBK клетки, претретирани с масло от *R. damascena* Mill. за същия период

показа недостоверно завишени стойности на MDA ($0,20 \pm 0,0085$ nmoles/ 10^6 клетки) спрямо нетретираниите клетки ($0,17 \pm 0,0083$ nmoles/ 10^6), докато претретиранието за 120 мин. доведе до статистически достоверно увеличение на ЛП ($0,27 \pm 0,0089$ nmoles MDA/ 10^6 клетки).



Фигура 11. Ефект на етеричните масла от *R. alba L.* и *R. damascena Mill.* върху спонтанната липидна пероксидация в MDBK клетки с експериментална HSV-1 инфекция.

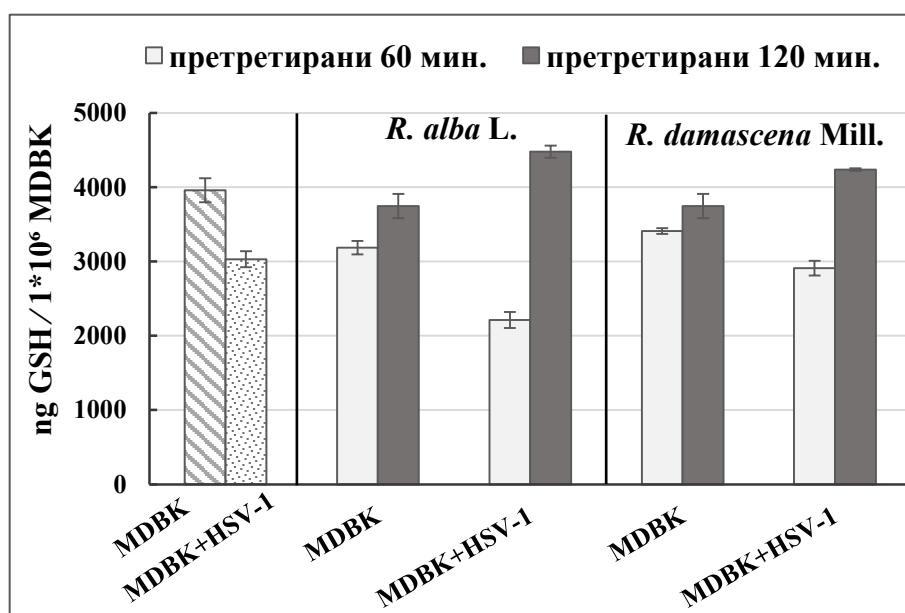
*Експерименталните групи са както следва: 1. MDBK клетки; 2. MDBK+HSV-1- инфектирани MDBK клетки с HSV-1, 3. MDBK (без вирус), преинкубирани 60 мин. или 120 мин. с етерично масло *R. alba L.* или *R. dam. Mill.*, 4. MDBK+HSV-1- инфектирани MDBK клетки, преинкубирани 60 мин. или 120 мин. с етерично масло с масло от *R. alba L.* или *R. damascena Mill.*

Преинкубирането на MDBK с маслата от двете рози за 60 или 120 мин. преди инокулирането с HSV-1, показва понижаване на ЛП в сравнение с инфектираните, но нетретирани клетки. Маслото от бялата роза показва по-голям ефект, по-силно изразен при 60 мин. преинкубиране, докато ефектът от претретиранието с масло от червената роза бе по-добре изразен при 120 мин. претретирание.

Ефект на етерично масло от Rosa alba L. и Rosa damascena Mill. върху нивото на тотален глутатион в MDBK клетки с експериментална HSV-1 инфекция

На Фигура 12 (Фигура 23 от дисертацията) е представен ефектът на етеричните масла върху концентрацията на общия GSH в MDBK

клетки с експериментална HSV-1 инфекция. Наблюдавано беше статистически достоверно намаляване на нивото на GSH в инфектираните клетки ($3029 \pm 107 \text{ ng}/1*10^6 \text{ MDBK}$ клетки) спрямо неинфектираните ($3958 \pm 162 \text{ ng}/1*10^6 \text{ MDBK}$ клетки). Прилагането на етеричните масла от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. доведе до възстановяване на нивата на GSH. Ефектът беше най-силно изразен при 120 мин. претретиране с етерично масло от *R. alba* L. ($4458 \pm 81 \text{ ng}/1*10^6 \text{ MDBK}$).



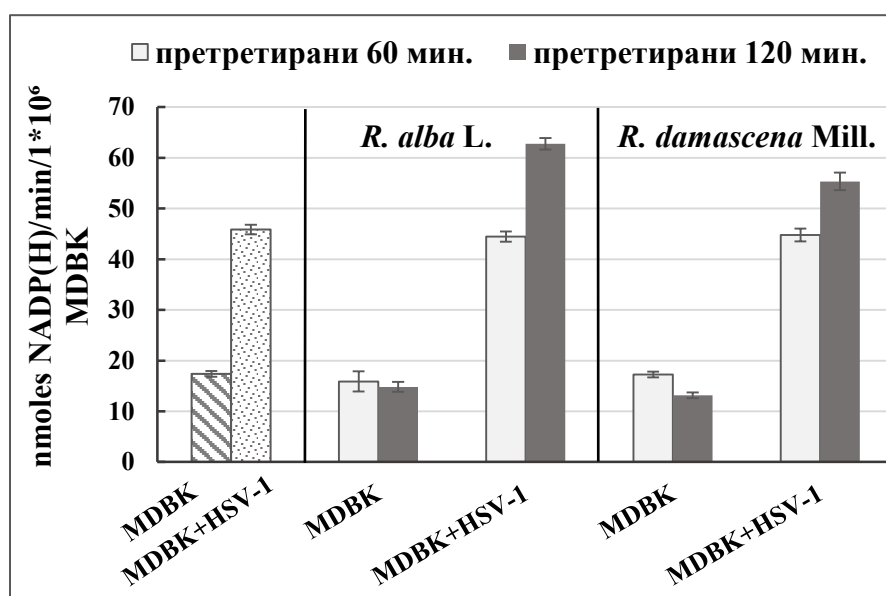
Фигура 12. Ефект на етеричното масло от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill върху нивото на общия глутатион в MDBK клетки с експериментална HSV-1 инфекция

* Експерименталните групи са както при Фигура 11. Нивото на GSH е изразено в ng съдържащ се в $1*10^6$ клетки

Ефект на етерично масло от R. alba L. и R. damascena Mill върху активността на глутатионпероксидаза в MDBK клетки с експериментална HSV-1 инфекция

Ефектът на етеричните масла върху активността на глутатионпероксидаза в MDBK, инфектирани с HSV-1, е показан на Фигура 13 (Фигура 24 от дисертацията). Инфектираните с HSV-1 клетки показаха статистически достоверна по-висока активност на ензима

(45,86 nmoles NADP(H)/1 min/1*10⁶ MBDK клетки) в сравнение с тази от неинфектираните MBDK клетки (17,38 nmoles NADP(H)/min/1*10⁶ MBDK клетки). Шестдесет минутното претретиране на клетките с маслата от двата вида рози нямаха ефект върху активността на GPx. При 120 мин. претретиране с маслата обаче, беше установено повишаване на активността на GPx в сравнение с тази на инфектираните клетки. Ефектът беше по-силно изразен при прилагане на маслото от *R. alba* L. (62,86 nmoles NADP(H)/1 мин./1*10⁶ MBDK клетки).



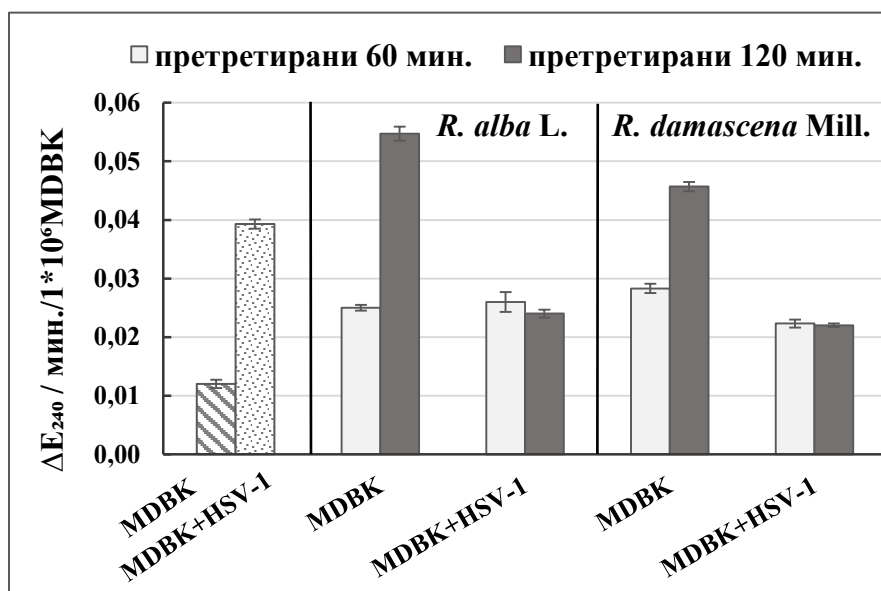
Фигура 24. Ефект на етерично масло от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. върху активността на глутатионпероксидаза в MBDK с експериментална HSV-1 инфекция.

* Експерименталните групи са както при Фигура 11.

Ефект на етеричните масла от Rosa alba L. и Rosa damascena Mill. върху активността на каталаза в MBDK, инфектирани с HSV-1

Клетките, инфектирани с HSV-1 показаха четирикратно повишаване на каталазната активност ($0,0393 \pm 0,0008 \cdot \Delta E_{240}/\text{min}/1 \cdot 10^6$ клетки) в сравнение с чистата клетъчна култура ($0,012 \pm 0,0007 \cdot \Delta E_{240}/\text{min}/1 \cdot 10^6$ клетки) (Фигура 14; Фигура 25 от дисертацията). При 60 и 120 минутно претретиране на заразени с HSV-1 клетки с масло

от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill., активността на каталаза намаляваше с 50% в сравнение с активността на заразени нетретирани клетки. Маслата от двете рози показаха еднакъв ефект върху ензимната активност, независимо от продължителността на претретирането.



Фигура 14. Ефект на етерично масло от *R. alba* L. и *R. damascena* M. върху активността на каталаза в MDBK клетки, инфектирани с HSV-1.

* Експерименталните групи са както при Фигура 11

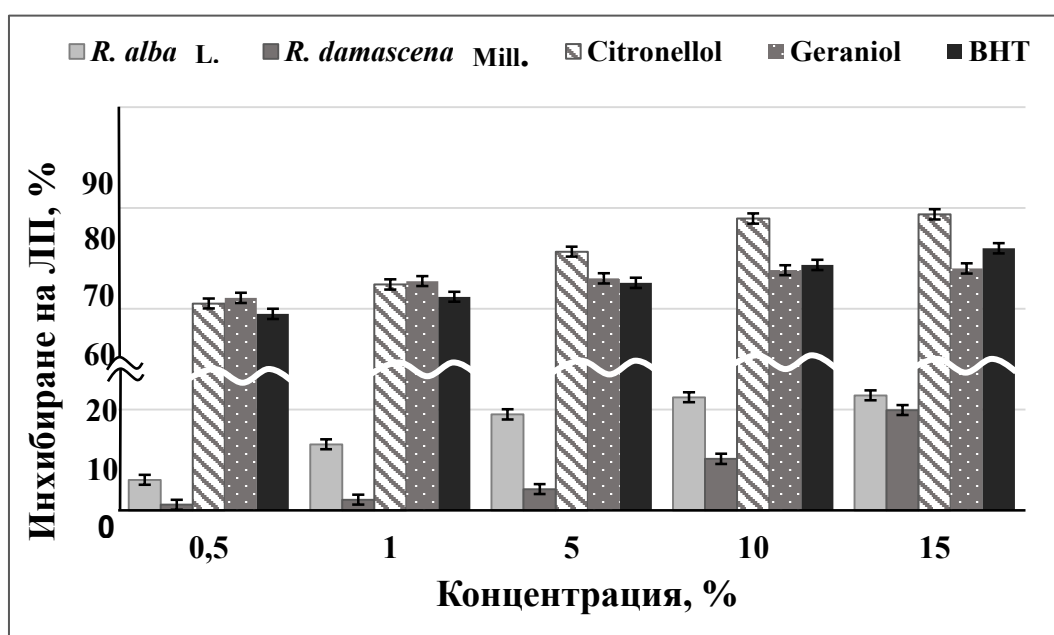
Ефектът на маслата върху незаразени MDBK клетки бе изразен в повишаване на каталазната активност. Тенденцията беше по-силно изразена при 120 мин. претретиране, като за масло от *R. alba* L. бе $0,0547 \pm 0,0012 \Delta E_{240}/\text{мин}/1 \cdot 10^6$ клетки, а за червената роза бе $0,0457 \pm 0,0008 \Delta E_{240}/\text{мин.}/1 \cdot 10^6 \text{MDBK}$ клетки.

Претретирането на клетките с розови масла доведе до статистически значимо намаляване на каталазната активност в сравнение с активността на ензима в заразените с херпес вирус клетки. Ефектът на етеричните масла от двете рози върху този маркер на оксидативния стрес беше еднакъв и не зависеше от времето на претретиране.

Изследване на антиоксидантния капацитет на розова вода от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Изследване ефекта на розова вода от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. върху Fe²⁺/аскорбат индуцирана липидната пероксидация в яйчни липозоми

Антиоксидантният капацитет на хидрозоли от *Rosa alba* L. и *R. damascena* Mill. и основните им ингредиенти гераниол и цитронелол беше изследван в яйчни липозоми с индуцирана с Fe²⁺/аскорбинова киселина ЛП (Фигура 15; Фигура 26 от дисертацията).



Фигура 26. Сравнителен анализ на ефекта на розова вода от *Rosa alba* L. и *R. damascena* Mill. върху Fe²⁺/аскорбинова киселина - индуцираното окисление на яйчни липозоми

*Данните са представени като разликата между 100% (съответстваща на максимално окисление) и съотношението на екстинкцията на пробата с определена концентрация на розова вода/макрокомпонент спрямо контролата (не съдържаща розова вода), отчетено при 532 nm, изразено в проценти.

Резултатите показаха ясно изразена зависимост на инхибиране (образуването на ТВА-реагиращите продукти) от концентрацията на хидрозолите. Хидрозолът на червената роза инхибираше ЛП много по-слабо от този на бялата роза, приложени в концентрации от 0,5% до 10%. При концентрация на хидрозолите 15% стойностите на инхибиторния

потенциал на двата хидрозола се доближиха и достигнаха 22% за *Rosa alba* L. и 20% за *Rosa damascena* Mill.

За изясняване приноса на главните ингредиенти на хидрозолите за антиоксидантните им свойства, бяха тествани индивидуалните антиоксидантни активности на макрокомпонентите цитронелол и гераниол в същата моделна система. Веществата показаха повече от 70% инхибиране на ЛП дори и при най-ниските тествани концентрации (0,5%). В концентрации 0,5 и 1% цитронелол и гераниол показаха същите инхибиторни активности като референтния антиоксидант бутилхидрокситолуен (ВНТ). При концентрация 10%, цитронелол инхибираше индуцираната ЛП 88 %, което беше повече с 13% от този на гераниол и ВНТ.

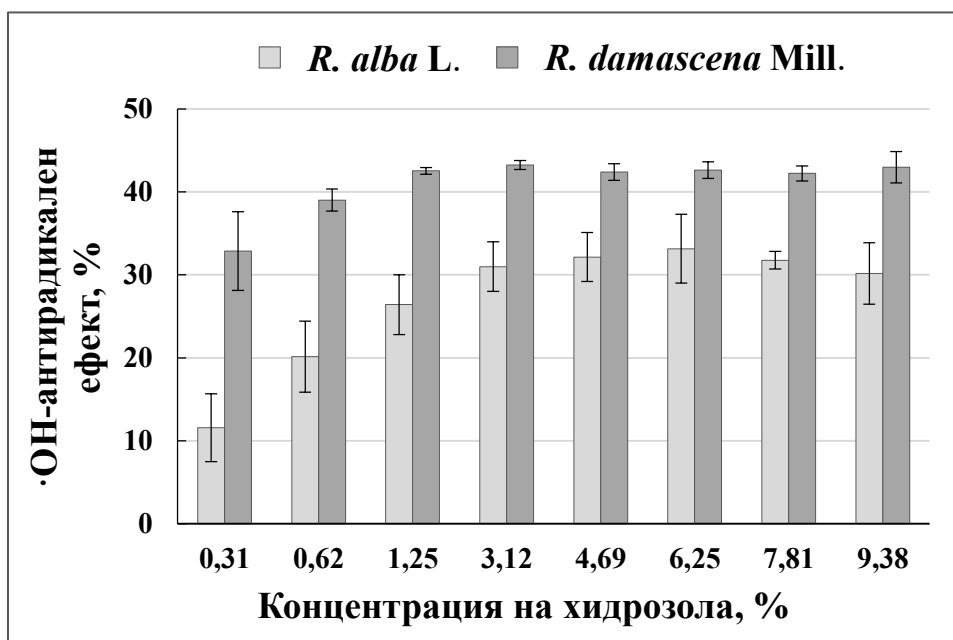
Антирадикалови свойства на розова вода от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill.

Въпреки че цитронелол и гераниол показваха много добри антиоксидантни свойства, биологичните ефекти на натуралните продукти с богат фитохимичен състав, са резултат от комбиниране на активностите на отделните им съставки. Следователно, за да се оцени правилно биологичния ефект на растителните екстракти, те трябва да бъдат тествани в тяхната естествена форма, а не отделните им компоненти.

Изследване на антирадикаловото действие на хидрозолите от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. в система, генерираща ·ОН радикали

Установен бе ясно изразен дозо-зависим анти хидроксил-радикалов ефект на хидрозола от *Rosa alba* L. в концентрация до 3,12%. Над тази концентрация, стойностите оставаха постоянни независимо от увеличаването на приложената концентрация (Фигура 16; Фигура 27 от дисертацията). Подобна картина бе наблюдаван и при хидрозола от *Rosa damascena* Mill.: при концентрация 1,25% се достигаше максимален

ефект, които не се променяше при по-високи концентрации. Хидрозолът от *Rosa damascena* Mill. показва по-добър ОН-скевинджър ефект от този на *Rosa alba* L. При най-ниската тествана концентрация (0,31%) ефектът на хидрозола от червената роза бе три пъти по-голям, при концентрация 0,62% и 1,25% - два пъти и в концентрации от 3,12% до 9,38%, около 12% по-висок от този на хидрозола от *Rosa alba* L.

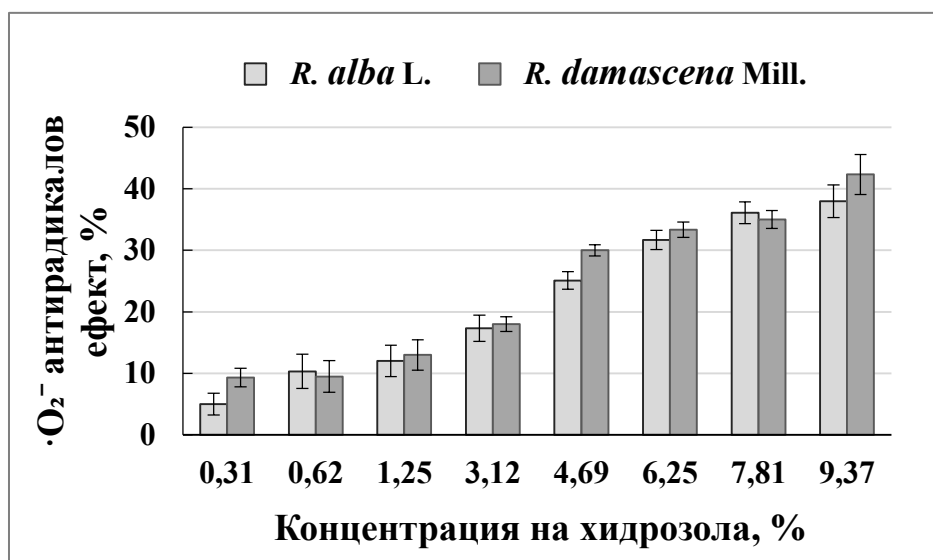


Фигура 16. Активност на хидрозоли от *Rosa alba* L. и *R. damascena* Mill. като ловители на хидроксилни радикали.

Изследване потенциала на розови води от Rosa alba L. и Rosa damascena Mill. като ловители на супероксид анион радикали генерирани в метионин/рибофлавинова система

На Фигура 17 (Фигура 28 от дисертацията) е показана активността на двата хидрозола в концентрации от 0,31% до 9,37% като ловители на супероксидни анион-радикали (O_2^-). Добре изразеният дозо-зависим ефект се наблюдава при концентрации от 0,62% до 4,69%. В концентрации над 6,25%, нарастването на скевинджър потенциала беше забавено. Нямаше статистически значими различия между стойностите

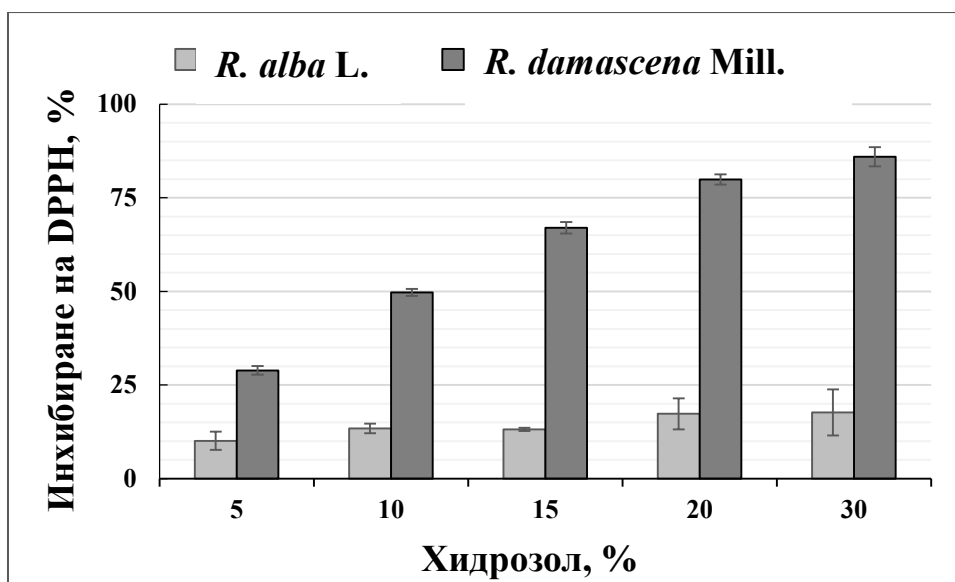
на $\cdot\text{O}_2^-$ антирадикаловото действие между двата хидрозола, следователно техният ефект е еднакъв.



Фигура 17. Активност на хидрозоли от *Rosa alba* L. и *R. damascena* Mill. като ловители на супероксидни анион-радикали генерирани в метионин/рибофлавинова система.

Изследване на DPPH антирадикаловото действие на розова вода от Rosa alba L. и Rosa damascena Mill.

Ефектът на хидрозоли от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. като донатори на Н за неутрализиране на DPPH-радикалите, са представени на Фигура 18 (Фигура 29 от дисертацията). Двата хидрозола бяха изследвани в концентрационен диапазон от 5% до 30%. Резултатите показват висок редуциращ потенциал на хидрозола от червената роза с максимална стойност 85,97% при концентрация на хидрозола 30%, а 50%-ен ефект бе постигнат при концентрация 10%. Увеличаването на концентрацията над 20% води до по-слабо нарастване на ефекта. Активността на хидрозола от бялата роза не показва значим редуциращ потенциал и не беше наблюдаван статистически достоверен дозозависим ефект в тестваните концентрации. При концентрация на хидрозола 20% радикал-редуциращият ефект беше 17,32%.



Фигура 18. Редуциращ потенциал на хидрозоли от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. в система от DPPH радикали.

ИЗВОДИ

1. Маслата от *R. alba* L. и *R. Damascena* Mill. имат еднакъв качествен, но различен количествен състав. Маслото от *R. damascena* Mill. е по-богато на съединения от класове НМ, OS, BC и OA (от 1,19% до 2,5%). Съединенията от класа SH са еднакво представени в двете масла. Монотерпените алкохоли гераниол и цитронелол в маслото от *R. alba* L са с 4% повече отколкото от в маслото от *R. damascena* Mill. Нерол е с еднакви относителни проценти в двете масла. Това е предпоставка за различие и в биологичните им активности.

2. Маслата от двете изследвани рози проявяват антибактериална активност:

- най-висока срещу Gram (+) *Streptococcus mutans*;
- десетократно по-ниска срещу Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*;
- слаба активност срещу Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и срещу Gram (-) *Salmonella abony*;
- най-слаба активност срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis*.

Маслото от *R. damascena* Mill. показва малко по-висока активност срещу последния щам.

3. Хидрозолите на двете изследвани рози инхибират бактериалния растеж само при високи концентрации. При концентрации над 50% потискат бактериалния растеж на *Staphylococcus epidermidis*, като хидрозолът от *R. damascena* Mill. беше двойно по-ефективен. Растежът на останалите бактериални видове се потискаше при концентрации на хидрозолите над 75%.

4. Маслата от *R. alba* L и *R. damascena* Mill подпомагат антифунгалното действие на нистатин срещу *Aspergillus flavus* и позволяват ефективното му прилагане в по-ниски дози. Комбинацията на нистатин и етерично масло от *R. damascena* Mill. проявява индикации

за синергичен ефект при въздействие върху радиалния растеж на *Aspergillus flavus* за време на култивиране 120 часа. За комбинацията на маслото от *R. alba* L. и нистатин може да се допусне слаб адитивен ефект.

5. Маслата на *R. alba* L и *R. damascena* Mill показват добра антиоксидантна активност. Маслото от *R. damascena* Mill. проявява по-добра радикал-улавяща активност срещу $\bullet\text{O}_2^-$. Маслата показаха малка разлика в редукционния им капацитет по отношение на DPPH със слаб превес на маслото от *R. damascena* Mill. Хидрозолът от *R. damascena* Mill. инхибира в по-висока степен от този на *R. alba* L. генерираните в химическа система хидроксидни радикали. Двата хидрозола в еднаква степен улавят супероксидните анион радикали.

6. Маслата от *R. alba* L. и *R. damascena* Mill. са със слаба активност срещу *Aspergillus niger*, *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* и *Alternaria*. Маслото от *R. damascena* Mill. прояви ниска активност и срещу *Aspergillus fumigatus*, а маслото от *R. alba* L. няма ефект срещу този микроорганизъм.

7. Хидрозолите от изследваните рози показват протективен ефект при състояния на оксидативен стрес, като хидрозолът от *R. alba* L. в сравнение с този от *Rosa damascena* Mill. по-ефективно предпазва липозомалните липиди от $\text{Fe}^{2+}/\text{asc}$ индуцирана пероксидация.

8. Хидрозолите на двете изследвани рози инхибират фунгиалния растеж при високи концентрации. При концентрации над 50%, потискат растежа на *Aspergillus niger*, *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* и *Alternaria*. Срещу *Aspergillus fumigatus* хидрозолите от двете рози нямат ефект.

9. Маслата на двете рози имат сравнително ниска цитотоксичност в сравнение със специфичните инхибитори на изследваните вируси, с изключение на ацикловир. Маслото от *R. alba* L. проявява по-ниска токсичност от това на *R. damascena* Mill. спрямо

Her2, MDCK и MDBK клетки. Спрямо ВТ клетки, маслото от *R. damascena* Mill. е с по-ниска цитотоксичност, в сравнение с маслото от *R. alba* L.

10. Предварителната обработка на монослоеве MDBK с етеричните масла води до протекция на клетките спрямо HSV-1. Маслото от *Rosa alba* L. показва значително по-силен ефект от маслото на *Rosa damascena* Mill.

11. Розовите масла повлияват положително състоянието на ОС, индуцирано от HSV-1 в MDBK клетки. Резултатите са отчетени чрез степента на нормализиране на маркерите за ОС (ЛП, GSH, CAT) до стойности близки до тези на контролните неинфектирани клетки след 60 минутна преинкубация. След 120 минутна преинкубация, ефектите и на двете масла отслабват.

12. Маслата нямат ефект върху вътреклетъчния репликативен цикъл на HSV-1 и HSV-2, CVB1, BVDV, грипен вирус A/Aichi/68/ H3N2 и HRSV. Гераниол и нерол проявяват слаб ефект срещу CVB1. Цитронелол и метилевгенол инхибират в слаба степен вътреклетъчния репликативен цикъл на HRSV.

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер:

1. За първи път е направен сравнителен фитохимичен анализ и са изследвани и сравнени биологичните активности на ароматичните продукти от българските *R. alba* L и *R. damascena* Mill.

2. За първи път е установено, че претретирането на MDBK клетките с масла от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. води до протекция на клетките от HSV-1, която е по-ефективна при масло от *Rosa alba* L. в сравнение с маслото от *Rosa damascena* Mill. За първи път е направена оценка на HSV-1 индуцираните промени в антиоксидантния статус на MDBK клетките и повлияването им от претретиране с маслата.

3. За първи път е проведено изследване на антивирусните ефекти на маслата и техни макрокомпоненти върху панел от вируси, причиняващи сериозни проблеми на човешкото здраве: HSV-1 и HSV-2, представители на сем. *Herpesviridae*; CVB1, представител на род *Enterovirus* на сем. *Picornaviridae*; BVDV и сурогатен хепатитен вирус С, представители на сем. *Flaviviridae*; грипен вирус A/Aichi/68/H3N2, представител на сем. *Orthomyxoviridae*; HRSV, представител на сем. *Paramyxoviridae*. Установено е, че маслата нямат ефект върху втреклетъчния репликативен цикъл на вирусите CVB1, HSV-1, HSV-2, HRSV, A/Aichi/68/H3N2 и BVDV. Гераниол слабо инхибира втреклетъчния репликативен цикъл на CVB1, а цитронелол и метилевгенол показаха слаб ефект срещу HRSV.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърден е хроматографският профил на ароматичните продукти от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill. розово масло, хидрозол и абсолю. Установено е подобие в химичния състав на AP от *Rosa alba* L. и *Rosa damascena* Mill., които са с еднакъв качествен състав, но с различни количествени съотношения.

2. Потвърдена е антибактериалната активност на маслата както следва: (i) най-голяма - срещу Gram (+) - *Streptococcus mutans*, еднаква за двете масла; (ii) десетократно по-ниска - срещу Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*; (iii) слаба активност - срещу Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, на Gram (-) *Salmonella abony*, без разлика в ефектите; (iv) най-слаба активност - срещу *Escherichia coli*, и *Staphylococcus epidermidis*, малко по-висока на маслото от *R. damascena* Mill. срещу последния щам.

3. Подтвърден е незначителният фунгистатичен ефект на маслата и хидрозолите срещу *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* и *Alternaria*. Маслото от *Rosa alba* L. не прояви ефект срещу *Aspergillus fumigatus*, а срещу останалите микроорганизми маслото от *Rosa damascena* Mill. е с по-добър ефект.

Научни трудове, свързани с дисертацията

1. Mileva, M., Nikolova, I., Nikolova, N., Mukova, L., **Georgieva, A.**, Dobрева, A., & Galabov, A. S. (2015). Investigation of antioxidant and antiviral properties of geraniol. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 31(1), 48-53. – 4,28 т.
2. **Georgieva, A.**, Vilhelmova, N., Muckova, L., Tzvetanova, E., Alexandrova, A., & Mileva, M. (2017). alterations in oxidative stress parameters in MDBK cells, infected by HERPES SIMPLEX VIRUS-1.m *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 70 (5). IF: 0,233. -10 т.
3. Jovtchev, G., Stankov, A., **Georgieva, A.**, Dobрева, A., Bakalova, R., Aoki, I., & Mileva, M. (2018). Cytotoxic and genotoxic potential of Bulgarian Rosa alba L. essential oil–in vitro model study. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 513-519. IF 1,227 – 8,57 т.
4. S. Gateva, G. Jovtchev, A. Stankov, **A. Georgieva**, A. Dobрева, M. Mileva. (2019). The potential of geraniol to reduce cytotoxic and genotoxic effects of MNNG in plant and human lymphocyte test-systems. *South African Journal of Botany*, 123, 170–179. IF: 1,504 – 10 т.

Цитирания

Статия:

Mileva, M., Nikolova, I., Nikolova, N., Mukova, L., **Georgieva, A.**, Dobрева, A., & Galabov, A. S. (2015). Investigation of antioxidant and antiviral properties of geraniol. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 31, 48-53.

Цитирана от:

1. Setzer, W. N. (2016). Essential oils as complementary and alternative medicines for the treatment of influenza. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(4), 16-22.
2. Karamalakova, Y. D., Adhikari, M. K., Kovacheva, N. D., Ivanov, V. A., Nikolova, G. D., & Gadjeva, V. G. (2018). Rose oil isolated from oil-bearing Rosa damascena Mill. as a protector against ionizing radiation-induced oxidative disorders. *Bulgarian Chemical Communications*, Special Issue C, 14 – 19.
3. Nasiri, Y., Zandi, H., & Morshedloo, M. R. (2018). Effect of Salicylic Acid and Ascorbic Acid on Essential oil Content and Composition of Dragonhead (L.) under Organic Farming. *TEOP*, 21(2), 362-373.
4. Dababneh, M. F., Protska, V. V., Kyslychenko, O. A., & Zhuravel,

I. O. (2016). The study of *Hosta lancifolia* rhizomes with roots, leaves and flowers volatile. *Der Pharma Chemica*, 8(20), 214-219 (<http://derpharmachemica.com/archive.html>).

Статия:

Jovtchev G., Stankov A., **Georgieva A.**, Dobрева A., Bakalova R., Aoki I., Mileva M. (2018). Cytotoxic and genotoxic potential of Bulgarian *Rosa alba* L. essential oil—in vitro model study *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32 (2), 513-519.

Цитирана от:

1. Safari, Moein, & Salman Ahmady-Asbchin. (2019). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of medlar (*Mespilus germanica* L.) leaves, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-7.

2. України, І. П. (2019). Оптимізація біотехнологічного процесу мікроклонального розмноження троянди ефіроолійної (*rosa damascena* mill.), http://nubip.edu.ua/sites/default/files/u145/dis_oliynik_0.pdf

3. Krajnc, E. (2019). Analiza eteričnih olj izbranih vrst rutičevk (Rutaceae), rožnic (Rosaceae) in lanikovk (Santalaceae) (Doctoral dissertation, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo), <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=107721>

Участия в научни форуми:

1. **Georgieva A.**, E. Tzvetanova, A. Alexandrova, A. Dobрева, M. Mileva. Comparative phytochemical analysis and pharmacological potential of aromatic products from Bulgarian *Rosa alba* L. and *Rosa damascena* Mill. 10-та Национална Научна Конференция на Българския Контактен Център на EFSA, Sofia, 2017. (Доклад)

2. **Georgieva A.**, E. Tzvetanova, A. Alexandrova, N. Vilhelmova and M. Mileva. Research of phytochemical composition, antioxidant and in vitro antiviral activity of essential oil and hydrosol from the bulgarian *Rosa alba* L. 15-та Националната конференция с международно участие „Природни науки”, Варна 2017. (Доклад)

3. **Georgieva A.**, N. Vilhelmova, L. Muckova, E. Tzvetanova, A. Alexandrova, M. Mileva. Oxidative stress parameters in MDBK cells, infected by Herpes Simplex Virus-1. Scientific conference with international participation, Dedicated to the 70th Anniversary of the Institute of Neurobiology “Neurosciences – from theory to the experiment”, Sofia, 2017. (Oral presentation in English)

4. **Georgieva A.**, E. Tzvetanova, G. Nenkova, A. Alexandrova, M. Mileva. Lipid peroxidation in liposomes. The tenth workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, IEMPAM, Sofia, 17-19 November 2015.

5. Mileva M., S. Gateva, G. Jovtchev, A. Stankov, **A. Georgieva**, A. Dobрева. Chemical compounds, antioxidant and genotoxic potential of Bulgarian *Rosa alba* L essential oil. *Microbiologia balkanica*, 2015, Thessaloniki.

6. Mileva M., J. Miteva-Staleva, E. Krumova, **A. Georgieva**, A. Dobрева, and A. S. Galabov. Overaditive antifungal activities of Bulgarian *Rosa alba* L. and *Rosa damascena* Mill. oils in combination with nystatin. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, ICNPU 2015, 14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria.

7. Mileva M., I. Nikolova, N. Nikolova, N. Vilhelmova, L. Mukova, **A. Georgieva**, A. Dobрева, I. Badjakov, I. Dincheva, and A. S. Galabov. Phytochemical and antiviral screening of essential oils from Bulgarian *Rosa alba* L. and *Rosa damascena* Mill. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, ICNPU 2015, 14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria.

8. Gerginova, D., **A. Georgieva**, M. Mileva, A. Dobрева, S. Simova, Comparative NMR Spectroscopy analysis of some plants essential oils belonging to *Rosaceae* family. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, ICNPU 2015, 14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria.

9. Mileva M., **A. Georgieva**, N. Vilhemova-Ilieva, I. Iliev, V. Kusovski, L. Mukova, D. Gerginova⁴, S. Simova, A. Dobрева. Chemical compounds and pharmacological potential of aromatic products from Bulgarian *Rosa alba* L. 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 9th CMAPSEEC, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria.

10. Mileva M., S. Gateva, G. Jovtchev, A. Stankov, **A. Georgieva**, A. Dobрева. Chemical compounds, antioxidant and genotoxic potential of Bulgarian *Rosa alba* L. essential oil. 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 9th CMAPSEEC, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria

11. Jovtchev G., A. Stankov, S. Gateva, **A. Georgieva**, A. Dobрева and M. Mileva. Does the essential oil from *Rosa alba* L. hide cytotoxic and genotoxic potential? XX International ECO-Conference 2016 – Safe Food, 28-30th September 2016, Novi Sad, Serbia.

12. Mileva M., S. Gateva, G. Jovtchev, A. Stankov, **A. Georgieva**, A. Dobрева. Chemical compounds, antioxidant and genotoxic potential of Bulgarian *Rosa alba* L. essential oil. 9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, 9th CMAPSEEC, 26-29 May 2016, Plovdiv, Bulgaria.

13. Mileva M., S. Gateva, G. Jovtchev, A. Stankov, **A. Georgieva**, A. Dobрева. Essential oil of *Rosa alba* L. as antioxidant with fine flavor, and low cytotoxic and genotoxic effect. 70-th Anniversary of The Stephan Angeloff Institute of Microbiology – BAS, 14-15 March 2017.

Участие в проекти по дисертационната тема:

Изследване на биологичните активности на екстракти от маслодайни рози (*Rosa alba* L., *Rosa damascena* Mill. и други продукти на „Комерг“ЕООД (2017 – 2018 г.)

Р-л на проекта доц. Милка Милева

СЪДЪРЖАНИЕ

<u>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....</u>	<u>5</u>
АРОМАТИЧНИ ПРОДУКТИ ОТ <i>ROSA ALBA L.</i> И <i>ROSA DAMASCENA MILL.</i>	5
ХИМИКАЛИ И РЕАГЕНТИ	5
КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ, ВИРУСНИ, БАКТЕРИАЛНИ И ГЪБИЧНИ ЩАМОВЕ.....	5
АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНОСТ	10
<u>РЕЗУЛТАТИ.....</u>	<u>11</u>
<u>ИЗВОДИ</u>	<u>42</u>
<u>ПРИНОСИ</u>	<u>44</u>
ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР:	44
ПРИНОСИ С ПОДТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:	45
<u>СЪДЪРЖАНИЕ</u>	<u>50</u>